



**“Caracterización bioquímica y espectro de inhibición
microbiana de las bacteriocinas producidas por
Lactobacillus buchneri y *Lactobacillus paracasei*”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

Hugo Minor Pérez

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Isabel Guerrero Legarreta (Tutor)
Dra. Amelia Farrés González-Sarabia (Asesor)
Dr. Carlos Regalado González (Asesor)
Dra. Edith Ponce Alquicira (Asesor)

MAYO 2004

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por las divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Hugo Minor Pérez

El día 18 de Mayo del año de 2004

Jurado:

Tutor: Dra, Isabel Guerrero Legarreta

Asesor : Dra. Amelia Farrés González-Sarabia

Asesor: Dra. Edith Ponce Alquicira

Sinodal: Dr. Carlos Regalado González

Sinodal: Dr. Francisco Fernández Perrino

Un agradecimiento especial para la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Así como para la Universidad de Murcia (España) donde se realizaron parte de las actividades experimentales.

RESUMEN

Las bacterias lácticas producen una serie de metabolitos con actividad antimicrobiana. Las bacteriocinas constituyen uno de los grupos importantes de compuestos biológicos producidos por estos microorganismos, que pueden ser empleadas en la extensión de la vida útil de los alimentos.

Estos péptidos son bioactivos contra bacterias Gram positivas y su espectro de inhibición incluye algunas bacterias productoras de toxiinfecciones alimentarias como *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum*. Además, algunas bacteriocinas, por sus propiedades bioquímicas como la resistencia térmica, pueden ser aplicadas en los alimentos en conjunto con otros tratamientos de conservación.

Sin embargo, para que su empleo en sistemas reales sea efectivo, es necesario optimizar el proceso de conservación a través de su control a nivel bioquímico, microbiológico y tecnológico.

En esta tesis se abordó el estudio de las bacteriocinas producidas por dos bacterias lácticas (*Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*) aisladas de carnes rojas. El estudio se enfocó en evaluar aspectos de producción, actividad y estabilidad que

pueden determinar su óptima aplicación en la conservación biológica de los alimentos.

Se observó que las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 y *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48, respectivamente.

Posteriormente se realizó una serie de estudios sobre las características bioquímicas. La bacteriocina producida por *Lactobacillus buchneri* presentó resistencia térmica a un tratamiento a 100°C durante 20 minutos, con una pérdida de actividad de alrededor del 15%. Resultados similares se obtuvieron para la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* bajo el mismo tratamiento. El pH óptimo de actividad de ambas bacteriocinas se encontró en un intervalo de 3.0-4.0. Ambas propiedades favorecen su posible aplicación en alimentos sometidos a tratamientos térmicos o en alimentos de alta acidez.

La propiedad de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y su resistencia térmica permiten sugerir que las bacteriocinas estudiadas pertenecen al Grupo II (de los no lantibióticos) de la Clase IIa. Sin embargo es necesario determinar la secuencia de aminoácidos y peso molecular para confirmar esta clasificación. Las bacteriocinas mantuvieron la mayor parte de su actividad antimicrobiana, alrededor del 85%, durante el almacenamiento a 4°C y 10 días, condición que puede favorecer su posible empleo en la conservación de alimentos refrigerados.

Las bacteriocinas fueron adsorbidas por sus respectivas células productoras en un intervalo de pH de 5.5-6.5. Esta propiedad favorece su aplicación en alimentos con pH menor a 5.5 debido a que se mejoraría la difusión cuando se emplean en alimentos a través de la producción *in situ*.

La producción de las bacteriocinas bajo las condiciones experimentales evaluadas estuvo asociada al crecimiento microbiano. Se observó que una atmósfera de N₂ (180 UA/mL para *Lactobacillus buchneri* y 120 para *Lactobacillus paracasei*) favoreció la producción en comparación con una mezcla de N₂-CO₂ (150 y 100 UA/mL respectivamente) y CO₂ (60 y 30 UA/mL respectivamente). La temperatura óptima de producción para la cepa de *Lactobacillus buchneri* fue de 30°C mientras fue de 35°C, para la cepa de *Lactobacillus paracasei*. También se encontró que el Tween 80 en una concentración al 1% mejora la recuperación de ambas bacteriocinas.

Los resultados obtenidos pueden contribuir a orientar hacia una mayor eficiencia el uso de las bacteriocinas en alimentos, tanto por producción *in situ* o mediante el empleo de bacteriocinas purificadas.

SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) are able to produce a number of metabolites with antimicrobial ability. Bacteriocins are a group of biological compounds produced by these microorganisms that may be applied to extend food shelf-life. These peptides are active against Gram positive bacteria, their inhibition spectra includes several toxic and infectious bacteria such as *Listeria monocytogenes* and *Clostridium botulinum*. Due their heat resistance, some bacteriocins can be also applied on foods together with other preservation methods.

However, in order to efficiently apply bacteriocins in real food systems, optimization of the preservation process involved is necessary through control at biochemical, microbial and technical levels.

The present thesis studied the bacteriocins produced by two LAB (*Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus paracasei*), isolated from red meats. Several production, activity and stability characteristics of these bacteriocins were studied.

The experiments carried out were focused on biochemical and physiological properties of the bacteriocins and the producing bacteria as preliminary studies for the futher use these compounds in red meat preservation.

The first part of the thesis was the study of the bacteriocins' inhibition spectra. It was observed that *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus paracasei* bacteriocins inhibited the growth of *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 and *L. monocytogenes* LMB 92000/48 respectively.

Studies were also carried out in order to determine the bacteriocins' biochemical characteristics. The bacteriocin produced by *Lactobacillus buchneri* was resistant to heating at 100°C during 20 min showing *circa* 15% activity reduction, also observed in the bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* when subjected to similar heating conditions. The highest activity for both bacteriocins were observed at pH 3.0 to 4.0. It was concluded that both properties favor the bacteriocin application in high acid foods.

The ability to inhibit *Listeria monocytogenes* growth as well as their heat resistance suggested that the bacteriocins belong to Group II (no-lantibiotics), Class IIa. Even though, it is necessary to determinate their aminoacid sequence and molecular weight in order to confirm this classification.

The studied bacteriocins kept their antimicrobial activity during storage at 4°C for 10 days, therefore it can be assumed that these compounds can be applied to foods under refrigeration conditions.

They were adsorbed by their producing cells in a pH range from 5.5 to 6.5. This property could be used to improve their diffusion, preventing cell adsorption when applied in foods by *in situ* production.

A primary production pattern was observed for both bacteriocins. Production under the experimental conditions was related to microbial growth, favored by a nitrogen atmosphere. With respect to production temperature, 30°C was the optimum for *Lactobacillus buchneri* and 35°C for *Lactobacillus paracasei*. It was also observed that 1% Tween 80 increased the recovery rate of both bacteriocins.

Although the studies at laboratory level cannot fully explain production, activity and stability dynamics for these bacteriocins in food systems preservation, these results can contribute towards a more efficient use of bacteriocins in foods by *in situ* production as well by the use of the purified compounds.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	I
Resumen	VI
Summary	IX
Índice general	XII
Índice de tablas	XVII
Índice de figuras	XIX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Bacterias lácticas	3
2.1.1 Taxonomía	3
2.1.2 Selección de bacterias lácticas para fines de conservación de los alimentos	5
2.1.3 Metabolitos y mecanismos de inhibición microbiana	9
2.1.4 Conservación de la carne fresca y procesada por adición de ácidos orgánicos de origen químico y microbiano	13
2.2 Bacteriocinas	16
2.2.1 Clasificación y características bioquímicas	16
2.2.2 Determinantes genéticas	24
2.2.3 Purificación	28
2.2.4 Producción en reactores biológicos	31
2.2.5 Conservación de la carne fresca y procesada	35
2.3 Aspectos normativos en el uso de las bacterias lácticas y las bacteriocinas en los alimentos	40
3. JUSTIFICACIÓN	42
4. ANTECEDENTES	44
5. OBJETIVOS	45
6. MATERIALES Y MÉTODOS	46
6.1 Cepas de bacterias lácticas	46

6.2 Identificación	47
6.3 Evaluación de la sensibilidad a las bacteriocinas	48
6.3.1 Técnica turbidimétrica	50
6.3.2 Técnica de difusión en agar: efecto del medio de cultivo, concentración de agar y surfactante en el halo de inhibición	51
6.3.3 Sensibilidad de <i>Listeria monocytogenes</i>	54
6.4 Obtención de las bacteriocinas	56
6.5 Concentración de las bacteriocinas	57
6.5.1 Precipitación con sulfato de amonio	57
6.5.2 Diálisis	59
6.5.3 Determinación de la concentración de proteína	60
6.6 Caracterización bioquímica	60
6.6.1 Estabilidad a diferentes temperaturas de almacenamiento	60
6.6.2 Determinación del pH óptimo de actividad	60
6.6.3 Determinación de la resistencia térmica	61
6.6.4 Determinación del pH de adsorción	61
6.6.5 Efecto de diferentes concentraciones de bacteriocina y determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en <i>Listeria monocytogenes</i>	63
6.7 Efecto de parámetros extrínsecos en la producción de las bacteriocinas	64
6.7.1 Medios de cultivo para bacterias lácticas	65
6.7.2 Temperatura	66
6.7.3 Atmósferas gaseosas	67
6.7.4 Concentración de surfactante	68
6.8 Pruebas preliminares de producción de bacteriocinas en un biorreactor	69
6.8.1 Efecto del pH en la actividad de las bacteriocinas producidas en un biorreactor	69

6.8.2 Determinación preliminar del patrón de producción	71
6.9 Diseño experimental y análisis estadístico	71
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
7.1 Selección de las cepas productoras de bacteriocinas	73
7.2 Selección de las cepas sensibles	74
7.2.1 Selección de las cepas sensibles por turbidimetría	74
7.2.2 Evaluación del efecto del medio de cultivo, concentración de agar y surfactante en los halos de inhibición	76
7.2.3 Inhibición de bacterias lácticas	79
7.2.4 Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i>	82
7.3 Concentración de las bacteriocinas	88
7.3.1 Concentración por precipitación con sulfato de amonio	88
7.4 Caracterización bioquímica	91
7.4.1 Estabilidad a diferentes temperaturas de almacenamiento	91
7.4.2 Determinación del pH óptimo de actividad	94
7.4.3 Determinación de la resistencia térmica	95
7.4.4 Evaluación del pH de adsorción	98
7.4.5 Efecto de diferentes concentraciones de bacteriocina sobre <i>Listeria monocytogenes</i> y determinación de la MIC	101
7.5 Efecto de parámetros extrínsecos en la producción de las bacteriocinas	105
7.5.1 Medios de cultivo para bacterias lácticas	105
7.5.2 Temperatura	110
7.5.3 Concentración de surfactante	111
7.5.4 Atmósferas gaseosas	113
7.5.5 Pruebas preliminares en un biorreactor	115
7.5.5.1 Efecto del pH en la producción de bacteriocinas en un biorreactor	115
7.5.5.2 Estudios preliminares de producción de bacteriocinas en un biorreactor	118

8. CONCLUSIONES	124
9. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	126
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
ANEXO I	142
Determinación de la concentración de proteína	142
Curva patrón de proteína	143
ANEXO II	144
Curvas de densidad óptica, ufc/mL y peso seco	144
ANEXO III	146
Pruebas preliminares de selección de cepas sensibles:	
Análisis turbidimétrico a 640 nm	146
ANEXO IV	149
Efecto en el halo de inhibición de nisina producida por <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454 empleando <i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-813 como cepa sensible: Análisis de varianza	149
ANEXO V	150
Efecto en el halo de inhibición de nisina producida por <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454 empleando <i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-813 como cepa sensible: Comparación múltiple de medias de Duncan	150
ANEXO VI	151
Efecto de diferentes valores de pH (con el empleo de soluciones amortiguadoras 5 mM) sobre el diámetro del halo de inhibición de <i>Lactobacillus hilgardii</i> NRRL B-1139	151
ANEXO VII	152
Efecto de variables extrínsecas en la producción de bacteriocinas por <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i> : Análisis de varianza	152
ANEXO VIII	155
Efecto de variables extrínsecas en la producción de bacteriocinas por <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i> : Comparación múltiple de medias de Duncan	155

ANEXO IX	158
Efecto del pH en la producción de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i> : Análisis de varianza	158
ANEXO X	159
Efecto del pH en la producción de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i> : Comparación múltiple de medias de Duncan	159
ANEXO XI	160
Producción de bacteriocinas en un bioreactor por <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i> : Análisis de varianza	160
ANEXO XII	161
Producción de bacteriocinas en un bioreactor por <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i> : Comparación múltiple de medias de Duncan	161
ANEXO XIII	162
Medios de cultivo	162

INDICE DE TABLAS

Tabla No.	Página
1. Bacterias lácticas asociadas a los alimentos	6
2. Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular obtenidos a partir de bacterias lácticas	9
3. Aplicación de los ácidos orgánicos como conservadores de la carne	13
4. Aplicación de las bacterias lácticas para incrementar la vida media de la carne y productos cárnicos	14
5. Clasificación de algunas bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas	18
6. Espectro inhibitorio de algunas bacteriocinas producidas por distintos géneros de bacterias lácticas	36
7. Bacterias productoras de bacteriocinas	47
8. Cepas de colección empleadas durante el estudio del espectro de inhibición microbiana: características generales y origen	49
9. Resumen de los diseños experimentales y análisis estadísticos ensayados	72
10. Criterios de selección para las bacterias productoras de bacteriocinas	73
11. Bacterias lácticas preseleccionadas con la técnica de	

turbidimetría como sensibles a las bacteriocinas de <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	76
12. Cepas sensibles a las bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	79
13. Prueba de resistencia a la estreptomycinina de diferentes cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> en medio líquido	83
14. Prueba de resistencia a la estreptomycinina de diferentes cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> en medio sólido	84
15. Sensibilidad de diferentes cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> a las bacteriocinas de <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	85
16. Purificación parcial de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus buchneri</i> a una saturación de sulfato de amonio de 60 y 80%	90
17. Purificación parcial de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus paracasei</i> a una saturación de sulfato de amonio de 60 y 80 %	90
18. Actividad de bacteriocina a diferentes valores de pH	94
19. Actividad específica durante la producción de la bacteriocina de <i>Lactobacillus buchneri</i> en un biorreactor	119
20. Actividad específica durante la producción de la bacteriocina de <i>Lactobacillus paracasei</i> en un biorreactor	121

INDICE DE FIGURAS

Figura No.	Página
1. Rutas de fermentación de azúcares por bacterias lácticas	4
2. Modelos para la formación de poros por la nisina	21
3. Regulación/producción de las bacteriocinas del grupo II en la célula	26
4. Esquema para la evaluación de la sensibilidad de cepas lácticas de colección a las bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	49
5. Halos de inhibición obtenidos con la técnica de difusión en agar	80
6. Concentración de la bacteriocina de <i>Lactobacillus buchneri</i> por precipitación con sulfato de amonio a diferentes niveles de saturación (20, 40, 60 y 80%)	88
7. Concentración de la bacteriocina de <i>Lactobacillus paracasei</i> por precipitación con sulfato de amonio a diferentes niveles de saturación (20, 40, 60 y 80%)	89
8. Efecto de la temperatura de almacenamiento a 4°C sobre la actividad de las bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus</i>	

<i>buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	92
9. Efecto de la temperatura de almacenamiento a –20°C sobre la actividad de las bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	93
10. Pérdida de la actividad de las bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i> , sometidas a diferentes temperaturas	96
11. pH de adsorción de la bacteriocina producida por <i>Lactobacillus buchneri</i>	98
12. pH de adsorción de la bacteriocina producida por <i>Lactobacillus paracasei</i>	99
13. Actividad de la bacteriocina producida por <i>Lactobacillus buchneri</i> contra <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994 en crecimiento exponencial	102
14. Actividad de la bacteriocina producida por <i>Lactobacillus paracasei</i> contra <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48 en crecimiento exponencial	103
15. Valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC)	

para las bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus buchneri</i> (con cepa sensible de <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994) y <i>Lactobacillus paracasei</i> (con cepa sensible de <i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48	105
16. Efecto de los medios de cultivo MRS y APT sobre la producción de bacteriocina	108
17. Efecto de diferentes temperaturas en la producción de las bacteriocinas de <i>Lactobacillus buchneri</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	111
18. Efecto de la concentración de Tween 80 (%) sobre la actividad de bacteriocinas	112
19. Efecto de diferentes atmósferas gaseosas sobre la producción de las bacteriocinas	113
20. Actividad de bacteriocina para la cepa de <i>Lactobacillus buchneri</i> a diferentes valores de pH	115
21. Actividad de bacteriocina para la cepa de <i>Lactobacillus paracasei</i> a diferentes valores de pH	116
22. Producción de la bacteriocina de <i>Lactobacillus buchneri</i> en	

un biorreactor	119
23. Producción de la bacteriocina de <i>Lactobacillus paracasei</i> en	
un biorreactor	121

1. INTRODUCCIÓN

La carne fresca roja es un alimento importante en la dieta de los países de Latinoamérica debido a su alto valor nutricional que aporta entre otros compuestos, aminoácidos esenciales como la lisina, la treonina y la histidina, los cuales con frecuencia se encuentran en bajas concentraciones en las proteínas de origen vegetal (Carballo y López, 1991).

La vida útil de este alimento es corta por la gran variedad de microorganismos que pueden crecer en su superficie y acelerar el proceso de descomposición. Para reducir el crecimiento de estos microorganismos en la carne fresca, se han desarrollado varias tecnologías de conservación. La refrigeración es una de las más importantes, sin embargo la carencia de estos sistemas o el inadecuado almacenamiento provocan la exposición de la carne a temperaturas superiores a los 5°C (Guerrero y Taylor, 1994). En estas condiciones se favorece el crecimiento de las bacterias mesófilas productoras de toxii infecciones alimentarias como *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* que pueden dar origen a problemas de salud pública (García y col., 1995). Como una alternativa para el control biológico de esta flora microbiana se ha explorado la posibilidad de aplicar las bacterias lácticas. El efecto de conservación

con el empleo de éstas se debe a la producción de compuestos antimicrobianos como los ácidos orgánicos y las bacteriocinas.

Un aspecto de interés al aplicar esta tecnología es el posible empleo posterior de la carne fresca conservada con bacterias lácticas vía fermentación láctica o con compuestos purificados como las bacteriocinas, en la elaboración de productos cárnicos procesados. De esta forma se abre la posibilidad de reducir el uso de compuestos químicos como los nitritos y los nitratos y satisfacer las exigencias actuales de consumo en los alimentos, que provocan su desplazamiento hacia el uso de los conservadores naturales.

Por lo anterior y para aprovechar todo el potencial de esta tecnología en el incremento de la vida útil de la carne, es necesario realizar estudios sobre el proceso de conservación con bacterias lácticas y sobre sus productos metabólicos con capacidad antimicrobiana, tanto a nivel bioquímico, como microbiológico y tecnológico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 BACTERIAS LÁCTICAS

2.1.1 TAXONOMÍA

Las bacterias lácticas se clasifican en los siguientes géneros, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* y *Carnobacterium* (Schielfler, 1993). Estas bacterias comprenden un número elevado de microorganismos Gram positivos, cuya característica principal es la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos. Las bacterias lácticas son anaerobias o aerotolerantes, no formadoras de esporas, generalmente no móviles, catalasa negativas, no reductoras de nitratos, tolerantes a la presencia de CO₂, nitritos, humo y concentraciones relativamente altas de sal y valores de pH bajos (Salminen y Wright, 1993).

Una característica importante para la clasificación de las bacterias lácticas es su patrón de fermentación. Éste se divide en homo y heterofermentativo de acuerdo con la ruta metabólica seguida y los productos finales formados. Las bacterias lácticas homofermentativas producen ácido láctico a partir de azúcares de seis carbonos (ruta de Embden-Meyerhof). A diferencia de éstas, las bacterias lácticas heterofermentativas tienen la capacidad de utilizar diferentes rutas metabólicas y producen además de ácido láctico, compuestos como CO₂, ácido acético, acetaldehído, diacetilo y etanol por la ruta de la fosfoacetolasa (Sharpe y Pettipher, 1983).

Un esquema de las rutas metabólicas de las bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas se muestra en la Figura 1

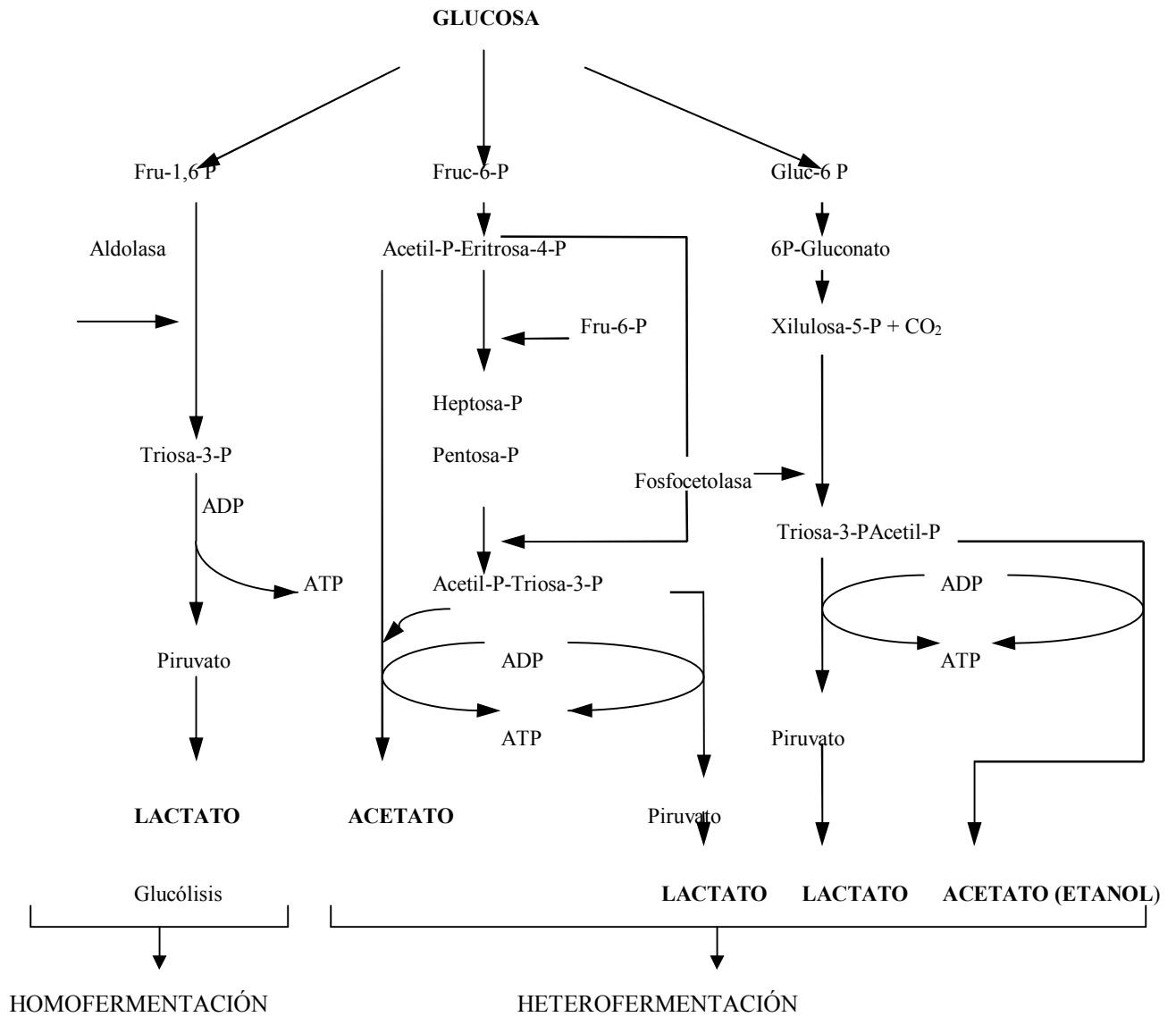


Figura 1. Rutas de fermentación de azúcares por bacterias lácticas (Kandler, 1983).

La temperatura óptima de crecimiento es otra característica importante de las bacterias lácticas. Salminen y Wright (1993) reportan un intervalo de temperatura de crecimiento de 10°C a 45°C.

2.1.2 SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS PARA FINES DE CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Una parte de los estudios llevados a cabo sobre las bacterias lácticas para aplicarlas en la conservación de los alimentos está enfocado hacia el aislamiento de bacterias capaces de producir compuestos antimicrobianos, como las bacteriocinas (Spelhaug y Harlander, 1989; Carminati y col., 1989; Harris y col., 1989; Piard y col., 1992; Stoffels y col., 1992; Vaughan y col., 1994; Hugas y col., 1995). De entre los diferentes microorganismos, las bacterias lácticas son las candidatas idóneas para producir bacteriocinas factibles de aplicarse en los alimentos (Sección 2.2.5) porque son reconocidas como generalmente seguras (GRAS por sus siglas en inglés).

El aislamiento de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas se realiza a través de un escrutinio de microorganismos en el sistema sujeto a estudio, por ejemplo un alimento, donde se separan éstas de la flora nativa o de otro origen, con el empleo de un medio de cultivo selectivo. Este proceso se realiza comúnmente empleando una serie de técnicas microbiológicas, como la siembra por estría. La posterior selección de las colonias aisladas permite ir separando las diferentes colonias de los microorganismos de interés. En la Tabla 1 se presentan las bacterias lácticas más comunes encontradas en diversos alimentos.

Tabla 1. Bacterias lácticas asociadas a los alimentos.

TIPO DE ALIMENTO	BACTERIAS LÁCTICAS COMUNES
<u>LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS</u>	
Quesos duros Queso cotagge	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> y subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> y subsp. <i>lactis</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Mantequilla fermentada, quesos con ojos	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> y subsp. <i>lactis</i> y var. <i>diacetylactis</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Queso tipo suizo	<i>Lactobacillus delbureckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lactobacillus helveticus</i>
Productos lácteos en general	<i>Lactobacillus brevis</i> ; <i>Lactobacillus buchmerii</i> ; <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> ; <i>Lactobacillus fermentum</i> ; <i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Yogurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> susp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>diacetylactis</i>
Leche ácida Kefir	Lactobacillus acidophilus <i>Lactobacillus kefir</i> ; <i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>
<u>CARNE</u>	
Cruda	<i>Carnobacterium divergens</i> ; <i>Carnobacterium piscicola</i> ; <i>Lactobacillus sake</i> ; <i>Lactobacillus curvatus</i> ; <i>Leuconostoc carnosum</i> ; <i>Leuconostoc gelidum</i>
Semi-conservada	<i>Lactobacillus viridescens</i> ; <i>Leuconostoc carnosum</i> , <i>Leuconostoc gelidum</i> <i>Carnobacterium divergens</i> ; <i>Carnobacterium piscicola</i>
Carne fermentada	<i>Pediococcus acidilactici</i> ; <i>Pediococcus pentosaceus</i> ; <i>Lactobacillus sake</i> ; <i>Lactobacillus curvatus</i> ; <i>Lactobacillus farciminis</i>
<u>PESCADO</u>	
Productos de pescado marinados	<i>Lactobacillus alimentarius</i> ; <i>Carnobacterium piscicola</i>
<u>VEGETALES FERMENTADOS</u>	
Pepinillos, col agria	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; <i>Lactobacillus bavaricus</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i> ; <i>Lactobacillus sake</i> ; <i>Lactobacillus plantarum</i>
Olivos	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; <i>Lactobacillus pentosus</i>
Salsa de soya	<i>Pediococcus halophilus</i>
Masas agrias	<i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i> ; <i>Lactobacillus amylovorus</i> ; <i>Lactobacillus reuteri</i> ; <i>Lactobacillus fermentum</i>
Vino (fermentación maloláctica)	<i>Leuconostoc oenos</i>

Wood y Holzapfel, 1996

Refiere Stiles (1996) una serie de características que deben reunir las bacterias lácticas para aplicarlas en la conservación de la carne. Las mejores candidatas provienen generalmente de la flora nativa de diversos sustratos alimentarios.

Se ha observado que estas bacterias presentan las mejores condiciones para crecer y predominar sobre la flora nativa del alimento cuando son empleadas en la conservación. Este predominio está asociado a la producción de compuestos antimicrobianos como los ácidos orgánicos (láctico y acético) y las bacteriocinas, además de determinantes genéticas favorables, producto de una selección natural (Stiles, 1996).

En la selección de las bacterias lácticas para conservar alimentos es necesario considerar sus características intrínsecas. Estas bacterias deben ser capaces de presentar un crecimiento abundante en sistemas reales, para competir con la flora nativa. La temperatura y pH óptimos de crecimiento son variables que influyen en su predominio sobre otras poblaciones bacterianas en un sistema determinado. Por ejemplo, Stiles (1996) menciona que son pocas las bacterias lácticas capaces de presentar un crecimiento adecuado en las temperaturas de refrigeración y concluye que *Carnobacterium piscicola* y *Leuconostoc gelidum* son de las pocas bacterias lácticas que presentan esta condición.

Otros criterios se refieren a la producción de compuestos antimicrobianos. En el caso del empleo de cepas productoras de bacteriocinas, estas deben obtenerse en

un período corto de tiempo, durante las primeras fases de crecimiento, para generar un efecto conservador al reducir el crecimiento de la flora microbiana indeseable. Además las bacteriocinas deben ser activas y estables en los alimentos (Stiles, 1996).

En carnes, para evitar cambios negativos en algunas propiedades sensoriales como la textura, el sabor y la jugosidad, se recomienda que las bacterias lácticas empleadas tengan un patrón de fermentación homoláctico para no producir ácido acético y CO₂, además de no producir polisacáridos y tener una débil actividad proteolítica y lipolítica. Tampoco deben generar la formación de aminas biogénicas, como por ejemplo tiramina e histamina (Huss y col., 1995).

Una vez que se aísla una cepa láctica prometedora como bioconservadora, es necesario realizar la identificación. Los métodos bioquímicos de identificación a través de pruebas como las API, están siendo desplazados por técnicas moleculares. Actualmente se emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar un segmento de ADN específico de hasta 6 kb. La técnica emplea una muestra de ADN desnaturalizado que se incuba en presencia de ADN polimerasa y dos oligonucleótidos iniciadores que dirigen a la ADN polimerasa en la síntesis de nuevas hebras complementarias. Generalmente con cada uno de estos ciclos se dobla la cantidad de ADN. Veinticinco ciclos pueden aumentar la cantidad de secuencia en aproximadamente un millón de veces. El ADN amplificado puede caracterizarse por diversas técnicas como la transferencia, el análisis de RFLP y la

secuenciación directa. Las empresas comerciales que se dedican a la identificación de bacterias lácticas, emplean una base de datos con secuencias de genes de bacterias conocidas para determinar el género y la especie de microorganismos desconocidos (Voet, 1992)

2.1.3 METABOLITOS Y MECANISMOS DE INHIBICIÓN MICROBIANA

Varios son los productos metabólicos de las bacterias lácticas que presentan actividad antimicrobiana y cada uno de estos compuestos tiene características bioquímicas que determinan su mecanismo de inhibición microbiana y el espectro de microorganismos sobre los que actuarán. Un resumen sobre estos compuestos, sus mecanismos de inhibición y los microorganismos sensibles se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular obtenidos a partir de bacterias lácticas.

COMPUESTO	MICROORGANISMOS PRODUCTORES	MICROORGANISMOS SENSIBLES
Ácido láctico Ácido acético	Todas las bacterias lácticas Bacterias lácticas heterofermentativas	Todos los microorganismos Todos los microorganismos, dependientes del pH
Alcoholes	Levaduras, bacterias lácticas heterofermentativas	Todos los microorganismos
Dióxido de carbono	Bacterias lácticas heterofermentativas	La mayoría de microorganismos
Diacetilo	<i>Lactococcus</i> sp.	Levaduras, bacterias Gram (-) a concentraciones ≥ 200 ppm, bacterias Gram (+) a concentraciones ≥ 300 ppm
Peróxido de hidrógeno	Todas las bacterias lácticas	Todos los microorganismos
Reuterina	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Amplio espectro: bacterias Gram (+), bacterias Gram (-), hongos
Sidosporas	Algunas bacterias anaerobias facultativas, la mayoría de las aerobias, incluyendo	Microorganismos dependientes de la molécula de hierro

Ácido benzoico	<i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Staphylococcus</i> sp.	
Ácido mevalónico	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pantonea agglomerans</i> (bacteria Gram (-), <i>Fusarium avenaceum</i>)
Lactona		
Metilhidantoina		
Microgard (Rodhin)	<i>Propionibacterium shermanii</i>	La mayor parte de bacterias Gram (-), levaduras, hongos
Bioprofit (Valio, Helsinki, Finlandia)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>Shermanii</i>	Amplio espectro: hongos, levaduras, bacterias lácticas heterofermentativas, <i>Bacillus</i> sp., bacteria Gram (+)

Haelander y col., (1997)

Los ácidos orgánicos son los principales compuestos que se emplean en la conservación de alimentos, su mecanismo de inhibición es bien conocido.

Brul y Coote (1999) mencionan que el efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos está relacionado directamente con la estructura no disociada de la molécula, siendo ésta capaz de difundirse a través de la membrana celular y disociarse en su interior para provocar la muerte de la célula. Varios autores refieren que los ácidos interfieren con el mantenimiento del potencial de membrana e inhiben el transporte activo (De Vuyst y Vandamme, 1994). Estos ácidos en su forma no disociada son 10-600 veces más efectivos como agentes antimicrobianos que en su forma disociada, la cual reporta Haelander y col. (1997) está determinada directamente por el pH del alimento. Para favorecer la forma no disociada de los ácidos orgánicos son necesarios valores de pH cercanos o menores al pK del ácido (Gottschalk, 1986). Con respecto a la inhibición microbiana, Ziauddin y col. (1993) mencionan en un estudio *in vitro* que el ácido láctico inhibe a algunas bacterias patógenas y de descomposición de los alimentos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Las bacterias lácticas producen peróxido de hidrógeno, que tiene efecto bactericida por que es altamente oxidante, provocando la peroxidación de los lípidos de la membrana celular y la destrucción de la estructura básica de proteínas celulares (Dahly y col., 1989).

El diacetilo es un producto de las bacterias lácticas fermentadoras de citrato (Hugenholtz, 1993) responsable del sabor y aroma a mantequilla. Se produce por una gran variedad de géneros de microorganismos como *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Es un compuesto que presenta un efecto antimicrobiano a concentraciones elevadas (Tabla 2), principalmente inhibe a microorganismos Gram negativos, levaduras y mohos (Jay, 1982). El mecanismo de inhibición está basado en la reacción del grupo α - α' -dicarbonilo de la molécula con la porción guanido del aminoácido arginina en enzimas microbianas (alcohol deshidrogenasa, adenilato ciclasa, glutamato deshidrogenasa y transcetolasas) desactivándolas debido a que bloquea o modifica su centro catalítico (Lindgren y Dobrosgosz, 1990).

Se ha reportado que el acetaldehído a concentraciones de 44 ppm puede reducir el crecimiento de *Escherichia coli* (Egyand, 1967). Sin embargo es poca su contribución a la reducción del crecimiento microbiano en sistemas alimentarios.

El etanol es producido por las bacterias lácticas heterofermentativas y produce la deshidratación de la membrana celular al extraer los lípidos y reducir su permeabilidad (Haelander y col., 1997). Este autor menciona que la producción por bacterias lácticas es escasa.

La reuterina es un compuesto producido específicamente por *Lactobacillus reuteri* que se encuentran principalmente en el tracto gastrointestinal humano y en algunos productos cárnicos. Este compuesto presenta un amplio intervalo de inhibición, es activo contra microorganismos como *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y algunos protozoos como *Trypanosoma*. Actúa inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa, lo que puede explicar su amplio espectro de inhibición (Axelsson y col., 1989).

También las bacterias lácticas producen CO₂ que se utiliza como inhibidor de crecimiento microbiano, aunque se desconoce con exactitud el mecanismo antagónico. En general las investigaciones realizadas concluyen que el CO₂ produce un incremento en la fase de latencia y del tiempo de generación de los microorganismos de descomposición (García y col., 1995).

Recientemente ha despertado interés otro grupo de compuestos producidos por algunas especies de bacterias lácticas, las bacteriocinas.

Una descripción más amplia sobre estos compuestos se da en la Sección 2.2. El mecanismo inhibitorio de las bacteriocinas se basa en la formación de poros en la membrana citoplásmica de células sensibles (Klaenhammer, 1993) provocando la pérdida de iones K^+ , ATP y en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas. Esta pérdida origina la disminución en el potencial de la membrana, consumo de reservas energéticas celulares y descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas que provocan finalmente la muerte de la célula (Bruno y Montville, 1993).

2.1.4 CONSERVACIÓN DE LA CARNE FRESCA Y PROCESADA POR ADICIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS DE ORIGEN QUÍMICO Y MICROBIANO

Recientemente ha surgido un auge hacia el consumo de alimentos mínimamente procesados y conservados en la forma más natural posible. A este respecto la obtención de ácidos orgánicos a través de fuentes microbianas puede ser una alternativa nueva con perspectivas de desarrollo en la conservación de alimentos como la carne. En la Tabla 3 se muestra un resumen de estudios realizados empleando ácidos orgánicos para conservar carne.

Tabla 3. Aplicación de los ácidos orgánicos como conservadores de la carne.

ÁCIDO ORGÁNICO	ESPECIE ANIMAL	MICROORGANISMO INDICADOR	REFERENCIA
Láctico, acético, fórmico, fosfórico	Pollo	<i>Enterobacteriaceae</i>	Mountney y O'Malley, 1965
Acético	Cerdo	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	Biemuller y col., 1973
Acético, propiónico	Cerdo	<i>E. coli</i>	Reynolds y Carpenter, 1974
Láctico, acético, propiónico	Res	<i>Pseudomona</i> sp. <i>Enterobacteriaceae</i>	Modic y col., 1978 Dezeure-Wallys y Vant'Hoof, 1980
Láctico	Res	<i>Enterobacteriaceae</i>	Robach, 1981
Sórbico	Pollo	<i>Enterobacteriaceae</i>	Leistner, 1983

Cítrico, ascórbico, acético, láctico	Carnero, cabra y res	<i>Enterobacteriaceae</i>	Woolthuis y Smulders, 1985
Láctico	Res, ternera	<i>Campylobacter</i> sp.	Smulders y col., 1986
Láctico	Varias especies	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> sp.	Smulders, 1987
Láctico	Varias especies	<i>Pseudomon</i> sp.	Hamby y col., 1987
Acético, láctico	Res	<i>Pseudomona</i> sp., <i>E. coli</i>	Accuf y col., 1987
Acético, láctico	Búfalo	<i>Salmonella</i> sp.	Surve y col., 1991
Láctico, propiónico	Cerdo	<i>E. coli</i>	Ogden y col., 1995

El elevado costo de los ácidos orgánicos implica una desventaja para su aplicación en la carne, buscándose por este motivo alternativas para su obtención. Se ha reportado la producción de ácido láctico *in situ* con bacterias lácticas, sobre la superficie de la carne como un medio barato y eficiente para la producción de este ácido orgánico (Guerrero y Taylor, 1994). Un resumen de los estudios aplicando estos microorganismos como medio de conservación se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Aplicación de las bacterias lácticas para incrementar la vida media de la carne fresca y productos cárnicos.

BACTERIA LÁCTICA	MICROORGANISMO DE DESCOMPOSICIÓN	CARNE O PRODUCTO CÁRNICO	REFERENCIA
<i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Brochotrix thermosphacta</i>	Embutidos	Roca y Kalman, 1989
<i>Lactobacillus sake</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Staphylococcus warneri</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Streptococcus</i> sp.	<i>Pseudomona</i> sp. <i>Escherichia coli</i>	Embutidos	Montel y Talon, 1993 Vogel y col., 1993
<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Pseudomona</i> sp. Enterobacteriaceae <i>Staphylococcus aureus</i>	Cerdo, res Cerdo Jamón	Guerrero y col., 1995 Minor, 1998 Lowndes y Henriksson, 1999
<i>Lactobacillus sake</i> <i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Listeria innocua</i>	Embutidos Embutidos	Hugas y col. 1999 Pérez-Chabela y col. 2001

Una de las primeras investigaciones en la conservación de carne con bacterias lácticas se llevó a cabo en carne de res, estudiando la viabilidad de aplicación de los diferentes géneros microbianos (Dubois y col., 1979). Estos autores exploraron el uso de bacterias de *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* para

inhibir microorganismos como *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomona putida*, *Pseudomona cepacia* y *Pseudomona fluorescens*, aisladas a partir de carne, concluyendo que las bacterias del género *Streptococcus* y *Lactobacillus* presentaron un mayor poder inhibitorio.

Lindgren y Dobrogosz (1990) señalan que el uso de cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* en embutidos incrementa su vida útil por inhibición de microorganismos de descomposición. Este resultado lo atribuyen a la producción de compuestos como el ácido láctico, asimismo reportaron inhibición debido a la competencia por el sustrato disponible. También en embutidos, Gibbs (1987) reportó inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* al inocular cepas de bacterias lácticas.

Montel y Talon (1993) mencionan inhibición en el crecimiento de *Pseudomonas* sp. y *Brochotrix thermosphacta* en carne envasada al vacío cuando se inocularon bacterias lácticas a concentraciones de 10^7 hasta 10^8 ufc/cm². Se produjo además una reducción en el pH de la carne a valores de 4.0-4.5.

Guerrero y col. (1995) emplearon la fermentación láctica controlada con cepas de *Lactobacillus bulgaricus* y *Pediococcus pentosaceus* y concluyeron que se reduce las poblaciones de *Pseudomonas* en carne de cerdo y res envasada al vacío y almacenada a la temperatura de 25°C.

En la inhibición de microflora indeseable en carnes inoculadas con cepas lácticas seleccionadas pueden influir además de la producción de ácidos orgánicos, otras variables como la competencia por el sustrato disponible y la producción de compuestos como las bacteriocinas

2.2 BACTERIOCINAS

Estos compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas han despertado interés para aplicarse en la conservación de los alimentos. A continuación se da una revisión bibliográfica al respecto.

2.2.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Klaenhammer (1988) refiere que las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana contra especies microbianas relacionadas taxonómicamente. Algunas bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas presentan una serie de características comunes, como la sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas y la tolerancia a temperaturas elevadas y a pH bajo.

Clasificación y síntesis bioquímica. Klaenhammer (1993) propuso grupos para clasificar a las bacteriocinas:

Grupo I. Lantibióticos. Este grupo está integrado por péptidos pequeños que contienen deshidroaminoácidos y tioéter aminoácidos (lantionina y metil-lantionina).

En función de su estructura se pueden subdividir en:

Tipo A. Moléculas anfipáticas, en forma de toroide (2.1 a 3.5 kDa). Contienen de 2 a 7 cargas positivas.

Tipo B. Moléculas globulares (de alrededor de 2 kDa). Tienen carga negativa o neutra.

Grupo II. Péptidos pequeños (<10 kDa) relativamente termoestables, no contienen lantionina. Se dividen en:

Clase IIa. Péptidos activos contra *Listeria monocytogenes* con la secuencia consenso N-terminal Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys.

Clase IIb. Los que necesitan dos péptidos para formar complejos de poración.

Clase IIc. Péptidos con grupos tiol (-SH) activos que requieren de cisteína reducida para activarse.

Grupo III. Proteínas grandes (>30 kDa), termosensibles. Se incluyen enzimas extracelulares bacteriolíticas.

Otros autores como Nissen-Meyer y Nes (1997) mencionan que las bacteriocinas, se pueden clasificar en dos grandes grupos (Tabla 5):

Tabla 5. Clasificación de algunas bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas.

GRUPO I: LANTIBIOTICOS		GRUPO II: BACTERIOCINAS NO MODIFICADAS	
TIPO A	TIPO B	Bacteriocinas de un péptido	Bacteriocinas de dos péptidos
Nisina	Mersacidina	* Bacteriocinas tipo pediocina	Lactococina G
Lactococina S	Actagardina	Pediocina PA1 Leucocina A Savaricina P Mesentericina Y105 Carnobacteriocina BM1 Carnobacteriocina B2 Enterococina A Piscicolina 126	Lactacina F
Subtilina	Cinnamicida		Plataricina E/F
Epidermina	Duramicina		Plataricina J/K
Pep 5			
Gallidermina			
Lacticin 481		* Bacteriocinas distintas a la pediocina	
Epilancin K7		Lactococina A	

Nissen-Meyer y Nes, (1997)

Grupo I. Bacteriocinas modificadas, conocidas como lantibióticos

Estas se dividen en dos grandes subgrupos en base a su estructura:

1.- Lantibióticos tipo A, entre los cuales se encuentra la nisina, la bacteriocina más ampliamente caracterizada. Son moléculas alargadas, con forma de tornillo y anfifílicas, con peso de molecular entre 2 y 5 kDa.

2.- Lantibióticos tipo B, de forma globular y peso molecular de alrededor de 2 kDa.

Grupo II. Bacteriocinas que no sufren modificación alguna, denominadas no lantibióticos.

Bacteriocinas modificadas (Grupo I). Las bacteriocinas modificadas son designadas como lantibióticos porque contienen en su estructura tioéter aminoácidos (lantionina).

La síntesis de las bacteriocinas modificadas (Grupo I) consiste específicamente en la deshidratación de residuos de serina dando aminoácidos α - β -insaturados como la 2,3-dideshidroalanina (Sahl y col., 1995). La lantionina se forma cuando el doble enlace en la 2,3-dideshidroalanina es atacado por el grupo tiol de un residuo de cisteína. La lantionina resultante puede, por lo tanto, ser descrita como la unión de D-alanina (derivada del residuo de serina) y L-lantionina (derivada de un residuo de cisteína), unida por un azufre que forma un enlace tioéter.

La lantionina es similar a la cisteína, puede ser descrita como dos residuos de L-alanina unidos por dos azufres, formando un puente disulfuro.

El enlace tioéter en la lantionina tiene la función de estabilizar la estructura tridimensional de los lantibióticos y es por lo tanto análoga en su función a la realizada en las proteínas por los enlaces disulfuro de las cisteínas.

Los puentes tioéter son más estables que los puentes disulfuro, resultando la lantionina más estable que la cisteína. Los lantibióticos también contienen metil-lantionina, cuya formación es similar a la de la lantionina excepto que deriva de un residuo de treonina en vez de serina.

Otros residuos modificados son la 2,3-dideshidroalanina y la 2,3-didehidrobutirina (2,3-didehidrotreonina). Se ha encontrado que la lactococina S contiene residuos D-alanina en tres posiciones definidas. La conversión de la serina a través de la ruta de la 2,3-didehidroalanina seguida de una hidrogenación estereoespecífica de la alanina podría ser el mecanismo a través del cual un D-aminoácido se forma en una proteína sintetizada en los ribosomas (Sahl y col. 1995).

Los lantibióticos tipo A interactúan con las membranas de las células sensibles y forman poros (Figura 2) por modificación del potencial de membrana (Moll y col. 1996a).

A)

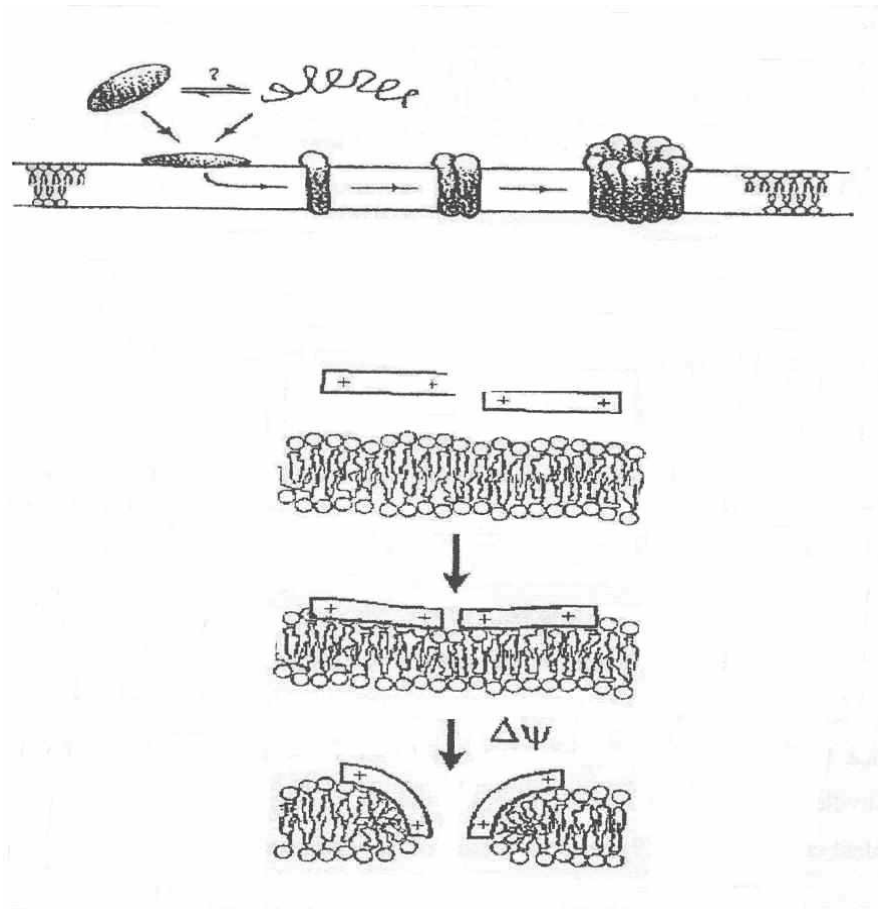


Figura 2. Modelo para la formación de poros por la nisina: A) Un monómero o estructura anfifílica de la nisina se une a la membrana de las células sensibles; después se inserta dentro de la membrana y forma agregados de poros. B) La nisina (catión) se une a fosfolípidos aniónicos en la membrana celular; la nisina se inserta dentro, lo cual provoca la unión de ésta con la superficie de lípidos (Moll, 1996b).

Por el contrario, los antibióticos del tipo B actúan inhibiendo a algunas enzimas.

Por ejemplo la mersacidina y la actagardina (antibiótico del tipo B) actúan

interfiriendo en la síntesis de la pared celular en bacterias Gram positivas (Sahl y col, 1995).

Bacteriocinas no modificadas (Grupo II). Todas las bacteriocinas del grupo II tienen en común que no sufren ninguna modificación posterior a su síntesis ribosómica. Dentro de este grupo, se encuentran dos grandes subgrupos:

- 1.- Las bacteriocinas de un solo péptido. Donde se distingue:
 - Del tipo pediocina
 - Lactococina A
- 2.- Las bacteriocinas formadas por dos péptidos

Las bacteriocinas tipo pediocina contienen entre 36 y 48 residuos, son producidas por una gran variedad de bacterias lácticas y tienen en común una secuencia aminoacídica muy similar. Son hidrofóbicas, catiónicas, muy estables al calor y poseen un marcado efecto inhibitorio frente a *Listeria sp.* (De Vuylts y Vandamme 1994; Nes y col., 1996).

En base a su secuencia primaria, recientemente se han identificado bacteriocinas que se incluyen en este grupo, por ejemplo, las carnobacteriocinas BM1 y B2 (Quadri y col., 1994), la enterocina A (Aymerich y col., 1996) y la piscicolina 126 (Jack y col., 1995).

Todas estas bacteriocinas tienen una similitud secuencial entre 40% y 60% especialmente en la región hidrofílica N-terminal (Aymerich y col., 1996). En todas las bacteriocinas tipo pediocina se tiene una región que contiene dos cisteínas

(unidas por un puente disulfuro) formando una secuencia típica de este grupo de bacteriocinas. A pesar de la estructura primaria similar, las bacteriocinas tipo pediocina difieren en la especificidad de células sensibles a su actividad.

En los péptidos con carácter antimicrobiano frecuentemente se ha observado que a pesar de la similitud entre los péptidos y de tener actividad sobre células sensibles parecidas, se encuentran muchas más diferencias de lo que cabría esperar basándose en la interacción entre un péptido catiónico anfifílico y los lípidos de la membrana celular. Algunas diferencias en los péptidos pueden producir las diferencias marcadas en su efectividad y la actividad (Nissen-Meyer y Nes, 1997).

La elucidación de los mecanismos que gobiernan la especificidad de los péptidos y la susceptibilidad de las células sensibles a la actividad de aquellos es uno de los mayores retos de la investigación en este campo, por la importancia que tendría la aplicación como agentes antimicrobianos en los alimentos.

La composición lipídica de la membrana celular atacada es un factor importante que determina la susceptibilidad de la misma. Finland y col. (1996) estudiando bacteriocinas híbridas construídas por ellos, pusieron de manifiesto que la región C-terminal es determinante de los sitios sensibles de la célula para bacteriocinas del tipo de las pediocinas. Esta región es la que interactúa con la membrana cambiando la perforación de la misma (Chikindas y col., 1993).

En el grupo II también se incluye bacteriocinas no modificadas distintas del tipo de las pediocinas, por ejemplo la lactococina A, péptido catiónico de 55 residuos que permea a la membrana (Holo y col., 1991; Van Belkum y col., 1991).

Las bacteriocinas de dos péptidos, como su nombre lo indica, consisten en dos péptidos catiónicos diferentes entre sí, de 25-40 residuos cada uno. Para desarrollar su actividad antibacteriana se requiere la presencia de ambos en forma simultánea, la actividad antimicrobiana óptima se obtiene cuando los dos péptidos están presentes en cantidades equivalentes. La lactococina G fue la primera bacteriocina de este tipo que se aisló y caracterizó (Nissen-Meyer y col., 1992). Estas bacteriocinas forman canales selectivos para potasio en la membrana de la célula sensible (Moll y col., 1996b). Los dos péptidos contienen regiones que les confieren carácter anfifílico al adquirir una estructura α -helicoidal. Los estudios de dicroísmo circular han mostrado que estas regiones adoptan la estructura α -helicoidal cuando los dos péptidos interactúan entre sí en presencia de micelas de las membranas del tipo de las células sensibles (Nissen-Meyer y Nes, 1997).

2.2.2 DETERMINANTES GENÉTICAS

Se han reportado estudios para dilucidar el proceso de producción en la célula de las diferentes bacteriocinas. Nes y col. (1996) refieren la existencia de al menos cuatro

genes (cinco para las bacteriocinas de dos péptidos) requeridos para la producción de bacteriocinas no modificadas. Estos genes son:

- 1.- El gen estructural (dos genes estructurales para las bacteriocinas de dos péptidos) a partir del cual se produce la transcripción de la información genética.
- 2.- El gen de la inmunidad, que codifica una proteína que protege a la cepa productora contra su propia bacteriocina.
- 3.- El gen que codifica la producción de un transportador asociado a la membrana, que transfiere la bacteriocina a través de la misma.
- 4.- El gen que codifica una proteína complementaria necesaria para la secreción de la bacteriocina.

Las prebacteriocinas sintetizadas contienen una secuencia líder con 15-30 residuos y una secuencia consenso específica que es la que contiene el grupo glicina-glicina común, a todas ellas (Klaenhammer, 1993). Las proteínas de inmunidad para la lactococina A y la carnobacteriocina B2 han sido aisladas y una fracción celular de dicha proteína ha sido detectada en asociación con la membrana celular (Niseen-Meyer y col. 1993; Venema y col., 1994; Quadri y col., 1995). No obstante no se ha dilucidado la forma en que las proteínas de inmunidad dan la resistencia contra la bacteriocina.

Se ha observado que la producción de algunas bacteriocinas del grupo II (como la plantaricina C11 de *Lactobacillus plantarum*, la sacaricina A, la sacaricina P y posiblemente la carnobacteriocina B2) son reguladas en su transcripción por un sistema de transducción que consiste de tres componentes (Nes y col., 1996):

- 1.-Un factor de inducción
- 2.-Una histidina proteín-kinasa
- 3.-Un regulador de respuesta

El factor de inducción es un polipéptido tipo bacteriocina con la secuencia inicial glicina-glicina y posiblemente es transportado a través de la membrana al exterior mediante un sistema de transporte tipo ABC. En la Figura 3, se presenta un esquema de producción de las bacteriocinas del tipo II en la célula.

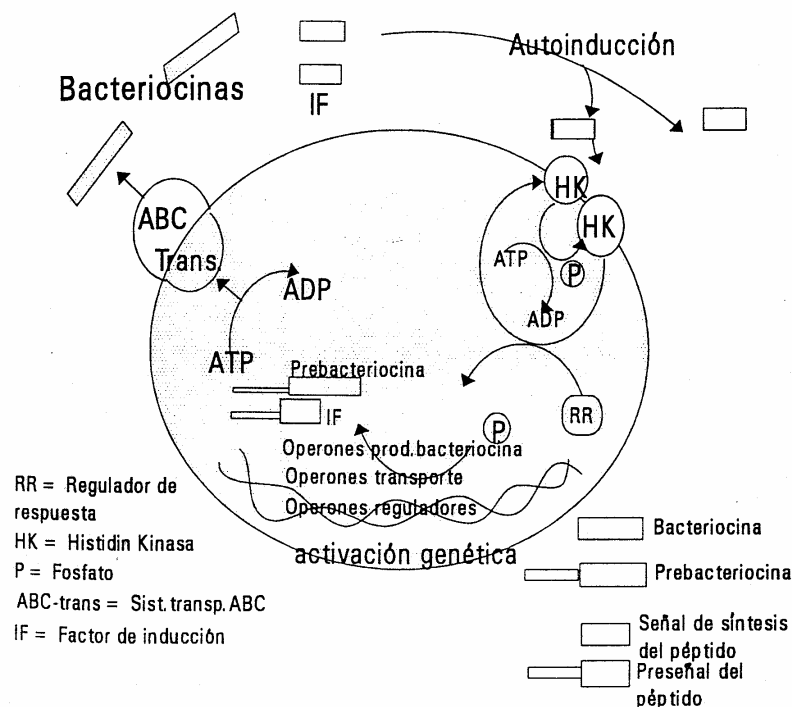


Figura 3. Regulación/producción de las bacteriocinas del grupo II en la célula (Nes y col. 1996).

Al igual que las bacteriocinas del grupo II, los lantibióticos son sintetizados como prepeptidos con una secuencia inicial en la zona N-terminal (Sahl y col. 1995). Dicha secuencia es aniónica y forma una hélice anfifílica, lo que hace posible mantener la bacteriocina inactiva hasta la secreción al exterior, facilitando la interacción con el transportador tipo ABC de membrana.

En el operón de los lantibióticos existen genes que codifican los siguientes procesos (Sahl y col. 1995):

- 1.- Una o más proteínas que proveen de inmunidad a la célula productora
- 2.- Un transportador específico de membrana tipo ABC
- 3.- Una serín-proteasa que posiblemente separa la secuencia inicial
- 4.- Una o dos proteínas que catalizan la deshidratación y la formación de los anillos en la lantionina.
- 5.- Proteínas reguladoras de dos componentes. Estas proteínas transmiten una señal al exterior de la célula que induce la expresión de la bacteriocina. Se ha visto que la propia nisina actúa como la señal extracelular que induce la expresión de su propio gen a través de proteínas reguladoras de dos componentes.

2.2.3 PURIFICACIÓN

Se han empleado varios métodos para la purificación de las bacteriocinas. Uno de ellos es utilizado para recuperar bacteriocinas del tipo no lantibióticos. Autores como Berridge y col. (1952); Yang y col. (1992) y Yang y Ray, (1994) mencionan que esta metodología se fundamenta en la observación de que las moléculas de estas bacteriocina cumplen con las siguientes características:

- a) Son excretadas por las células productoras
- b) Son catiónicas
- c) Son adsorbidas por la superficie celular de la cepa productora y de otras bacterias Gram positivas
- d) La adsorción es dependiente del pH. A pH 6.0 se tiene una adsorción de cerca del 90%, mientras que a pH alrededor de 2.0 la adsorción es cercana al 1%
- e) Se evita la pérdida de actividad al destruir por calor a las células productoras (por posible producción de enzimas proteolíticas)

Esta metodología se ha empleado para la purificación parcial de tres bacteriocinas que no contienen lantionina: la pediocina AcH, la leucocina Lem1 y la sakacina A. Las cepas productoras se crecieron en un medio de cultivo adecuado y las condiciones de fermentación se optimizaron para cada bacteriocina (composición y pH final del medio de cultivo, tiempo, temperatura, etc), seguido de un proceso de pasteurización para destruir a las células productoras. El pH del medio se ajustó a 6.0 para que la bacteriocina fuera adsorbida. Posteriormente la células se recuperaron y resuspendieron en volúmenes pequeños de una solución salina 100 mM (pH 2.0). A 4°C se liberaron las moléculas de bacteriocina de

la superficie celular. Con este procedimiento los rendimientos fueron mayores del 95% a partir de una muestra inicial con una actividad mayor de 10^8 unidades/g. Finalmente se obtuvo un material adecuado para la posterior purificación.

Uno de los esquemas más utilizados en la purificación de las bacteriocinas tipo lantibiótico aprovecha la naturaleza catiónica y la relativa hidrofobicidad de estas moléculas. Este método fue desarrollado por Sahl y Brandis (1981) para la purificación de la Pep5, consiste de una serie de etapas secuenciales de adsorción, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de filtración en gel, las cuales se pueden llevar a cabo con algunas modificaciones, incluyendo la cromatografía líquida de alta presión con una columna de fase reversa (HPLC). Esta metodología ha sido empleada para la purificación de una amplia variedad de bacteriocinas tipo lantibiótico como la subtilina (Schüller y col. 1989), SA-FF22 (Jack y col. 1994), la salivaricina A (Ross y col. 1993), la estafilococina Au-26 (Scott y col. 1992) y la estafilococina 1580 (Sahl, 1994).

Uno de los mayores problemas que presentan este tipo de estudios es el bajo rendimiento de purificación de la bacteriocina, además de ser un proceso lento. Sin embargo algunos autores mencionan que con algunas modificaciones pueden ser más accesibles. Allgaier y col. (1991) desarrollaron un procedimiento viable a nivel comercial para la producción a gran escala de la epidermina y la gallinadermina. Estos autores demostraron que, omitiendo las etapas de HPLC en fase reversa y la

filtración en gel, e incluyendo cromatografía de intercambio aniónico y de interacción hidrofóbica, se pueden obtener mayores concentraciones de las bacteriocinas tipo lantibiótico con rendimientos mayores en hasta un 50% al procedimiento original.

Algunas bacteriocinas que no contienen lantionina han sido también purificadas por métodos que tienen en común el crecimiento de las cepas productoras en un medio de cultivo líquido bajo las condiciones óptimas de producción, la remoción posterior de las células productoras y la precipitación de las bacteriocinas a partir del sobrenadante. Este último paso se realiza empleando sulfato de amonio a diferentes concentraciones (Holo y col., 1991; Muriana y Klaenhammer, 1991; Bhunia y col., 1991; Hastings y col., 1991; Hechard y col., 1992; Holck y col., 1992; Berridge y col., 1992). El precipitado con la bacteriocina es disuelto en agua desionizada o en una solución amortiguadora débil. Las bacteriocinas pueden ser separadas mediante el uso de varios procedimientos como cromatografía de exclusión, de intercambio iónico o hidrofóbica.

Aún cuando esta técnica ha permitido obtener preparaciones altamente purificadas, el rendimiento obtenido se encuentra por debajo del 20% y el proceso implica varios días. Varios autores (Holo y col., 1991, Nissen-Meyer y col., 1993; Tahara y col., 1992) han descrito un método de cuatro etapas para purificar varias bacteriocinas que no contienen lantionina. Esta estrategia implica la precipitación con sulfato de amonio a partir del sobrenadante de un medio de cultivo y la subsecuente

separación de las bacteriocinas empleando cromatografía de fase reversa e intercambio iónico, dando como resultado un incremento en el rendimiento y la actividad específica.

2.2.4 PRODUCCIÓN EN REACTORES BIOLÓGICOS

Otra área de interés en la aplicación de las bacteriocinas en la conservación de los alimentos es su producción en reactores biológicos.

Aún cuando la producción empleando sistemas sintéticos es un proceso caro que limita su aplicación en los alimentos, existen posibles alternativas para sistemas reales como los cárnicos.

Una de éstas es la producción *in situ* a través de la fermentación láctica (Guerrero y Taylor, 1994). En este proceso los estudios se enfocan a aquellos aspectos fisiológicos que estén relacionados directamente con la producción de las bacteriocinas, así como los factores que influyen en la actividad y estabilidad antimicrobiana de la misma.

Como se mencionó previamente (Sección 2.1) existen factores extrínsecos que pueden influir en el crecimiento y la producción de las bacteriocinas por parte de las

bacterias lácticas. Los principales son: la temperatura, el pH, las atmósferas gaseosas y la fuente de carbono. A continuación se presenta un resumen de varios estudios sobre la producción de bacteriocinas en biorreactores, enfocándose principalmente en aspectos relacionados al patrón de producción.

Parente y Ricciardi (1994) estudiaron la influencia del pH sobre el crecimiento y la producción de ácido láctico y bacteriocinas de la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140 NWC. El pH óptimo de crecimiento se encontró entre 6.0 y 6.5 y la producción de la bacteriocina mostró una cinética de metabolito primario.

Parente y Ricciardi, (1994) evaluaron la producción de la bacteriocina de *Enterococcus faecium* DPC1146 en una fermentación en lotes, con un medio de cultivo formado por (g/L): glucosa (10), triptona (7.5), hidrolizado de caseína (5), extracto de levadura (2.5), KH_2PO_4 (5), Tween 80 (2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.25), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.05) a pH 5. La bacteriocina se produjo durante el crecimiento exponencial mostrando una cinética de metabolito primario. Esta producción se detuvo al final de la fase exponencial y la actividad antimicrobiana disminuyó. El pH óptimo de producción fue de 5.5.

Por su parte, Kaiser y Montville (1993) produjeron la bacteriocina bavaricina MN de *Lactobacillus bavaricus* en medio de cultivo APT. El cultivo en lotes se mantuvo a

pH 6.0 y 30°C. Mencionan estos autores que la adición de 3 g/L de extracto de carne de res al medio de cultivo causó un incremento en la velocidad de crecimiento y en la producción de la bacteriocina aunque establecieron que la actividad de la bacteriocina se redujo de 3200 UA/mL a 800 UA/mL a las 76 h.

Coventry y col. (1996) reportaron un estudio sobre la bacteriocina brevicina 286 producida por *Lactobacillus brevis* VB286, aislada de carne empacada al vacío. En su estudio determinaron que la producción de la bacteriocina fue óptima durante el crecimiento exponencial a 20°C. Las mayores velocidades de crecimiento celular se presentaron entre los 30 y 37°C.

Parente y Hill (1992) determinaron que la producción de la bacteriocina enterocina 1146 de *Enterococcus faecium* DPC fue influenciada por el pH, la presencia de extracto de levadura y Tween 80 y, en menor grado, por el pH inicial del medio de cultivo.

Otro aspecto de los estudios de la producción de las bacteriocinas es el desarrollo de modelos matemáticos. Lejeune y col. (1998) desarrollaron un modelo para describir la producción de amilovorina L471 de *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 en medio de cultivo MRS. El objetivo del estudio fue generar un modelo empírico para evaluar el crecimiento microbiano y la producción de la bacteriocina. Los

parámetros se determinaron a partir de fermentaciones con glucosa inicial a diferentes concentraciones (5, 30, 40 y 60 g/L). Además se evaluó la temperatura (30, 37 y 45°C). El modelo pudo describir el crecimiento y la producción de la bacteriocina. La producción específica varió considerablemente con la temperatura de operación, siendo la mejor a 30°C.

Vignolo y col. (1994) evaluaron la producción de lactocina 705 de *Lactobacillus casei* CRL 705 aislada de embutidos. La máxima actividad se obtuvo en medio MRS a pH 6.5-7.5. Los autores encontraron que se obtienen mayores concentraciones de bacteriocina con la adición de Tween 80 (0.5-2.0%), glucosa (2.0%), triptona (1.0%), y extracto de levadura (2.0%). La producción de la bacteriocina no disminuyó en presencia de NaCl 3% y NaNO₂ (0.02%). La lactocina 705 es estable al pH y temperatura de maduración (pH 5.0-6.0 y 15°C) de embutidos curados y secos.

Balasubramanyam y Varadaraj (1998) estudiaron la producción de la bacteriocina de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFR en medio de leche. Encontraron que la producción de esta bacteriocina se presentó durante la fase logarítmica y los inicios de la estacionaria y concluyeron que las condiciones óptimas de producción fueron un tiempo de incubación de 48 h a 37°C.

2.2.5 CONSERVACION DE LA CARNE FRESCA Y PROCESADA

La tendencia actual en la conservación de los alimentos es reducir el empleo de agentes químicos. La atención se ha centrado en conservadores naturales, como las bacteriocinas. En la Tabla 6 se muestran algunas de las bacteriocinas más comunes producidas por distintos géneros de bacterias lácticas y su espectro de inhibición.

Tabla 6. Espectro inhibitorio de algunas bacteriocinas producidas por distintos géneros de bacterias lácticas.

BACTERIOCINAS	MICROORGANISMO PRODUCTOR	MICROORGANISMOS INHIBIDOS	REFERENCIA
<i>Lactococcus sp.</i>			
Lactostrepticinas	L. lactis sp. lactis y cremoris	<i>Lactococcus sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>L. helveticus</i>	Kozak y col., 1978
Diplocina	L. lactis sp. cremoris 346	<i>Lactococcus sp.</i>	Davey, 1984
Lactococinas B y M	L. lactis sp. lactis y cremoris	No determinado	Van Belkum y col., 1989
Lactococina A	L. lactis sp. lactis	<i>Lactococcus sp.</i>	Holo y col., 1991
Nisina	<i>L. lactis</i> sp. CNRZ 481	Bacterias gram positivas	Gireesh y col., 1992
Lacticina 481		Bacterias lácticas, <i>Cl. tyrobutyricum</i>	Piard y col., 1992
	<i>L. helveticus</i> LP27		
	<i>L. acidophilus</i> N2		
<i>Lactobacillus sp.</i>			
Lactocina 27	<i>Lactobacillus sake</i> 706	<i>L. helveticus</i> sp.	Upreti y Hinsdill, 1975
Lactacina B	<i>L. casei</i> B80	<i>Lactobacillus sp.</i>	Barefoot y Klaenhammer, 1983 y 1984
Sakacina A	<i>L. helveticus</i> 481	<i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Schillinger y Lucke, 1989
Caseicina A	<i>L. sake</i> LA5	L. casei	Rammelsberg y col., 1990
Helveticina J	<i>L. johnsonii</i> VP111088	L. helveticus, L. acidophilus	Joerger y Klaenhammer, 1990
Lactocina S	<i>L. sake</i> LTH1673	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus</i>	Mortvedt y col., 1991
Lactacina F	<i>L. helveticus</i> V1829	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Muriana y Klaenhammer, 1991
Sakacina P	Lactobacillus brevis	<i>Lactobacillus, L. monocytogenes</i>	Tichacek y col., 1992
Helveticina V-1829	<i>Lactobacillus platarum</i> BF001	L. helveticus, L. bulgaricus	Vaughan y col., 1992
Brevicina 286		<i>Listeria sp.</i>	Coventry y col., 1996
Plataricina F		Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis	Paynter y col. 1997
Acidofilina 801	<i>L. gelidum</i> UAL187	Serratia marcescens, L. helveticus 102	Zamfir y col., 1999
	L. mesenteroides		
	mesenteroides	<i>spp.</i>	
	<i>L. paramesenteroides</i> OX		
<i>Leuconostoc sp.</i>			
Leucocina A		Bacterias lácticas, <i>L. monocytogenes</i>	Harding y Shaw, 1990
Mesenterocina Y105		L. monocytogenes	Hécharde y col., 1992
Leuconocina S	Pediococcus acidilactici	<i>L. monocytogenes, S. aureus, Cl. botulinum</i>	Lewus y col., 1992
	Carniobacterium piscicola		
Otras			
Pediocina		Listeria monocytogenes	Berry y col., 1991
Carnocina UI49		<i>Lactobacillus sp.</i>	Stoffels y col. 1992

Una de las bacteriocinas más usadas en la conservación de los alimentos es la nisina. Esta bacteriocina es aceptada por la FDA como sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS por sus siglas en inglés) (Jung y col., 1992; Hansen, 1994). En la actualidad la nisina se emplea como aditivo alimentario en más de cincuenta países, incluidos los de la Unión Europea (con el número E-234) y en Estados Unidos de América (Delves-Broughton, 1996).

La nisina aplicada mediante aspersion (Ambicina^{MR}, 5,000 UA/mL) ha sido efectiva para descontaminar la superficie de la carne de res (Cutter y Siragusa, 1994). Además la combinación de nitrito y de 1,000 a 10,000 IU/g de nisina es efectiva contra *Clostridium botulinum* y algunas bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en salchichas tipo Frankfurt y en carne cruda (Caserio y col., 1979; Rayman y col., 1983; Chung y col., 1989).

La literatura reporta una serie de estudios sobre el uso de *Pediococcus acidilactici* (Bac+) y pediocina en carne cruda, cocida y productos fermentados (Hugas, 1998). Las pediocinas AcH y PA/1 son más seguras para aplicarse en carne y productos cárnicos que la nisina. Sin embargo, *Pediococcus acidilactici* no es una cepa de la flora nativa de la carne y presenta algunas dificultades para producir bacteriocinas a la temperatura de refrigeración (Hugas, 1998). En estudios realizados *in situ* con carne fresca y salchichas fermentadas, la pediocina ha sido

capaz de reducir o al menos estabilizar la población de *Listeria monocytogenes* (Nielsen y col., 1990; Foegeding y col., 1992).

En salchichas tipo Viena inoculadas en la superficie con *Listeria monocytogenes* y *Pediococcus acidilactici* y almacenadas a 4°C y 25°C, se encontró que a la temperatura de refrigeración los cultivos bioprotectores no fueron capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria patógena, pero a 25°C en las muestras inoculadas con *Pediococcus acidilactici* se inhibió *Listeria monocytogenes* (Hugas, 1998).

En embutidos fermentados estilo americano la producción de la pediocina previno el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en condiciones de baja acidez. La actividad de la pediocina no fue afectada por la grasa o las proteínas presentes en los alimentos, mientras que se observó un efecto sinérgico entre la bacteriocina y el ácido láctico (Foegeding y col., 1992). El empleo de la cepa de *Pediococcus acidilactici* productora de pediocina ha sido aprobado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés) para su uso en tocino, con el fin de prevenir el crecimiento de *Clostridium botulinum* y la producción de la toxina botulínica. Este proceso es también adaptado para alimentos refrigerados de baja acidez, como la ensalada de pollo a pH 5.1 (Hutton y col., 1991).

Las bacterias lácticas bacteriocinogénicas psicrótrofas tienen un alto potencial de uso como cepas bioprotectoras de carne y productos cárnicos. Entre otras bacteriocinas producidas por estas cepas se encuentran la sakacina, la curvacina, la bavaricina, la leucocina y la carnobacteriocina. Sin embargo, con excepción de la enterocina A y la lactocina S, estos compuestos no tienen un espectro antimicrobiano equivalente a la nisina o la pediocina PA-1/AcH, aunque la mayoría son activas contra *Listeria monocytogenes* (Hugas, 1998).

En carne de cerdo troceada se evaluó la cepa productora de bacteriocina de *Lactobacillus sake* Lb706 para reducir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Al pH normal de la carne (5.5) la cepa de *Listeria monocytogenes* no creció pero las células permanecieron viables. En carne de cerdo con pH alto (carne de corte oscuro o DFD por sus siglas en inglés) las cepas bacteriocinogénicas redujeron la cuenta microbiana y detuvieron el crecimiento de *Listeria monocytogenes* más eficientemente que la variante de las cepas no productoras de bacteriocinas (Schillinger y Lücke, 1989; Schillinger y col., 1991).

Hugas y col. (1995) reportaron que *Lactobacillus sake* CTC494 redujo la población de *Listeria innocua* en 1.25 ciclos logarítmicos en embutidos fermentados, así como en jamón cocido refrigerado (inoculado a un nivel de 10^2 ufc/g). En carne de pollo

reportan una reducción de 1.2 a 1.5 ciclos logarítmicos durante el almacenamiento por 7 días a 7°C.

2.3 ASPECTOS NORMATIVOS EN EL USO DE LAS BACTERIOCINAS Y LAS BACTERIOCINAS EN LOS ALIMENTOS

En México el empleo de las bacterias lácticas y las bacteriocinas como bioconservadores de los alimentos no es objeto de ninguna reglamentación por parte de las Normas Oficiales. A la fecha los organismos internacionales que hacen referencia al uso de bacterias lácticas en los alimentos son la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) y la Unión Europea. La FDA permite el empleo de bacterias lácticas como cultivos iniciadores en los alimentos, así como su uso como cepas bioprotectoras. La Unión Europea no reglamenta el empleo de cultivos de bacterias lácticas en los alimentos. La reglamentación está controlada en forma interna por cada miembro de la comunidad europea, por ejemplo Dinamarca es uno de los pocos países que tienen una legislación para la adición de microorganismos en los alimentos, que autoriza el empleo de los cultivos lácticos productores de bacteriocinas (Ministerio de Agricultura y Pesquería de Dinamarca, 1997).

Con respecto a las bacteriocinas, la FDA de los Estados Unidos permite el empleo de la nisina y la pediocina como conservadores de los alimentos. De acuerdo con la legislación de la Unión Europea, éstas pueden ser adicionadas a los alimentos en la categoría de conservadores (Parlamento Europeo 1995); la única bacteriocina que ha sido aprobada para emplearse como conservador en los alimentos es la nisina y su uso incluye a alimentos como la sémola, la tapioca, los pudines, los quesos madurados y la crema espesa entre otros (Parlamento Europeo 1995). Se ha establecido la ingesta diaria aceptada (ADI por sus siglas en inglés) de 0.13 mg/kg para la nisina pura con una actividad de 40×10^6 unidades/g (Comité Científico para Alimentos, 1990).

3. JUSTIFICACIÓN

En años recientes la biotecnología alimentaria ha adquirido una gran importancia debido a que ofrece una amplia variedad de alternativas para el desarrollo de nuevos productos alimenticios, así como la generación de nuevas tecnologías de conservación que permiten incrementar la vida útil y conservar las características sensoriales y nutricionales.

Una de las áreas de estudio con amplias perspectivas de desarrollo es la de los conservadores naturales. El empleo de estos compuestos puede satisfacer la demanda de la población de productos más sanos y de mayor calidad. Por otra parte, en un futuro cercano se espera un aumento considerable en el consumo de alimentos orgánicos (donde no se emplean conservadores, insecticidas o fertilizantes químicos) y por tanto la necesidad de realizar su conservación en forma natural.

Uno de los conservadores naturales de importancia lo forman las bacteriocinas. Éstas son péptidos producidos por microorganismos como las bacterias lácticas, que tienen actividad antimicrobiana contra cepas relacionadas taxónicamente con el microorganismos productor (Klaenhammer, 1988). Aunque el espectro inhibitorio de las bacteriocinas está restringido a bacterias Gram positivas algunas

producidas por las bacterias lácticas son activas contra microorganismos patógenos de los alimentos como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (De Vuyst y Vandamme, 1994). Entre sus propiedades bioquímicas se encuentra la estabilidad térmica (bacteriocinas de la Clase IIa) lo que permitiría aplicarlas en combinación con tratamientos térmicos, tienen acción bactericida irreversible, presentan estabilidad en algunos alimentos y son biodegradables.

4. ANTECEDENTES

Como antecedentes a este trabajo se tienen los estudios realizados por el Dr. Victor Kuri Hernández en la Queen's University of Belfast (Irlanda), institución con la que el área ha tenido una colaboración amplia, que dieron como resultado el aislamiento e identificación de bacterias lácticas de productos cárnicos mexicanos con capacidad de producir bacteriocinas (Kuri, 1998). Por su parte en el Área de Bioquímica de Macromoléculas (UAM Iztapalapa) se ha trabajado sobre la conservación de carnes rojas con bacterias lácticas (Guerrero y Taylor, 1994; Guerrero y col., 1995; Minor y col., 2002; Minor y col., 2004). De esta forma ambas líneas de investigación dieron origen al presente estudio.

En esta tesis, de cuatro cepas productoras de bacteriocinas (Tabla 7) se seleccionaron dos: *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*. Los criterios de selección se determinaron a partir de una perspectiva de su empleo posterior en la conservación de alimentos. Por ejemplo, los microorganismos de estudio son bacterias lácticas, se aislaron de productos cárnicos y producen bacteriocinas capaces de inhibir bacterias patógenas.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar el espectro de inhibición microbiana y las características bioquímicas de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* para su posible aplicación como bioconservadores de carnes.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el espectro de inhibición microbiana de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* sobre algunas cepas de colección de bacterias lácticas, patógenas y deterioradoreas de los alimentos.
- Determinar las características bioquímicas de las bacteriocinas producidas por las cepas mencionadas.
- Determinar el efecto de algunos parámetros extrínsecos en la producción de las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*.
- Llevar a cabo un estudio preliminar de la producción de las bacteriocinas de las cepas mencionadas en un biorreactor de 2 L.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS

A partir de cuatro cultivos puros de bacterias productoras de bacteriocinas aisladas de chorizo y carne de cerdo en el Laboratorio Nacional de Salud Pública (México) y el Centro de Investigación de Agricultura y Alimentos (Queen's University of Belfast, Irlanda) por el Dr. Victor Kuri Hernández (Tabla 7), se seleccionaron a *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* como cepas de estudio. Éstas se eligieron por los siguientes criterios: haber sido aisladas de carne, ser bacterias lácticas y tener el mayor espectro de inhibición microbiano (Kuri, 1998). Además el Dr. Kuri, demostró la naturaleza proteica de las bacteriocinas mediante el empleo de enzimas (proteasas).

Tabla 7. Bacterias productoras de bacteriocinas.*

CEPA DE COLECCIÓN	ORIGEN	CARACTERÍSTICAS
<i>Enterococcus</i> sp. (76)	Queen's University of Belfast, Irlanda	Gram positiva, productora de bacteriocina
<i>Enterococcus</i> sp. (29)	Queen's University of Belfast, Irlanda	Gram positiva, productora de bacteriocina
<i>Lactobacillus</i> sp. (133)	Queen's University of Belfast, Irlanda	Gram positiva, productora de bacteriocina
<i>Lactobacillus</i> sp. (22)	Queen's University of Belfast, Irlanda	Gram positiva, productora de bacteriocina
	Queen's University of Belfast, Irlanda	

*Donadas por el Dr. Víctor Kuri Hernández

Las cepas bacterianas se crecieron en caldo de cultivo MRS (deMan, Rogosa y Sharpe, Difco, Detroit, EUA) a pH 7.0, durante 24 h a 37°C. Posteriormente las muestras se almacenaron con glicerol (50% muestra - 50% de glicerol) en viales de 1 mL a – 80°C hasta su uso.

6.2 IDENTIFICACIÓN

En estudios previos se estableció que las dos cepas microbianas de estudio eran bacterias lácticas (Kuri, 1998). Para confirmar esta información y tener la certeza del género y la especie se enviaron a identificar por secuencia ribosomal

16S (PCR) en los laboratorios Midilabs (Newark, Delaware, EUA). Se determinó que las cepas eran *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*.

6.3 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LAS BACTERIOCINAS

Debido a la cantidad de bacterias sobre las que se evaluó la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas, se empleó una prueba turbidimétrica (Benkerroum y col., 1993) para preseleccionar las posibles bacterias sensibles. Posteriormente se confirmó la sensibilidad con la técnica de difusión en agar .

La lista de bacterias, sus características y origen se muestra en la Tabla 8. Éstas se obtuvieron de la colección microbiana del Área de Bioquímica de Macromoléculas (UAM Iztapalapa), así como del cepario del Grupo de Investigación en Microbiología Aplicada de la Universidad de Murcia (España) y del Centro de Investigación en Agricultura y Alimentos de Queen's University of Belfast (Irlanda).

El esquema de las actividades realizadas para evaluar el espectro de inhibición sobre bacterias lácticas de colección se muestra en la Figura 4.

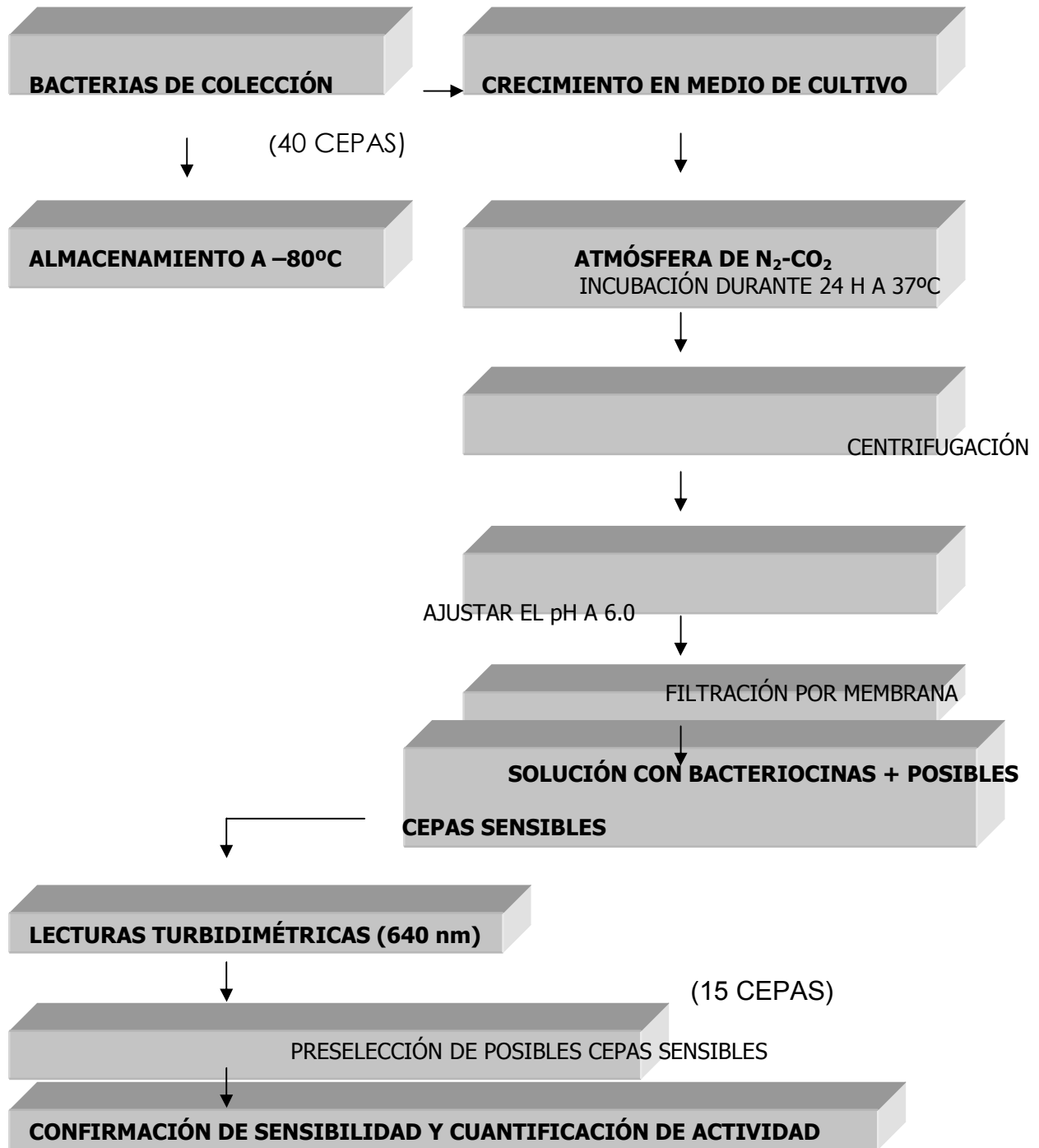


Figura 4. Esquema para la evaluación de la sensibilidad de cepas lácticas de colección a las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*.

6.3.1 TÉCNICA TURBIDIMÉTRICA

Se utilizó una técnica turbidimétrica para preseleccionar las cepas de bacterias lácticas sensibles a las bacteriocinas de la siguiente forma:

La obtención de las bacteriocinas se realizó como se indica en la Sección 6.4. Las posibles bacterias lácticas sensibles (Sección 6.3) se crecieron sembrando dos asadas de los cultivos madre en tubos con 10 mL de caldo MRS a pH 7.0.

Las muestras se incubaron a 37°C durante 24 h. Al final de la incubación el medio se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga Beckman J2-MI (Beckman Inc., Palo Alto, California, EUA) con un rotor No. 14. Posteriormente el sobrenadante se decantó y el precipitado se resuspendió en 5 mL de caldo MRS estéril. Esta suspensión fue inoculada con 5 mL de la solución con bacteriocinas (Sección 6.4) y se incubaron durante 24 h. Se midió biomasa por lecturas de densidad óptica, tomando a intervalos constantes de tiempo muestras que se diluyeron en medio de cultivo estéril, para obtener valores de absorbancia menores a 0.3 (Dalgaard y col. 1994). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU modelo 650 (Palo Alto, California, EUA) a 640 nm.

El control negativo consistió de una solución de bacteriocinas sometida a calentamiento a 120°C durante 2 min para eliminar la actividad antimicrobiana.

Se seleccionaron 15 cepas microbianas de las 40 cepas iniciales sobre las que se evaluó la sensibilidad a las bacteriocinas (Sección 7.2.1).

6.3.2 TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR: EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO, CONCENTRACIONES DE AGAR Y SURFACTANTE EN EL HALO DE INHIBICIÓN

En esta técnica la evaluación de la actividad antimicrobiana se fundamenta en la difusión de la bacteriocina en un medio de cultivo sólido que contiene la cepa sensible (Tramer y Fowler, 1964). La difusión en agar ha sido empleada para evaluar la actividad de la mayoría de las bacteriocinas, incluidas algunas aisladas de la carne (Schillinguer y Lucke, 1989). Se utiliza una bicapa de medio de cultivo sólido, donde la parte inferior tiene una concentración de agar bacteriológico mayor que la capa superior. Con esto se evitan las pérdidas en la concentración de la bacteriocina por adherencia a la superficie de la caja de Petri y se favorece la difusión de la misma en la capa delgada (Wolf y Gibbson, 1996).

Se realizó un estudio del efecto de los medios APT y MRS, de la concentración de agar bacteriológico (0.75, 1.0 y 1.75%) y de la concentración de surfactante (0, 0.5, 1.0 y 1.5%) sobre el diámetro del halo de inhibición. Se utilizó *Lactococcus lactis* ATCC 11454 productora de nisina y como cepa sensible a *Lactobacillus plantarum* NRRL B-813. El motivo para emplear nisina como referencia es debido a su

conocida alta actividad antimicrobiana que produce halos de inhibición definidos y de mayor tamaño en comparación con la mayoría de las bacteriocinas (De Vuyst y Vandamme, 1994). Se realizó el diseño factorial y la correspondiente ANOVA, además de una comparación múltiple de medias por Duncan con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

Se utilizaron las mejores condiciones para el crecimiento de las cepas microbianas sobre las que se evaluó el efecto inhibitorio de las bacteriocinas. Se consideraron los siguientes factores:

- 1.- Medio de cultivo (MRS o APT para las bacterias lácticas y medio TSB para las cepas patógenas).
- 2.- Condiciones de incubación de las cepas microbianas: temperatura (30°C y 35°C) y tiempo de incubación (12 y 24 h).
- 3.- Diluciones (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}).
- 4.- Condiciones de incubación de las placas para la prueba de actividad de bacteriocina: temperatura y tiempo de preincubación (4°C y 12 y 20 h) temperatura y tiempo de incubación (30°C y 37°C durante 12 h)
- 5.- Volumen de bacteriocina (50, 100 y 150 μ L).

Para ejemplificar este proceso a continuación se indica la metodología empleada con la cepa sensible *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1139. La bacteria se creció en

caldo MRS a pH 7.0 durante 24 h a 30°C. Finalizado este tiempo se hicieron diluciones 10^{-1} hasta 10^{-4} en agua peptonada tamponada a pH 6.0 (Scharlau Microbiology, Murcia, España). De la mayor dilución se tomaron 200 μL (2×10^3 ufc) y se vaciaron en 20 mL de medio de cultivo MRS (0.8% de agar bacteriológico y 1.5% de Tween 80, pH 6.0) a una temperatura aproximada de 40°C. Se preparó una capa de medio MRS a pH 6.0 con agar bacteriológico al 1.5%. Esta se vació en las cajas de petri, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

Posteriormente se adicionó una segunda capa de medio MRS con la cepa sensible previamente preparada. Se hicieron pozos en las cajas de Petri y se les adicionaron 50 μL de la muestra con bacteriocina. Las placas se dejaron en refrigeración (4°C) durante 20 h. Posteriormente se incubaron a 30°C durante un período de 24 h.

Las unidades arbitrarias de actividad se calcularon de la siguiente forma:

$$\text{UA/mL} = (1/d) (1/m) (f)$$

donde:

UA = unidades de actividad

d = dilución donde se detecta un halo de inhibición de 1 mm

f = factor de conversión (1000 μL / 1 mL)

m = volumen de muestra (mL)

6.3.3 SENSIBILIDAD DE *Listeria monocytogenes*

La determinación del efecto de inhibición de las bacteriocinas sobre la cepa patógena de *Listeria monocytogenes* se realizó mediante difusión en agar empleando las bacteriocinas concentradas (máxima actividad obtenida) por precipitación con sulfato de amonio.

El efecto sobre otras cepas patógenas como *Staphylococcus aureus*, se evaluó de la forma antes mencionada.

Las cepas microbianas de colección de *Listeria monocytogenes* (LM82, Scott A, NCTC 11994, LMB 92000/48, LMB 911204/47) se crecieron tomando dos asadas de un cultivo madre, que se introdujeron en tubos con 10 mL de medio de cultivo TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Detroit, EUA) a pH 7.0. Se incubaron durante 24 h a 35°C. Posteriormente las bacterias se sembraron por estría cruzada en medio selectivo Palcam (Agar Selectivo para *Listeria* sp., Merck) adicionado de un suplemento de inhibidores, mezcla de dos antibióticos y un colorante (Poliximixina B-sulfato 5.0 mg; Cefacidina 10.0 mg; Acriflavina 2.5 mg, Merck). Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h. Las colonias representativas (colonias verdosas con viraje negrozco) se resembraron en medio TSB a pH 7.0 incubándose bajo las condiciones antes referidas. Las bacterias se almacenaron a -80°C en glicerol (50 % muestra – 50% de glicero) hasta su uso.

De las distintas bacterias de colección de *Listeria monocytogenes* se sabía que algunas cepas eran resistentes a la estreptomina (Marín-Iñesta, comunicación personal). Para confirmar esta información y considerando la posibilidad que fueran inhibidas por las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* se decidió trabajar sobre su resistencia al antibiótico. Una bacteria resistente a la estreptomina y sensible a las bacteriocinas, permitiría evaluar la actividad de estos péptidos en carne. Con la estreptomina se elimina la flora microbiana nativa de la carne (que específicamente con este alimento en fresco, no puede ser eliminada por métodos comunes, como la esterilización, debido a que se provocan cambios considerables en sus características intrínsecas) dejando crecer al microorganismo control (*Listeria monocytogenes*).

Se utilizaron dos métodos para evaluar la sensibilidad de las cinco cepas de colección de *Listeria monocytogenes* a la estreptomina. Uno fue por crecimiento en placa y otro por turbidimetría. De cultivos madre de las diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* (LM82, Scott A, NCTC 111994, LMB 92000/48 y LMB 911204/47) se tomaron dos asadas, que se introdujeron en tubos con 10 mL de medio TSB a pH 7.0. Las muestras se incubaron durante 24 h a 35°C. Posteriormente se diluyeron 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} a partir de la última dilución se tomó 1 mL (1×10^4 ufc) que se vació en 50 mL de medio TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, Detroit, EUA) a una temperatura de 40°C. La estreptomina se diluyó 1:2 en agua destilada estéril y se vació en el medio TSA la cantidad necesaria para

alcanzar una concentración final de 0.2, 0.4, 0.6 y 1.0 g/L. Las placas se dejaron en incubación a 35°C durante 24 hr. La presencia de colonias se consideró como una prueba de resistencia al antibiótico. La ausencia de colonias se tomó como una prueba de sensibilidad a la estreptomicina.

Para la prueba por turbidimetría se prepararon tubos con 9 mL de medio TSB a pH 7.0. De las muestras de bacterias de *Listeria monocytogenes* previamente crecidas y diluídas se tomó 1 mL que se vació en cada tubo. En el medio se adicionó previamente estreptomicina diluída hasta alcanzar una concentración de 0.2, 0.4, 0.6 y 1.0 g/L. Las muestras se dejaron en incubación a 35°C durante 24 h. La presencia nítida de turbidez se consideró una prueba de resistencia al antibiótico, mientras que la ausencia de turbidez como una prueba positiva de sensibilidad a la estreptomicina.

6.4 OBTENCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Se preparó el inóculo de las bacterias lácticas productoras de bacteriocina sembrando dos asadas de los cultivos madre en tubos de vidrio con un volumen de 10 mL de caldo MRS a pH 7.0. Se dejaron en incubación durante 24 h a 37°C. Para minimizar la formación del peróxido de hidrógeno y evitar su efecto sobre la inhibición microbiana se prepararon frascos serológicos con 18 mL de caldo de cultivo MRS a pH 7.0 sellados herméticamente, a los cuales se les eliminó el oxígeno sustituyéndolo por una atmósfera de N₂-CO₂ (50-50%) (Brink y col., 1994).

El medio se burbujeó con esta mezcla de gases durante 3 min para eliminar el oxígeno residual. Se adicionó un volumen de 2 mL del inóculo previamente preparado. La incubación se realizó a 37°C durante 24 h bajo una atmósfera de N₂-CO₂. Al final del período de incubación, para eliminar las células, el medio se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 10 min con la centrífuga previamente mencionada.

Posteriormente se desechó el precipitado formado por células y se ajustó el pH del sobrenadante a 6.0 con una solución de NaOH 0.1 N. El sobrenadante con bacteriocinas se esterilizó por filtración en membrana (Hugas y col. 1995) con un filtro de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0.2 µm.

6.5 CONCENTRACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

6.5.1 PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO

Para determinar algunas de las propiedades bioquímicas de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* fue necesario realizar una etapa de purificación parcial y concentración. Ésta se realizó mediante precipitación con sulfato de amonio.

Como se mencionó en la Sección 2.2.3 varias son las técnicas para la purificación de las bacteriocinas.

Entre las ventajas de utilizar sulfato de amonio en la precipitación de bacteriocinas, se encuentran su alta solubilidad, es un compuesto no tóxico para la mayoría de las enzimas y proteínas, además su costo es bajo y en algunos casos puede presentar un efecto estabilizador al evitar la desnaturalización de las proteínas (Dixon y Web, 1979).

Con las bacteriocinas concentradas se evaluaron propiedades como el pH y la temperatura óptima de actividad, así como la estabilidad a diferentes condiciones de almacenamiento.

Se realizó una etapa preliminar evaluando diferentes concentraciones de sulfato de amonio en volúmenes de 100 mL de medio de cultivo con bacteriocinas. A partir de los resultados se trabajó con 1 L de medio de cultivo.

Las dos cepas productoras de bacteriocinas fueron crecidas tomando una muestra de un cultivo madre que se sembró en tubos con rosca con 10 mL de caldo MRS. Posteriormente se incubó el medio durante 24 h a 37°C. En botellas serológicas se adicionaron 18 mL de caldo de cultivo MRS con 1% de Tween 80. La atmósfera de aire se cambió por una mezcla de N₂-CO₂ con una relación de 50-50% (Brink y col. 1994). Del inóculo previamente crecido se inyectaron en las botellas 2 mL.

Posteriormente las muestras se incubaron durante 24 h a 37°C bajo una atmósfera de N₂-CO₂.

Las células se eliminaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrifuga Beckman J2-MI con un rotor No. 14. El sobrenadante se recolectó y se adicionó sulfato de amonio a diferentes concentraciones de saturación (20, 40, 60 y 80%) en volúmenes de 100 mL. La solución con bacteriocinas se sometió a agitación constante en baño de hielo, agregando el sulfato de amonio lentamente para evitar la formación de zonas de saturación (Scopes, 1994). Las muestras se dejaron en reposo durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron a 11,000 rpm durante 30 min a 4°C (Hugas y col. 1995). El precipitado y el sobrenadante fueron recolectados y dializados (para eliminar el exceso de sales de amonio) frente a una solución amortiguadora de fosfato de sodio 3 mM a pH 6.0 durante 12 h.

6.5.2 DIÁLISIS

Las bolsas de diálisis se pusieron en agitación en agua destilada durante un tiempo de 3-4 h. Posteriormente se calentaron en solución de sulfito de sodio (3% w/v) a 80°C durante 1 minuto. Se acidificaron en solución de ácido sulfúrico al 0.2% y se lavaron en agua caliente. En estas bolsas se introdujeron las muestras a dializar, como se refirió previamente.

6.5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

Se determinó proteína total en el precipitado y el sobrenadante por el método de Lowry (1951). La técnica se reporta en el Anexo I. También se cuantificó la actividad de la bacteriocina como se indica en la Sección 6.3.2.

6.6 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

6.6.1 ESTABILIDAD A DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

La estabilidad de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se evaluó durante el almacenamiento a 4°C y – 20°C por 30 y 90 días respectivamente. A muestras de bacteriocina concentrada por precipitación con sulfato de amonio (Sección 7.3) se les determinó a intervalos constantes de tiempo la actividad de bacteriocina con la técnica de difusión en agar (Sección 6.3.2) empleando como cepa sensible a *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1139 (cepa con mayor sensibilidad, Sección 7.2.3).

6.6.2 DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO DE ACTIVIDAD

Se evaluó el pH óptimo empleando muestras de bacteriocina concentrada y dializada (Sección 7.3) en soluciones amortiguadoras de fosfato de sodio 5 mM a diferente pH (3, 4, 5, 6, 8 y 10). La actividad de bacteriocina se determinó por difusión en agar (Sección 6.3.2) con *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1139 como cepa

sensible. Se utilizó un control que consistió de solución amortiguadora a los diferentes valores de pH, sin la bacteriocina.

6.6.3 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA TÉRMICA

El efecto del calor sobre la actividad de bacteriocina se evaluó empleando muestras de bacteriocinas concentradas y dializadas (Sección 7.3). Cada muestra se sometió a calentamiento (40, 60, 80 y 100 °C) durante 20 minutos (Hugas y col. 1995). La actividad residual de la bacteriocina se determinó por la técnica de difusión en agar (Sección 6.3.2), empleando igualmente como cepa sensible a *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1139.

6.6.4 DETERMINACIÓN DEL pH DE ADSORCIÓN

En la Sección 2.2.3 se mencionó que las bacteriocinas pueden ser adsorbidas por sus células productoras. Para evaluar esta propiedad las bacterias lácticas fueron crecidas en medio APT (Sección 6.4). Posteriormente el medio se sometió a centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. Las células productoras de bacteriocina en el precipitado fueron resuspendidas diluyéndose 1:5 en una solución 5 mM de fosfato de sodio a pH 6, ajustado con ácido fosfórico al 5% (la solución se agitó lentamente durante 1 h a 4°C). Las muestras fueron lavadas nuevamente en

agua destilada (1:5) y centrifugadas a 10,000 rpm a 4°C. Las células se resuspendieron hasta 20 veces el volumen original.

Las células productoras (0.1 mL con 10^5 células) y la preparación de bacteriocina (0.1 mL, obtenida como se indica en la Sección 6.4) fueron adicionados en un volumen de 1.8 mL de una solución amortiguadora de fosfato de sodio 5 mM ajustada a diferentes valores de pH (2, 4, 6 y 8) con ácido fosfórico al 5% y una solución de NaOH 0.1 N. La mezcla fue incubada durante 30 min a 4°C y centrifugada a 15,000 rpm a 4°C durante 5 min. Posteriormente se midió la actividad de la bacteriocina (Sección 6.3.2) en el sobrenadante.

Se emplearon dos controles: el primero consistió de 0.1 mL de agua estéril con 0.1 mL de la suspensión de las células productoras. El segundo control consistió de 0.1 mL de agua estéril con 0.1 mL de la solución de bacteriocina.

El porcentaje de bacteriocinas adsorbida se determinó de la siguiente forma:

$$PBA = 100 \times \left(1 - \frac{\text{UA/mL sobrenadante libre de células} - \text{UA/mL en el control II}}{\text{UA/mL en el control I}} \right)$$

donde:

PBA = porcentaje de bacteriocina adsorbida

6.6.5 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BACTERIOCINA Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) EN *Listeria monocytogenes*

La concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) fue evaluada de acuerdo con la metodología descrita por Nielsen y col. (1990). Este valor se determinó considerando la posibilidad de aplicar las bacteriocinas en sistemas cárnicos reales donde sea necesario inhibir el crecimiento de esta cepa patógena.

Se emplearon cepas de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 (para la bacteriocina de *Lactobacillus buchneri*, Sección 7.2.4) y *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48 (para la bacteriocina de *Lactobacillus paracasei*, Sección 7.2.4), las cuales presentaron mayor sensibilidad a las bacteriocinas de estudio.

Estas cepas patógenas se crecieron en medio TSB a pH 7.0 a 35°C durante 24 h. Finalizado este tiempo se hicieron diluciones 10^{-1} hasta 10^{-3} en medio de cultivo estéril. Las bacteriocinas concentradas (Sección 7.3) fueron diluidas en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 5 mM a pH 6.0 a diferentes unidades de actividad.

Se tomaron muestras de 2 mL de bacteriocina producida por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* con diferentes unidades de actividad 50, 100 y 400 UA/mL y

de 50, 100, 200 y 300 UA/mL respectivamente. Estas muestras se colocaron en tubos de ensayo que contenían suspensiones de *Listeria monocytogenes* (1 mL con 1×10^4 ufc). El crecimiento de *Listeria monocytogenes* se evaluó mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias (ufc) del cultivo. La MIC se determinó como la concentración más baja de bacteriocina en la cual no se observó crecimiento.

Paralelamente se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de la bacteriocina producida por *Lactobacillus buchneri* (50 y 400 UA/mL) y de la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* (50 y 200 UA/mL) sobre *Listeria monocytogenes*. Se empleó un volumen de 5 mL de las cepas sensibles de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 y *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48 respectivamente (diluídas hasta una concentración de 10^5 ufc/mL, Sección 7.2.4). A intervalos constantes de tiempo se midieron ufc/mL.

6.7 EFECTO DE PARÁMETROS EXTRÍNSECOS EN LA ACTIVIDAD DE LAS BACTERIOCINAS

Parte importante en la aplicación de las bacterias lácticas en la conservación de alimentos (a través de producción *in situ* o con el empleo de compuestos antimicrobianos purificados) es el estudio de la producción de metabolitos antimicrobianos como los ácidos orgánicos y las bacteriocinas. Como se mencionó en la Sección 2.2 los estudios sobre la producción de las

bacteriocinas están enfocados principalmente al desarrollo de medios de cultivo económicos que faciliten su posterior comercialización. Sin embargo la producción *in situ* de bacteriocinas puede ser una alternativa viable para su empleo en la conservación de alimentos como la carne y sus productos procesados (Nielsen y col., 1990; Foegeding y col., 1992). Por tanto es necesario evaluar aquellos aspectos que influyen en la fisiología microbiana para la producción de las bacteriocinas, con el fin de mejorar su eficiencia de producción a un nivel comercializable.

Se realizó un estudio a nivel de matraz evaluando diferentes parámetros extrínsecos (medio de cultivo, temperatura, pH, atmósferas gaseosas y surfactante) en la producción de las bacteriocinas. Finalmente en un biorreactor se determinó su patrón de producción.

6.7.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS LÁCTICAS

Se evaluó el efecto de los caldos de cultivo para bacterias lácticas MRS y APT a pH 7.0 sobre la producción de las bacteriocinas, la cual se llevó a cabo como se indica en la Sección 6.4. El oxígeno se eliminó con una corriente de N₂-CO₂ (50-50%) y la incubación se realizó durante 20 h a 37°C.

Se midió la actividad de las bacteriocina producidas por ambas bacterias lácticas en estudio, empleando la cepa sensible de *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1139 con la técnica de difusión en agar (Sección 6.3.2) y se midió la biomasa por lecturas de densidad óptica a 640 nm. Se tomaron muestras a intervalos constantes de tiempo que se diluyeron en medio de cultivo estéril para obtener lecturas de absorbancia menores a 0.3 (Dalgaard y col., 1994). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

Las lecturas de densidad óptica se relacionaron con el peso seco empleando una curva de correlación previamente determinada (Anexo II).

6.7.2 TEMPERATURA

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la producción de bacteriocinas se utilizó medio de cultivo APT a pH 7.0 (como se explica en la Sección 7.5.1 no se encontró una diferencia significativa entre el medio MRS y APT, pero este último es más económico). La producción se realizó como se mencionó en la Sección 6.4. El oxígeno se eliminó por una corriente de N₂-CO₂ (50-50%) y la incubación se realizó a diferentes temperaturas (4, 20, 25, 30, 35 y 40°C) durante 20 h.

La actividad de bacteriocina y la biomasa se midieron como se indica en las Secciones 6.3.2 y 6.7.1.

6.7.3 ATMÓSFERAS GASEOSAS

Se evaluaron diferentes atmósferas gaseosas: N₂ (Nitrógeno Comprimido Grado 5.0 Ultra alta pureza, Lote 2002010095, Praxair, México), mezcla de N₂-CO₂ (Mezcla de gas comprimido, Grado Certificado, n.o.s. ONU 1956, Praxair, México) y CO₂ (Gas comprimido, Alta pureza Grado 3.0, Praxair, México) sobre la producción de bacteriocinas de las cepas de estudio.

Se prepararon los inóculos de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* como se explica a continuación.

Se sembraron las bacterias en estudio en 10 mL de caldo APT a pH 7.0. Se incubaron durante 20 h a 37°C. Para minimizar la formación de peróxido de hidrógeno y evitar su efecto sobre la inhibición microbiana de la cepa sensible, se prepararon frascos serológicos (capacidad de 50 mL) con 18 mL de caldo APT a pH 7.0 sellados herméticamente a los cuales se les eliminó el aire sustituyéndolo (mediante inyección) por la atmósfera de gases de N₂, mezcla de N₂-CO₂ (50-50%) o CO₂ con un flujo de 15 mL/min (20 psia). Previamente el medio de cultivo también se burbujeó con el gas correspondiente durante 5 min para eliminar el oxígeno

residual. Se agregaron 2 mL del inóculo previamente preparado. La incubación se realizó durante 20 h a 30°C ó 35°C para *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* respectivamente.

La actividad de bacteriocina y la biomasa se midieron como se indica en las Secciones 6.3.2 y 6.7.1.

6.7.4 CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE

La producción se realizó como se mencionó en la Sección 6.4 con medio de cultivo APT y una atmósfera de N₂ (como se verá en la Sección 7.5.4, con esta atmósfera se obtuvo la mayor actividad para ambas bacteriocinas). Se evaluaron diferentes concentraciones de Tween 80 (0.5, 1.0 y 1.5%) sobre la producción de bacteriocinas de las cepas de estudio. Las muestras se incubaron durante 20 h a 30°C y 35°C para las cepas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* respectivamente.

La actividad de bacteriocina y la biomasa se midieron como se menciona en las Secciones 6.3.2 y 6.7.1.

6.8 PRUEBAS PRELIMINARES DE PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN UN BIORREACTOR

6.8.1 EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD DE LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS EN UN BIORREACTOR

Este estudio se llevó a cabo con el fin de escalar las condiciones óptimas de las pruebas preliminares de producción de bacteriocinas. Se evaluó el efecto de diferentes valores de pH.

Se realizó en un biorreactor FA-5000 de 2 L (Sistemas y Equipos de Vidrio, Puebla, México) que consta de un control digital de pH y electrodo, un control digital de temperatura $0-70^{\circ}\text{C} \pm 0.1$, un sistema mecánico de agitación con propela tipo turbina de 6 paletas y 3 baffles, con un intervalo de agitación de 30-500 rpm y una jarra fabricada en vidrio Pyrex con capacidad de 2 L.

Se preparó el inóculo de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* tomando una muestra de un cultivo madre que se propagó en 100 mL de caldo APT a pH 7.0, con una atmósfera de N_2 y Tween 80 en una concentración de 1%. La incubación se realizó durante 18 h (con el fin de que el cultivo estuviera en la fase exponencial de crecimiento) a 30°C y 35°C respectivamente.

El medio de cultivo en la jarra de 2 L se inoculó con la cepa productora de bacteriocina, en un volumen de trabajo de 900 mL de caldo APT, con 1% de Tween 80. Posteriormente se eliminó el oxígeno residual del medio de cultivo por burbujeo de N₂ durante 5 min. El inóculo representó el 10% del volumen de trabajo (v/v)

Para realizar la producción en el biorreactor se sustituyó la atmósfera de aire por N₂ a un flujo de 15 ml/min (20 psia). El nitrógeno suministrado se filtró a través de una unidad de filtración Millex-FG₅₀ (Millipore, Francia) con una membrana PTFE con un tamaño de poro de 0.2 μm. Se empleó una agitación de 150 rpm. Se agregó al medio Tween 80 al 1%. La temperatura de fermentación fue de 30°C y 35°C para *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*, respectivamente. El experimento se realizó con control de pH a diferentes valores (4.5, 5.0 y 5.5) el cual se reguló con NaOH 1 N.

La actividad de la bacteriocina producida se midió con la técnica de difusión en agar (Sección 6.3.2). La biomasa se midió cada 4 h por lecturas turbidimétricas a una longitud de onda de 640 nm, haciendo diluciones para obtener lecturas menores a 0.3. El peso seco se determinó empleando una curva ajustada que correlaciona la densidad óptica con el peso seco (Anexo II).

6.8.2 DETERMINACIÓN PRELIMINAR DEL PATRÓN DE PRODUCCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*

Se evaluó la producción de las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* con control de pH a 4.5. Para evitar la formación de espuma y homogenizar las células se utilizó una agitación constante de 150 rpm.

6.9 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la producción de las bacteriocinas sobre cepas sensibles mediante el método de difusión en agar se empleó un diseño factorial completo, al cual se asignaron en forma totalmente aleatoria las muestras. El diseño factorial consistió en 2x3x4 (medio de cultivo: APT o MRS; concentración de agar: 0.75, 1.0 y 1.75%; concentración de surfactante: 0, 0.5, 1.0 y 1.5). Se utilizó como cepa productora a *Lactococcus lactis* ATCC 11454 y como cepa sensible a *Lactobacillus plantarum* NRRL B-813. Los datos se sujetaron a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Duncan.

Los datos obtenidos de la evaluación de parámetros extrínsecos en la actividad de la bacteriocina (Fuente de variación: medio de cultivo, temperatura, atmósfera gaseosa, concentración de surfactante y cepa láctica productora de bacteriocina), se sujetaron a un análisis de varianza usando como variables las dos cepas lácticas

como un bloque. Posteriormente se realizó una comparación múltiple de medias de Duncan.

Los datos obtenidos del estudio del efecto del pH y del tiempo en la actividad de la bacteriocina producida en un biorreactor se sometieron a un análisis de varianza (Fuentes de variación: pH, tiempo, cepa láctica) y a una comparación múltiple de medias de Duncan.

Por su parte los datos obtenidos del estudio preliminar de la actividad de las bacteriocinas en un biorreactor se sujetaron a un análisis de varianza (Fuente de variación: tiempo, cepa láctica) y a una comparación múltiple de medias de Duncan. La Tabla 9 muestra las fuentes de variación, variables de respuesta y pruebas estadísticas llevadas a cabo en esta tesis. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 SELECCIÓN DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS

Se consideraron inicialmente cuatro cepas productoras de bacteriocinas (Tabla 8) para ser sujetas de estudio. Estas cepas microbianas fueron seleccionadas con base en los criterios enlistados en la Tabla 10.

Tabla 10. Criterios de selección para las bacterias productoras de bacteriocinas.

CRITERIO DE SELECCIÓN*
Cepas aisladas de carne roja
Bacterias lácticas
Producir bacteriocinas con amplio espectro de inhibición microbiana

*Kuri (1998).

Diversos investigadores mencionan que los microorganismos de la flora nativa presentan las mejores características genéticas para adaptarse y competir con microorganismos patógenos y de descomposición de la carne, cuando son empleados en su conservación a través de la fermentación láctica (Stiles, 1996; Kuri, 1998).

Muchas de las bacterias lácticas, así como sus productos metabólicos pueden ser empleados en la conservación de los alimentos debido a que se permite su uso tanto por las reglamentaciones de la UE (Unión Europea) como por la FDA de los Estados Unidos (Sección 2.3). Con base al conocimiento de las bacterias lácticas como bioconservadores, a la ventaja de seleccionar cepas nativas de carnes rojas, así como al mayor espectro de inhibición microbiano de las bacteriocinas producidas, se seleccionó a *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* como sujetos de estudio.

El género y especie de estas cepas se confirmó a través de técnicas moleculares en los laboratorio Midilabs (Newark, Delaware, EUA) como se indica en la Sección 6.2.

7.2 SELECCIÓN DE CEPAS SENSIBLES

7.2.1 SELECCIÓN DE CEPAS SENSIBLES POR TURBIDIMETRÍA

En el Anexo III se muestran los resultados obtenidos de la preselección de cepas sensibles. Se tomó como criterio de selección la densidad óptica obtenida después de una incubación a 37°C durante 18 h.

En la Tabla 11 se muestran las 15 cepas preseleccionadas como sensibles (8 perteneciente a los géneros de *Lactobacillus*; 2 a *Pediococcus*; 2 a *Staphylococcus* y 2 cepas aisladas del género de *Lactobacillus* sp. y 1 concentrado comercial) a las cuales se les confirmó la sensibilidad por difusión en agar (Sección 6.3.2). Como se observa, la mitad de las bacterias sensibles pertenecen al mismo género de las bacterias productoras (*Lactobacillus*), lo cual confirma lo reportado en la literatura (Klaenhammer, 1988) respecto a que el espectro de inhibición microbiana de las bacteriocinas se centra principalmente en bacterias relacionadas taxonómicamente con la cepa productora.

Tabla 11. Bacterias lácticas preseleccionadas con la técnica por turbidimetría como sensibles a las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*.

BACTERIA DE COLECCIÓN	SENSIBILIDAD A LA BACTERIOCINA DE <i>Lactobacillus buchneri</i>	SENSIBILIDAD A LA BACTERIOCINA DE <i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus sake</i> PC-1 11016	-	+
<i>Staphylococcus xylosus</i> DD-34 5000 509	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-813	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-4495	+	+
<i>Staphylococcus carnosus</i> MC-1 02055	+	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PC-1 11016	+	-
<i>Lactobacillus</i> sp.	+	+
<i>Lactobacillus hilgardii</i> NRRL B-1139	+	+
<i>Lactobacillus alimentarius</i> BJ-33 5000 1855	+	+
<i>Lactobacillus brevis</i> CETC 815	-	+
<i>Lactobacillus</i> sp. (cepa aislada e identificada por API)	-	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JC	+	-
<i>Lactobacillus fructosus</i> NRRL B-294	+	+
SagaL (cepas lácticas comerciales)	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp. (cepas aislada e identificada por API)	+	-
<i>Lactobacillus</i> sp. (cepa aislada e identificada por API)	-	+

(+) Posibles cepas sensibles

(-) Cepas no sensibles

Prueba realizada por turbidimetría (Sección 7.2.1 y Anexo III)

7.2.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO, CONCENTRACIÓN DE AGAR Y SURFACTANTE EN LA INHIBICIÓN DE CEPAS SENSIBLES

Se empleó como modelo el efecto de los factores en el halo de inhibición de nisina producida por *Lactococcus lactis* 11454 sobre *Lactobacillus plantarum* NRRL B-813. La nisina produce halos de inhibición grandes y bien definidos, en comparación con la mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas.

En el Anexo IV se muestra el análisis de varianza de los resultados. No se encontró diferencia significativa ($p < 0.065$) entre los medios de cultivo APT y MRS sobre el diámetro del halo de inhibición. Tampoco se encontró diferencia significativa ($p < 0.99$) entre las concentraciones de agar bacteriológico. Sin embargo, y como era de esperarse, el diámetro del halo de inhibición fue mayor a concentraciones más bajas de agar bacteriológico. La concentración de Tween 80 tuvo un efecto significativo ($P > 0.012$) sobre el diámetro del halo de inhibición, aunque la diferencia no fue significativa (Duncan con una $\alpha = 0.05$) entre las concentraciones de 1.5% y 1.0%, por lo que en los análisis posteriores se empleó una concentración de Tween 80 al 1%.

Cabo y col. (1999) mencionan que la técnica de difusión en agar presenta algunos inconvenientes para determinar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas a través de la formación de zonas de inhibición. Refieren entre estos la poca difusión de los péptidos a través del gel. Para mejorar la zona de inhibición, recomiendan el empleo de surfactantes como el Tween, además de que es necesario considerar variables como el tiempo de difusión de la bacteriocina (preincubación) y la densidad del gel.

Wolf y Gibbons (1996) establecen que cuando la concentración de agar se reduce de los valores convencionales de 1.5% de concentración de agar a 0.75% se mejora en un 21% el diámetro del halo de inhibición (se permite una mejor difusión de las

bacteriocinas). Para obtener mejores resultados algunos autores (Schillinguer y Lucke, 1989; Hugas, 1998) emplean una bicapa de medio de cultivo, una de las capas con una concentración de agar bacteriológico del 1.5% y otra con una concentración de 0.75% (donde se incluye la cepa sensible). En la Figura 6 se muestran los halos de inhibición por la bacteriocina de *Lactobacillus buchneri* obtenidos con la técnica de difusión en agar (Sección 6.3.2).

7.2.3 INHIBICIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS

En la Tabla 12, se muestran los resultados del espectro de inhibición microbiana por la bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*. La mayoría de las cepas inhibidas corresponden a los géneros de *Lactobacillus*. Todas las bacterias, así como los concentrados lácticos comerciales, son bacterias Gram positivas.

Tabla 12. Cepas sensibles a las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*.

BACTERIAS DE COLECCIÓN	BACTERIOCINA PRODUCIDA POR <i>Lactobacillus buchneri</i>	BACTERIOCINA PRODUCIDA POR <i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus sake</i> PC-1 11016	-	+
<i>Lactobacillus brevis</i> CETC 815	-	+
<i>Lactobacillus alimentarius</i> BJ-33 5000 1855	++	-
<i>Staphylococcus xylosus</i> DD-34 5000 509	+++	+++
<i>Lactobacillus fructosus</i> NRRL B-294	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL- B-1118	-	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-813	+	-
<i>Staphylococcus carnosus</i> MC-1 02055	++	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PC-1 110161	+	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i> NRRL B-1130	+++	+++
<i>Lactobacillus</i> sp. (cepa aislada de camarón)	++	+
Saga L (cepas comerciales)	++	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (JC)	++	-
<i>Lactobacillus</i> sp. (L2, cepa aislada e identificada con API)	+	-
<i>Lactobacillus</i> sp. (cepa 56 aislada e identificada con API)	-	+
<i>Lactobacillus</i> sp. (cepa aislada e identificada con API)	-	++

* Se reporta el máximo diámetro obtenido del halo de inhibición, con la escala: + = 8 mm; ++ = 9 mm; +++ = 10 mm. Los resultados se obtuvieron por duplicado.

Ennahar y col. (2000) refieren varios estudios para explicar el mecanismo de inhibición de las bacteriocinas de la Clase IIa (clasificación a la que pertenecen las bacteriocinas de estudio, como se discute en la Sección 7.4.4). Indican estos autores que los péptidos tienen un modo de acción primario que permeabiliza la membrana de los microorganismos sensibles, debido a la formación de poros que provocan un desbalance iónico y la pérdida de fosfato inorgánico. Este fenómeno ha sido demostrado en bacteriocinas como la pediocina PA-1, la mesentericina Y105 y la bavaricina MN.

De esta forma se genera una disipación de la fuerza protón-motriz (PMF por sus siglas en inglés) que en el caso de las bacteriocinas de la Clase IIa implica una total pérdida del ΔpH , y una pérdida parcial del potencial de membrana $\Delta\Psi$. Los lantibióticos provocan la pérdida de ambos.

La actividad letal de las bacteriocinas de la Clase IIa se debe, por tanto, a la pérdida de la fuerza protón-motriz, particularmente se provoca una disminución en la concentración de APT en el 98.9% y se bloquea la entrada de aminoácidos, la cual es mediada por el transporte activo.

Se observaron diferencias en cuanto a la sensibilidad de las bacterias evaluadas; sugieren algunos autores (Chen y Montville, 1995; Kaiser y Montville, 1996) que esto se debe a que esta sensibilidad es dependiente de la concentración y tiempo de

exposición de las bacteriocinas y otros factores debidos a las células o el medio. Chen y col. (1998) demostraron que la composición de lípidos de las células sensibles es un factor determinante en la acción bactericida de la pediocina PA-1, refieren estos autores que la afinidad de las bacteriocinas por la fracción lipídica se incrementa con el aumento en el contenido de lípidos aniónicos. Encontraron también que la afinidad de las bacteriocinas de la Clase IIa a las membranas de las células sensibles se ve afectada por el pH. Por ejemplo, una disminución a valores de pH de 7.5 a 6.0 provoca una mejora tanto de la unión a la membrana como en la permeabilización de la misma. Sin embargo la formación de poros por la bavaricina MN es óptima a pH 6.0 y menos eficiente a otros valores de pH (Kaiser y Montville, 1996).

Este fenómeno se puede explicar debido a que la carga total positiva de las bacteriocinas de la Clase IIa provoca que éstas se adhieran a las cabezas de los fosfolípidos con carga negativa. Sin embargo al alterar las propiedades de la bacteriocinas o de la membrana por un cambio de pH o debido a un cambio en la composición lipídica se produce un efecto de disociación en las interacciones péptido-lípido. Ambos tipos de alteraciones indican la influencia de las uniones electrostáticas en las interacciones de las bacteriocinas de la Clase IIa con la membrana de las células sensibles (Ennahar y col., 2000).

7.2.4 INHIBICIÓN DE *Listeria monocytogenes*

El estudio sobre la inhibición de microorganismos patógenos se centró en *Listeria monocytogenes* por las razones previamente mencionadas (Sección 2.2.5). Se conoce que las bacteriocinas de la Clase IIa tienen una fuerte actividad antilisterial, aunque también es común encontrar la inhibición de otras bacterias Gram positivas pertenecientes a los siguientes generos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* y *Brochothrix* (Ennahar y col. 2000). Además algunas bacteriocinas de esta clase han demostrado ser efectivas contra las esporas y células vegetativas de *Clostridium* sp.

Las características de las cepas de *Listeria monocytogenes* en estudio se reportan en la Tabla 8.

En el análisis de la inhibición de las bacterias patógenas se incluyó un estudio sobre el efecto de la estreptomicina en la inhibición de *Listeria monocytogenes*. Como se mencionó en la Sección 6.3.3 se tenía la información de que algunas de estas cepas patógenas eran resistentes al antibiótico. Para confirmar esta información y considerando la posibilidad de utilizar estas cepas de bacterias en la evaluación de la actividad de las bacteriocinas en carne se

determinó la resistencia a la estreptomicina parte de varias cepas de *Listeria monocytogenes*. En la Tabla 13 y 14 se reportan los resultados de las pruebas realizadas por turbidimetría y células viables (ufc). Una bacteria resistente a la estreptomicina y sensible a las bacteriocinas permitiría evaluar la actividad antimicrobiana de estos péptidos en carne. Sin embargo, como se explica en la Sección 7.2.4, la cepa de *Listeria monocytogenes* resistente a la estreptomicina también lo fue a ambas bacteriocinas en estudio. Se encontró tanto en la prueba en medio líquido como en medio sólido que *Listeria monocytogenes* Scott A, LMB47, LMB48 y NCTC 11994 son sensibles a la estreptomicina, mientras que *Listeria monocytogenes* LM82 es resistente, como se había reportado con anterioridad (Marín-Iniesta, comunicación personal).

Tabla 13. Prueba de resistencia a la estreptomicina de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* en medio líquido.

BACTERIAS DE COLECCIÓN	RESISTENCIA EN MEDIO LÍQUIDO (POR TURBIDEZ) A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ESTREPTOMICINA			
	0.2 g/L	0.4 g/L	0.6 g/L	1.0 g/L
<i>Listeria monocytogenes</i> LM82	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB48	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB47	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	-	-	-	-

*La presencia nítida de turbidez se consideró una prueba de resistencia al antibiótico (+); la ausencia de turbidez como una prueba de sensibilidad (-).

Tabla 14. Prueba de resistencia a la estreptomicina de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* en medio sólido.

BACTERIAS DE COLECCIÓN	RESISTENCIA EN MEDIO SÓLIDO (PRESENCIA DE UFC) A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ESTREPTOMICINA			
	0.2 g/L	0.4 g/L	0.6 g/L	1.0 g/L
<i>Listeria monocytogenes</i> LM82	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB48	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB47	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	-	-	-	-

*La presencia de ufc se consideró como una prueba de resistencia al antibiótico (+), la ausencia de UFC como una prueba de sensibilidad al antibiótico (-)

Para evaluar la sensibilidad de *Listeria monocytogenes* a las bacteriocinas de estudio, se empleó la mayor concentración de bacteriocina obtenida por precipitación con sulfato de amonio (Sección 7.3).

Con las condiciones óptimas para la prueba de inhibición por difusión en agar (previamente determinadas en el grupo de investigación del Dr. Fulgencio Marín Iniesta, Universidad de Murcia, España), se determinó el efecto de las bacteriocinas sobre *Listeria monocytogenes*. Se crecieron las cepas de *Listeria monocytogenes* en medio de cultivo TSB a pH 7.0, se hicieron diluciones de 10^{-3} – 10^{-5} y se empleó un volumen de bacteriocina de 50 μ L. Las condiciones de preincubación fueron 5-10 h y a 5°C y la incubación de 20-24 h a 30°C.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Sensibilidad de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* a las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*. *

BACTERIAS DE COLECCIÓN	SENSIBILIDAD A LA BACTERIOCINA DE <i>Lactobacillus buchneri</i> *	SENSIBILIDAD A LA BACTERIOCINA DE <i>Lactobacillus paracasei</i> *
<i>Listeria monocytogenes</i> LM82	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	++	+
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB48	+	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB47	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	+++	++

* Se reporta el máximo diámetro obtenido del halo de inhibición, con la escala: + = 8 mm; ++ = 9 mm; +++ = 10 mm. Los resultados se obtuvieron por duplicado.

Se encontró que ambas bacteriocinas (de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*) son capaces de inhibir a cepas de *Listeria monocytogenes*. Con la bacteriocina de *Lactobacillus buchneri* la cepa con mayor sensibilidad bajo las condiciones experimentales estudiadas es *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, mientras que para la bacteriocina de *Lactobacillus paracasei*, la cepa con mayor sensibilidad es *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48.

Ambas bacteriocinas fueron incapaces de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* LM82. Posiblemente esto se deba al desarrollo de un mecanismo de resistencia bacteriana. Se sabía que esta bacteria (*Listeria monocytogenes* LM82) es resistente a estreptomicina y posiblemente esta propiedad le confiera también resistencia a otros compuestos antimicrobianos. Además, entre las diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*, provenientes de distintas

colecciones, puede haber variaciones genéticas que expresan mecanismos de resistencia microbiana..

La diferencia en la sensibilidad de las cepas de *Listeria monocytogenes* se puede explicar también con base a la especificidad y potencia de la actividad de las bacteriocinas de la Clase IIa que es influenciada por la composición de lípidos de la membrana celular de las cepas sensibles, la cual determina el tipo y grado de interacciones entre las bacteriocinas y la fracción lipídica.

Algunos autores (Hanlin y col. 1993; Noerlis y Ray, 1993; Ray, 1993) explican que la resistencia al efecto inhibitorio de las bacteriocinas puede deberse a que en las poblaciones bacterianas sensibles se encuentran microorganismos potencialmente tolerantes y/o con modificaciones estructurales o al menos con predisposición a tales modificaciones, las cuales espontáneamente emergen en caso de la exposición a las bacteriocinas.

En el caso de la nisina, se han encontrado modificaciones en la composición de los ácidos grasos (Ming y Daeschel, 1993; Mazzota y Montville, 1997) y en la composición de los fosfolípidos (Ming y Daeschel, 1995; Verheul y col. 1997) en cepas de *Listeria monocytogenes* con resistencia a esta bacteriocina. Los cambios encontrados implican la disminución en la proporción de los ácidos grasos C-15 a C-17 en comparación con la composición de las cepas sensibles (Mazzotta y Montville,

1997), mayor presencia de fosfatidiletanolamina y menor presencia de fosfatidil glicerol aniónico y cardiolípidos (Verheul y col. 1997; Crandal y Montville 1998).

Se ha sugerido que estos cambios en la composición de los ácidos grasos provocan que la membrana sea menos fluida lo que evita la inserción de las moléculas de nisina. Además de estas modificaciones, se mencionan cambios en la pared celular (Davies y col. 1996) y un requerimiento de cationes divalentes (Crandall y Montville, 1998) que pueden influir en la resistencia de *Listeria monocytogenes* a la nisina. Sin embargo, el nexo de unión entre las alteraciones celulares y el mecanismo de resistencia permanece todavía sin determinar y las investigaciones para las bacteriocinas de la Clase IIa se están realizando (Ennahar y col. 2000).

Con respecto al modo de acción inhibitorio de los antibióticos, se sabe que inhiben reacciones bioquímicas esenciales. Específicamente en el caso de la estreptomicina inhibe la función del ribosoma 30s, otros como la penicilina inhibe la síntesis de la pared celular y la eritromicina inhibe la función del ribosoma 50s (Stainer y col. 1996).

7.3 CONCENTRACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

7.3.1 CONCENTRACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO

Las Figuras 6 y 7 muestran las unidades de actividad/mL de las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*; al incrementar el porcentaje de saturación de sulfato de amonio, se aumentan las unidades de actividad de bacteriocina. De la misma forma, se observa una reducción en la actividad de bacteriocina en el sobrenadante.

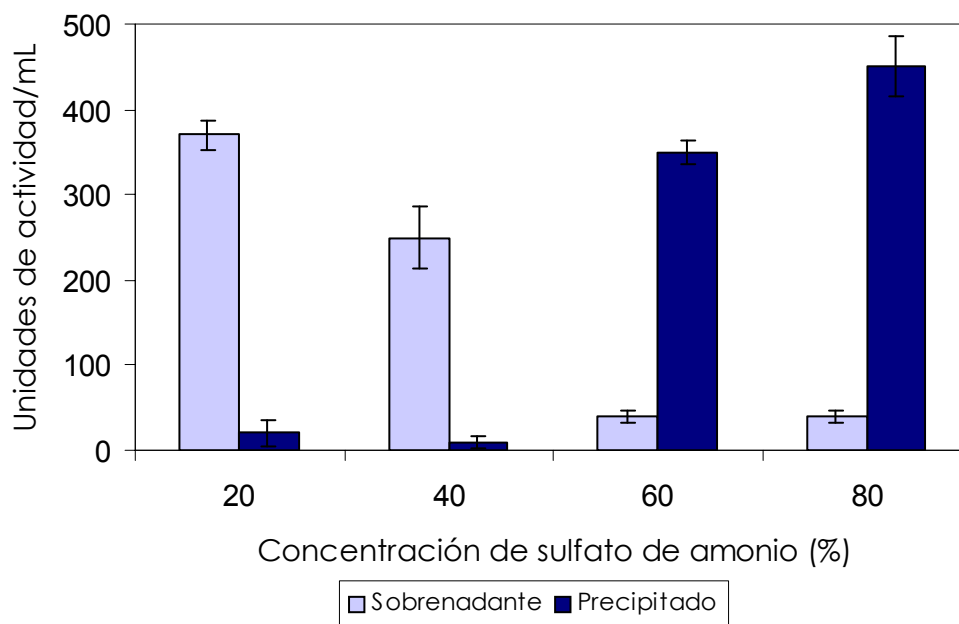


Figura 6. Concentración de la bacteriocina de *Lactobacillus buchneri* por precipitación con sulfato de amonio a diferentes niveles de saturación (20, 40, 60 y 80%).

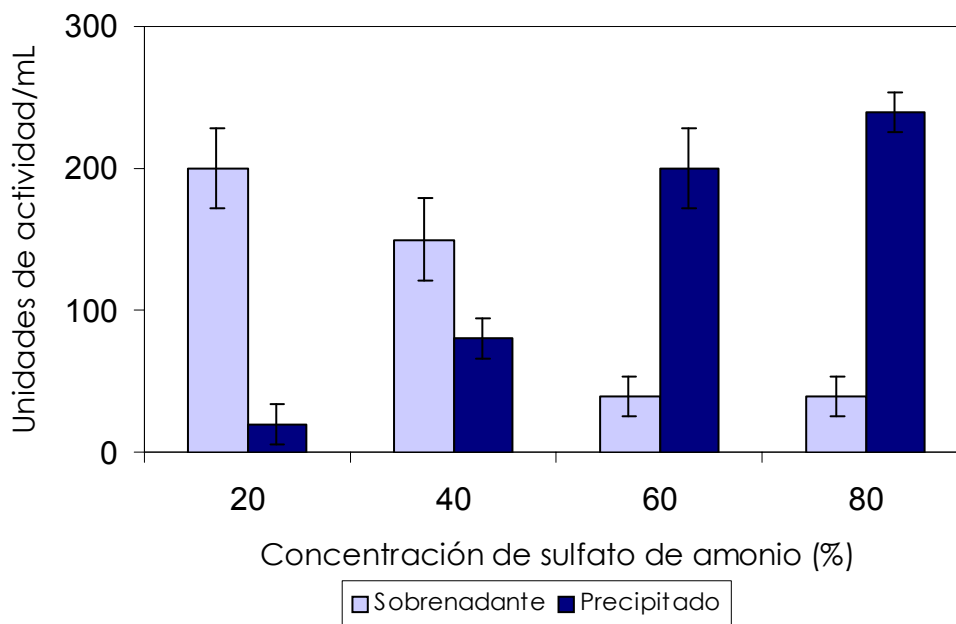


Figura 7. Concentración de la bacteriocina de *Lactobacillus paracasei* por precipitación con sulfato de amonio a diferentes niveles de saturación (20, 40, 60 y 80%).

A partir de estos resultados se observó que la mayor actividad de bacteriocina para *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* se obtuvo con una concentración de sulfato de amonio del 60% y 80%. En las Tablas 16 y 17 se muestra el contenido de proteína, actividad y factor de purificación para las bacteriocinas, utilizando las concentraciones de saturación indicadas.

Tabla 16. Purificación parcial de las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* a una saturación de sulfato de amonio de 60 y 80%.

Paso de la purificación	Proteína (µg/mL)	Proteína total (µg)	Actividad (UA/mL)	Actividad total (UA)	Actividad específica (UA/µg)	Factor de purificación
Muestra inicial	3.42	1719	200	1 x 10 ⁵	58.00	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 60%	1.63	34.6	352	6500	188.00	3.22
(NH ₄) ₂ SO ₄ 80%	1.30	28.2	400	8000	284.00	4.88

Tabla 17. Purificación parcial de las bacteriocinas de *Lactobacillus paracasei* a una saturación de sulfato de amonio de 60 y 80%.

Paso de la purificación	Proteína (µg/mL)	Proteína total (µg)	Actividad (UA/mL)	Actividad total (UA)	Actividad específica (UA/µg)	Factor de purificación
Muestra inicial	1.190	594	150	75,000	126	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 60%	0.979	21.5	275	5500	256	2.02
(NH ₄) ₂ SO ₄ 80%	0.899	18.3	350	7000	382	3.03

Se observó un incremento en la actividad para la bacteriocina de *Lactobacillus buchneri* de 3.2 y 4.8 veces, mientras que para la bacteriocina de *Lactobacillus paracasei* se observó un incremento de 2.0 y 3.0 veces, para las concentraciones de saturación de 60 y 80% respectivamente.

7.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

7.4.1 ESTABILIDAD A DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

Las Figuras 8 y 9 muestran el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de estudio. Se presentó una reducción en la actividad de las bacteriocinas conforme transcurre el tiempo de almacenamiento, siendo este efecto más marcado a 4°C en comparación con -20°C. Jack y col. (1995) sugieren que esta pérdida de actividad puede deberse a la presencia de proteasas que inactivan las bacteriocinas, aunque esto depende de las condiciones (por ejemplo, si son bacteriocinas puras o crudas y el medio en que se almacenan) de almacenamiento. También se ha reportado posible pérdida de la actividad por agregación de las moléculas de bacteriocina. Por tanto, en los estudios posteriores ambas bacteriocinas fueron almacenadas a -20°C. En estas condiciones se logró conservar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas en un nivel adecuado para los estudios de caracterización bioquímica y producción.

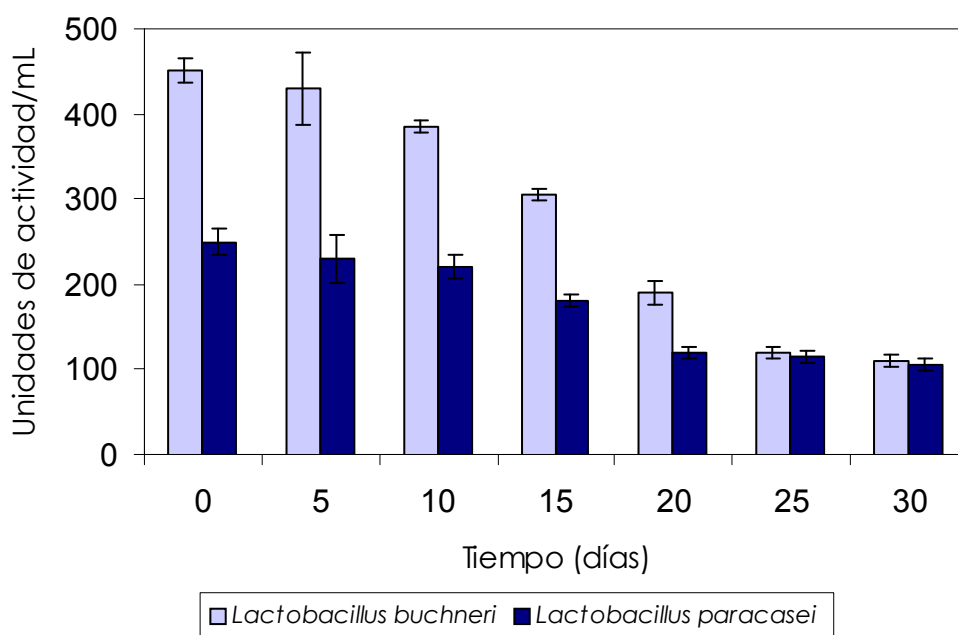


Figura 8. Efecto de la temperatura de almacenamiento a 4°C sobre la actividad de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*.

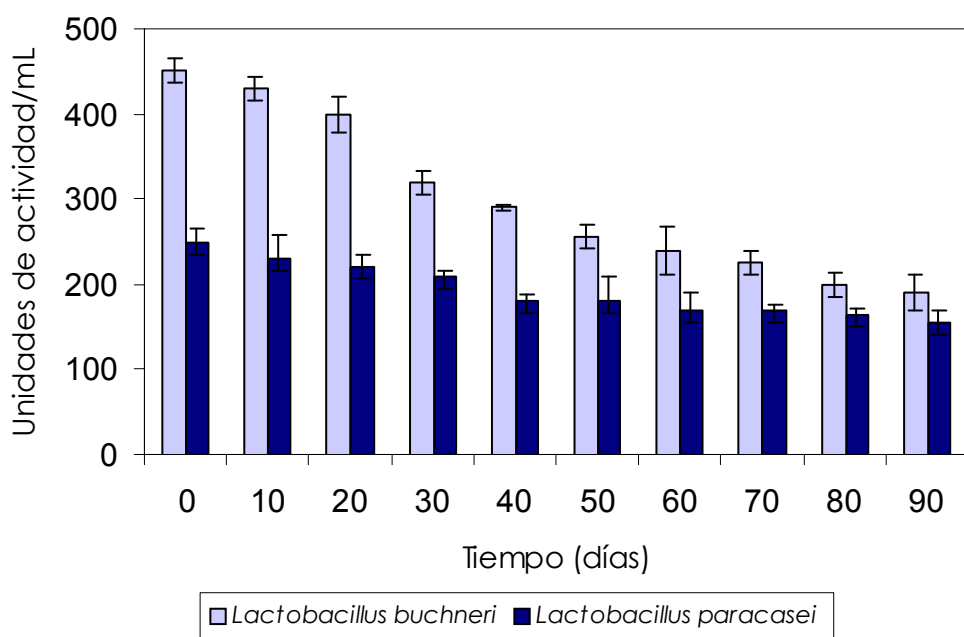


Figura 9. Efecto de la temperatura de almacenamiento a -20°C sobre la actividad de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*.

7.4.2 DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO DE ACTIVIDAD

La Tabla 18 muestra los resultados de la actividad de las bacteriocinas a diferentes pH; se observa que la bacteriocina producida por *Lactobacillus buchneri* presentó mayor actividad a pH 3.0 y 4.0, mientras que la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* tuvo la mayor actividad a pH 4.0 y 5.0. Ambas bacteriocinas no presentaron actividad alguna a pH 10.

Tabla 18. Actividad de bacteriocina a diferentes valores de pH.

PH	ACTIVIDAD DE BACTERIOCINA (UA/ML)	ACTIVIDAD DE BACTERIOCINA (UA/ML)
	Bacteriocina producida por <i>Lactobacillus buchneri</i>	Bacteriocina producida por <i>Lactobacillus paracasei</i>
3.0	400 ± 28.00	200 ± 21.00
4.0	400 ± 14.00	250 ± 14.00
5.0	350 ± 14.00	250 ± 7.00
6.0	350 ± 28.00	175 ± 14.00
8.0	150 ± 21.00	100 ± 7.00
10.0	-	-

* Se empleó como cepa sensible a *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1139 para ambas bacteriocinas de estudio. Las mediciones se realizaron por duplicado.

Para obtener estos valores se consideró el efecto sobre el halo de inhibición (inhibición del microorganismo control) de los diferentes valores de pH. Los diámetros de estos halos se muestran en el Anexo VI.

Generalmente las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas presentan estabilidad a pH ácidos. Mehta y col. (1983) establecieron que la bacteriocina

producida por *Lactobacillus acidophilus* AC1 es estable en un intervalo de pH de 4.0-7.5. Por su parte Daeschel y col. (1990) mencionan que la plantaricina A producida por *Lactobacillus plantarum* es activa en un intervalo de pH de 4.0-6.5. *Lactobacillus reuteri* LA6 produce la reutericina 6, estable a pH 4.0-10.0 (Toba y col. 1991a), la bacteriocina producida por *Lactobacillus acidophilus* M46 también presenta un intervalo amplio de actividad, es estable a pH de 2.0-12.0 (Ten Brink y col. 1990). Como se observa la mayoría de las bacterias pertenecientes al género de *Lactobacillus* presentan un intervalo de actividad amplio que abarca valores tanto ácidos como básicos. Sin embargo por tratarse de estructuras peptídicas presentan un óptimo de actividad (Jack y col. 1995) que para las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* fue 4.0. Desde el enfoque de estudio de esta tesis (para la conservación de alimentos) este valor adquiere importancia debido a la posible aplicación de estas bacteriocinas en alimentos de alta acidez.

7.4.3 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA TÉRMICA

Una característica de las bacteriocinas que está despertando gran interés es la resistencia térmica. El estudio de esta propiedad se enfocó en su posible aplicación en la conservación de productos cárnicos sometidos a cocimiento (por ejemplo las salchichas tipo Frankfurt). El objetivo principal es inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos que resistan el

proceso de calentamiento. También son de interés las bacterias lácticas que tengan resistencia térmica para conservar vía fermentación láctica *in situ* productos cárnicos cocidos.

Como se observa en la Figura 10, la bacteriocina de *Lactobacillus buchneri* tuvo una mayor resistencia (porcentaje de pérdida de actividad) al calor en comparación con la bacteriocina de *Lactobacillus paracasei*.

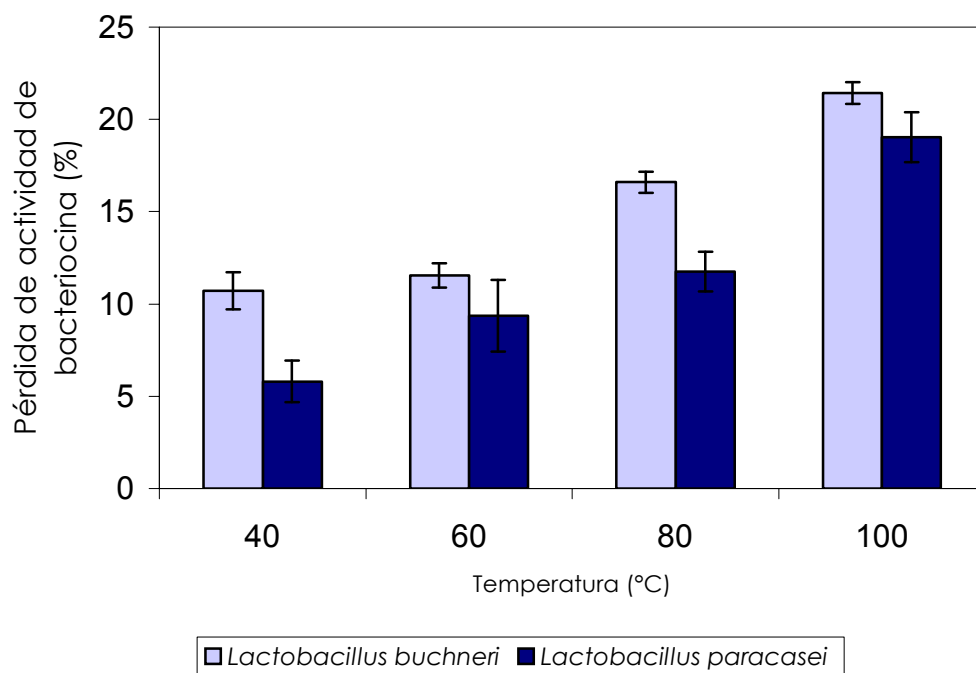


Figura 10. Pérdida de la actividad de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* sometidas a diferentes temperaturas.

Mientras que con la primera bacteriocina se mantuvo una actividad similar en los tratamientos a 80°C y 100°C, con la segunda bacteriocina se observó una pérdida gradual de la actividad conforme se tuvo una mayor exposición al calor. Posiblemente la primera bacteriocina sea mejor candidata para aplicarse en la conservación de productos cárnicos cocidos, debido a su ya mencionada resistencia térmica y a tener un mayor espectro de inhibición microbiano (Secciones 7.2.3 y 7.2.4).

Rodríguez y col. (2000) encontraron en un estudio sobre bacteriocinas producidas por diferentes cepas de *Lactobacillus buchneri* (TAB6, TAB48, TAB60 y TAB65) aisladas de leche, que tres bacteriocinas mostraron resistencia térmica al calentamiento a 60°C durante 60 min y 100°C durante 20 min. Mientras que la bacteriocina producida por la cepa TAB48 fue sensible al segundo tratamiento. Otros estudios reportan también bacteriocinas producidas por bacterias del género de *Lactobacillus* sp. con resistencia térmica. *Lactobacillus plantarum* produce la bacteriocina plantaricina 35d resistente un tratamiento de 80°C durante 120 min (Messi y col. 2001). *Lactobacillus acidophilus* N2 produce la bacteriocina lactacina B resistente a una tratamiento de 100°C durante 60 min (Barefoot y Klaenhammer, 1983). Por su parte *Lactobacillus helveticus* 481 produce una bacteriocina estable a un tratamiento de 100°C durante 30 min (Joerger y Klaenhammer, 1986).

7.4.4 EVALUACIÓN DEL pH DE ADSORCIÓN

En las Figuras 11 y 12 se muestra que la mayor adsorción de la bacteriocinas para la cepa de *Lactobacillus buchneri* se encontró en un intervalo de pH de 5.5-6.5. Los estudios con *Lactobacillus paracasei*, mostraron que la mayor adsorción se dió en un intervalo de pH de 6.0-6.5.

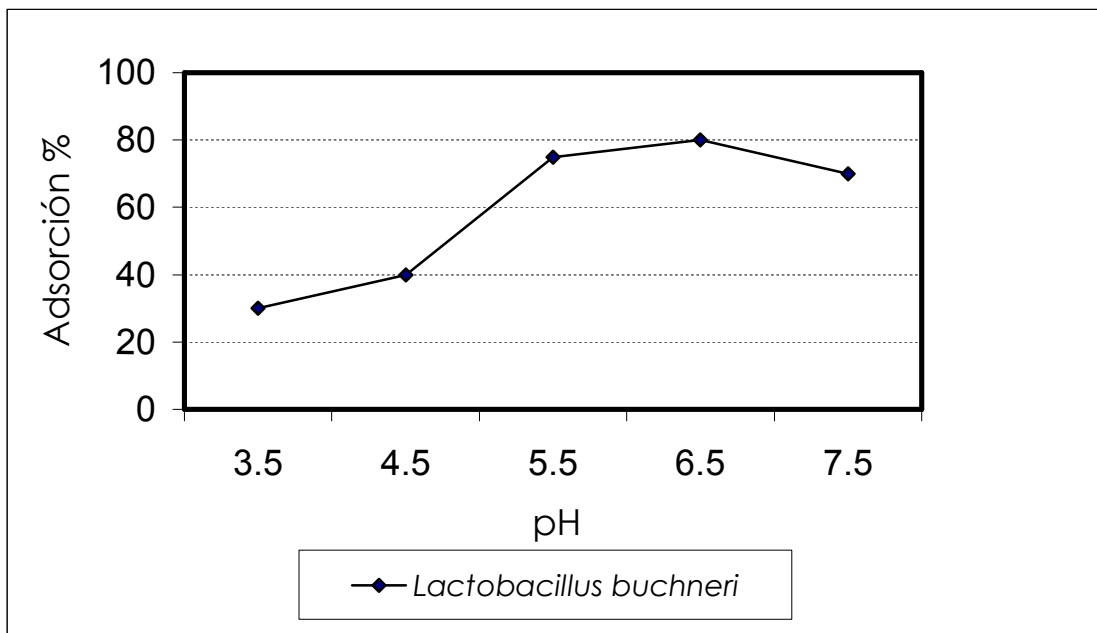


Figura 11. pH de adsorción de la bacteriocina producida por *Lactobacillus buchneri*.

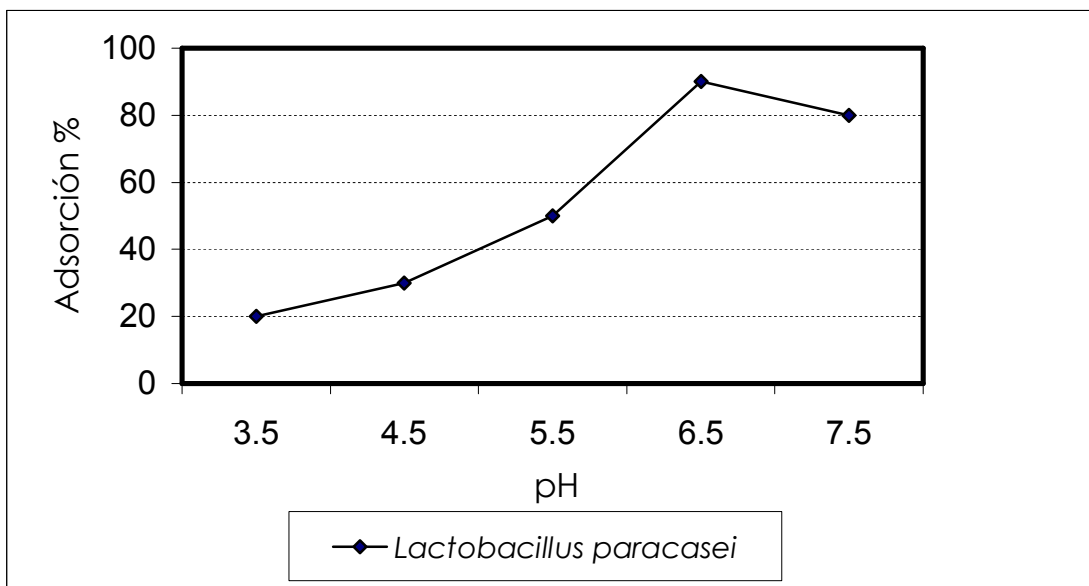


Figura 12. pH de adsorción de la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei*.

La técnica de adsorción es empleada para la recuperación de las bacteriocinas del tipo no lantibiótico. También se ha reportado su uso con la nisina (Sección 2.2.3).

De acuerdo con la clasificación de Klaenhammer (1993) las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* pueden formar parte del Grupo II (de los no lantibióticos) de la Clase IIa por su actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* y su termoestabilidad (Sección 7.4.3), lo que concuerda con los estudios realizados por Kuri (1998), sin embargo para determinar con precisión su clasificación es necesario determinar el peso molecular y la secuencia de aminoácidos.

Tanto Klaenhammer (1993) como Nissen-Meyer y Nes (1997) refieren que las bacteriocinas del tipo no lantibiótico tienen un marcado efecto contra *Listeria sp.*, son estables al calor, catiónicas, hidrofóbicas y tienen un peso molecular <10 kDa. Además tienen una secuencia consenso N-terminal Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys (Sección 2.2.1).

Partiendo de la hipótesis de que las bacteriocinas en estudio pertenecen al Grupo II, se empleó la técnica de adsorción reportada por Yang y Ray (1994), que refiere que las bacteriocinas del tipo no lantibiótico, tienen una serie de características comunes como:

- a) Ser excretadas por las células productoras.
- b) Son catiónicas.
- c) Pueden ser adsorbidas por la superficie celular de la cepa productora y otras bacterias Gram positivas.
- d) La adsorción es dependiente del pH. A valores de pH de alrededor de 6.0 la adsorción es cercana al 90%, mientras que a valores de alrededor de 2.0 la adsorción es del 1%
- e) Puede mejorarse el rendimiento de recuperación al destruir por calentamiento las células productoras (se evita la posible pérdida de actividad de bacteriocina por la producción de enzimas proteolíticas) que permiten la posterior recuperación de las bacteriocinas.

Estos autores también reportan en un estudio sobre cuatro diferentes géneros de bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*) la adsorción de sus respectivas bacteriocinas.

Desde una perspectiva de la conservación de los alimentos, el valor del pH de adsorción permite establecer un parámetro, para evitar que las bacteriocinas sean adsorbidas por las células productoras cuando se apliquen en la conservación de carne fresca a través de la fermentación láctica *in situ*. De esta forma se puede mejorar la inhibición de los microorganismos control, como las cepas de *Listeria monocytogenes* (al favorecerse la difusión de las bacteriocinas en la superficie del alimento).

7.4.5 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BACTERIOCINA SOBRE *Listeria monocytogenes* Y DETERMINACIÓN DE LA MIC

La actividad de la bacteriocina producida por *Lactobacillus buchneri* sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 se muestra en la Figura 13. En un intervalo de tiempo de 3-6 h se observó una reducción de hasta 4.5 ciclos logarítmicos, con una actividad de bacteriocina de 400 UA/mL, que corresponden aproximadamente a un 60% de reducción.

De la misma forma para la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* se observó una reducción entre las 3-6 h de 3.5 ciclos logarítmicos, que corresponden a un 50% de reducción de las ufc de *Listeria monocytogenes*. Posteriormente se observó un leve incremento en el crecimiento de estas bacterias (Figura 14).

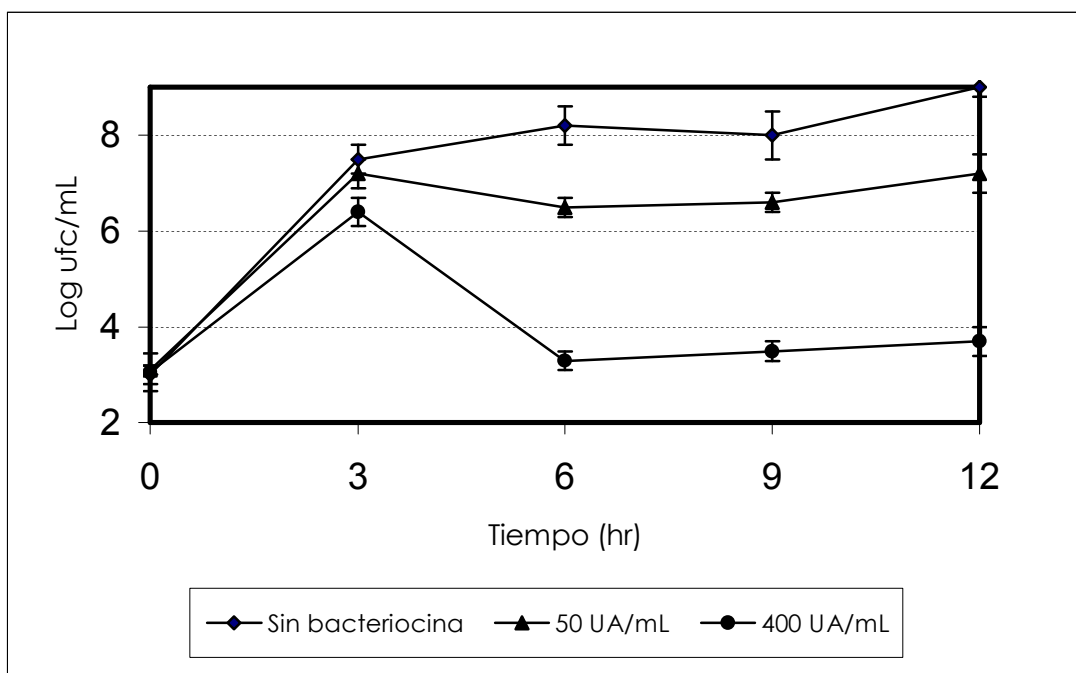


Figura 13. Actividad de la bacteriocina producida por *Lactobacillus buchneri* sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 en crecimiento exponencial.

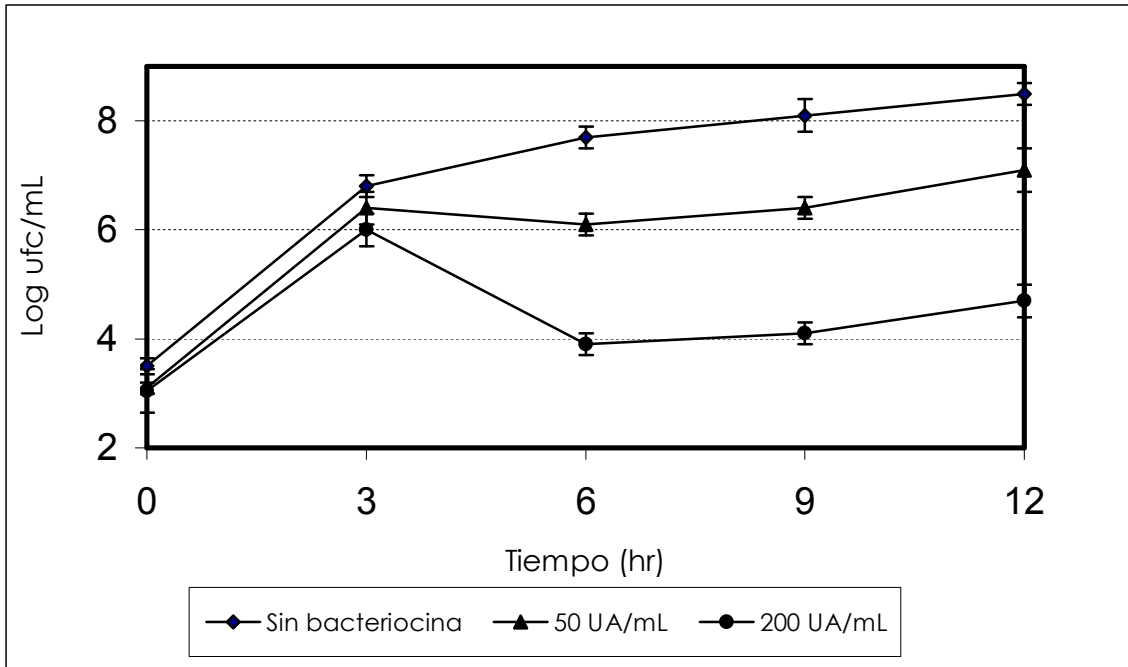


Figura 14. Actividad de la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* sobre *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48 en crecimiento exponencial.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) para las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* se realizó empleando diferentes concentraciones de bacteriocina, como se mencionó en la Sección 6.6.5. La Figura 15 muestra que con la bacteriocinas producida por *Lactobacillus buchneri* se obtuvo en la inhibición de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 un promedio de 50 UA/mL como la MIC, por su parte con la bacteriocinas producida por *Lactobacillus paracasei* se obtuvo en la inhibición de *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48 un promedio de 100 UA/mL como la MIC. Como se observa es necesario duplicar la concentración de bacteriocina en ambos estudios para inhibir el crecimiento de las cepas patógenas (1×10^4 ufc).

Como se explicó en la Sección 7.2.4 la sensibilidad de *Listeria monocytogenes* está influenciada, entre otras variables, por la concentración de bacteriocina y la composición de la membrana citoplasmática de la cepa sensible, así como por un posible proceso de adaptación que puede originar resistencia bacteriana.

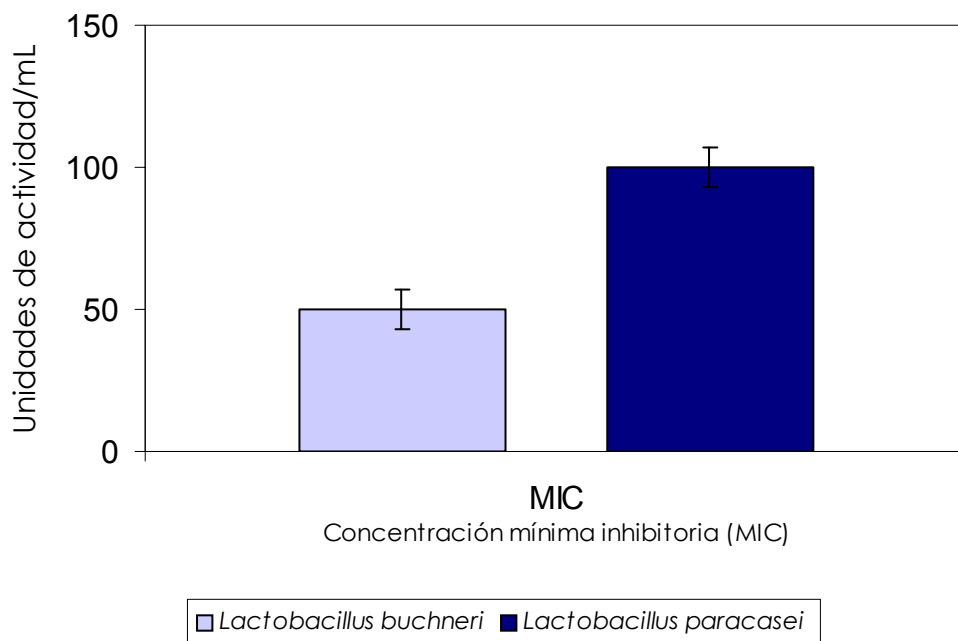


Figura 15. Valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) para las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* (con cepa sensible de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994) y *Lactobacillus paracasei* (con cepa sensible de *Listeria monocytogenes* LMB 92000/48).

7.5 EFECTO DE PARÁMETROS EXTRÍNSECOS EN LA ACTIVIDAD DE LAS BACTERIOCINAS

7.5.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS LÁCTICAS

El estudio de la producción de las bacteriocinas es uno de los aspectos de mayor relevancia junto con su actividad antimicrobiana y estabilidad, para la aplicación en alimentos. Tanto la actividad como la estabilidad pueden determinar la

eficiencia real de estos compuestos biológicos en la conservación de sistemas alimentarios.

Zamfir y col. (2000) mencionan que en la mayoría de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas la cantidad de éstas liberada al medio de cultivo está relacionada con el crecimiento microbiano (biomasa producida). De manera que presentan una cinética de producción de metabolito primario.

Varios aspectos son de interés en el estudio de la producción de estos compuestos biológicos. La delimitación de las condiciones de estudio está determinada en gran parte por el objetivo a alcanzar, algunos de estos autores reportan el empleo de medios de cultivo nuevos a un costo accesible que facilitan la producción a nivel industrial, otros refieren estudios básicos empleando medios semidefinidos para facilitar su posterior purificación y determinar propiedades como secuencia de aminoácidos y peso molecular (Carolissen-MacKay y col., 1997).

Yang y Ray (1994) mencionan que los medios de cultivo como los empleados en esta tesis son necesarios para obtener niveles altos de producción de bacteriocinas. Sin embargo, éstos contienen gran cantidad de péptidos con un peso molecular en el intervalo del reportado para algunas bacteriocinas (3,000-6,000 Da) lo que dificulta un proceso posterior de purificación (Carolissen-Mackay y col., 1997). Algunos autores (Joerger y Klaenhammer, 1986; Hasting y col., 1991)

recomiendan la sustitución de la triptona por caseína-aminoácidos para eliminar la cantidad excesiva de sustancias que interfieran en la purificación.

Como se indica en la Sección 6.7 el objetivo del estudio fue determinar algunos aspectos fisiológicos de la producción de las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* que permitan generar información sobre las características de producción para optimizar un posterior proceso de conservación de carne fresca vía producción de bacteriocinas *in situ* o mediante el empleo de bacteriocinas purificadas o semipurificadas.

La Figura 16 muestra que la mayor actividad se obtuvo con el medio de cultivo MRS para ambas cepas bacterianas en estudio.

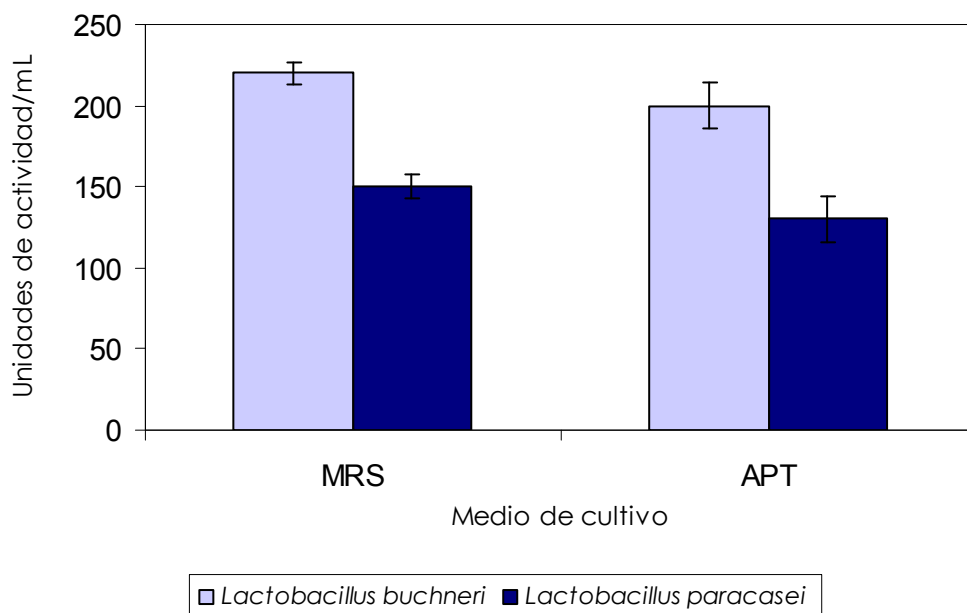


Figura 16. Efecto de los medios de cultivo MRS y APT sobre la producción de bacteriocina.

No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.06$) en la actividad de bacteriocina (Anexo VI) entre los medios de cultivo (MRS y APT). Sin embargo, para posibles fines de producción en mayor escala se puede usar como criterio de selección el costo del medio de cultivo (el costo del medio APT es menor en comparación con el medio MRS) como se hizo posteriormente en los estudios de producción preliminares en un biorreactor.

La mayor actividad de bacteriocina en el medio de cultivo MRS puede deberse a la presencia en este medio de componentes como el extracto de carne (las bacterias de estudio fueron aisladas de carne roja) y la presencia de Tween 80 que tuvo

una influencia significativa en la recuperación de las bacteriocinas (Sección 7.4). Vignolo y col. (1994) mencionan en un estudio con la bacteriocina producida por *Lactobacillus casei* CRL 705, que cuando al medio MRS se le adicionó glucosa, triptona o extracto de levadura se mejoró la producción de la bacteriocina. Mientras que no se encontró influencia alguna de compuestos como el NaCl y el NaNO₂. Este proceso lo explican De Vuyts y col. (1996) quienes mencionan en un estudio sobre la producción de la bacteriocina de *Lactobacillus amylovorus* DEC 471 que la mayor producción está relacionada con la cantidad de glucosa (fuente de carbono) y nitrógeno suplementado en el medio de cultivo.

Por otro lado se encontró diferencia significativa entre las cepas ($p > 0.02$) con una mayor producción para *Lactobacillus buchneri* (210 UA/mL) y de 140 UA/mL para la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* (Anexo VII). Como se discute en la Sección 7.5.5 esta diferencia de actividades estuvo relacionada con un mayor crecimiento (biomasa) de la primera cepa láctica, además de diversos factores relacionados con las características intrínsecas de las cepas sensibles y con las condiciones en las cuales se evalúa esta sensibilidad (Secciones 7.2.3 y 7.2.4), lo que también influye en la mayor actividad encontrada.

7.5.2 TEMPERATURA

La temperatura es otro de los parámetros que tienen efecto sobre la producción de las bacteriocinas. El estudio se realizó en medio de cultivo APT debido a que no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.06$) en la actividad entre este medio MRS (Anexo VI y VII) y APT, como se mencionó anteriormente.

La Figura 17 muestra una mayor actividad con la bacteriocina producida por *Lactobacillus buchneri* a 30°C, mientras que la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* presentó mayor actividad a 35°C. El promedio de actividad de bacteriocinas fue significativamente mayor ($p > 0.010$) a la temperatura de 30°C (185 UA/mL) y 35°C (165 UA/mL) (Anexo VII).

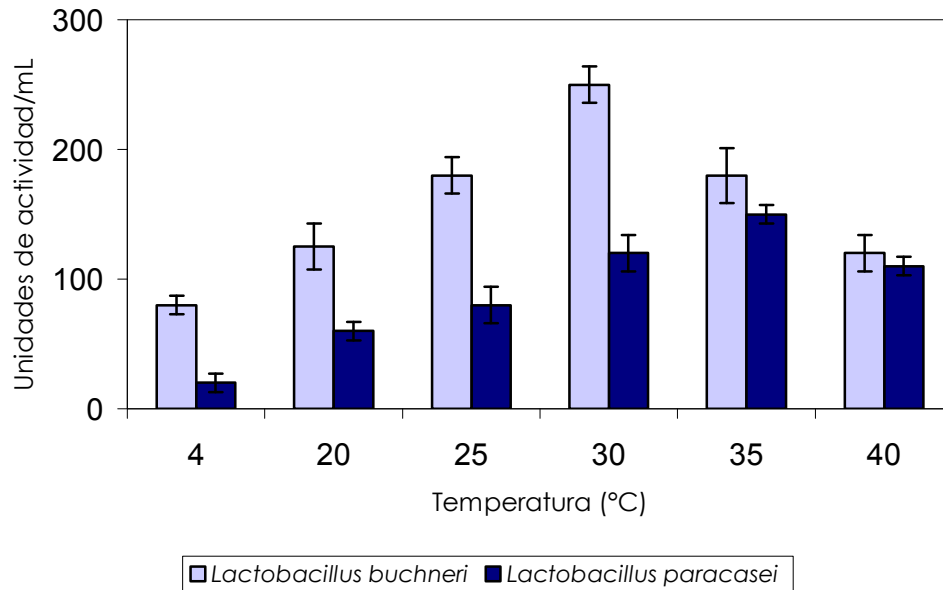


Figura 17. Efecto de diferentes temperaturas en la producción de las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*.

7.5.3 CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE

La Figura 18 muestra los resultados de la actividad para ambas bacteriocinas. Se encontró una diferencia significativa ($p > 0.016$) entre las distintas concentraciones de Tween 80 (0, 0.5, 1.0 y 1.5%), sin embargo no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de Tween 80 de 1.0 y 1.5% (Anexo VI).

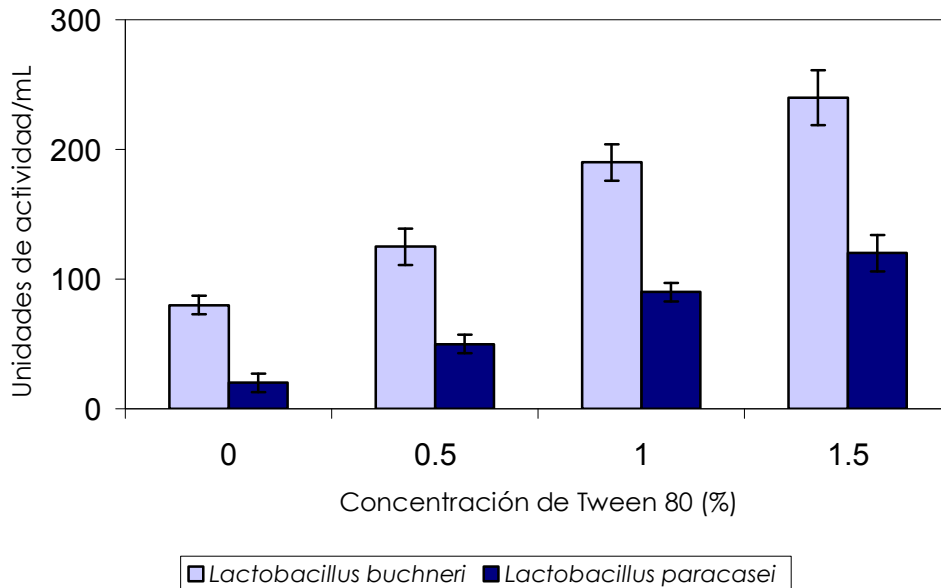


Figura 18. Efecto de la concentración de Tween 80 (%) sobre la actividad de bacteriocina.

Mackay-Carolissen y col. (1997) mencionan que el Tween 80 puede formar micelas de los péptidos de bacteriocina que da como resultado la estabilización de la actividad antimicrobiana. Otros autores también comentan la posibilidad de que este compuesto facilite la liberación de las bacteriocinas a través de la membrana celular (Scopes, 1994).

Por su parte Muriana y Klaenhammer (1991) reportan que la formación de estas micelas puede facilitar la recuperación de las bacteriocinas mediante técnicas de separación de biomoléculas.

7.5.4 ATMÓSFERAS GASEOSAS

La Figura 19 muestra los resultados de la actividad de las bacteriocinas en relación al efecto de las atmósferas gaseosas. La mayor actividad se encontró para ambas bacteriocinas cuando se empleó una atmósfera gaseosa de N₂.

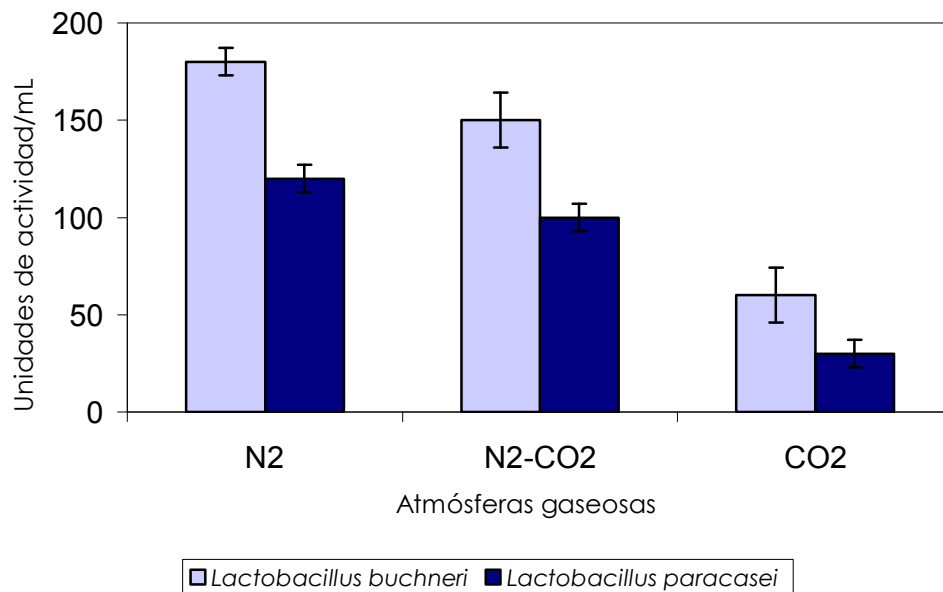


Figura 19. Efecto de diferentes atmósferas gaseosas sobre la producción de las bacteriocinas.

Como se muestra en el Anexo VI, se encontró diferencia significativa ($p > 0.001$) sobre la actividad de las bacteriocinas para los diferentes tratamientos. La mayor actividad se encontró tanto en la cepa de *Lactobacillus buchneri* como con la cepa de *Lactobacillus paracasei* en una atmósfera gaseosa de N₂ (Anexo VII), sin

embargo no se encontró diferencia significativas entre las atmósferas de N₂ y la mezcla de N₂-CO₂ (175 UA/mL y 155 UA/mL respectivamente) por prueba de Duncan.

Se encontró diferencia significativa ($p > 0.019$) entre las cepas con una mayor actividad para *Lactobacillus buchneri* (130 UA/mL) y de 83.33 UA/mL para la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* (Anexo VII)

La mayor actividad de bacteriocina empleando una atmósfera de nitrógeno puede deberse entre otros aspectos a que éste no afecta el crecimiento celular y por tanto la producción (para aquellas bacteriocinas que tienen un patrón de producción primario). Además como menciona Venema y col. (1993) la mayor actividad puede también estar relacionada con las condiciones anaerobias, que permiten una mayor estabilidad al generar un ambiente reductor en el medio de cultivo.

Por su parte García y col. (1995) mencionan que el CO₂ tiene un efecto inhibitor del crecimiento microbiano, aunque esta inhibición es variable para las diferentes cepas microbianas.

7.5.5 PRUEBAS PRELIMINARES DE PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN UN BIORREACTOR

7.5.5.1 EFECTO DEL pH EN LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN UN BIORREACTOR

Las Figuras 20 y 21 muestran la actividad de las bacteriocinas a diferentes valores de pH.

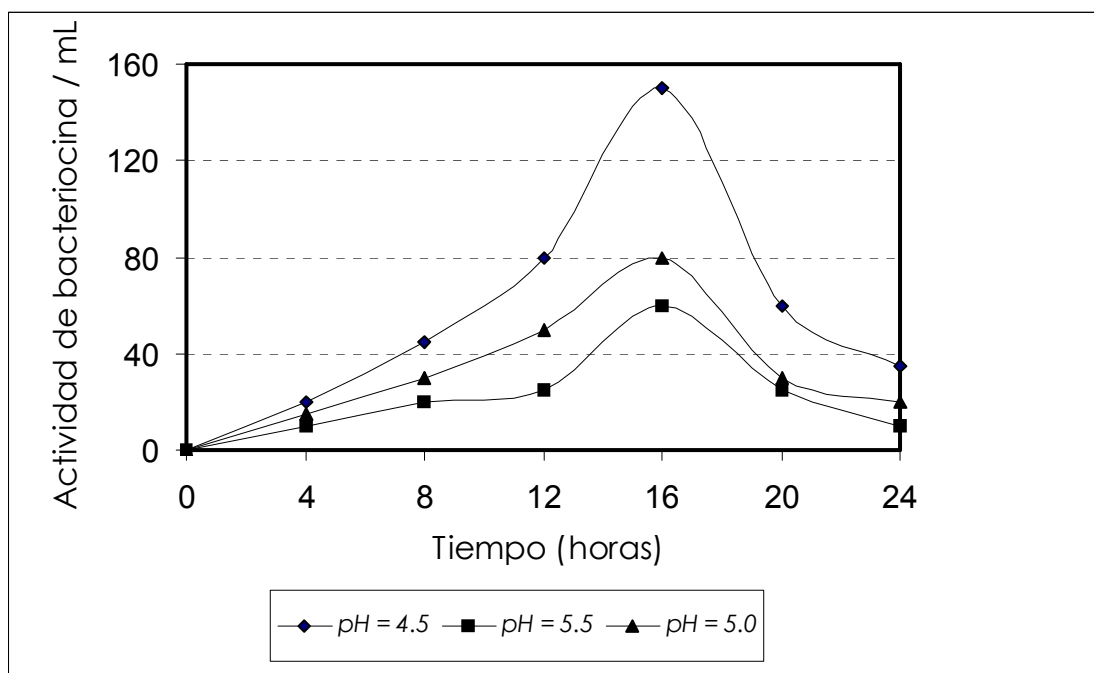


Figura 20. Actividad de bacteriocina para la cepa de *Lactobacillus buchneri* a diferentes valores de pH.

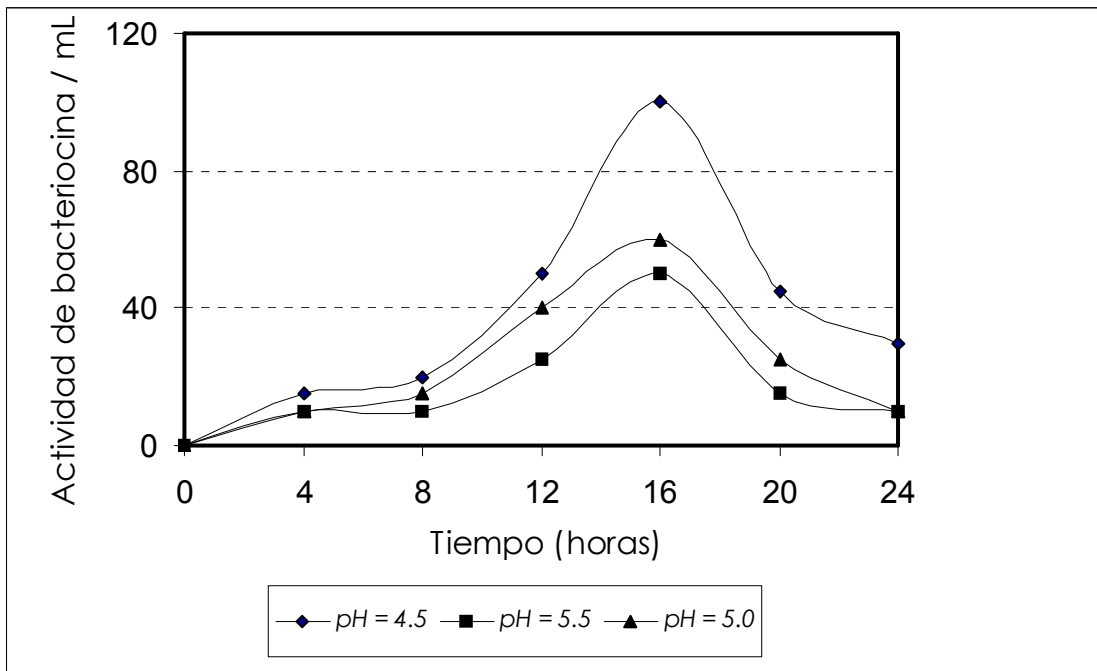


Figura 21. Actividad de bacteriocina para la cepa de *Lactobacillus paracasei* a diferentes valores de pH.

La máxima actividad de la bacteriocina de *Lactobacillus buchneri* (Figura 20) fue a pH 4.5 (150 UA/mL) en comparación con pH 5.5 (80 UA/mL) y pH 5.0 (60 UA/mL). Yang y Ray (1994) establecen que conforme el pH aumenta las bacteriocinas pueden ser adsorbidas por las células productoras y de esta forma se reduce la actividad antimicrobiana cuantificada. Otras posibles explicaciones a esta menor actividad se discuten en la Sección 7.5.5. Para la cepa de *Lactobacillus buchneri* se obtuvo un máximo de actividad (150 UA/mL) después de 16 hr de fermentación a pH 4.5. En la Figura 22 se observa que la actividad antimicrobiana alcanza un máximo al final de la fase exponencial de crecimiento, antes del inicio de la fase estacionaria (con control de pH a 4.5).

La actividad de bacteriocina se incrementó constantemente en relación con el aumento de la biomasa (Tabla 19) durante la fase de crecimiento exponencial de la bacteria.

Para *Lactobacillus paracasei* se encontró (Figura 21), de manera similar a *Lactobacillus buchneri*, que la mayor actividad de bacteriocina fue a pH 4.5 (100 UA/mL) en comparación con el pH de 5.5 (60 UA/mL) y el pH de 5.0 (50 UA/mL).

El máximo de actividad de bacteriocina (100 UA/mL) se obtuvo después de 16 h de fermentación a pH de 4.5. En la Figura 23 se observa, al igual que con la cepa de *Lactobacillus buchneri*, una disminución en la actividad de bacteriocina al final de la fase exponencial de crecimiento (con control de pH a 4.5). Estos resultados pueden explicarse de manera similar a los obtenidos con la cepa de *Lactobacillus buchneri*. Por su parte también la actividad de bacteriocina se incrementó en relación con el aumento de la biomasa (Tabla 19) durante la fase exponencial de crecimiento.

Con respecto al análisis estadístico (Anexo IX) se encontraron diferencias significativas ($p > 0.010$) de pH con respecto a la actividad de bacteriocina. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de producción a pH 4.5

(46.42 UA/mL) y los obtenidos con pH 5.0 y 5.5, con un promedio de actividad de 24.64 y

22.14 UA/mL. El tiempo también tuvo un efecto significativo sobre la actividad ($p > 0.020$), la mayor actividad se obtuvo a las 16 h (83.33 UA/mL en promedio).

Se encontró una diferencia significativa entre las cepas ($p > 0.010$) con una mayor actividad para *Lactobacillus buchneri* de 36.90 UA/mL en promedio y de 26.19 UA/mL para la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* (Anexo VII)

7.5.5.2 ESTUDIOS PRELIMINARES DE PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN UN BIORREACTOR

Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas para una máxima actividad de las bacteriocinas, se procedió a llevar a cabo un estudio preliminar de producción en un biorreactor.

La Figura 22 muestra que la producción de la bacteriocina de *Lactobacillus buchneri* presentó un patrón de producción relacionado con el crecimiento bacteriano (fase exponencial). Este comportamiento también se reporta en la Tabla 19 para la actividad específica. Al final de esta fase se observa una reducción en la actividad de bacteriocina. Zamfir y col. (2000) mencionan que el crecimiento microbiano

se detiene debido posiblemente a que la fuente de carbono, principalmente glucosa, fue consumida totalmente.

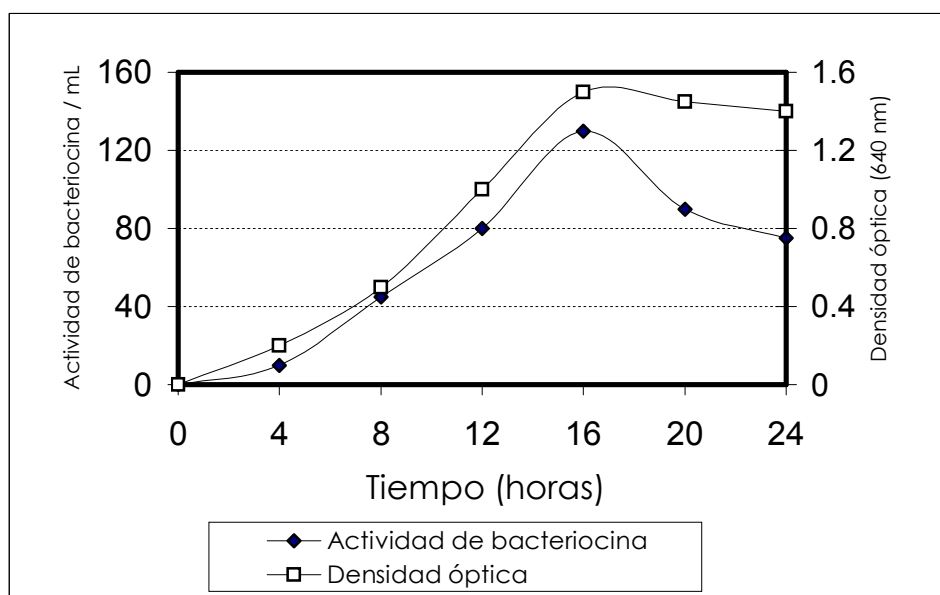


Figura 22. Producción de la bacteriocina de *Lactobacillus buchneri* en un biorreactor.

Tabla 19. Actividad específica durante la producción de la bacteriocina de *Lactobacillus buchneri* en un biorreactor.

TIEMPO ESPECIFICA (h)	ACTIVIDAD DE BACTERIOCINA (UA/mL)	PESO SECO (g/L)	ACTIVIDAD (UA/g)x10 ³
0	0	1.815	0
4	10	1.957	5.108
8	45	2.170	20.735
12	80	2.524	31.685
16	130	2.879	45.147
20	90	2.843	31.645
24	75	2.808	26.704

De Vuyst y col. (1996) mencionan que la producción de las bacteriocinas, está relacionada con una cinética de producción de metabolito primario, con el crecimiento bacteriano. Este fenómeno se presenta en la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, siendo muy pocos los casos en que la producción se realiza durante la fase estacionaria (Kozak y col., 1978; Biswas y col., 1991; Jiménez-Díaz y col., 1993).

Un patrón similar se obtuvo con *Lactobacillus paracasei* (Figura 23 y Tabla 20). Para ambas bacteriocinas al final del crecimiento exponencial se observó una reducción en la actividad antimicrobiana. Varios autores (Parente y col., 1994; Zamfir y col., 2000; De Vuyst y col., 1996) dan varias posibles explicaciones a este fenómeno, como una posible pérdida de la actividad por la presencia de proteasas y la adsorción de las bacteriocinas por las células productoras.

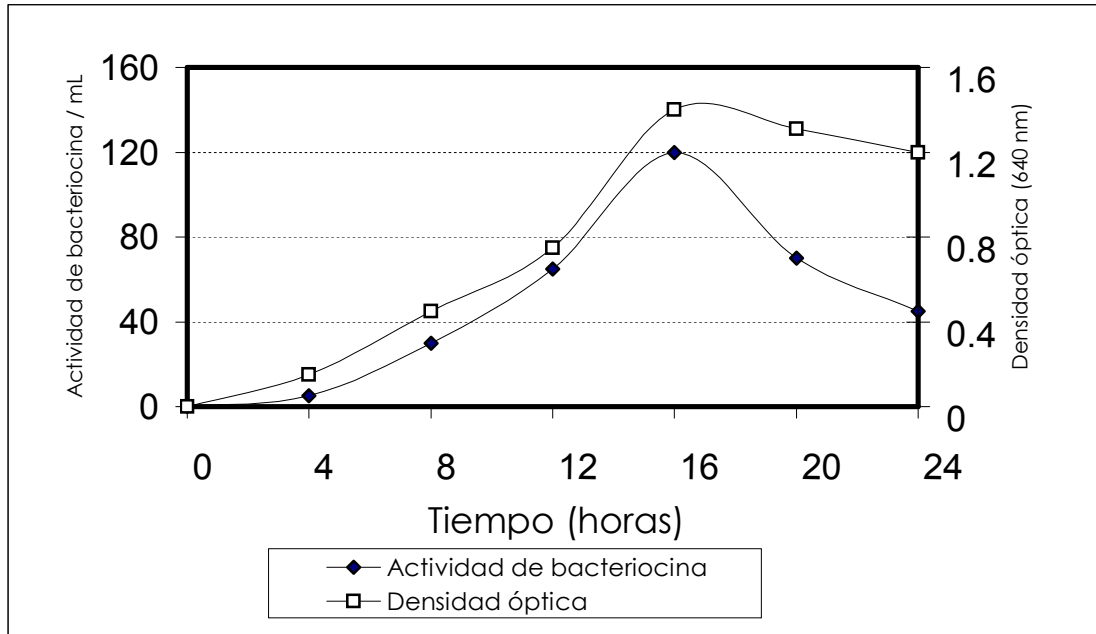


Figura 23. Producción de la bacteriocina de *Lactobacillus paracasei* en un biorreactor.

Tabla 20. Actividad específica durante la producción de la bacteriocina de *Lactobacillus paracasei* en un biorreactor.

TIEMPO ESPECIFICO (h)	ACTIVIDAD DE BACTERIOCINA (UA/mL)	PESO SECO (g/L)	ACTIVIDAD (UA/g)x10 ³
0	0	1.815	0
4	5	1.921	2.601
8	30	2.134	14.053
12	65	2.347	27.688
16	120	2.808	42.727
20	70	2.744	25.503
24	45	2.666	16.875

Como se discutió en la Sección 2.2.3 las bacteriocinas tienden a ser adsorbidas por sus células productoras cuando el pH del medio es básico o cercano a la neutralidad.

Yang y Ray (1994) establecieron que a valores de pH cercanos a 6.0 la adsorción es cercana al 90%, mientras que a valores de alrededor de 2.0 la adsorción es del 1%. Carolissen-Mackay y col. (1997) reportan posibles cambios bioquímicos en esta pérdida de la actividad que, principalmente con las bacteriocinas purificadas puede ser el resultado de un efecto específico del sitio catalítico, debido a la pérdida de cofactores o modificaciones covalentes. Sin embargo son necesarios mayores estudios para determinar con precisión las condiciones y el mecanismo por el cual se presenta este fenómeno.

Con respecto al análisis estadístico (Anexo IX) se encontraron diferencias significativas para el tiempo ($p > 0.001$) y la cepa productora ($p > 0.020$), con respecto a la actividad de bacteriocina. Se encontraron diferencias significativas en el tiempo de producción, siendo a las 16 h donde se alcanza el máximo de actividad con un promedio de actividad de 117.5 UA/mL.

También se encontró diferencia significativa entre las cepas ($P>0.020$) con una mayor actividad para *Lactobacillus buchneri* de 52.14 UA/mL en promedio y de 44.8 UA/mL para la bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* (Anexo VII).

8. CONCLUSIONES

* Las bacteriocinas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* inhiben a cepas de *Listeria monocytogenes*.

* Ambas bacteriocinas de estudio presentan resistencia térmica, debido a que tienen una pérdida de actividad de 15-20% en los tratamientos térmicos de 80 y 100°C durante 20 min. Esta propiedad bioquímica puede favorecer su aplicación en la elaboración de productos cárnicos procesados como los embutidos que son sometidas a un proceso de cocimiento.

* El pH óptimo de actividad de ambas bacteriocinas se encontró en un intervalo de 3.0-4.0. Además estos compuestos biológicos son adsorbidos en una mayor proporción por las células productoras en un intervalo 5.5-6.5. Estos valores son dos parámetros que pueden ser empleados para mejorar la aplicación de las bacteriocinas en alimentos de baja acidez, por producción *in situ* o mediante concentrados purificados.

* La actividad antimicrobiana en condiciones de bajas temperaturas (4°C) se encontró que ésta se mantiene constante durante 10 días; mientras que a -20°C esta actividad permanece por alrededor de 3 meses.

* Las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* tienen un patrón de producción primario (relacionado con el crecimiento bacteriano), como en la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas.

* Las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei* reúnen una serie de características favorables (son bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos, producen bacteriocinas que inhiben a *Listeria monocytogenes*, tienen resistencia térmica, presentan estabilidad a bajas temperaturas (4°C) y a valores de pH ácido) para aplicarse en la conservación de alimentos, en especial los sustratos cárnicos.

9.- PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuff, G.R.**, Vanderzant, C., Savell, J.W., Jones, D.K., Griffin, D.B. y Ehlers, J.W. 1987. Effect of acid decontamination of beef subprimal cuts on the microbiological and sensory characteristic of steaks. *Meat science* **19**:217-226
- Allgaier, H.**, Walter, J., Schlüter, M. y Werner, R.G. 1991. Strategy for the purification of lantibiotics. En: Nisin and novel lantibiotics. G. Jung y H.G. Sahl (Editores). Escom Publishers, Amsterdam, Holanda, pp. 422-433
- Axelsson, L.T.**, Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. y Lindgren, S. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology Health* **2**:131-136
- Aymerich, M.T.**, Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M y Nes, I.F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the family pediocins. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:1676-1682
- Badui, S.** 1999. Química de los Alimentos, Editorial Alhambra Mexicana, México, D.F., pp. 156-160
- Bailey, F.J. y Hurts, A.** 1971. Preparation of a highly active form of nisin from *Streptococcus lactis*. *Canadian Journal of Microbiology* **17**:61-67
- Balasubramanyam, B.V. y Varadaraj, M.C.** 1998. Cultural conditions for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbruecki ssp. bulgaricus* CFR 2028 in milk medium. *Journal of Applied Bacteriology* **84**:97-102
- Barefoot, S.F. y Klaenhammer, T.R.** 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **45**:1808-1815
- Barefoot, S.F. y Kalenhammer, T.R.** 1984. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied Environmental Microbiology* **45**:1808-1815
- Beenkerrum, N.**, Ghouti, Y., Sandine, W.E. y Tantaouni-Elaraki, A. 1993. Methods to demonstrate the bacterial activity of bacteriocins, *Letters in Applied Microbiology*, **17**:78-81
- Berridge, N.J.**, Newton, G.F. y Abraham, E.P. 1952. Purification and nature of the lantibiotic nisin. *Biochemical Journal* **52**:529-535
- Berry, E.D.**, Hutkins, R.W. y Mandingo, R.W. 1991. The use of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* to control postprocessing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurtes. *Journal of Food Protection* **54**:681-686

- Bhunia, A.K.**, Johnson, M.C., Ray, B. y Kaichayanad, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology* **70**:25-33
- Biemuller, G.**, Carpenter, J. y Reynolds, A. 1973. Reduction of bacteria on pork carcasses. *Journal of Food Science* **38**:261-265
- Biswas, S.R.**, Ray, P., Johnson, M.C. y Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:1265-1267
- Braun, V.**, Pilsl, H. y Grob, P. 1994. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Archives of Microbiology* **161**:199-206
- Brink, B.**, Minekus, M., van de Vossen J.M.B.M., Leer, R.J. and Huis in't Veld, J.H.J. 1994. Antimicrobial activity of lactibacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Journal of Applied Microbiology* **77**:140-148
- Brul, S.** y Coote, P. 1999. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* **50**:1-17
- Bruno, M.E.C.** y Montville, T.J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:3003-3010
- Cabo, M.L.**, Murado, M.A., González, M.P. y Pastoriza, L. 1999. A method for the bacteriocin quantification. *Journal of Applied Bacteriology* **87**: 907-914
- Carballo, B.** y López, T.G. 1991. Manual de Bioquímica y Tecnología de la carne, Vicente Ediciones, Madrid, España, pp. 64-65
- Caridi, A.** 2002. Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29**:303-308
- Carminati, D.**, Giraffa, G. y Bossi, M.G. 1989. Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **52**:614-617
- Carolissen-MacKay, V.**, G. Arendse, and W.J. Hastings. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol* **34**:1-16
- Caserio, G.**, Stecchini, M., Pastore, M. y Gennari, M. 1979. The individual and combined effects of nisin and nitrate on the spore germination of *Clostridium botulinum* in meat mixtures subjected to fermentation. *Industria Alimentaria* **18**:894-898
- Chen, Y.** y Montville. 1995. Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Bacteriology* **79**:684-690
- Chen, Y.**, Ludescher, R.D. y Montville, T.J. 1998. Influence of lipid composition on pediocin PA-1 binding to phospholipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:3530-3532
- Chikindas, M.L.**, García-Garcerá, M.J., Driessen, A.J.M., Ledebøer, A.M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N. y Venema, G. 1993. Pediocin PA-1 a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* Pe PAC1.0 forms hydrophilic pores in the

- cytoplasmic membranes of target cells. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:3577-3584
- Chung, K.**, Dickson, J.S. y Crouse, J.D. 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Applied and Environmental Microbiology* **55**:1329-1333
- Crandall, A.D.** y Montville, T.J. 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:231-237
- Coventry, M.J.**, Wan, J., Gordon, J.B., Mawson, R.F. y Hickey, M.W. 1996. Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. *Journal of Applied Bacteriology* **80**:91-98
- Cutter, C.N.** y Siragusa, G.R. 1994. Decontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. *Food Microbiology* **11**:481-489
- Daeschel, M.A.**, McKenney, M.C. y McDonald, L.C. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiology* **7**:91-98
- Dahly, T.A.**, Midden, W.R. y Hartman, P.E. 1989. Comparison of killing of Gram-negative and Gram positive bacteria by pure single oxygen. *Journal of Applied Bacteriology* **171**:2188-2194
- Dalgaard, P.**, Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K. and McMeekin, T. 1994. Estimation of bacteria growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology* 391-404
- Davies, E.A.**, Falahee, M.B. y Adams, M.R. 1996. Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance. *Journal of Applied Bacteriology* **81**:139-146
- Davey, G.P.** 1984. Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **48**:895-896
- De Vuyst, L.** y Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, genetics and applications, *Blackie Academic and Professional*, 1era. Edición, Holanda, pp. 6-7
- De Vuyst, L.**, Callewart, R. y Crabbé, K. 1996. Primary metabolic kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* **142**:817-827
- Delves-Broughton, J.** 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology* **44**(11):100-117
- Dezeure-Wallis, B.** y Vant'Hoof, J. 1980. Effect of lactic acid sprays on beef carcass contamination. *Proceedings of the 24th European Meetings of Meat Research Workers*, Colorado Springs, pp. 316-318
- Dixon, M.** y Webb, E.C. 1979. Enzymes. 3ª Edición. Academic Press, Nueva York Estados Unidos
- Dubois, G.**, Beaumier, H. y Charbonneau, P. 1979. Inhibition of bacteria isolated from ground meat by *Streptococcaceae* and *Lactobacillaceae*. *Journal of Food Science* **44**:1649-1652

- Egyand, L.G.** 1967. Studies on cell division: the effect of aldehydes ketones and α -keto-aldehydes on the proliferation of *Escherichia coli*. *Current Medical and Biology* **1**:14-20
- Ennahar, S.**, Sashihara, T., Sonomoto, K. y Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosíntesis, structure and activity. *FEMS microbiology Reviews* **34**:85-106
- Fimland, G.**, Blingsmo, O.R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I.F. y Nissen-Meyer, J. 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:3313-3318
- Foegeding, P.M.**, Thomas, A.B., Pilkington, D.H. y Klaenhammer, T.R. 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by *in situ* produced pediocin during dry fermented sausage production, *Applied and Environmental Microbiology* **58**:884-890
- Food and Drug Administration**, 1979. Code of Federal Regulations, Chap.21. Parts 100 to 199. April 1, 1979. Office of the Federal Register, Washington, DC
- García, T.**, Martín, R. Sanz, B. y Hernández, P.E. 1995. Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: Envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos* **35**:1-10
- Gibbs, P.A.** 1987. Novel uses for acid lactic fermentation in food preservation. En: Changing Perspectives in Applied Bacteriology Supplement. C.S. Gutteridge y J.R. Norris (Editores), pp. 51S-58S
- Gireesh, T.**, Davidson, B.E. y Hiller, A.J. 1992. Conjugal transfer in *Lactococcus lactis* of a 68-kilobase-pair chromosomal fragment containing the structural gene for the peptide bacteriocin nisin. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:1670-1676
- Gottschalk, G.** 1986. Bacterial Metabolism. Springer-Verlag. Berlin, 2a Edición. Nueva York, EUA, pp. 222-224,
- Guerrero, I.** y Taylor, A.J. 1994. Meat surface decontamination using lactic acid from chemical and microbial sources. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **27**:201-209
- Guerrero, I.**, Mendiola, R., Ponce, E. y Prado, A. 1995. Inoculation of lactic acid bacteria on meat substrates as a means of decontamination. *Meat Science* **40**:397-411
- Hamby, P.L.**, Savell, J.W., Acuff, G. R., Vanderzant, C. y Crooz, H.R. 1987 Spray-chilling and carcasses decontamination system using acid lactic and acetics acid. *Meat Science* **21**:1-14
- Hanlin, M.B.**, Kalchayanad, N., Ray, P. y Ray, B. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *Journal of Food Protection* **56**:252-255
- Hansen, J.N.** 1994. Nisin as a model food preservative. *Review Food Science and Nutrition* **34**:69-93

- Harding, C.D.** y Shaw, B.G. 1990. Antimicrobial activity of *Leuconostoc gelidum* against closely related species and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* **69**:648-654
- Harris, L.J.**, Daeschel, M.A., Stiles, M.E. y Klaenhammer, T.R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **52**:384-387
- Hastings, J.W.**, Sailer, M., Johnson, K., Ray, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin genes from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology* **173**:7491-7500
- Hechard, Y.**, Derijard, B., Letellier, F. y Cenatiempo, Y. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y 105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology* **138**:2725-2731
- Haelander, I.M.**, von Wright, A. y Mattila-Sandholm, T.M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology* **8**:146-150
- Henderson, J.T.**, Chopko, A.L. y Wassenaar van P.D. 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives of Biochemical and Biophysic* **295**:5-12
- Hening, S.**, Metz, R. y Hammer, W.P. 1986. New aspects for the applications of nisin to food products based on its mode of action. *International Journal of Food Microbiology* **3**:135-141
- Holck, A.**, Axeslsson, L., Birkeland, E., Aukrust, T. y Bloom, H. 1992. Purification of amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB 706. *Journal of General Microbiology* **138**:2715-2720
- Holo, H.**, Nilseen, O., y Nes, I.F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology* **173**:3879-3887
- Holzer, M.**, Mayrhuber, E., Danner, H. y Braun, R. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* forage preservation. *Trends in Biotechnology* **21**:282-287
- Hugas, M.**, Garriga, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. 1995. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *Journal of Applied Bacteriology* **79**:322-330
- Hugas, M.** 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *44th International Congress of Meat Science and Techology*, Vol. II, Barcelona, España, pp. 74-83
- Hugas, M.**, Pagés, F., Garriga, M. y Monfort, J.M. 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products with different atmospheres. *Food Microbiology* **15**:639-650

- Hugas, M.**, Garriga, M., Pascual, M., Aymerich, T.A. y Monfort, J.M. 1999. Effects of ingredients and bacteriocinogenic starter culture on the inhibition of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. *Proceedings of the Seventeenth International Conference of the Food Microbiology and Higiene (ICFMH)*, Veldoven, Holanda, pp. 249-250
- Hugenholtz, J.** 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* **12**:165-178
- Hurts, A.** 1981. Nisin. En: *Advance in Applied Microbiology*. D. Periman y A.I. Laskin (Editores), Vol. 27, Academic Press, Nueva York, pp. 85-123
- Huss, H.H.**, Jeppesen, V.F., Johansen, C. y Gram L. 1995. Biopreservation of fish products. A review of recent approaches and results. *Journal of aquatic Food Product Technology* **4**(2):5-24
- Hutton. M.T.**, Chehak, P.A. y Hanlin, J.H. 1991. Inhibition of botulinum toxin production by *Pediococcus acidilactici* in temperature abused refrigerated foods. *Journal of Food Safety* **11**:225-267
- ICMSF.** 1996. Microorganismos de los alimentos: Características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia, pp. 171, España
- Jack, R.W.**, Carne, A., Metzger, J., Stefanovic, S., Sahl, H.G., Jung, G. y Tagg J.R. 1994. Elucidation of the structures of SA-FF22, a lanthionine containing antibacterial peptide produced by *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *European Journal of Biochemistry* **220**:455-462
- Jack, R.W.**, Tagg, J.R. y Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiological Reviews* **50**:171-200
- Jacob, F.**, Lwoff, A., Siminovitch, A. y Wollman, E. 1953. Définition de quelques termes relatifs á la lysogénie. *Instituto Pasteur (Paris)* **84**:22-224
- Jay, J.M.** 1982. Antimicrobial activity of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**:525-527
- Jiménez-Díaz, R.**, Rios-Sánchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz.Barba, J.L. y Piard, J.C. 1993. Plataricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:1416-1424
- Joerger, M.C.** y Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology* **167**:439-446
- Joerger, M.C.**, y Klaenhammer, T.R. 1990. Cloning, expresion, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *Journal of Bacteriology* **172**:6339-6347

- Jung, D.S.**, Bodyfelt, F.W. y Daeschel, M.A. 1992. Influence of fat and emulsifier on the efficacy of nisin and meat products. *Journal of Food Protection* **53**:81-91
- Kaiser, A.L.** y Montville, T.J. 1993. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricum MN, in batch and continuous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology* **75**:536-540
- Kaiser, A.L.** y Montville, T.J. 1996. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:4529-4535
- Kandler, D.** 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**:209-224
- Klaenhammer, T.R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**:337-349
- Klaenhammer, T.R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **12**:39-86
- Kozak, W.**, Bardowski, I. y Dobrzanski, W.T. 1978. Lactoc-strepcins- acid bacteriocin produced by lactic streptococci. *Journal of Dairy Research* **45**:247-257
- Kuri, H.V.** 1998. Lactic acid bacteria and *Salmonella* from Mexican pork products: characterization and antagonism. Tesis de Doctorado. The Queen's University of Belfast, U.K.
- Leistner, L.** 1983. Prospect of the preservation and processing of meat. *Proceedings of the 5th World Conference on Animal Production*, Tokio, pp. 1-2
- Lejeune, R.**, Callewaert, R., Crabbé, K. y De Vuyst, L. 1998. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE471 in batch cultivation. *Journal of Applied Microbiology* **84**:159-168
- Lewus, C.B.**, Sun, S. y Montville, T.J. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:143-149
- Lindgren, S.E.**, y Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonist activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiology Review* **87**:149-164
- Liu, W.** y Hansen, J.N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:2551-2558
- Lowry, O.H.**, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biology and Chemistry* **193**:265-275.
- Lowndes, R.** y Henriksson, A. 1999. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by lactic acid bacteria on sliced coked ham. *Proceedings of the Seventeenth International*

Conference of the Food Microbiology and Higiene (ICFMH), Veldoven, Holanda, pp. 271-272

- Mazzota, A.S.** y Montville, T.J. 1997. Nisin induced changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant at 10°C and 30°C. *Journal of Applied Bacteriology* **82**:32-38
- McMullen, L.M.** y Stiles, M.E. 1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *Journal of Food Protection Supplement* 64-71
- Mehta, A.M.**, Patel, K.A. y Dave, P.J. 1983. Isolation and purification of an inhibitory protein from *Lactobacillus acidophilus* AC1. *Microbiology* **37**:37-43
- Mendonca, A.F.**, Molins, R.A., Kraft A.A. y Walker, H.W. 1989. Microbiological, chemical, and physical changes in fresh, vacuum-packaged pork treated with organic acids and salts, *Journal of Food Science* **54**:18-21
- Messi, P.**, Bondi, M., Sabia, C., Battini, R. y Manicardi, G. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology* **64**:193-198
- Ming, X.** y Daeschel, M.A. 1993. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance response of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* **56**:944-948
- Ming, X.** y Daeschel, M.A. 1995. Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* **58**:416-420
- Ministerio de Agricultura y pesquerías de Dinamarca.** 1997. Statutory Order on Food Additives. 1997. Statutory order no. 942 of December 11, Copenhagen, Dinamarca
- Minor, P.H.** 1998. Cambios en parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad de la carne de cerdo sometida a fermentación láctica como método de bioconservación. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México, D.F.
- Minor, P.H.**, Ponce, A.E., Macias, B.S. y Guerrero, L.I. 2002. Conservación de la carne fresca de cerdo por fermentación láctica: efecto sobre el color, la textura y la formación de los ácidos grasos libres. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. ISSN 1665-2738, Vol. 1, números 1-2, 73-80
- Minor, P.H.**, Ponce, A.E., Macias, B.S. y Guerrero, L.I. 2004. Changes in long chain fatty acids and microbial populations of pork inoculated with two biopreservatives strains. *Meat Science* **66**:793-800
- Modic, P.**, Bastic, L., Zivarovic, R. y Milosevski, V. 1978. The group of weak organic acids with salt on the prolongation of the shelf-life of ground young beef, *Proceedings of*

the 24th European Meeting of Meat Research Workers, Colorado Springs, EUA, pp. 5-11

- Moll, G.N.**, Ubbink-Kok, T., Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Konings, W.N. y Driessen A. 1996a. Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two component bacteriocin. *Journal of Bacteriology* **178**:600-605
- Moll, G.N.**, Roberts, G.C.K., Konings, W.N. y Driessen, A.J.M. 1996b. Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. *Antonio van Leeuwenhoek* **69**:185-191
- Montel, M.C.** y Talon, R. 1993. Factors affecting growth and lipase production by meat *Lactobacilli* strains and *Brochotrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology* **64**:229-240
- Moretro, T.**, Hagen, S.F. y Axelsson, L. 1998. A new, competly defined médium for meat lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* **85**:715-722
- Mortvedt, C.I.** y Nes, I.F. 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. *Journal of General Microbiology* **136**:1601-1607
- Mortvedt, C.I.**, Nissen-Meyer, J., Sletten, K. y Nes, I.F. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocins produced by *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:1829-1834
- Mountney, G.J.** y O'Malley, J. 1965. Acids as poultry meat preservatives. *Poultry Science* **44**:582-586
- Muriana, P.** y Klaenhammer, T.R. 1991. Cloning, phenotypic expresión, and DNA sequences of the gene for the lactococin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus sp.* *Journal of Bacteriology* **173**:1779-1788
- Muriana, P.M.** y Klaenhammer, T.R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin P, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:114-121
- Nes, I.F.**, Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. y Holo, H 1996. Biosynthesis of bacteriocin in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**:113-128
- Nielsen, J.W.**, Dickson, J.S. y Crouse, J.D. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:2142-2145
- Nissen-Meyer, J.**, Holo, H., Havarstein, L.V., Sletten, K. y Nes, I. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology* **174**:5686-5692
- Nissen-Meyer, J.**, Larsen, A.G., Sletten, K., Daeschel, M. y Nes, I.F. 1993. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *Journal of General Microbiology* **139**:1973-1978

- Niessen-Meyer, J.**, Nes, I.F. 1997. Ribosomal synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Archives of Microbiology* **167**:67-77
- Noerlis, Y.** y Ray, B. 1993. Factors influencing immunity and resistance of *Pediococcus acidilactici* to the bacteriocina, pediocin AcH. *Letters in Applied Microbiology* **18**:138-143
- Ogden, S.K.**, Taylor, A.J., Guerrero, I., Escalona, H. y Gallardo, F. 1995. Changes in odour, colour and texture during the storage of acid preserved meat. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **28**:521-527
- Parente, E.** y Hill, C. 1992. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **73**:290-298
- Parente, E.** y Ricciardi, A. 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Letters in Applied Microbiology* **19**:12-15
- Parlamento Europeo. 1995.** European Parliament and Council Directive no. 95/2/EC of 20 Feb. 1995 on food additives other than colours and sweeteners. OJ no. L61, Marzo 18, 1995, pp.1-40
- Paynter, M.J.**, Brown, K.A. y Hayasaka, S.S. 1997. Factors affecting the production of an antimicrobial agent, plataricin F, by *Lactobacillus plantarum* BF001. *Letters in Applied Microbiology* **24**:159-165
- Pérez-Chabela, L.**, Barrientos, G.R., Ponce, A.E y Signorini, P.M. 2001. Effect of heat-resistant lactic acid bacteria on *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. *IFT Annual Meeting*, Nueva Orleans, EUA, pp. 19
- Piard, J.C.**, Muriana, P.M., Desmazeaud, M.J. y Klaenhammer, T.R. 1992. Purification and characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology* **279**:284
- Quadri, L.E.**, Saller, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* LV 17B. *Journal of Biochemistry and Chemistry* **269**:12204-12211
- Rammelsberg, M.**, Muller, E. y Radler, F. 1990. Cascicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Archives of Microbiology* **154**:249-252
- Rammelsberg, M.**, y Radler, F. 1990. Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology* **69**:177-184
- Ray, B.** 1993. Sublethal injury, bacteriocins and food microbiology. *ASM News* **59**:285-291
- Rayman, M.K.**, Malik, N. y Hurts, A. 1983. Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model meat system. *Applied and Environmental Microbiology* **46**:1450-1452
- Reynolds, A.** y Carpenter, J. 1974. Bacterial properties of acetic and propionic acids on pork carcasses. *Journal of Animal Science* **38**:515-519

- Robach, M.** 1981. Inhibizione del deterioramento e dei batteri patogeni del pollame fresco e confezionato sottovuoto mediante ácido sórbico e sorbato dei potassio, *Tecnologie Alimentari* **9**:42-44
- Roca, M.** y Kalman, I. 1989. Antagonistic effect of some starter culture on *Enterobacteriaceae*. *Meat Science* **25**:123-132
- Rodriguez, E.,** González, B., Gaya, P., Núñez, M. y Medina, M. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw mill. *International Dairy Journal* **10**:7-15
- Ross, K.F.,** Ronson, C. y Tagg, J.R. 1993. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarum* 20P3, *Applied and Environmental Microbiology* **59**:2014-2021
- Sahl, H. G.** y Brandis, H. 1981. Production, purification and chemical properties of anti-staphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of General Microbiology* **127**:377-384
- Sahl, H.G.** 1994. Staphylococcin 1580 is identical to the lantibiotic epidermin. Implications for the nature of bacteriocins from gram positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:752-755
- Sahl, H.G.,** Jack, R.W. y Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry* **230**:827-853
- Salminen, S.** y Wright, A. 1993. Lactic Acid Bacteria, Marcel Dekker, Nueva York, EUA, pp. 7-8
- Sanz, B.,** Selgas, D., Parejo, J. y Ordoñez, J.A. 1988. Characteristics of meat lactobacilli isolated from dry sausages. *International Journal of Food Microbiology* **6**:18-19
- Schillinger, U.** y Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* **55**:1901-1906
- Schillinger, U.,** Kaya, M. y Lücke, F.K. 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-production strain of *Lactobacillus sake*. *Journal of Applied Bacteriology* **70**:473-478
- Schleifer, K.H.** 1993. Section 12, Gram-positive cocci. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, P.H.A. Sneath, N.S., Mair, M.E. Sharpe y J.G. Holt (Eds), Williams and Wilkins, Los Angeles, EUA, pp.
- Schüller, F.,** Benz, R. y Sahl, H.G. 1989. The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. *European Journal of Biochemistry* **182**:181-186
- Scopes, R.K.** 1994. Protein purification. Principles and Practice, Third Edition, Springer-Verlag, USA, pp 38-39, 71-101
- Scott, J.C.,** Sahl, H.G., Carne, A. y Tagg, J.R. 1992. Lantibiotic-mediated anti-lactobacillus activity of a vaginal *Staphylococcus aureus* isolate. *FEMS Microbiology Letters* **93**:97-102

- Sharpe, M.E.** y Pettipher, G.L. 1983. Food spoilage by lactic acid bacteria. En: Economic Microbiology. A.H. Rose (Editor), Vol. 8, Academic Press, Nueva York, EUA, pp. 199-223
- Smulders, F.J.** 1987. Prospectives of decontamination of meat and poultry by organic acid to especial reference to lactic acid. En: Elimination of pathogenic organism from meat and poultry. F.J. Smulders, (Editor), Elsevier Science Publishers, Londres, Inglaterra, pp. 319-344
- Smulders, F.J.M.,** Barendsen, P., Van Logtestun, J.G., Mossel, D.A.A. y Van Der Marel, G.M. 1986. Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat descontaminant. *Journal of Food Technology* **21**:419-436
- Spelhaug, S.R.** y Harlander, S.K. 1989. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Protection* **52**:856-862
- Stainer, R.G.,** Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R. 1996. Microbiología. Editorial Reverté. pp. 720-721, España
- Stiles, M.E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**:235-249
- Stoffels, G.,** Ingolf, F.N. y Goumundsdooffir, A. 1992. Isolation and propierties of a bacteriocin producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *Journal of Applied Bacteriology* **73**:309-316
- Surve, A.N.,** Sherikan, A.T., Bhilegaonkar, K.N. y Karkare, U.D. 1991. Preservative effect of combinations of acetic acid with lactic or propionic acid on buffalo meat stored at refrigeration temperatures. *Meat Science* **29**:309-322
- Tagg, J.R.,** Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriology Review* **40**:722-756
- Tahara, T.,** Kanatani, K., Yacida, K., Miura, H., Sakamoto, M. y Oshimura, M. 1992. Purification and some propierties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Biosciencie Biotechnology and Biochemistry* **56**:1212-1215
- Taylor, C.** y Kung, L. 2002. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aeróbic stability of high moisture corn in laboratory silos. *Journal of Dairy Science* **85**:1526-1532
- Ten Brink, B.,** Huisin't Veld, J.H.J. y Munekus, M. 1990. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* M46; optimization of production and partial characterization. *FEMS Microbiology Review* **87**:91-95
- Tichaczek, P.S.,** Meyer, J.N., Nes., R.F., Vogel., R.F. y Hammes, W.P. 1992. Characterization of the bacteriocin curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 P. *Systematic Applied Microbiology* **15**:460-468
- Toba, T.,** Yoshioka, E. y Itoh, T. 1991. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Letters in Applied Microbiology* **13**:281-286
- Tramer, J.** y Fowler, G.G. 1964. Estimation of nisin i foods. *Journal of Food Science and Food Agriculture* **8**:522-528

- Ungermann, V.**, Goeke, K., Fiedler, P. y Zähler, H. 1991. Optimization of fermentation of gallidermin and epidermin. En: Nisin and novel lantibiotics. G. Jung y H.G. Sahl (Editores). Publishers, Holanda, pp. 410-421
- Upreti, G.C.** y Hinsdill, R.D. 1975. Production and mode of action of lactocin 27 bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **7**:139-145
- Van Belkum, M.J.**, Hayema, B.J., Geis, A., y Venema, G. 1989. Cloning of two bacteriocins gene from a lactocal bacteriocin plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* **55**:1187-1191
- Van Belkum, M.J.**, Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, J.F., Konings, W.N. y Abee, T. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage independent protein mediated manner. *Journal of Bacteriology* **173**:7934-7941
- Vaughan, E.E.**, Daly, C. y Fitzgerald, G.F. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Applied Bacteriology* **73**:299-308
- Vaughan, E.E.**, Caplice, E., Looney, R., O'Rourke, N., Coveney, H. 1994. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials, *Journal of Applied Bacteriology* **76**:118-123
- Venema, K.**, Abbe, T. y Haandrikmar, A. 1993. Mode of action of Lactococcin B, a thiol activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:1041-1048
- Venema, K.**, Venema, G. y Kok, J. 1995. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends in Microbiology* **3**:299-304
- Verheul, A.**, Russell, N.J., van't Hof, R., Rombouts, F.M. y Abee T. 1997. Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:3451-3457
- Vignolo, G.M.**, Kairuz, M.N., Ruiz, H.A. y Oliver, G. 1994. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Journal of Applied Bacteriology* **80**:90-93
- Vogel, R.F.**, Lohmann, M., Nguyen, M., Weller, A.N. y Hammes, W.P. 1993. Molecular characterization of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake* isolated of a sauerkraut and their application in sausage fermentations. *Journal of Applied Bacteriology* **74**:295-300
- Wolf, C.E.** y Gibbons, W.R. 1996. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *Journal of Applied Bacteriology*, **80**:453-457
- Wood, B.J.** y Holzapfel, W.H. 1996. The genera of lactic acid bacteria, Blackie Academic and Professional, London
- Woolthuis, C.H.J.**, y Smulders, F.J.M. 1985. Microbial decontamination of calf carcasses by lactic acid sprays. *Journal of Food Protection* **48**:832-837

- Woolthuis, H.J.**, Mossel, D.A., Van Logtestijn, J.D. y Smulders, F.M. 1984. Microbial decontamination of porcine liver with lactic acid and hot water. *Journal of Food Protection* **47**:221-226
- Yaldirim, Z.**, Avsar, Y.K. y Yaldirim, M. 2002. Factors affecting the adsorption of buchnericin LB, a bacteriocin produced by *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology Research* **157**:103-107
- Yang, R.**, Johnson, C.M. y Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:3355-3359
- Yang, R.**, y Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology* **11**:281-291
- Zamfir, M.**, Callewaert, R., Cornea P.C., Savu, L., Vatafu, I. y De Vuyst, L. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology* **87**:923-931
- Zamfir, M.**, Callenwaert, R., Cornea, P.C. y De Vuyst, L. 2000. Production kinetic of acidophilina 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *FEMS Microbiology Letters* **190**:305-308
- Ziauddin, K.S.**, Rao, D.N. y Amla, B.L. 1993. *In vitro* study on the effect of lactic acid and sodium chloride on spoilage and pathogenic bacteria of meat. *Journal of Food Science and Technology* **30**:204-207

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

La determinación de proteína se realizó utilizando el método de Lowry (1951).

Se emplearon los siguientes reactivos:

SOLUCIÓN A: 0.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker) + 1 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot (2 \text{H}_2\text{O})$ (J.T. Baker) en 100 mL de agua destilada.

SOLUCIÓN B: 20 g Na_2CO_3 (J.T. Baker) + 4 g NaOH (J.T. Baker) en 1 L de agua destilada.

SOLUCION C: 1 mL sol. A + 50 ml sol. B

SOLUCION D: 10 mL Folin-Ciocalteu Fenol (Sigma) en 10 mL de agua destilada.

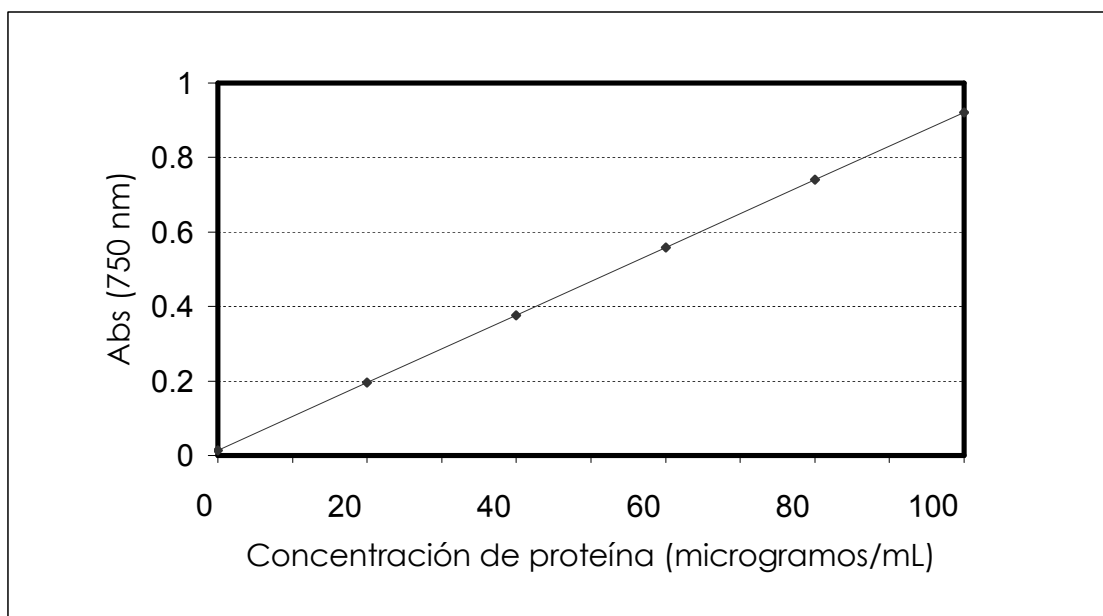
La muestra (tanto del precipitado como del sobrenadante) se llevó a un volumen de 0.5 ml con agua destilada y se adicionaron 2.5 ml de la solución C. La solución se agitó en un vortex y se dejó reposar durante 5-10 minutos. Posteriormente se agregó 0.25 ml de la solución C y se agitó nuevamente dejándose reposar 30 min en obscuridad. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 750 nm en una espectrofotómetro Beckman DU modelo 650 (San José, California, EUA).

La curva patrón se preparó con una solución de 500 mg/mL de seroalbúmina bovina (Sigma) diluida a diferentes concentraciones 0, 20, 40,

60, 80 y 100 µg/mL. La concentración de proteína en las muestras se extrapola de una curva patrón ajustada y los datos se sometieron a un ajuste de regresión.

CURVA PATRÓN DE PROTEÍNA

Se empleó seroalbúmina bovina (Sigma) diluída a diferentes concentraciones (0, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL). La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry.

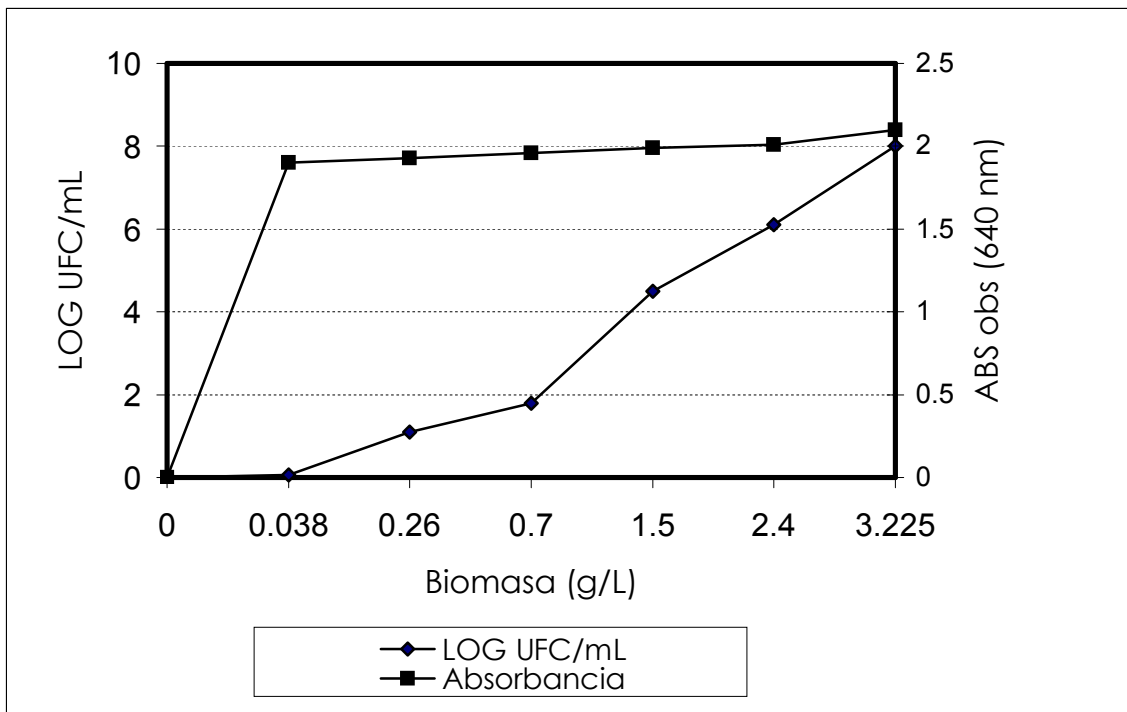


Curva patrón para la determinación de proteína por el método de Lowry (1951).

La curva ajustada es $Y = 0.04110 + 0.0090745 X$ con una $R^2 = 0.9952$

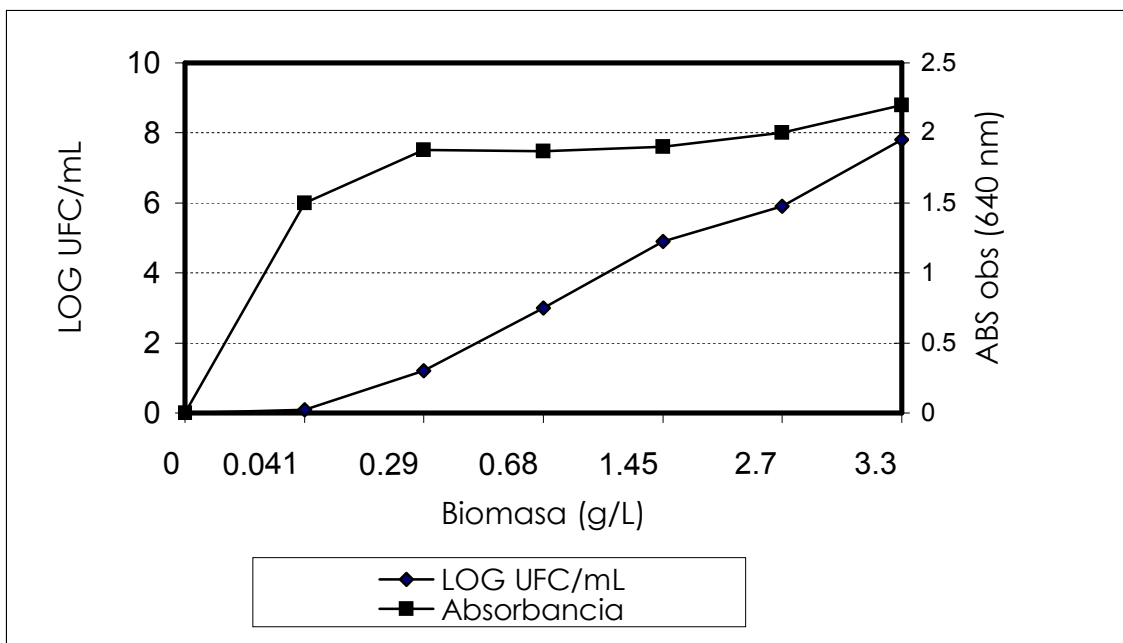
ANEXO II

CURVAS DE DENSIDAD ÓPTICA, UFC/ML Y PESO SECO



Curvas de densidad óptica, peso seco y logaritmo de cuenta viable, en medio de cultivo APT con la bacteria de *Lactobacillus buchneri*

i



Curvas de densidad óptica, peso seco y logaritmo de cuenta viable, en medio de cultivo APT con la bacteria de *Lactobacillus paracasei*

Parámetros de la curva de densidad óptica (D.O.) contra peso seco (g/L)

Coefficiente de correlacion	Ordenada al orgien	Pendiente	Ecuación
0.989*	-2.55*	1.41*	D.O. = 1.41(peso seco)-2.56
0.98**	-2.261**	1.382**	D.O. = 1.382(peso seco) – 2.261

*Datos obtenidos para la cepa de *Lactobacillus buchneri* crecida en medio APT

**Datos obtenidos para la cepa de *Lactobacillus paracasei* crecida en medio APT

ANEXO III

PRUEBAS PRELIMINARES DE SELECCIÓN DE CEPAS SENSIBLES: ANÁLISIS TRUBIDIMÉTRICO A 640 NM

Cepas de colección sobre las que se evaluó la sensibilidad a las bacteriocinas empleando un análisis turbidimétrico.

Bacterias de colección	Bacteriocina de <i>Lactobacillus buchneri</i>		Bacteriocina de <i>Lactobacillus paracasei</i>	
	D.O. (promedio) SAB	D.O. (promedio) CB	D.O. (promedio) SAB	D.O. (promedio) CB
<i>Lactobacillus</i> sp. (B2)	1.40	1.40	1.55	0.90
<i>Lactobacillus sake</i> PC-1 11016	1.3	1.25	1.35	0.80
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PC-1 11016	1.4	1.3	1.55	1.10
<i>Staphylococcus xilosus</i> DD-34 5000 509	1.6	1.1	1.45	0.85
<i>Lactobacillus fructosus</i> B-2041	1.5	0.9	1.65	1.1
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-4495	1.4	0.7	1.45	0.9
<i>Pediococcus cerevisiae</i> NCTC 8066	1.1	1.2	1.35	1.40
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ450	1.3	1.35	1.25	1.20
<i>Enterococcus</i> sp. (76)	1.25	1.20	1.55	1.50
<i>Enterococcus</i> sp. (29)	1.1	1.1	1.35	1.30
<i>Lactobacillus</i> sp. (133)	1.35	1.30	1.45	1.55
<i>Lactobacillus</i> sp. (22)	1.40	1.45	1.55	1.60
<i>Staphylococcus carnosus</i> MC-1 02055	1.30	1.65	1.65	1.70
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	1.55	1.60	1.45	1.45
<i>Lactobacillus alimentarius</i> BJ-33 50001855	1.70	1.1	1.60	1.65
<i>Lactobacillus minor</i> ATCC 119B	1.45	1.45	1.45	1.50
<i>Lactobacillus amylophilus</i> NRRL B-4437	1.35	1.40	1.65	1.70
<i>Lactobacillus casei</i> sp. <i>rhamnosus</i> NRRL B-445	1.45	1.35	1.35	1.40
<i>Lactobacillus amylovorus</i> NRRL B-4540	1.30	1.30	1.25	1.20
<i>Lactobacillus hilgardii</i> NRRL B-1127	1.40	1.45	1.60	1.65
<i>Lactobacillus hilgardii</i> NRRL B-1139	1.55	0.90	1.65	1.1
<i>Lactobacillus pentosus</i> LP-1 31035	1.60	1.65	1.55	1.60
<i>Lactobacillus brevis</i> CETC 815	1.45	1.50	1.35	1.30
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1.30	1.35	1.40	1.45
<i>Streptococcus diacetilactici</i>	1.20	1.35	1.50	1.55
<i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-813	1.60	0.8	1.65	1.2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp.	1.60	1.65	1.50	1.55
<i>mesenteroides</i> NRRL B-1118				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp <i>cremoris</i> NRRL B-3232	1.40	1.65	1.35	1.35
<i>Propionibacterium acidipropionici</i> NRRL B-3568	1.25	1.20	1.40	1.50
<i>Alteromonas putrefasciens</i> ATCC 8071	1.75	1.85	1.70	1.65
<i>Brochothrix thermosphacta</i> ATCC 11509	1.65	1.70	1.55	1.60
<i>Staphylococcus aureus</i> 51	1.80	1.85	1.65	1.75
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	1.70	1.75	1.60	1.70
<i>Micrococcus luteus</i> 50	1.35	1.40	1.45	1.45
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1.65	1.70	1.60	1.60
<i>Pseudomona fluorescens</i>	1.45	1.50	1.55	1.60
<i>Proteus mirabilis</i>	1.60	1.60	1.45	1.45
<i>Enterococcus cloacae</i>	1.35	1.45	1.50	1.40
<i>Enterococcus faecalis</i> NRRL B-537	1.1	1.20	1.30	1.35
Saga L	1.65	1.10	1.60	0.9

P1 (cepa aislada)	1.20	1.25	1.35	0.80
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (JC)	1.45	0.90	1.40	1.40
L2 (cepa aislada)	1.60	1.1	1.50	1.55
Cepa 56 (cepa aislada)	1.35	1.40	1.40	0.80

Los símbolos se refieren a:

SB: sin actividad de bacteriocina (se agregó bacteriocina inactivada)

CB: con bacteriocinas

Los datos son el promedio de dos mediciones

ANEXO IV

EFFECTO EN EL HALO DE INHIBICIÓN DE NISINA PRODUCIDA POR *Lactococcus lactis* ATCC 11454 EMPLEANDO *Lactobacillus plantarum* NRRL B-813 COMO CEPA SENSIBLE: ANÁLISIS DE VARIANZA

Análisis de varianza

Fuente de variación	Análisis estadístico	
	Pr> (modelo) 0.0471	P>
Medio de cultivo		0.065
Concentración de agar		0.9986
Concentración de surfactante		0.012

ANEXO V

EFFECTO EN EL HALO DE INHIBICIÓN DE NISINA PRODUCIDA POR *Lactococcus lactis* ATCC 11454 EMPLEANDO *Lactobacillus plantarum* NRRL B-813 COMO CEPA SENSIBLE; COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS DE DUNCAN

Comparación múltiple de medias de Duncan

Fuente de variación	Análisis estadístico		
		\bar{X}^*	
Medio de cultivo	MRS	10	A
	APT	10	A
Concentración de agar	1.5 %	11	A
	1.0 %	12	A
	0.75%	12	A
Concentración de surfactante	1.5 %	19	A
	1.0 %	17	A
	0.5 %	13	B
	0.0 %	13	B

* Diámetro del halo de inhibición (mm). Letras iguales no son significativamente diferentes con una $\alpha = 0.05$

ANEXO VI

EFFECTO DE DIFERENTES VALORES DE PH (CON EL EMPLEO DE SOLUCIONES AMORTIGUADORAS 5 MM) SOBRE EL DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1139

Diámetros del halo de inhibición obtenido mediante el empleo de soluciones amortiguadoras a diferente valor de pH (3, 4, 5, 6, 8 y 10)

Fuente de variación	Diámetro del halo de inhibición (mm)
pH	
3	-
4	-
5	1
6	1
7	2
8	2
10	3

* La prueba se realizó empleando a *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1139 como microorganismo indicador. Las mediciones se realizaron por duplicado.

ANEXO VII

EFFECTO DE VARIABLES EXTRÍNSECAS EN LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR *Lactobacillus buchneri* Y *Lactobacillus paracasei*: ANÁLISIS DE VARIANZA

ANEXO VIII

EFFECTO DE VARIABLES EXTRÍNSECAS EN LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR *Lactobacillus buchneri* Y *Lactobacillus paracasei*: COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS DE DUNCAN

ANEXO IX

EFFECTO DEL PH EN LA PRODUCCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS DE *Lactobacillus buchneri* Y *Lactobacillus paracasei*: ANÁLISIS DE VARIANZA

Análisis de varianza		
Fuente de variación	Análisis estadístico	
	Pr> (modelo)	P>
	0.020	
pH		0.010
Tiempo		0.020
Cepa productora		0.010

ANEXO X

EFFECTO DEL PH EN LA PRODUCCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS DE *Lactobacillus buchneri* Y *Lactobacillus paracasei*: COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS DE DUNCAN

Comparación múltiple de medias de Duncan

Fuente de variación		Análisis estadístico		
pH		\bar{X}^*		
	4.5	46.42	A	
	5.0	24.64	B	
	5.5	22.14	B	
				Tiempo (h)
		0	0	F
		4	13.33	E
		8	23.33	D
		12	45	B
		16	83.33	A
	20	33.33	C	
	24	19.16	D	
Cepa productora	<i>Lactobacillus buchneri</i>	36.90	A	
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	26.19	B	

* Unidades de actividad/mL empleando como cepa sensible a *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1139. Letras iguales no son significativamente diferentes con una $\alpha = 0.05$.

ANEXO XI

PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN UN BIOREACTOR POR *Lactobacillus buchneri* Y *Lactobacillus paracasei*: ANÁLISIS DE VARIANZA

Análisis de varianza

Fuente de variación	Análisis estadístico	
	Pr> (modelo)	P>
	0.001	
Tiempo		0.001
Cepa productora		0.020

ANEXO XII

PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS EN UN BIOREACTOR POR *Lactobacillus buchneri* Y *Lactobacillus paracasei*: COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS DE DUNCAN

Comparación múltiple de medias de Duncan

Fuente de variación		Análisis estadístico	
		—	X*
Tiempo	0	0	G
	4	10	F
	8	32.5	E
	12	65	C
	16	117.5	A
	20	72.5	B
	24	52.5	D
Cepa productora	<i>Lactobacillus buchneri</i>	52.14	A
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	44.8	B

* Unidades de actividad/mL empleando *Lactobacillus hilgardii* NRRL B-1129 como cepa sensible. Letras iguales no son significativamente diferentes con una $\alpha = 0.05$.

ANEXO XIII

MEDIOS DE CULTIVO

Agar MRS (g/L)

Polipeptona	10.0 g
Extracto de carne	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Glucosa	5.0 g
Tween 80	1.08 g
Fosfato dipotásico	2.0 g
Acetato de sodio	5.0 g
Citrato de amonio	2.0 g
Sulfato de amonio	0.2 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
Agar bacteriológico	15.0 g

Se ajusta el pH del medio según requerimientos. Se disuelven 70.3 por 1 litro de medio de cultivo

Agua peptonada tamponada	
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato de sodio	9.0 g
Fosfato dipotásico	1.5 g

pH final = 7.0 (aproximado)

Medio de cultivo TSA (g/1 L)

Peptona pancreática caseína	15.0 g
Peptona de soya	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar-agar	15.0 g

pH final 7.3 ± 0.2

Medio TSB (g/L)

Peptona de caseína	17.0 g
Peptona de soya	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Dextrosa	2.5 g

pH final = 7.3 (aproximado)

Medio de cultivo Palcam (g/L)

Peptona	23.0 g
Almidón	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar-agar	13.0 g
D(-) manita	10.0 g

Citrato de amonio y hierro (III)	0.5 g
Esculina	0.8 g
Glucosa	0.5 g
Cloruro litico	15.0 g
Rojo de fenol	0.08 g
PH: 7.0 ± 0.2 a 25°C	

APT Broth (g/L)

Caseína digerida por enzimas pancreáticas	10.0 g
Extracto de levadura	7.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato de potasio	5.0 g
Citrato de sodio	5.0 g
Dextrosa	10.0 g
Polisorbato 80	0.2 g
Sulfato de magnesio	0.8 g

Cloruro manganoso

0.14

g

Sulfato ferroso	0.04 g
Carbonato de sodio	1.25 g

pH final 6.7 ± 0.2



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 0001

CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y ESPECTRO DE INHIBICION MICROBIANA DE LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*.

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 18 del mes de mayo del año 2004 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. RUBEN ROMAN RAMOS
- DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA
- DRA. AMELIA FARRAS GONZALEZ-SARAVIA
- DR. CARLOS REGALADO GONZALEZ
- DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
DE: HUGO MINOR PEREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBARLO

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. OSCAR ARMANDO MONROY
HERMOSILLO

PRESIDENTE

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

VOCAL

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

VOCAL

DRA. AMELIA FARRAS
GONZALEZ-SARAVIA

VOCAL

DR. CARLOS REGALADO GONZALEZ

SECRETARIO

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ
PERRINO