



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DEL MÉTODO DE SECADO, TEMPERATURA Y pH  
SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NISINA  
PRODUCIDA POR *Lactococcus lactis* UQ2”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

**CARINA URIBE DÍAZ**

DIRIGIDA POR

**Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.

FACULTAD DE  
QUÍMICA



BIBLOTECA

No. Adq. 151078

No. Título \_\_\_\_\_

~~Clas.~~ 079.355

U76e

---



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DEL MÉTODO DE SECADO, TEMPERATURA Y pH  
SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NISINA  
PRODUCIDA POR *Lactococcus lactis* UQ2”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**CARINA URIBE DÍAZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**

**SINODALES**

**Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ** \_\_\_\_\_  
DIRECTOR

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ** \_\_\_\_\_  
SINODAL

**Dr. SILVIA AMAYA LLANO** \_\_\_\_\_  
SINODAL

**Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR** \_\_\_\_\_  
SINODAL

## *Dedicatoria:*

*Para la Mujer que me apoyó todos estos años,*

*por su infinito amor,*

*cariño, comprensión y apoyo*

*Por acompañarme en los buenos y malos momentos*

*y lograra que este momento llegara*

*Gracias Mamá*

## *Agradecimientos:*

*A Dios por haberme puesto en este camino y permitirme llegar a una de las metas.*

*A mi mamá Cony, por enseñarme la fortaleza que una mujer puede tener para lograr todo aquello que se proponga. Eres la mejor mamá que Dios pudo habernos dado.*

*A Benjamín, por todo el apoyo, comprensión y amor que me ha dado. Gracias por permitirme formar parte de tu vida y estar siempre a mi lado, en las buenas y en las malas.*

*A mis hermanos Cristina, Carlos y Gisela, por ser un ejemplo a seguir y hacer este camino más fácil y divertido. Los quiero mucho y siempre agradeceré a la vida que haya crecido con ustedes.*

*A mis Abuelitos que en algún momento han formado parte de este triunfo. Gracias por su apoyo y sabiduría. También a Francisco y Cachito porque ya son parte de nuestra hermosa familia.*

*A Adriana, Maguie, Paulina, Zaira, Marta y Paco porque más que mis amigos se convirtieron en mis hermanos, por su apoyo y buenos momentos en esta etapa de mi vida.*

*A la Dra. Blanca García y el Dr. Carlos Regalado porque confiaron en mí y me permitieron formar parte de este proyecto.*

*A mis sinodales Dra. Silvia Amaya y Dr. Ramiro Pacheco, por su valiosa aportación a este trabajo.*

*A la Universidad Autónoma de Querétaro por abrir sus puertas a personas con ganas de crecer y cambiar el mundo.*

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Bacteriocinas	3
II.2 Nisina	4
II.2.1 Propiedades físico-químicas	6
II.2.2 Estructura	7
II.2.3 Mecanismo de acción	9
II.2.4 Nisina como agente conservador de alimentos	10
II.3 Secado por aspersión	11
II.4 Liofilización	13
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS	17
IV.1 General	17
IV.2 Específicos	17
V. METODOLOGÍA	18
V.1 Materiales	18
V.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo	18
V.2 Métodos	18
V.2.1 Tratamiento de las muestras	18
V.2.2 Obtención del extracto celular	19
V.2.3 Secado de las muestras	19
V.2.4 Tratamientos con diferentes pH, temperatura y tiempo.	20

V.2.5 Determinación de la actividad de nisina	21
V.2.5.1 Activación de <i>Microocccus luteus</i>	21
V.2.5.2 Método de difusión en agar	22
V.2.6 Determinación de la actividad acuosa en polvos	23
V.2.7 Determinación de sólidos totales	24
VI. RESULTADOS	25
VI.1 Determinación de sólidos totales	25
VI.2 Parámetros físico químicos de la nisina	25
VI.3 Determinación de la actividad de nisina	26
VI.4 Análisis estadístico de los tratamiento a las muestras	27
VII. DISCUSIÓN	34
VIII. CONCLUSIONES	37
IX. BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	43

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de las bacteriocinas	4
2	Características generales de la nisina	7
3	Ventajas y desventajas del secado por aspersión	13
4	Ventajas y desventajas de la liofilización	15
5	Tratamientos a los que se sometieron las muestras según el diseño experimental 3 <sup>3</sup>	21
6	Determinación de sólidos totales	25
7	Determinación de parámetros de calidad	26
8	Rendimiento y recuperación de la cantidad inicial de nisina	26
9	Rendimiento y recuperación de la cantidad inicial de nisina total	27
10	Tratamientos a los que se sometió la nisina comercial	28
11	Tratamientos a los que se sometió la nisina de laboratorio	29
12	Análisis de varianza de tratamientos para nisina del laboratorio	31
13	Relación de temperatura y tiempo de tratamientos térmicos para alimentos procesados	32
14	Análisis de varianza de tratamientos para nisina comercial	32



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de la nisina	8
2	Modelo que muestra el mecanismo de acción dual de la nisina de <i>Lactococcus lactis</i>	9
3	Secado por aspersion	12
4	Secador Buchi Mini Spray Dryer B-191 (lado izquierdo) y Liofilizadora Labconco, Kansas City, E.U.A. (lado derecho)	19
5	Activación de <i>M. luteus</i>	22
6	Halos de inhibición de <i>M. luteus</i> , causados por la acción bactericida de la nisina presente en la muestra	23
7	Curva de calibración para obtener la concentración de nisina	43

## RESUMEN

La conservación de los alimentos se ha venido buscando desde tiempos remotos, desarrollándose diversos métodos y medios para este fin. Sin embargo, la importancia por el consumo de alimentos naturales ha ido en aumento a la par del desarrollo e incremento de nuevas enfermedades asociadas al uso de aditivos químicos. La nisina una bacteriocina producida por el microorganismo *Lactococcus lactis* es la más estudiada para su uso como conservador en alimentos. Diversos estudios se han enfocado en su producción mediante fermentación sumergida usando diferentes medios de cultivo alternativos. Sin embargo, su mayor estabilidad a largo plazo, se obtiene en polvo. Por otro lado, varios estudios han demostrado que la estabilidad de la nisina aumenta cuando se usa en soluciones ácidas y es resistente a altas temperaturas dándole así propiedades importantes para su uso en alimentos procesados. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el método de secado y el efecto de la temperatura y el pH en las propiedades y estabilidad de la actividad antimicrobiana de nisina obtenida por la cepa nativa *Lactococcus lactis* UQ2. Los métodos de secado evaluados fueron por aspersion y liofilización. La actividad de las suspensiones se evaluó en soluciones a diferentes temperaturas: 62°C, 100°C y 121°C y tiempos: 5, 10 y 15 minutos en valores de pH de 2, 5 y 7. Se logró obtener nisina en polvo a partir de la fermentación del *Lactococcus* UQ2 en medio de cultivo con suero de leche por dos métodos, logrando un 7.9% de recuperación de la actividad de nisina. La nisina deshidratada obtuvo un máximo de actividad de 2,229 UI/g y 1,813 UI/g para el secado por aspersion y el secado por liofilización respectivamente. Se observó que la nisina es más estable, soluble y se tiene menos pérdida de actividad cuando está en un pH más ácido, a temperaturas y tiempos más bajos.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde inicios de la humanidad la conservación de los alimentos ha sido un fin buscado para lograr mantener un reservorio de éstos, desde tiempos remotos se han desarrollado diferentes métodos de conservación como el salado, el ahumado, la congelación, entre otros; y en épocas recientes la utilización de compuestos químicos y procesos físicos, entre otros. Sin embargo, en la actualidad la preocupación por adquirir productos naturales ha ido en aumento, aunado a la correlación entre el uso de aditivos químicos con enfermedades crónico-degenerativas. Es así como el descubrimiento y desarrollo de sustancias naturales como conservadores alimenticios ha ido en incremento.

Una de las alternativas de conservación de alimentos más recientes, es el uso de las bacteriocinas, péptidos o complejos peptídicos sintetizados ribosomalmente con actividad bactericida o bacteriostática en contra de especies bacterianas estrechamente relacionadas con la cepa productora.

Dentro de las bacteriocinas más estudiadas, se encuentra la nisina que es sintetizada y secretada por un microorganismo lácteo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Esta bacteriocina es utilizada como conservador de alimentos y es la única reconocida por la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA, EUA), con la categoría de Generalmente Reconocido como Seguro ("Generally Recognized As Safe" GRAS).

La nisina se produce en forma natural en algunos productos lácteos y además se usa como aditivo en industrias lácteas para prevenir el deterioro por bacterias Gram positivas, las que incluye *Streptococos*, *Lactococos*, *Lactobacilos*, *Leuconostoc*, *Pediococos*, siendo también efectiva en contra de esporas de *Clostridium* y *Bacillus*.

En el laboratorio de Biotecnología de Alimentos se han producido diferentes fermentaciones utilizando *Lactococcus lactis* UQ2 y diferentes medios de cultivo como el suero de leche para la producción de nisina, obteniéndose muestras en estado sólido sobre las cuales se mide la actividad antimicrobiana de la nisina producida.

Las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas (BAL) se caracterizan por presentar una serie de propiedades comunes, tales como la sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas, su tolerancia térmica, estabilidad a bajo pH y la acción antibacteriana. El efecto de distintos factores físico-químicos sobre la actividad de una bacteriocina no sólo tiene el fin de caracterizarla, sino también sirve para inferir su posible aplicación industrial, ya que las altas temperaturas y las amplias variaciones de pH son, entre otras, algunas de las condiciones que debe resistir una bacteriocina para ser útil como potencial agente inhibidor de microorganismos no deseados en procesos alimenticios tales como fermentaciones de leche, maduración de quesos, curado de encurtidos.

Para aumentar la estabilidad de la nisina es necesario además disminuir a un mínimo la actividad de agua, esto a través de métodos de secado, como el secado por aspersión y la liofilización.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el método de secado y el efecto de la temperatura a diferentes valores de pH en las propiedades y estabilidad de la actividad antimicrobiana de nisina en polvo obtenida de la fermentación de *Lactococcus lactis* UQ2, una cepa aislada de un queso mexicano en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro utilizando como medio de cultivo suero de leche, con el fin de obtener una materia prima con valor agregado aplicable en la industria alimenticia.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Bacteriocinas

Tradicionalmente se considera a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablon y col., 2000).

Estas moléculas han sido utilizadas como una importante herramienta en estudios evolutivos y ecológicos. Sin embargo, con el desarrollo comercial exitoso de la bacteriocina nisina (producida por *Lactococcus lactis*) y el uso de las herramientas de la biología molecular e ingeniería genética, en años recientes ha habido un resurgimiento importante en el estudio de las bacteriocinas, particularmente en sus aplicaciones biomédicas potenciales y en la bioconservación de los alimentos (Cotter y col., 2005).

Las bacteriocinas son péptidos de secreción, las cuales pueden ser transportadas al exterior de la célula por proteínas del sistema ABC (ATP binding cassette) que usan ATP como energía, o por un sistema de secreción general (sistema *sec*-dependiente) (Garneau y col., 2002). La clasificación de las bacteriocinas ha sido reportada según sus características genéticas y bioquímicas (Nes y col. 2007). Cotter y col., (2005) propusieron recientemente una clasificación (Cuadro 1), en donde los lantibióticos quedan agrupados en la clase I y las bacteriocinas carentes de lantionina se agrupan en la clase II. Un tercer grupo de bacteriocinas corresponde a aquellas que son termolábiles y de elevada masa molecular, con actividad hidrolítica, denominadas bacteriolisinas. Estos autores no incluyen a las bacteriocinas de la Clase IV porque no se ha demostrado fehacientemente su existencia. Heng y Tagg (2006) propusieron una nueva clasificación de bacteriocinas, en la que respetan la agrupación de Cotter y col. (2005) con respecto

a la clase I y II, pero a la clase III la dividen en dos tipos: IIIa bacteriolíticas y IIIb no líticas, y la clase IIc ahora agrupada como la clase IV para péptidos cíclicos.

Cuadro 1. Clasificación de las bacteriocinas según Cotter y col., 2005

Clasificación*	Comentarios sobre la clasificación	Ejemplos
Clase I Contiene lantionina Bacteriocinas/lantibióticos	Incluye de uno a dos péptidos lantibióticos. 11 subclases han sido propuestas	Un único péptido: nisina, mersacidina, lacticina 481. Dos péptidos: lacticina 3147, citolisina
Clase II	Clase heterogénea de péptidos pequeños IIa: tipo pediocina IIb: dos péptidos IIc: cíclicas, formalmente clase V IId: péptido lineal no tipo pediocina	Clase IIa: pediocina PA, Leucocina A Clase IIb: lacticina F Clase IIc: enterocina AS48, reuterina 6 Clase IId: lactococina A, divergicina A.
Bacteriolisinas Proteínas no bacteriolíticas **		Proteínas grandes, termolábiles, muchas veces hidrolasas.

\* Bacteriocinas clase IV sin fracción proteica no son incluidas porque aún no han sido demostradas.

\*\* Sugiere que estas no han logrado ser consideradas como bacteriocinas.

Algunas bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas tal como la nisina, inhiben no solamente a bacterias genéricamente muy relacionadas, sino también a patógenos de alimentos como *Listeria monocytogenes* (causante de la listeriosis que produce fiebre, diarrea, dolor de cabeza, dolor en el cuello, pérdida de equilibrio) o de bacterias que esporulan como *Clostridium*. Debido a esto, el interés por usar las bacteriocinas como un arsenal de conservadores naturales en alimentos se ha incrementado en los últimos años (O' Sullivan y col., 2002).

## II.2 Nisina

La nisina fue descubierta en 1933 pero no fue hasta 1971 donde se reveló su estructura molecular. En el año de 1953 en Inglaterra se convierte en la primera bacteriocina comercializada y desde entonces ha sido aprobada en más de 80

países para ser utilizada en alimentos. La nisina fue aceptada en 1969 por la Organización Mundial de la Salud ("World Health Organization" OMS) como un aditivo para alimentos. En 1988 fue aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, EUA). Hasta ahora la nisina es la única bacteriocina purificada disponible comercialmente (Murillo, 2008).

La bacteriocina nisina es producida de modo natural por cepas de *Lactococcus lactis*. Está compuesta por 34 aminoácidos; su masa molecular es de aproximadamente 3.5 kDa, y su punto isoeléctrico es de 10.1. De acuerdo con la clasificación de Cotter y col. (2005), la nisina es una bacteriocina de la clase I. Contiene cinco anillos dentro de su estructura los cuales le dan su característica lantibiótica. Existen dos variantes de nisina, A y Z, cuya actividad antimicrobiana es muy semejante, estructuralmente sólo varían en algunos aminoácidos (Zendo y col., 2003).

La nisina es el prototipo de un grupo de bacteriocinas denominadas lantibióticos, moléculas que poseen en general un espectro antimicrobiano mayor que el del resto de las bacteriocinas, siendo así más importantes para el control de microorganismos patógenos (Suárez, 2004). La actividad de la nisina se mide en Unidades Reading (UR) o Unidades Internacionales (UI), que corresponde a la actividad lítica sobre un microorganismo específico de la nisina comercial británica y está basada en la actividad antimicrobiana de 1 µg de un lote estándar de nisina comercial. La actividad aproximada de 1 µg de nisina pura es de 40 UI. La nisina seca se conserva durante años, pero en solución depende del pH y es mejor cuando menor sea. Comercialmente se presenta en forma de preparados estandarizados a  $1 \times 10^6$  UR con un 2.5% de sustancia pura. Las suspensiones del mismo se enturbian con facilidad por el contenido de proteína láctea (Cubero y col., 2002).

### II.2.1 Propiedades fisicoquímicas

La nisina es una molécula catiónica debido a la combinación de tres residuos de lisina y uno de histidina (dependiendo de la variante de nisina) junto con la ausencia de glutamato y aspartato. Los grupos de cadena lateral de histidina tienen un pKa de 6.5, y las de lisina de 10.0; esto hace que la carga neta de la nisina dependa del pH. La nisina es más soluble a pH ácido, y se hace menos soluble conforme se acerca a la neutralidad. La nisina es insoluble en solventes no polares (Davidson y col., 2005).

Los concentrados de nisina se mantienen estables por largos períodos si se mantienen secos, en la oscuridad y a temperaturas no superiores a 25°C. Estudios demuestran que a pH 3.0, se pierde menos del 5% de actividad, después de un tratamiento térmico de 115 °C durante 20 minutos; a valores de pH por encima y por debajo de este hay una marcada disminución de la actividad: 28.5% de pérdida a pH 2 y el 21.4% de pérdida a pH 4. Conforme se acercan los valores de pH a la neutralidad se observan mayores pérdidas de actividad. A pH alto, se ha sugerido que los residuos de deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb) se vuelven más susceptibles a modificaciones debido a la presencia de nucleófilos, disminuyendo así la estabilidad y la solubilidad de la molécula (Liu y Hansen, 1990).

En términos prácticos, la nisina suele estar protegida por los demás ingredientes alimentarios y no será dañada su actividad por procesos como la pasteurización o la esterilización. Esto se ilustra mediante la utilización satisfactoria de la nisina en productos con valores de pH altos y sometidos a tratamientos térmicos como conservas vegetales.

Algunas de las características generales de la nisina incluidas las propiedades y las aplicaciones se muestran en el Cuadro 2.



Cuadro 2. Características generales de la nisina

Característica	Descripción
Organismos que la producen	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Biosíntesis	Modificación enzimática post-traducciona
Variantes	Nisina A, Nisina Z
Peso molecular	3353 Daltons (por monómero)
Estructura	34 péptido de aminoácidos. Contiene aminoácidos como: lantionina, $\beta$ metil lantionina, y deshidroserina y deshidrotreonina.
Propiedades	Catiónica con una carga positiva de 3 (2 de la nisina Z). Anfífilas: hidrofóbica en el N-terminal e hidrofílica en la C-terminal
Solubilidad	56 mg/ml a pH 2.2; 3 mg/ml a pH 5; 1 mg/ml a pH 11
Estabilidad	Óptima a pH 3
Actividad	Bactericida y bacteriostática contra una amplia gama de bacterias Gram positivas. Inhibidora de esporas de bacterias gram positivas..
Métodos de aplicación	En solución o como polvo, mezclado con los alimentos, a menudo se usa en combinación con tratamientos térmicos.
Principales aplicaciones	Jugos pasteurizados, carne y productos cárnicos, productos de pescado, fórmulas infantiles rehidratadas, etc.

(Davidson y col., 2005)

### II.2.2 Estructura

Los lantibióticos constituyen una única familia de péptidos de los cuales el precursor es sintetizado ribosomalmente seguido por modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones incluyen la introducción de estructuras insaturadas poco comunes como deshidroalanina, deshidrobutirina y la formación del típico enlace tioéster intracelular llamado lantionina. Dichas estructuras están formadas de un derivado de cisteína, de un grupo sulfhidrilo para el doble enlace y

de un residuo deshidratado, dando origen a las características policíclicas estructurales propias de los lantibióticos (García, 2009).

En la Figura 1 se muestra la representación esquemática de la estructura de la nisina. Los residuos que se muestran en gris son serinas y treoninas. Ala-S-Ala, Ala-S-Abu son lantioninas, los residuos que participan en la formación de los cinco anillos lantionina, se muestran en negro (Hasper y col., 2004). Para poder formarse esta estructura, la nisina sufre modificaciones postraduccionales, las modificaciones postraduccionales que se le realizan son diversas, las más importantes involucran reacciones de deshidratación de residuos de serina y treonina, lo que da lugar a la formación de dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb), respectivamente. La reacción de estos aminoácidos con el grupo tiol (SH) de un residuo de cisteína, genera un enlace tioéter generando lantionina (en el caso de Dha) y β-metil-lantionina (en el caso de Dhb). La formación de estos enlaces dentro del péptido genera una serie de estructuras “globulares” que son características de los lantibióticos. La integridad del anillo es esencial para la actividad antimicrobiana (Cotter, y col. 2005).

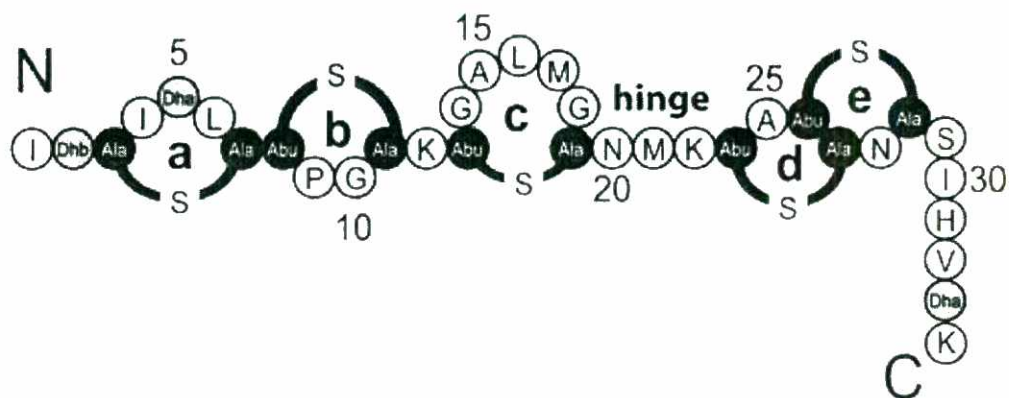


Figura 1. Estructura de la nisina (Hasper y col., 2004)

La N-terminal contiene una alta proporción de residuos hidrofóbicos y la C-terminal es más hidrófilo, por lo que en solución la nisina adopta una estructura flexible. (Davidson y col., 2005).

### II.2.3 Mecanismo de Acción

El modelo más aceptado que muestra el mecanismo de acción dual de la nisina propone que inicialmente la bacteriocina se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular (Figura 2, etapa 1). Posteriormente, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano y utiliza esta molécula para anclarse a la membrana celular (Figura 2, etapa 2). Luego, la bacteriocina cambia su orientación con relación a la membrana y se inserta en esta última, lo que involucra la traslocación de su extremo carboxilo terminal a través de la membrana. Finalmente, la unión de diversos péptidos en el sitio de inserción provoca la formación de un poro transmembranal que permite la salida de moléculas importantes como aminoácidos y ATP, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular (Figura 2, etapa 3).

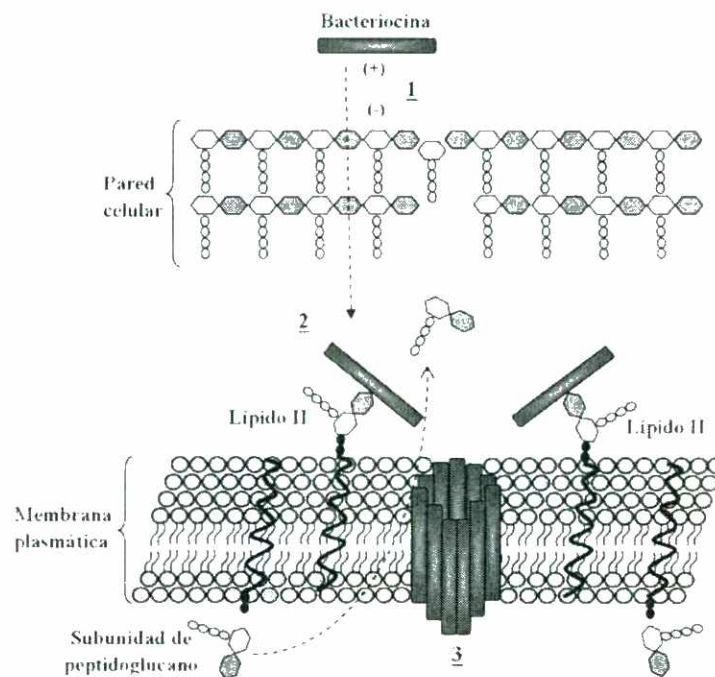


Figura 2. Modelo que muestra el mecanismo de acción dual de la nisina de *Lactococcus lactis*. (Cotter, 2005)

Etapa 1, la nisina posee una carga neta positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Etapa 2, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular interfiriendo con su síntesis, lo que lleva a la bacteria a muerte celular. Etapa 3, adicionalmente, varias moléculas de nisina utilizan al lípido II para anclarse e insertarse en la membrana celular y comenzar con la formación de los poros, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular (Cotter, 2005).

#### II.2.4 Nisina como agente conservador de alimentos

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

De todas las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas aparecen como las más adecuadas desde un punto de vista tecnológico para ser utilizadas como conservadores grado alimentario. En principio, su naturaleza peptídica permite la degradación por las enzimas digestivas, resultando así presuntivamente inocuas para el consumidor y su microbiota intestinal de ocupación y, en algunos casos, su espectro de acción incluye a los potenciales patógenos y alterantes asociados a los alimentos (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., entre otros). Por último, sus propiedades físico-químicas las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento y, además, su pequeño tamaño permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los productos alimentarios (Roller, 2003).

Adicionalmente, las bacterias lácticas ofrecen la posibilidad de producir las bacteriocinas *in situ* durante el proceso de fabricación. De hecho, se ha demostrado

que muchos de los cultivos iniciadores utilizados en sistemas alimentarios producen bacteriocinas (Nettles y Barefoot, 1993). Por lo tanto, se podría evitar la adición directa de una preparación pura de la bacteriocina, que implicaría un mayor gasto económico.

La nisina también se utiliza para disminuir la intensidad del tratamiento térmico de los alimentos enlatados, para controlar la fermentación maloláctica en vinos y para evitar el crecimiento de bacterias lácticas durante la fabricación de la cerveza (Naidu, 2000).

En la actualidad la nisina se ha utilizado cada vez más ampliamente como conservador de alimentos. Ya que está aprobado en más de 80 países, incluyendo Estados Unidos, donde se le ha otorgado el estatus GRAS (Generally Recognized As Safe) (O'keeffe y Hill, 2000).

### II.3 Secado por aspersión

El secado por aspersión es un sistema cuyo principio de operación consiste en colocar una suspensión a deshidratar en forma de pequeñísimas gotas en contacto con una corriente de aire caliente en movimiento en forma tal, que el tiempo de interacción gota-aire sea mínimo. Este proceso, por lo tanto es un método casi instantáneo de producir un sólido seco a partir de un producto alimentado en forma fluida, siendo el aire caliente el medio que suministra el calor necesario para la evaporación y al mismo tiempo el acarreador del agua eliminada (Gutiérrez, 1984).

La operación de secado por aspersión se muestra en la Figura 3. La atomización de la alimentación por medio de boquillas o atomizadores rotatorios forman una nube de pequeñas gotas de diámetro menor a 2 mm que navegan por el aire caliente; su contacto con el medio caliente ocasiona la evaporación del contenido de agua (Murrieta, 2008).

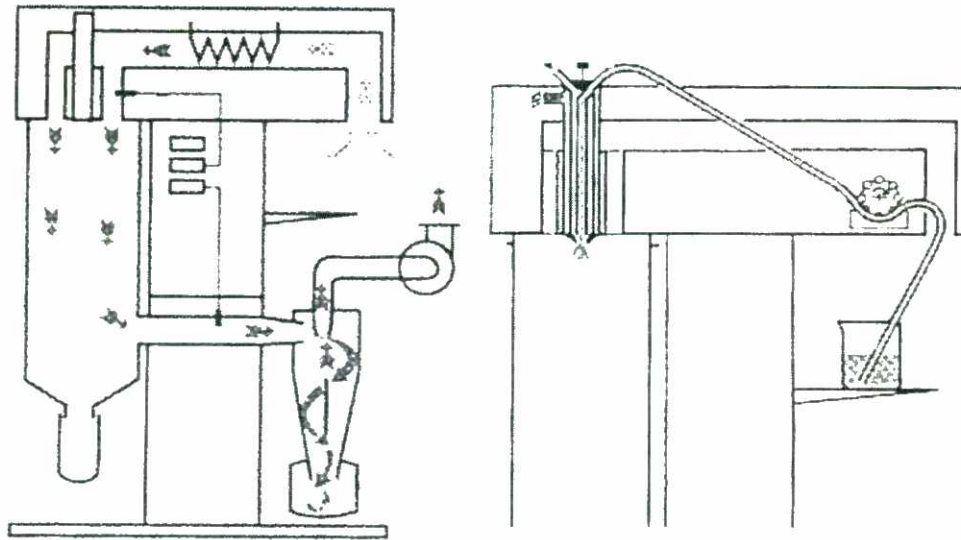


Figura 3. Secado por aspersión. Manual de instrucciones Mini Spray Dryer

La turbulencia, flujo de caudal de aire y gravedad, trasladan el polvo junto con el aire húmedo hasta un separador ciclónico que permite la colección del producto final con una humedad próxima a valores del 3% o menor. Este valor residual de agua, equivale a una actividad de agua próxima a 0.10, valor con el cual la única reacción de deterioro significativa es la oxidación de lípidos (Gascón y col., 2006).

La alta velocidad de secado, en el orden de 1 a 20 segundos, brinda productos de calidad manteniendo bien las propiedades nutricionales y sensoriales. Es utilizado para el secado de leche en polvo, té, cacao, café, jugos y pulpas vegetales, concentrados proteicos y extractos de levadura (Gascón y col., 2006).

El secado por aspersión es utilizado generalmente cuando el producto a obtener no puede evaporarse mecánicamente, cuando es sensible a altas temperaturas, cuando no se puede exponer a tiempos prolongados a altas temperaturas y cuando se requiere obtener un contenido ultrafino de partículas (Gómez, 2008).

En el Cuadro 3 se presentan algunas ventajas y desventajas del secado por aspersión:

Cuadro 3. Ventajas y desventajas del secado por aspersión

Ventajas	Desventajas
Puesto que los tiempos de secado son muy cortos, muchos materiales termosensibles pueden ser secados satisfactoriamente. Además estos cortos tiempos implican un alto rendimiento.	El calor requerido por unidad de peso del producto es alto, pues: - El contenido de humedad en la alimentación puede ser grande comparado con la mayor parte de los otros tipos de secadores. - El rendimiento térmico es bajo debido a las restricciones en la temperatura de entrada del aire y a la temperatura relativamente alta del aire de salida.
El producto es obtenido como un polvo fluido finamente dividido y en forma fácilmente soluble en un disolvente apropiado y con una buena presentación del producto.	El costo del equipo es alto respecto del tonelaje anual de producto secado particularmente en el caso de equipos de pequeña capacidad.
El tamaño de partícula de algunos productos es ajustable dentro de ciertos límites, variando las condiciones de atomización.	El equipo requiere mucho espacio.
El proceso es adecuado para el secado continuo de cantidades relativamente grandes de material.	La recuperación en los gases de salida de producto que forma polvo puede ser problemática o puede necesitar un equipo auxiliar.
En ciertos casos, en donde es conveniente obtener una baja densidad aparente, del producto es ventajoso este método.	No se puede usar el secador por spray con productos tóxicos a menos que se tomen precauciones especiales.

Adaptado de Nonhebel (2002)

#### II.4 Liofilización

La liofilización es un proceso que consiste en desecar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Es por lo tanto el paso directo del hielo (sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido. Se obtiene una masa seca, esponjosa de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original, mejorando su estabilidad y siendo fácilmente redisuelta en agua (Jennings, 1993).

Los científicos franceses Bordas y D'Arsonval en 1906 y el americano Shackell en 1909, citados por Jennings (1993), descubren la aplicación del principio físico de la

sublimación, construyendo un sencillo aparato de liofilización de laboratorio. A partir de este descubrimiento, la técnica de liofilización se ha ido desarrollando y utilizando para la desecación de diversos antibióticos, enzimas, sueros y vacunas a fines de prolongar su actividad terapéutica.

La liofilización consiste en tres etapas:

I. Congelación inicial: es una operación previa y obligatoria. El tiempo de duración depende de varios factores como la cantidad, concentración y naturaleza propia del producto. En líneas generales podemos decir que una congelación adecuada es la base de que el producto liofilizado presente óptimas condiciones de aspectos, conservación de sus propiedades originales y rápida rehidratación.

II. Sublimación o desecación primaria: es la etapa en la que la mayor parte del agua libre pasa a vapor. Los parámetros temperatura, presión y tiempo pueden ser modificados independientemente pero están íntimamente relacionados, no es posible modificar, sin que se afecten los otros, por lo que en todo momento deben ser considerados conjuntamente y analizados sus efectos.

III. Desorción o desecación secundaria: Su misión es eliminar las últimas trazas de vapor de agua, evaporando el agua no congelada ligada al producto. Se lleva a cabo a una temperatura inferior a la de desnaturalización del producto y se logra una humedad final hasta valores inferiores al 1 % (Jennings, 1993).

En el Cuadro 4 se presentan algunas ventajas y desventajas del secado por liofilización.



Cuadro 4. Ventajas y desventajas de la liofilización

Ventajas	Desventajas
La temperatura a que es sometido el producto, está por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.	Es un proceso costoso.
Debido a la baja temperatura que se opera, la pérdida de constituyentes volátiles, es mínima, se reduce el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufren alteraciones.	Necesidad de personal calificado en la operación y mantenimiento de los equipos.
Se eliminan los fenómenos de oxidación, dado que se opera y envasa a alto vacío.	Elevado costo de inversión de las instalaciones y equipos.
La gran porosidad del producto facilita con rapidez la reconstitución por la adición de agua o del solvente adecuado.	Implica largos tiempos de procesamiento.

Adaptado de Pardo (2002)

### **III. HIPÓTESIS**

Existen diferencias en la actividad antimicrobiana de la nisina obtenida utilizando como medio de cultivo suero de leche, al utilizar diferentes métodos de secado y tratamientos térmicos a diferentes valores de pH.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Evaluar el método de secado y el efecto de la temperatura y pH en las propiedades y estabilidad de la actividad antimicrobiana de nisina en polvo.

### IV.2 Específicos

- Obtener nisina en polvo a partir del caldo de fermentación de *Lactococcus lactis* UQ2 usando suero de leche como medio de cultivo mediante secado por aspersión y por liofilización.
- Determinar el efecto del tipo de secado en la actividad antimicrobiana de la nisina en polvo.
- Estudiar el efecto de tres diferentes temperaturas, tres valores de pH, a tres diferentes tiempos sobre la actividad antimicrobiana de la nisina mediante un diseño experimental  $3^3$ .

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

- Nisina Comercial (Sigma-Aldrich, 2.5% pureza, donde 1  $\mu\text{g}$  = 1 UI de nisina.
- Tween 20 al 50% (Tween20 y agua destilada en partes iguales 1:1)
- Solución Ringer  $\frac{1}{4}$  (Por litro: NaCl 9.0 g, KCl 0.42 g,  $\text{CaCl}_2$  0.24 g,  $\text{NaHCO}_3$  0.20 g; diluido 1:3 en agua destilada)
- Ácido clorhídrico 0.02 N
- Hidróxido de sodio 0.1 M y ácido clorhídrico 0.1 M
- Mini Spray Dryer BUCHI B-191
- Liofilizadora Labconco,
- Aqualab CX-2

#### V.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo

- *Micrococcus luteus* NCIB 8166, microorganismo indicador de la actividad de nisina. Proporcionados por el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química.
- Medio Assay (BS 4020, 1974), el cual contiene (g/L): peptona bacteriológica 10.0; extracto de res 3.0; NaCl 3.0; levadura autolisada 1.5; azúcar mascabado 1.0; agar 10.

### V.2 Métodos

#### V.2.1 Tratamiento de las muestras

Las muestras utilizadas fueron obtenidas de la fermentación de *L. Lactis UQ2* en suero de leche a un pH controlado de 6.0 y a las 24 horas de fermentación (Piña, 2010), éstas se calentaron a 80°C por 30 minutos, para inactivar proteasas,

posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 4°C y 15,000 g, el sobrenadante se ajustó a pH 6.5 con NaOH 0.1 N, para evitar interferencias de las propiedades antimicrobianas del ácido láctico (García-Almendárez y col., 2008).

#### V.2.2 Obtención del extracto celular

El precipitado de las muestras centrifugadas, se resuspendió en HCl 0.1 M y se ajustó a pH 1.5 con HCl concentrado, se sometió a ebullición durante 10 minutos, seguido de una centrifugación a 13,000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue el extracto celular, el cual se ajustó a pH 6.5 con NaOH 0.1M, y se esterilizó por membrana (De Vuyst y col., 1996). Finalmente, para aumentar la estabilidad del extracto celular se secó mediante liofilización (Labconco).

#### V.2.3 Secado de las muestras

Para la obtención del concentrado en polvo, las muestras fueron sometidas a secado por aspersion y por liofilización, para el secado por aspersion se utilizó un secador Buchi Mini Spray Dryer Modelo B-191. Los parámetros fueron: temperatura de entrada: 180°C, temperatura de salida: 80°C (Acosta, 2005); para el secado por liofilización se utilizó la liofilizadora Labconco (Figura 4).



Figura 4. Secador Buchi Mini Spray Dryer B-191 (lado izquierdo) y Liofilizadora Labconco (lado derecho)

#### V.2.4 Tratamientos con diferentes pH, temperatura y tiempo

Una vez obtenidas las muestras en polvo, se sometieron a diferentes tratamientos teniendo tres variables: temperatura, tiempo y pH, basándose en un modelo estadístico  $3^3$  para observar sus interacciones entre éstas. Como variable respuesta se consideró la actividad antimicrobiana de la nisina; para saber el orden de los tratamientos, se utilizó el programa estadístico JMP.

Se disolvió la muestra en ácido clorhídrico 0.02 N en una relación de 0.1 gr de muestra por 300  $\mu$ L de la solución de HCl, se calentó la muestra disuelta en baño de agua a 98°C por 5 minutos, posteriormente se enfrió en baño de hielo (British Standards BS 4020:1974).

Para cada tratamiento se ajustó el pH con HCl o NaOH según el caso, consecutivamente se esterilizó la muestra por membrana; se tomó 200  $\mu$ L de la muestra estéril y se calentó en baño seco de acuerdo al tratamiento correspondiente. El Cuadro 5 nos muestra los tratamientos aplicados a las muestras de acuerdo al modelo dado por el programa estadístico JMP, considerando las interacciones entre las tres variables y duplicados de cada tratamiento.

Después de cada tratamiento, la muestra fue enfriada en un baño de hielo y se determinó la actividad de nisina por el método de difusión en agar.

Para comparar el comportamiento y estabilidad de la nisina obtenida en el laboratorio, se sometieron a los mismos tratamientos muestras de nisina comercial (Sigma-Aldrich, 2.5 % pureza), la cual se preparó de acuerdo al British Standard BS 4020:1974, es decir, de la misma manera que las muestras para este estudio.

Cuadro 5. Tratamientos a los que se sometieron las muestras, según el diseño experimental 3<sup>3</sup>

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1, 49	7	121	5
2, 24	2	100	15
3, 53	2	62	15
4, 18	2	121	5
5, 21	5	121	10
6, 45	5	121	15
7, 46	7	100	10
8, 26	2	62	10
9, 34	5	62	5
10, 12	7	100	5
11, 51	7	100	15
13, 39	5	62	10
14, 29	7	121	15
15, 54	2	100	5
16, 33	2	100	10
17, 42	5	100	15
19, 35	2	121	15
20, 25	5	100	10
22, 36	5	121	5
23, 47	7	62	5
27, 32	2	121	10
28, 31	5	62	15
30, 41	2	62	5
37, 38	5	100	5
40, 50	7	62	15
43, 52	7	62	10
44, 48	7	121	10

## V.2.5 Determinación de la actividad de nisina

### V.2.5.1 Activación de *Micrococcus luteus*

*M. luteus* se tomó de una conserva preparada en el laboratorio de biotecnología conservada a -70 °C. Esta conserva se colocó en un tubo con caldo assay y se incubó 48 h a 30 °C. Finalizado el periodo de incubación, se sembró por estriado en

un tubo inclinado y en placas con agar assay al 1 %, para verificar la pureza de la cepa (Figura 5) (González-Toledo, 2009).

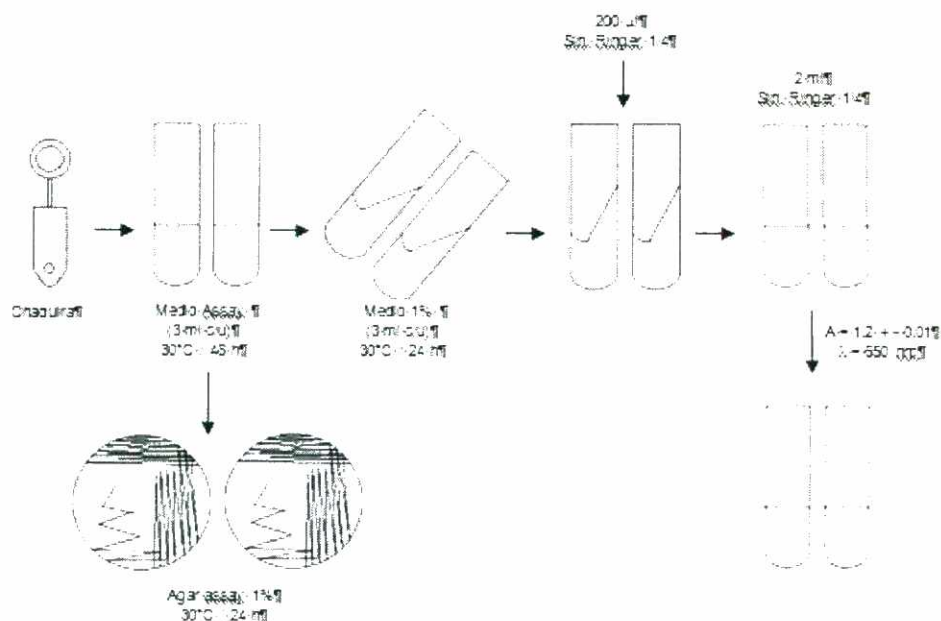


Figura 5. Activación de *M. luteus* (Lara-Cortés, 2006)

El inóculo para los ensayos de actividad se preparó tomando el cultivo de los tubos, diluyendo con 500  $\mu$ L de solución Ringer  $\frac{1}{4}$ ; de esta solución concentrada, se tomaron gradientes de 1, 2, 3 hasta 10  $\mu$ L y se aforaron a 1 mL con solución Ringer  $\frac{1}{4}$ , para ajustar la concentración del microorganismo a una absorbancia de  $0.3 \pm 0.01$ , leyendo a una longitud de onda de 650 nm (González, 2009).

#### V.2.5.2 Método de difusión en agar

Se prepararon cajas petri de 14 cm de diámetro con 40 ml de medio assay inoculado con 2 % de solución ajustada de *Micrococcus luteus* y con 2 % de solución tween 20 al 50 %. El *M. luteus* no debe de agregarse al medio si la temperatura está por encima de los 35 °C. Una vez preparadas las cajas, se ponen en refrigeración 1 h. Se hicieron 9 pozos de 4 mm de diámetro utilizando un



horadador estéril No. 4 uniformemente distribuidos por caja; en cada pozo se vertieron 60  $\mu$ l de muestra, haciendo duplicados de cada una, las cajas se incubaron a 30 °C por 48 horas (Figura 6). Pasado el tiempo de incubación se miden los halos de inhibición con la metodología señalada en el estándar Británico (BS 4020, 1974). La cuantificación de la actividad antimicrobiana de la nisina de los extractos se expresan en Unidades Internacionales (UI). Este valor se calcula extrapolando el halo de inhibición obtenido, en una curva de calibración, y multiplicando por el inverso de la dilución de la muestra (González-Toledo, 2009).

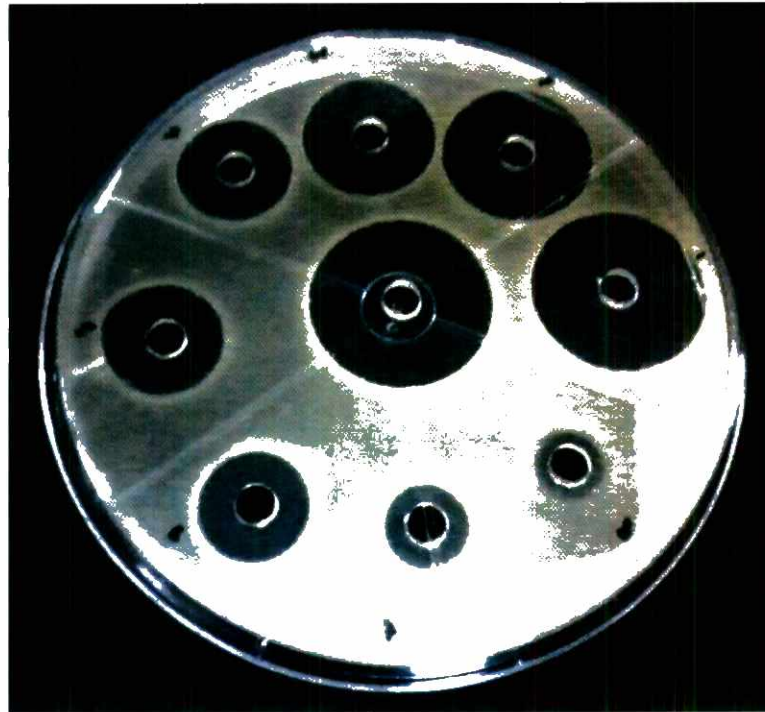


Figura 6. Halos de inhibición de *M. luteus*, causados por la acción bactericida de la nisina presente en la muestra

#### V.2.6 Determinación de la actividad acuosa en polvos

La determinación de la actividad acuosa se llevó a cabo con el equipo Aqualab CX-2. Se coloca la muestra y el equipo dará automáticamente la actividad de agua.

## V.2.7 Determinación de sólidos totales

La determinación de sólidos totales se llevó a cabo de acuerdo al método de secado, el cual consiste en poner a peso constante cápsulas de porcelana, se colocan 5 mL de muestra y se seca en estufa a 110 °C hasta peso constante. Al término de esto, se pesó la cápsula con los sólidos, según la norma NMX-F-527-1992 (1992).

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Determinación de sólidos totales

A la muestra antes de secarse, se le determinó los sólidos totales para calcular el porcentaje de muestra seca recuperada en las diferentes técnicas de secado. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 6, donde se observa los valores de sólidos totales para las muestras, la cantidad de polvo obtenida por cada método de secado y el porcentaje de rendimiento. En cuanto al método de secado por liofilización se tuvo un mayor rendimiento en sólidos totales, debido a que en el secado por aspersion se tiene una pérdida del polvo considerable ya que el diseño del equipo no facilita la recuperación total de éste, comparada con el método de secado por liofilizado en el cual la muestra no pasa por varios recipientes del equipo y no se tiene pérdida considerable del producto.

Cuadro 6. Determinación de sólidos totales

% Sólidos totales	Secado por aspersion			Secado por liofilización		
	mL secados	gr de polvo obtenidos	% de rendimiento	mL secados	gr de polvo obtenidos	% de rendimiento
2.48	900	10.6	47.7	100	2.1	86.0

### VI.2 Parámetros fisico-químicos de la nisina

Los parámetros fisicoquímicos que se determinaron fueron la actividad de agua y la actividad de nisina de cada polvo obtenido, los resultados se muestran en el Cuadro 7. Se puede observar que en cuanto al método de secado por aspersion se obtiene una menor actividad de agua, la cual es de suma importancia ya que se sabe que una baja actividad de agua implica una mayor estabilidad del producto. Se observa además, una mayor actividad de nisina en el polvo de la muestra secada por aspersion. Sin embargo, de acuerdo a los resultados anteriores se llega

a un equilibrio si consideramos que en el secado por liofilización se tiene un mayor rendimiento del polvo.

Cuadro 7. Determinación de parámetros de calidad

Secado por aspersión		Secado por liofilización	
Actividad de agua	Actividad de nisina UI en 0.5 g	Actividad de agua	Actividad de nisina UI en 0.5 g
0.34	783.4	0.54	645.8

### VI.3 Determinación de la actividad de nisina

La actividad de nisina se determinó antes de secar las muestras, después de cada método de secado y en el extracto celular para determinar la actividad de nisina recuperada después del secado. En el Cuadro 8 se pueden observar los resultados obtenidos, en donde se muestran las actividades de nisina en cada caso y el rendimiento, obteniéndose un mayor rendimiento de recuperación para el liofilizado, sin embargo la diferencia entre ambos métodos de secado no es considerable.

Cuadro 8. Rendimiento y recuperación de la cantidad inicial de nisina

Muestra	Actividad neta por litro del medio (UI)	Actividad del extracto activo seco (UI/g)	Rendimiento del extracto seco (g/L del medio)	Recuperación (%)
Secada por aspersión	326,206.0	2,299.5	11.8	7.5
Secado por liofilizado	36,245.1	1,813.1	21.3	10.7

En el Cuadro 9, se observa el rendimiento y porcentaje de recuperación total de la nisina en polvo, tomando en cuenta la obtenida por ambos métodos de secado así como el del extracto celular, el cual tuvo una actividad de 7,385 UI/g. Se hicieron

los cálculos para los tres casos obteniéndose un porcentaje de recuperación del 7.9% desde su actividad en líquido.

Cuadro 9. Rendimiento y recuperación de la cantidad inicial de nisina total

Actividad neta por litro del medio (UI)	Extracto libre de células		Actividad del extracto celular (UI/g)	Recuperación (%)
	Actividad del extracto activo seco MSL (UI/g)	Actividad del extracto activo seco MSA (UI/g)		
362,451.1	1,813.1	2,299.5	7,385.0	7.9

MSL: Muestra secada por liofilización  
MSA: Muestra secada por aspersión

#### VI.4 Análisis estadístico de los tratamientos a las muestras

Para el tratamiento de las muestras se optó por utilizar el método de secado por aspersión, ya que éste implicaba menos tiempo para obtener las muestras en polvo y un menor costo que el método de secado por liofilizado, ya que en este último, primero se tienen que congelar las muestras y después liofilizarlas, lo que implica utilizar dos equipos.

Las muestras se sometieron a los diferentes tratamientos y se les determinó la actividad de nisina como variable respuesta, estos tratamientos se hicieron tanto a la nisina obtenida en el laboratorio como a la nisina comercial para poder observar el comportamiento de los polvos.

Los resultados de los títulos para el caso de la nisina comercial, se muestran en el Cuadro 10, en donde se observa el comportamiento de éstos respecto a los diferentes pH, temperatura y tiempos de acuerdo a un modelo estadístico  $3^3$  obtenido mediante el programa estadístico JMP.

Cuadro 10. Tratamientos a los que se sometió la nisina comercial

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Actividad de nisina	
				UI/g	UI
1	7	121	5	24,955.75	2.82
2	2	100	15	235,371.68	26.59
3	2	62	15	256,203.54	28.95
4	2	121	5	593,212.38	67.03
5	5	121	10	43,902.65	4.96
6	5	121	15	39,460.17	4.45
7	7	100	10	49,911.50	5.64
8	2	62	10	686,778.76	77.60
9	5	62	5	702,433.62	79.37
10	7	100	5	66,902.65	7.56
11	7	100	15	32,168.14	3.63
12	7	100	5	44,168.14	4.99
13	5	62	10	845,663.71	95.56
14	7	121	15	24,955.75	2.82
15	2	100	5	795,097.34	89.85
16	2	100	10	343,389.38	38.80
17	5	100	15	38,725.66	4.37
18	2	121	5	303,884.96	34.34
19	2	121	15	74,150.44	8.38
20	5	100	10	49,911.50	5.64
21	5	121	10	44,982.30	5.08
22	5	121	5	58,840.70	6.65
23	7	62	5	56,938.05	6.43
24	2	100	15	208,292.04	23.53
25	5	100	10	44,168.14	4.99
26	2	62	10	607,769.91	68.68
27	2	121	10	191,150.44	21.60
28	5	62	15	470,743.36	53.19
29	7	121	15	19,079.65	2.15
30	2	62	5	795,097.35	89.85
31	5	62	15	381,539.82	43.11
32	2	121	10	75,973.45	8.58
33	2	100	10	262,486.73	29.66
34	5	62	5	621,619.47	70.24
35	2	121	15	75,973.45	8.58
36	5	121	5	38,858.41	4.39
36	5	100	5	58,840.71	6.65
38	5	100	5	44,539.82	5.03
39	5	62	10	646,415.93	73.05
40	7	62	15	37,238.94	4.21
41	2	62	5	703,628.32	79.51

PROPIEDAD DE LA FACULTAD  
 DE QUÍMICA DE LA U.S.A.

Cuadro 10. Tratamientos a los que se sometió la nisina comercial. Continuación

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Actividad de nisina	
				UI/g	UI
42	5	100	15	39,672.57	4.48
43	7	62	10	43,115.04	4.87
44	7	121	10	21,557.52	2.43
45	5	121	15	30,141.59	3.40
46	7	100	10	59,203.54	6.69
47	7	62	5	74,477.87	8.42
48	7	121	10	19,079.64	2.16
49	7	121	5	19,079.64	2.16
50	7	62	15	32,955.75	3.72
51	7	100	15	24,592.92	2.78
52	7	62	10	32,955.75	3.72
53	2	62	15	303,884.96	34.34
54	2	100	5	814,557.52	92.05

Los resultados de los títulos para el caso de la nisina de laboratorio, se muestran en el Cuadro 11, en donde se observa el comportamiento de éstos respecto a los diferentes valores de pH, temperatura y tiempo.

Cuadro 11. Tratamientos a los que se sometió la nisina de laboratorio

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Actividad de nisina	
				UI/g	UI
1	7	121	5	20.76	4.19
2	2	100	15	193.33	38.80
3	2	62	15	599.35	120.42
4	2	121	5	37.46	7.52
5	5	121	10	43.32	8.71
6	5	121	15	37.42	7.52
7	7	100	10	22.08	4.66
8	2	62	10	693.88	139.41
9	5	62	5	447.66	89.84
10	7	100	5	25.56	5.40
11	7	100	15	19.07	4.02
12	7	100	5	29.60	6.25
13	5	62	10	386.67	77.60
14	7	121	15	14.80	3.12
15	2	100	5	287.29	57.90

Cuadro 11. Tratamientos a los que se sometió la nisina de laboratorio. Continuación

Tratamiento	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Actividad de nisina	
				UI/g	UI
16	2	100	10	258.05	52.00
17	5	100	15	106.97	21.60
18	2	121	5	21.68	4.35
19	2	121	15	27.86	5.61
20	5	100	10	143.37	28.95
21	5	121	10	48.23	9.70
22	5	121	5	43.32	8.71
23	7	62	5	247.93	50.01
24	2	100	15	193.33	38.80
25	5	100	10	123.84	25.00
26	2	62	10	772.50	155.21
27	2	121	10	32.25	6.50
28	5	62	15	347.32	69.70
29	7	121	15	9.91	2.09
30	2	62	5	772.50	155.21
31	5	62	15	300.00	60.21
32	2	121	10	27.86	5.61
33	2	100	10	222.89	44.92
34	5	62	5	518.26	104.01
35	2	121	15	40.45	8.71
36	5	121	5	43.32	8.71
37	5	100	5	192.95	38.80
38	5	100	5	192.95	38.80
39	5	62	10	386.67	77.60
40	7	62	15	172.78	34.85
41	2	62	5	772.50	155.21
42	5	100	15	123.84	25.00
43	7	62	10	214.15	43.20
44	7	121	10	17.13	3.61
45	5	121	15	32.32	6.50
46	7	100	10	25.56	5.40
47	7	62	5	214.15	43.20
48	7	121	10	17.13	3.61
49	7	121	5	17.94	3.61
50	7	62	15	172.78	34.85
51	7	100	15	19.07	4.02
52	7	62	10	172.78	34.85
53	2	62	15	599.35	120.42
54	2	100	5	332.60	67.03



Los resultados para la nisina obtenida en el laboratorio, fueron analizados con el programa estadístico JMP, obteniéndose los valores del análisis de varianza correspondientes y se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Análisis de varianza de tratamientos para nisina de laboratorio

Source	Nparm	GL	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
pH	2	2	22,136.68	574.08	<0.0001
Temperatura	2	2	64,837.91	1,681.49	<0.0001
Tiempo	2	2	1,699.65	44.07	<0.0001
Temperatura*pH	4	4	14,865.53	192.76	<0.0001
pH*Tiempo	4	4	463.92	6.01	0.0014
Tiempo*Temperatura	4	4	1,057.75	13.71	<0.0001
Tiempo*Temperatura*pH	8	8	415.29	2.69	0.0256

Como se puede observar, de acuerdo a los valores de Prob>F, todos los valores resultan significativos con el 5% de nivel de confianza ( $\alpha < 0.05$ ), es decir, cada una de las variables temperatura, pH y tiempo así como las interacciones entre sí resultan ser significativas para la variable de respuesta: actividad de nisina, que de acuerdo a la literatura consultada es más estable en soluciones ácidas y es resistente a temperaturas y tiempos relativamente altos o los establecidos para tratamientos térmicos de alimentos procesados (Liu y Hansen, 1990).

Se puede observar además, que a un pH más ácido la nisina presenta una mayor actividad, mientras que respecto a tiempos y temperaturas se percibe que a mayor temperatura y tiempo se tiene una menor actividad. Es decir, la nisina será resistente a temperaturas altas pero tiempo cortos. Es importante mencionar que de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010, (2010), que establece las especificaciones sanitarias para la leche, fórmulas lácteas, productos lácteos combinados y derivados lácteos, reconoce a los tratamientos de pasteurización rápida y esterilización en alimentos procesados, como tiempos considerablemente cortos.

Cuadro 13. Relación de temperatura y tiempo de tratamientos térmicos para alimentos procesados

Tratamiento	Temperatura y tiempo*
Pasteurización	Lenta 63°C / 30 min Rápida 72°C / 15 s
Ultrapasteurización o esterilización (NOM-243-SSA1-2010)	135°C a 149°C / 2 a 8 s

Los resultados para la nisina comercial, fueron también analizados por el programa estadístico JMP, obteniéndose los valores del análisis de varianza correspondientes al Cuadro 14, donde se puede apreciar que el comportamiento de la muestra fue muy similar a la muestra de la nisina obtenida en el laboratorio, teniéndose valores significativos para todas las variables, pH, temperatura y tiempo y la interacción entre éstos.

El comportamiento tanto de la nisina comercial como de la nisina obtenida en el laboratorio es similar, a mayor temperatura y tiempo se tiene una mayor pérdida de la actividad, mientras que conforme aumenta el pH, la nisina pierde estabilidad y resulta menos soluble afectando considerablemente su actividad.

Cuadro 14. Análisis de varianza de tratamientos para nisina comercial

Source	Nparm	GL	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
pH	2	2	15,673.18	186.60	<0.0001
Temperatura	2	2	11,907.95	141.77	<0.0001
Tiempo	2	2	4,325.19	51.49	<0.0001
Temperatura*pH	4	4	9,122.29	54.30	<0.0001
pH*Tiempo	4	4	5,117.12	30.46	<0.0001
Tiempo*Temperatura	4	4	1,168.11	6.95	0.0006
Tiempo*Temperatura*pH	8	8	1,092.37	3.25	0.0101

La mayor actividad (772.5 UI/g) en cuanto a la nisina obtenida en el laboratorio se tiene a un pH de 2, a una temperatura de 62°C y a un tiempo de 5 y 10 minutos; así

mismo la menor actividad de la nisina (9.919 UI/g), se tiene a un pH de 7, a una temperatura de 121°C y a un tiempo de 15 minutos. Mientras que para la nisina comercial, la mayor actividad (814,557.5 UI/g) se tiene a un pH de 2, a una temperatura de 100°C y a un tiempo de 5 minutos; así mismo la menor actividad de la nisina (19,079.6 UI/g), se tiene a un pH de 7, a una temperatura de 121°C y a un tiempo de 15 minutos, observándose una pérdida del 97.66 % para la nisina comercial y un 98.72% para la nisina del laboratorio, que son valores muy similares entre sí.

## VII. DISCUSIÓN

Se logró obtener una muestra en polvo a partir de la fermentación del *Lactococcus* UQ2 en medio de cultivo con suero de leche por dos métodos, secado por aspersión y secado por liofilización obteniéndose una actividad de nisina similar para ambos casos, pero con rendimientos diferentes, alcanzándose un mayor rendimiento en el secado por liofilización. Sin embargo, se prefirió utilizar el secado por aspersión para evaluar la estabilidad de la nisina debido a que éste ofrece la ventaja de un secado considerablemente rápido para los productos sensibles al calor así como costos bajos de operación. Así mismo, se observó que la muestra secada por aspersión presenta una menor actividad de agua que de acuerdo a autores como Baduí (2006), implica una mayor estabilidad microbiana en los polvos.

Se obtuvo un porcentaje de recuperación de la actividad de nisina de 7.9%, valor relativamente promedio, si consideramos que González-Toledo en 2009 obtuvo un 15.5% de rendimiento recuperado en muestras obtenidas del mismo medio de fermentación. De igual manera se encontró una máxima actividad de nisina deshidratada mediante secado por aspersión de 4,455 UI/g, mientras que las muestras en este estudio mostraron un máximo de 2, 229.48 UI/g y 1,813.11 UI/g para el secado por aspersión y el secado por liofilización respectivamente.

La nisina adsorbida en las células, se purificó parcialmente usando la técnica de adsorción-liberación, obteniéndose una actividad máxima de 7,385.04 UI/g, mientras que González-Toledo (2009). Por el mismo método obtuvo una actividad de 102,150 UI/g. Se puede observar que pueden influir varios factores tales como las condiciones de la fermentación (nutrientes, medio de cultivo, temperatura, entre otros) y las condiciones en que fueron tratadas las muestras, ya que éstas fueron secadas una semana después de la fermentación generándose posiblemente una agregación de la nisina producida, con la consecuente pérdida de actividad al dificultarse su difusión. Entre otros factores, se puede incluir la adsorción de la

nisina a las células productoras, la destrucción de dicho péptido por la acción de proteasas, y la formación de agregados de nisina, los cuales provocan la disminución de la actividad (Chatterjee y col., 2005).

Una vez obtenida la muestra seca de nisina, se comprobó la estabilidad de ésta a diferentes pH, temperatura y tiempos, parámetros seleccionados de acuerdo a los tratamientos térmicos a los que son sometidos los alimentos procesados, correspondientes a la esterilización, pasteurización y ebullición, encontrándose que a mayor temperatura y mayores tiempos, se va disminuyendo la actividad de nisina. Herman y col. en el 2006, determinaron el efecto que ocasiona la temperatura durante el proceso de esterilización por calor húmedo sobre la nisina en su acción sobre *Lactobacillus fructivorans*, contaminante habitual de las conservas a base de tomates y su concentración mínima inhibitoria, encontraron que la actividad de la nisina frente al *L. fructivorans* se ve marcadamente afectada por la temperatura a la cual puede ser sometida durante un proceso de esterilización, proceso al que se recurre habitualmente para la conservación de muchos alimentos. Esta temperatura modifica las concentraciones a la cual la bacteriocina debe utilizarse pero no la inactiva totalmente ya que la actividad inhibitoria se hizo evidente a concentraciones superiores a 50 ppm. Sin embargo, podría ser difícil comparar estos resultados con los obtenidos en nuestro estudio, ya que no se utilizó el mismo método para medir la inhibición de microorganismos, en el artículo se utiliza un método cualitativo, se trata además de un microorganismo diferente, pero es importante resaltar que la nisina tuvo el mismo comportamiento, que a mayor temperatura la actividad se ve afectada, pero en ningún caso fue inactivada totalmente.

También se observó que la nisina es más estable, soluble y tiene menos pérdida de actividad cuando está en un pH más ácido, esto debido a que la nisina es una molécula catiónica debido a la combinación de tres residuos de lisina y uno de histidina (dependiendo de la variante de nisina) junto con la ausencia de glutamato y aspartato. Los grupos de cadena lateral de histidina tienen un pKa de 6.5, y las de

lisina de 10.0; esto hace que la carga neta de la nisina dependa del pH. La nisina es más soluble a pH ácido, y se hace menos soluble conforme se acerca a la neutralidad (Davidson y col., 2005). Estudios demuestran que a pH 3.0, se pierde menos del 5% de actividad, después de un tratamiento térmico de 115 °C durante 20 minutos; a valores de pH por encima y por debajo de este hay una marcada disminución de la actividad: 28.5% de pérdida a pH 2 y el 21.4% de pérdida a pH 4. Conforme se acercan los valores de pH a la neutralidad se observan mayores pérdidas de actividad. A pH alto, se ha sugerido que los residuos de dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb), se vuelven más susceptibles a modificaciones debido a la presencia de nucleófilos, disminuyendo así la estabilidad y la solubilidad de la molécula (Liu y Hansen, 1990)

Jozala en 2005, encontró que la solubilidad de la nisina depende del pH, a un valor de 2.5, la solubilidad es del 12%, a pH 5, 4% y es insoluble a pH neutros y alcalinos. En HCl diluido a pH 2.5, la nisina es estable a temperatura de ebullición y no presenta pérdida marcada de actividad. Eventualmente, puede ocurrir la inactivación a pH 7 a temperatura ambiente.

El efecto de distintos factores físicoquímicos sobre la actividad de una bacteriocina no sólo tiene el fin de caracterizarla, sino también sirve para inferir su posible aplicación industrial. Las altas temperaturas y las amplias variaciones de pH son, entre otras, algunas de las condiciones que debe resistir una bacteriocina para ser útil como potencial agente inhibidor de microorganismos no deseados en procesos alimenticios tales como fermentaciones de leche, maduración de quesos, curado de encurtidos, entre otros (Fariás, 1996).

## VIII. CONCLUSIONES

Se obtuvo nisina en polvo producida por *Lactococcus lactis* UQ2 usando como suero de leche como medio de cultivo mediante secado por aspersión y por liofilización. Los resultados en cuanto al rendimiento, sugieren que el mejor método para concentrar la nisina es la liofilización, aunque representa un elevado costo. Sin embargo, se obtuvo una recuperación de actividad de nisina muy similar entre sí, por lo que a gran escala el secado por aspersión puede tener mayores ventajas.

El análisis estadístico mostró que hay un efecto significativo de los tres factores estudiados, temperatura, pH y tiempo así como sus interacciones entre sí sobre la actividad de nisina.

Por su estabilidad a diversos factores, la nisina puede ser utilizada como aditivo en la industria alimentaria que a pesar de disminuir su actividad antimicrobiana, su mecanismo de acción es llevado a cabo a concentraciones nanomolares. No obstante, debe considerarse utilizar valores de pH de mayor estabilidad en donde la concentración remanente siga siendo la necesaria para llevar a cabo su mecanismo de acción para prevenir el crecimiento de microorganismos deterioradores y patógenos.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Acosta, M. 2005.** Producción de un ingrediente antimicrobiano por fermentación de suero lácteo suplementado usando *L. Lactis UQ2*. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Badui, D. S. 2006.** Química de los Alimentos. 4ª edición. Pearson. México. Pp. 28-38
- BS 4029: 1974.** Methods for the estimation and differentiation of nisin in processed cheese.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., van der Donk, W. A. 2005.** Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.* 105:633-683.
- Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C. Nes, I. y Hernandez, P. 2001.** Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech.* 7: 281-305.
- Cotter, P. D., Hill C., Ross R. P. 2005.** Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777-788.
- Cubero, N., Monferrer A., Villalta J. 2002.** Aditivos Alimentarios. 1ª Edición. Almasa. España 67. Pp. 55-57
- Davidson, P. M., Sofus, J. N., Branen, A. L. 2005.** Antimicrobials in Food. 3ª Edición. Taylor & Francia. EUA. Pp. 464-523.
- De Vuyst, I., Callewaert, R., Crabbé, K. 1996.** Primary metabolite kinetics of bacteriocin by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for simulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology.* 142: 817-827.
- Farías, M. E. 1996.** Estudios bioquímicos y genéticos de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Argentina. Universidad Nacional de Tucumán. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencia de los Alimentos.
- Forman, D. 2004.** Commentary: Nitrites, nitrates and nitrosation as causes of brain cancer in children: Epidemiological challenges. *Int. J. Epidemiol.* 33: 1216–1218,
- García-Almendárez, B., Cann, I., Martin, S., Guerrero, L.G., Regalado, C. 2008.** Effect of *L. Lactis UQ2* and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control.* 19: 670-680.



- García-Parra, M. D. 2009.** Efecto de la percepción en quórum y modificación genética de *Lactococcus lactis* UQ2 sobre la producción de nisina en leche. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos.
- Garneau, S., Martín N. I., Vederas J. C. 2002.** Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. 84: 577-592.
- Gascón A., Muravnick N., Suliá P., Ventura L., Bressia C., D'Innocenzo S. 2006.** Tecnología de elaboración industrial de Frutas y Hortalizas deshidratadas. Cátedra de Industrias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Argentina.
- Gómez, C. M., López, H. O. 2008.** Preparación de microesferas mediante secado por aspersión. *Rev. Cubana Farm.* 42:101-107
- González-Toledo, S. Y. 2009.** Optimización de la producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2 a nivel biorreactor y su incorporación en materiales de empaque comestible. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestría. Pp. 1-29
- González-Toledo, S. Y., Domínguez-Domínguez, J., García-Almendárez, B. E., Prado-Barragán, L. A., Regalado-González, C. 2010.** Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. *J. Food Sci.* 75: M347-M353.
- Gutiérrez, F. G. 1984.** Memorias del Curso sobre Deshidratación de Alimentos, XV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato. Pp. 276-283
- Hasper H. E., De Kruijff B., Breukink, E. 2004.** Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry*. 43:11567–11575.
- Heng, N. C. K., Tagg, J. R. 2006.** Class distinction for bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:1-2.
- Herman, C., Garro, O. A., 2006.** Efecto de la temperatura de esterilización de la nisina en su actividad sobre *Lactobacillus fructivorans*. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Argentina, pp. 1-3.
- Jennings, T. A. 1993.** Seminario de liofilización. Sociedad Internacional de Liofilización. Argentina, pp. 1-5

- Jozala, F. A., Novaes, L., Cholewa, O., Moraes, D., Vessoni, T. 2005.** Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 262-265.
- Lara-Cortés, E. 2006.** Elaboración de un empaque biodegradable a partir de concentrado de suero. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de alimentos.
- Liu, W., Hansen, J. N. 1990.** Some chemical and physical properties of nisin, a small antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2551-2558.
- Montville, T. J., Chen Y. 1998.** Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 511-519.
- Montville, T.J. and Winkowski, K. 1997.** Principles which influence microbial growth, survival, and death in foods. in Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville T.J. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., pp. 13-29.
- Murillo, M. M. 2008.** Evaluación de propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de películas comestibles adicionadas con nisina y/o glucosa oxidasa. Distrito Federal. Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis para obtener el grado de Maestra en Biotecnología.
- Murrieta Pazos, I. 2008.** Implementación de los procesos de extrusión y secado por aspersión en la obtención y caracterización de análogos de queso en polvo, bajos en grasa y con elevado contenido proteico. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Naidu, A. S. 2000.** Natural antimicrobial systems. 1ª Edición. CRC Press. New York, EUA, pp. 237-273.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Holo, H. 2007.** Bacteriocins diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189-1198.
- Nettles, C. G., Barefoot, S. F. 1993.** Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *J. Food Protect.* 56: 338-356.

- Nonhebel, G. 2002** El Secado de Sólidos en la Industria Química. 1ª Edición. Reverté. Barcelona. España, pp. 295-308
- NMX-F-527-1992.** Alimentos. Determinación de sólidos totales, sólidos disueltos y sólidos en suspensión en agua. Normas mexicanas. Dirección general de normas. México, D.F.
- NOM-243-SSA1-2010.** Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Normas mexicanas. Dirección general de normas. México, D.F.
- O’Keeffe, T., Hill, C. 2000.** Potential in food preservation. In: Bacteriocins. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press. Londres. Gran Bretaña, pp. 183 – 191.
- O’Sullivan, L. Ross, R. P., Hill C. 2002.** Potential of bacteriocins producing lactic acid bacteria for improvement in food safety and quality. *Biochimie*. 84: 593-604.
- Pardo, B. J. M. 2002.** Modelling studies on freeze-drying of coffee extracts. PhD Thesis. University of Reading. School of Food Biosciences. Inglaterra
- Piña, S. A. 2010.** Producción de nisina a nivel biorreactor utilizando subproductos industriales. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis de Ingeniero Químico en Alimentos.
- Roller, S. 2003.** Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. 1ª Edición. CRC. Boca Raton, EUA, pp. 11-33.
- Sablón, E. B., Contreras E., Vandamme, E. 2000.** Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetic and biosynthesis. En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Scheper, T. Ed. Springer-Verlag. Berlín, Alemania, pp 2-6
- Suárez Lepe, J. A., Iñigo Leal, B. 2004.** Microbiología Enológica. 3ª Edición. Mundi Prensa. México. Pp. 576-577.
- Thomas, L., Wimpenny, J. 1996.** Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2006-2012.

**Zendo, T., Fukao M., Ueda K., Higuchi T., Nakayama J., Sonomoto K. 2003.** Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 1616-1619.

## ANEXO 1

### CURVA DE CALIBRACIÓN ACTIVIDAD DE NISINA

Para calcular la actividad de cada muestra, se elaboró una curva de calibración de nisina comercial disuelta en HCl a pH2 (Figura 5), con gradientes de 1, 3, 5, 7 y 9 UI/mL, en la cual se interpolaron los halos de inhibición para conocer las UI/mL correspondientes.

Se hizo una regresión lineal de los datos, con lo que se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.998. La ecuación de la recta es:

$$y = (7.8612)(x) + 11.3419$$

en donde  $y$  = halo de inhibición, y  $x$  = concentración de nisina (UI/mL)

$$\text{por lo tanto: } x = \frac{y - 11.3419}{7.8612}$$

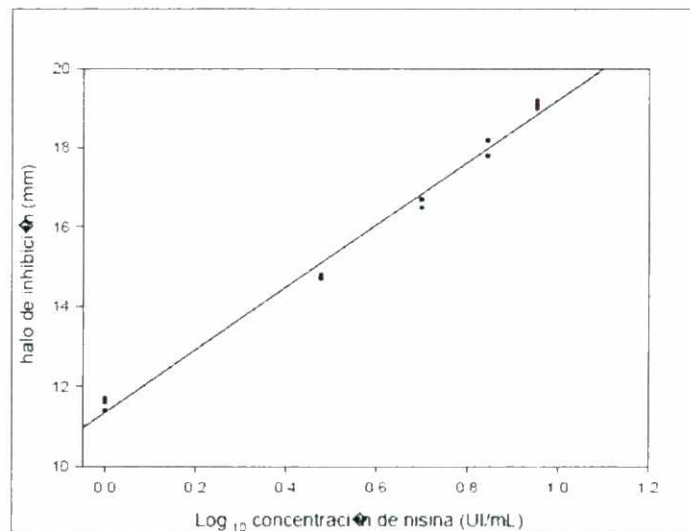


Figura 7. Curva de calibración para determinar la concentración de nisina

(González-Toledo, 2009)