

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Iztapalapa



Ciencias Biológicas y de la Salud

Caracterización de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus helveticus*

T E S I S

Para obtener el grado de:

Maestra en Biotecnología

P R E S E N T A:

Q.A. Olivia Lugo Magaña

Directora

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Asesores:

Dra. Gabriela Rodríguez Serrano

Dr. Humberto Hernández Sánchez



México D.F. a 19 de Agosto del 2013

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Caracterización de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus helveticus*

que presentó

Olivia Lugo Magaña

Comité Tutorial:

Director: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero _____

Asesor: Dr. Humberto Hernández Sánchez _____

Asesor: Dra. Gabriela Rodríguez Serrano _____

Jurado:

Presidente: Dr. José Ramón Verde Calvo _____

Secretario: Dra. Mariana Rodríguez Sánchez _____

Vocal: Dra. Rina María Gonzales Cervantes _____

Vocal: Mtra. Lorena Gómez Ruiz _____



AGRADECIMIENTOS

Sin duda alguna al terminar algún trabajo, en este caso, la tesis uno piensa en el sin número de personas que debemos agradecer, así que antes que nada pensé seriamente en el significado de la gratitud.

Gratitud es el sentimiento que experimenta una persona al estimar un favor o beneficio que alguien le ha concedido. Al sentir gratitud se desea corresponder al mencionado favor de alguna manera. El sentimiento de gratitud está vinculado al agradecimiento.

La gratitud se puede expresarse de diversas formas. Puedes sentirte agradecido muchas veces a lo largo del día por las pequeñas cosas que nos suceden.

En este caso, por medio de unas pequeñas líneas quiero expresar mi total agradecimiento a todas las personas que me brindaron su ayuda, su comprensión, su cariño y su tiempo mientras realicé el posgrado.

A mis queridos Padres, que siempre están a mi lado apoyándome, aun en mis malas decisiones y en los peores momentos. La inspiración para seguir adelante, el coraje, la humildad y los buenos valores los aprendí de mis padres.

A mi querida hermana, a quien jamás le he podido dedicar el tiempo que meceré, las atenciones y el cuidado. Esto no significa que no la ame, muy por el contrario ella está todo el tiempo en mi mente y es la razón por la cual jamás me rendiré.

Agradezco a la Dra. Alma, por brindarme esta oportunidad y confiar en mí, por su tiempo y sus consejos pero más importante, gracias Dra. por darme palabras aliento cuando más lo necesite.

A la Dra. Gaby y a la Mtra. Lore por sus consejos, su tiempo, sus conocimientos y por las enseñanzas.

A Deni y a Claudia, sí, así sin títulos porque sin duda lo que más les agradezco es su amistad y su cariño.

A todos y cada uno de los chicos de la PP2, Yola, Naye, Oscar, Omar, Frank, Angi. A los chicos de la generación Willy, Ary, Isa y Nestor. Muchas gracias por aguantarme estos dos años. A mis queridas niñas del Club SKFC que siempre lograron sacarme una sonrisa Itzel, Anali y Dan.

A Mimi ...



A mi querida amiga Daniela; (Wakashi para los amigos) Jamás podré agradecerte de forma adecuada por el tiempo que me regalaste, las risas, los llantos, y cuanta emoción insana escrita en pequeñas frases.

Finalmente una persona muy importante para mí. Susana o Sushi de verdad, yo no sé qué haría si no tuviera una amiga como tú.

Mientras no moleste a nadie, seguiré haciendo cosas fuera de lo normal. Tal vez me equivoque en algún momento pero, tomare mis propias decisiones, si me pierdo en el trayecto sufriré, si me equivoco rectificaré, y si no puedo reparar el error continuare.
Cada tropiezo no será una derrota, sino una experiencia de fortaleza.

まだまだだね





RESUMEN

La conservación de alimentos así como la prevención de enfermedades causadas por éstos es un tema que ha motivado la investigación científica. El empleo de aditivos de origen natural es uno de los campos más ampliamente estudiados. Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza peptídica sintetizadas ribosomalmente por diferentes bacterias y con propiedades antimicrobianas. Las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas son generalmente reconocidas como seguras y por lo tanto son de gran interés para su uso como aditivo en alimentos.

En los últimos años se han descubierto y caracterizado nuevas bacteriocinas de bacterias ácido lácticas, que permiten aprovechar al máximo su potencial antimicrobiano

En el presente trabajo, se estudió la producción, purificación y caracterización de un péptido que presentó características propias de una bacteriocina. Este péptido fue producido por una cepa de *Lactobacillus helveticus* y fue probado contra un microorganismo sensible (*Listeria innocua*) para determinar su actividad antimicrobiana. Al realizar la fermentación de *Lactobacillus helveticus* en dos medios; uno con Oligomate 55 como fuente de carbono y otro en MRS se encontró que, al utilizar un medio con Oligomate se obtuvo una mayor producción de compuestos antimicrobianos comparado con el MRS. Se evaluaron 3 diferentes metodologías para la purificación de este péptido: ultrafiltración, precipitación y adsorción-desorción en células.

Tras realizar las purificaciones se encontró que el método más efectivo para tener la bacteriocina activa fue por adsorción-desorción en células tanto para los extractos de fermentación de un medio con Oligomate 55 como en un medio con MRS.

Se determinó por HPLC el peso molecular se encontró que los péptidos presentes en ambos extractos parcialmente purificados con actividad tenían entre 5 y 12 kDa.

La evaluación del modo de acción de ambos extractos purificados evidenció un efecto bacteriolítico frente a *Listeria innocua*, sin embargo al evaluarlo frente a otro microorganismo (*Escherichia coli*) no se encontró un modo de acción aparente, por lo cual el modo de acción aún no es claro.



Finalmente se evaluó el efecto del pH y la temperatura, para ello se aplicó un diseño experimental 2^3 para generar una superficie de respuesta para cada extracto sobre la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas purificadas de ambos extractos. Probando dos diferentes modelos de regresión múltiple, se encontró que en ambos casos el efecto del pH resulta ser significativo, pero en el caso de la bacteriocina producida en un medio con Oligomate 55 también es significativo el efecto de la interacción del pH y la temperatura. La bacteriocina en ambos casos es estable a pH entre 3 y 5 y a temperaturas de 70 y 80°C.



SUMMARY

Food preservation and the prevention of diseases caused by food is an issue that has motivated scientific research. The use of natural additives is one of the topics studied. Bacteriocins are peptide compounds synthesized ribosomally by different bacteria with antimicrobial properties. Bacteriocins of lactic acid bacteria are generally recognized as safe and therefore are of great interest for use as food additives.

In recent years have discovered and characterized new bacteriocins of lactic acid bacteria, which allow us to maximize potential use as antimicrobial

In this study, we studied the production, purification, and characterization of a peptide presented characteristics of a bacteriocin. This peptide was produced by a strain of *Lactobacillus helveticus* and was tested against a sensitive organism (*Listeria innocua*) to determine its antimicrobial activity. When performing the fermentation of *Lactobacillus helveticus* in two media Oligomate 55 and MRS, it was found that by using Oligomate 55 medium we obtained higher production of antimicrobial compounds as compared to a MRS medium. 3 different methods were assessed for the purification of this peptide: ultrafiltration, precipitation, and cell adsorption-desorption.

After performing the purification it was found that the most effective method to get the active bacteriocin to a good yield was by cell adsorption-desorption in both cell extracts of fermentation medium with Oligomate 55 as MRS medium. Extracts of both media with antimicrobial activity, we determined their molecular weight by HPLC and found that the peptides present had a weight between 5 and 12 kDa.

Evaluation mode of action in both purified extracts, showed a bacteriolytic effect against *Listeria innocua*. However, when evaluated against other microorganisms (*Escherichia coli*) the mode of action remains unclear.

Finally the effect of pH and temperature on the antimicrobial activity of the purified bacteriocins of both extracts was evaluated, testing 2 different regressions models found that in both cases the pH effect is significant, but in the case of the bacteriocin produced by a minimal medium there is also a significant interaction effect of pH and temperature. In both cases the bacteriocin is stable at pH between 3 and 5 and at temperatures of 70 to 80 °C.



Índice

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	vi
SUMMARY	viii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Bacterias ácido lácticas	2
2.2 <i>Lactobacillus helveticus</i>	3
2.3 Compuestos antimicrobianos	4
2.4 Bacteriocinas.....	6
2.4.1 Bacteriocinas producidas por BAL.....	9
2.4.2 Clasificación de bacteriocinas de BAL.....	9
2.4.3 Síntesis de bacteriocinas	11
2.4.4 Modo de acción	12
2.4.5 Métodos de purificación.....	14
2.5 Potencial z.....	16
2.6 Prebióticos	18
3 JUSTIFICACIÓN	20
4 HIPÓTESIS	21
5 OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos particulares	21
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
7 METODOLOGÍA	23
7.1 Activación de las cepas.....	23
7.2 Producción de la bacteriocina	23
7.3 Determinación de la bacteriocina.....	24
7.4 Purificación de la bacteriocina.....	24
7.4.1 Purificación por ultrafiltración.....	24
7.4.2 Purificación por acetona fría.....	25
7.4.3 Purificación por adsorción- desorción en células	25
7.5 Determinación del potencial Z.....	26



7.6	Determinación del peso molecular por electroforesis.....	26
7.7	Determinación del peso molecular por HPLC	27
7.8	Evaluación del modo de acción	27
7.9	Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de la bacteriocina parcialmente purificada	28
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
8.1	Producción de bacteriocinas	31
8.2	Purificación de la bacteriocina.....	33
8.3	Determinación del potencial Z.....	40
8.4	Determinación del peso molecular por electroforesis.....	41
8.5	Determinación del peso molecular por HPLC	43
8.6	Evaluación del modo de acción	46
8.7	Evaluación del efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de la bacteriocina parcialmente purificada	48
9	CONCLUSIONES.....	53
10	PERSPECTIVAS	54
11	BIBLIOGRAFÍA.....	55
12	ANEXOS	60



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Bacteriocinas Gram positivas (Hammami <i>et al.</i> , 2010).	8
Figura 2 Modo de acción de las bacteriocinas. (A) Bacteriocinas clase I; (B) Bacteriocinas clase II y (C) bacteriocinas clase III (Cotter <i>et al.</i> , 2005)	14
Figura 3 Dibujo esquemático de la doble capa electroquímica y potencial Z de una partícula cargada. Adaptado de Wongsangonsep <i>et al.</i> , 2005.	17
Figura 4 Determinación del % Inhibición del crecimiento de <i>L. innocua</i> en extractos libres de células y en extractos tratados de dos diferentes medios de cultivo.	32
Figura 5 Determinación del % Inhibición de las fracciones obtenidas por ultrafiltración con una membrana de 10 kDa.	34
Figura 6 Determinación del % Inhibición de <i>L. innocua</i> de la bacteriocina purificada por adsorción- desorción en células de <i>Lactobacillus helveticus</i> .	36
Figura 7 Determinación del % de inhibición de <i>L. innocua</i> para la purificación de la bacteriocina por adsorción-desorción en células de <i>Lactobacillus helveticus</i> con ajuste de pH para la desorción.	37
Figura 8 Determinación del potencial Z en función del pH para las muestras purificadas de la fermentación de MRS y de Oligomate 55.	41
Figura 9 Estimación del peso molecular de los péptidos obtenidos por adsorción-desorción en un gel de electroforesis SDS-PAGE (12% poliacrilamida) Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2 Estándar de albúmina; carril 3 muestra purificada por adsorción-desorción en células (ADC) en MRS y carril 4 muestra purificada por adsorción-desorción (ADC) en células con Oligomate 55.	42
Figura 10 Cromatograma de los péptidos obtenidos adsorción-desorción en células producidas en MRS. $\lambda=215, 254$ y 280 nm	43
Figura 11 Cromatograma de los péptidos obtenidos adsorción-desorción en células producidas en Oligomate 55. $\lambda=215, 254$ y 280 nm	44
Figura 12 Cromatograma del estándar de polipéptidos BIo-Rad con triosefosfato isomerasa de 26.625 kDa, mioglobina de 16.95 kDa, α -lactoalbúmina de 14.43 kDa, aprotinina de 6.512 kDa, cadena B de la insulina oxidada de 3.496 kDa y bacitracina de 1.42 kDa (215, 254 y 280 nm).	44



- Figura 13** Curva de crecimiento de *Listeria innocua* en presencia y ausencia de la bacteriocina. La flecha indica el momento en el cual la bacteriocina de los diferentes extractos, fue añadida. **47**
- Figura 14** Curva de crecimiento de *Escherichia coli* K12 en presencia y ausencia de la bacteriocina. La flecha indica el momento en el cual la bacteriocina de los diferentes extractos, fue añadida. **47**
- Figura 15** Contornos de la superficie y superficie de respuesta estimada para la bacteriocina purificada por adsorción desorción en células producidas en MRS **51**
- Figura 16** Contornos de la superficie y superficie de respuesta estimada para la bacteriocina purificada por adsorción desorción en células producidas en Oligomate 55 **52**
- Figura 17** Curva patrón de estándar de proteínas BIORAD para la determinación del peso molecular por electroforesis SDS page **60**
- Figura 18** Curva patrón de estándar de polipéptidos de BIORAD para la determinación del peso molecular por HPLC **60**



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de BAL de acuerdo a la configuración del ácido láctico (Moreira dos Santos, 2003).	3
Tabla 2 Diseño compuesto central rotatorio (DCCR) para evaluar la interacción del pH y la temperatura sobre de la actividad de la bacteriocina.	29
Tabla 3 Dominio del diseño experimental	30
Tabla 4 Rendimientos y actividad específica de las bacteriocinas de la fermentación en Oligomate 55 y MRS. Los valores de las mediciones son de tres experimentos independientes con una desviación estándar inferior al 10%. EXB, extracto de bacteriocina; ADC1, adsorción-desorción en células; ADC2, adsorción-desorción en células con ajuste de pH a 1.5	39
Tabla 5 Peso molecular de los péptidos obtenidos por adsorción-desorción en células de la fermentación en Oligomate 55 y en MRS calculado mediante electroforesis.	42
Tabla 6 Peso molecular de los péptidos purificados por adsorción-desorción en células de Oligomate 55 y MRS mediante HPLC	45
Tabla 7 ANOVA para evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la bacteriocina del extracto de Adsorción desorción en MRS.	49
Tabla 8 ANOVA para evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la bacteriocina del extracto de Adsorción desorción en Oligomate 55.	49



1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas se emplean como conservadores en alimentos. Estos se usan, en parte, debido al hecho de que pueden prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro.

Lactobacillus helveticus pertenece a las bacterias ácido lácticas, es un importante cultivo iniciador termófilo que se emplea predominantemente en la fermentación de la leche para la fabricación de diferentes quesos. Además de su importancia tecnológica existe evidencia científica que demuestra que las cepas pertenecientes a la especie *Lactobacillus helveticus* tienen propiedades promotoras de la salud. Si bien *Lactobacillus helveticus* no es considerado como un microorganismo probiótico, se ha demostrado que tiene efectos benéficos en el hospedero por la generación de péptidos antihipertensivos durante la fermentación de la leche, además de la generación de otros compuestos antimicrobianos como es el peróxido de hidrógeno, el ácido láctico y las bacteriocinas.

Las bacteriocinas son metabolitos secretados por las bacterias ácido lácticas que ayudan a mantener y restaurar la flora intestinal, evitando el crecimiento y desarrollo de patógenos ya que tienen la capacidad de ser potentes antimicrobianos. En los últimos años se han desarrollado diversas investigaciones en torno a su detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos así como su aplicación. Por otro lado se han evaluado diferentes fuentes de carbono para la producción de las bacteriocinas y se conoce que el uso de Oligosacáridos como el Oligomate 55, que es un prebiótico, favorece la producción de estos compuestos. Figueroa- Gonzales (2010) reportó que *Lactobacillus helveticus* en presencia de Oligomate 55 como fuente de carbono, producía una mayor inhibición frente a sus microorganismos indicadores que usando otra fuente de carbono.

El objetivo de este proyecto de investigación fue la caracterización de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus helveticus* en presencia de un medio con Oligomate 55,



comparado con las producidas en MRS. Así como purificación parcial de la bacteriocina y el modo de acción de la bacteriocina.

2 ANTECEDENTES

2.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo diverso de bacterias que, si bien, no están sujetas a un grupo taxonómico estricto, tienen en común la producción de ácido láctico a partir de los carbohidratos y son Gram positivas. El grupo de BAL asociadas con los alimentos incluyen cocos de los géneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y bacilos de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium* (Balciunas *et al.*, 2013). En general, las BAL son no esporulados, microaerofílicos o anaerobios facultativos, carecen de citocromos y catalasa estrictas y poseen un contenido de guanina y citosina (G+C) inferior a 50 mol %. Las BAL son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) y desempeñan un papel importante en la conservación de alimentos, ya sea en la microbiota natural o en cultivos iniciadores añadidos bajo condiciones controladas (Cintas *et al.*, 2001).

Moreira dos Santos (1993) menciona que las BAL probablemente sean el grupo de bacterias más abundante y difundido en la naturaleza, debido a la capacidad que poseen de crecer en una gran variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas. Dentro de las BAL, el grupo *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo, incluyendo especies con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes.

Las BAL se han dividido en dos grupos, de acuerdo con los productos finales de la fermentación de la glucosa. Las especies que producen fundamentalmente ácido láctico se denominan homofermentativas, mientras que las que producen una mezcla de productos finales (lactato, acetato, etanol, CO₂) se consideran heterofermentativas. En la tabla 1 se muestra una clasificación de acuerdo a la configuración de los esteroisómeros del ácido láctico (D, L o DL).



En realidad, la diferencia entre las bacterias lácticas homo y heterofermentativas reside en las enzimas asociadas con la fermentación de la glucosa. De esta manera, las bacterias lácticas se dividen en tres grupos fisiológicos diferentes: 1) Heterofermentativos obligados, que poseen las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, pero no fructosa difosfato aldolasa, 2) Homofermentativos obligados, que carecen de las dos deshidrogenasas pero poseen aldolasa, y 3) Homofermentativos facultativos, que aunque poseen las dos deshidrogenasas degradan la glucosa preferentemente como los homofermentadores obligados (Moreira dos Santos, 1993).

Tabla 1. Clasificación de BAL de acuerdo a la configuración del ácido láctico (Moreira dos Santos, 1993).

Género	Tipo de fermentación	Producto final	Configuración del lactato
<i>Lactococcus</i>	Homofermentativa	Lactato	L(+)
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativa	Lactato, acetato, CO ₂	D(-)
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativa	Lactato	DL, L (+)
<i>Streptococcus</i>	Homofermentativa	Lactato	L(+)
<i>Lactobacillus</i>			
<i>Thermobacterium</i>	Homofermentativa	Lactato	D(-), L(+), DL
<i>Streptobacterium</i>	Homofermentativa	Lactato	D(-), L(+), DL
	Heterofermentativa	Lactato, acetato	D(-), L(+), DL
<i>Betabacterium</i>	Heterofermentativa	Lactato, acetato, CO ₂	DL
<i>Bifidobacterium</i>	Heterofermentativa	Lactato:acetato	L(+)
<i>Carnobacterium</i>	Heterofermentativa		

2.2 *Lactobacillus helveticus*

Lactobacillus helveticus pertenece a las BAL debido a su producción de ácido láctico (Christensen *et al.*, 2003). Es una bacteria termo y ácido tolerante, homofermentativa con la capacidad de producir altos niveles de ácido láctico, es generalmente reconocida como



segura (GRAS). El ácido láctico producido por *L. helveticus* es una mezcla racémica de L y D isómeros (Kylä-Nikkilä *et al.*, 2000).

Está presente en alimentos fermentados principalmente en quesos. Es utilizado como un cultivo iniciador y coadyuvante en la fabricación de queso y demuestra un número de rasgos altamente deseables, incluyendo autólisis rápida, amargor reducido y el aumento de notas de sabor. *L. helveticus* está agrupada tradicionalmente entre los cultivos iniciadores termofílicos debido a su uso en la fabricación de quesos suizo e italiano "cocido" (Callanan *et al.*, 2008). El efecto benéfico de *L. helveticus* ha sido evaluado en enfermedades como el cáncer y la inflamación intestinal. Cabe señalar que, aunque *L. helveticus* no se considera un cultivo probiótico, ciertas cepas han demostrado tener efectos benéficos a través de la generación de péptidos antihipertensivos liberados durante la fermentación proteolítica de la leche (Prajapati *et al.*, 2012).

En otros estudios se encontró que *Lactobacillus helveticus* 481 fue capaz de producir un agente antimicrobiano activo (bacteriocina) contra cinco especies estrechamente relacionadas. Los indicadores sensibles fueron *L. helveticus* 1846 y 1244, *L. bulgaricus* 1373 y 1489, y *L. lactis* 970 y demostró en los mismos, que tiene un modo de acción bactericida contra indicadores sensibles. Esta bacteriocina fue designada como helveticina J. Mediante diferentes técnicas de ultrafiltración de sobrenadantes de cultivo confirmaron que la bacteriocina estaba presente como un agregado de gran peso molecular (< 300,000 daltons). Por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante se encontró una banda de proteína de 37,000 daltons con actividad para esta misma bacteriocina. Para la síntesis de bacteriocinas se demostró que *L. helveticus* 481 alberga un solo plásmido de 8-megadalton (Joerger y Klaenhammer, 1986).

2.3 Compuestos antimicrobianos

Desde hace varios años en países como Europa y Estados Unidos está prohibida la producción de alimentos que contengan antibióticos debido a que en el consumidor final puede generarse resistencia a esos antibióticos y dejándolo propenso a enfermedades bacterianas. Adicionalmente, la utilización de antibióticos destruye no solo las bacterias



patógenas sino también las bacterias que forman parte de la microflora normal, que intervienen en el proceso de digestión de los alimentos, protegen al organismo contra infecciones futuras. Por estas razones, es necesario encontrar sustancias que cumplan con la función antibiótica pero que no afecten las funciones regulares del organismo (Jaramillo *et al.*, 2010).

La biopreservación es un método de conservación que extiende la vida útil y aumenta la seguridad de los alimentos, por medio del uso de una microbiota natural, controlada y de sus productos antimicrobianos. Diferentes estudios han aplicado la biopreservación mediante el uso de una microbiota natural como las BAL aisladas de productos lácteos, cárnicos, pescados y vegetales, utilizando sus propiedades antibacterianas, atribuidas a los productos finales de su metabolismo (Vásquez y Suarez, 2008). El mayor efecto preservativo de las BAL es la producción de los ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, dando como resultado el descenso del pH. Sin embargo éstas también producen diversos compuestos como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), dióxido de carbono (CO₂), diacetilo (2,3-butanodiona), compuestos no caracterizados y compuestos de naturaleza peptídica como bacteriocinas (Cintas *et al.*, 2001; Ammor *et al.*, 2006).

La producción de ácidos orgánicos se realiza durante el metabolismo anaerobio y estos juegan un papel importante en la disminución del pH. La inhibición del crecimiento microbiano por el efecto del ácido fórmico, acético, propiónico y los ácidos butírico y láctico; se produce debido a la capacidad de estos ácidos para pasar a través de las membranas celulares disociándose en el ambiente más alcalino del interior de la células con la consecuente acidificación el citoplasma (Kashket, 1987). La gran mayoría de estos metabolitos son absorbidos en el intestino grueso, permitiendo al hospedero ganar energía de los alimentos no digeridos en la parte superior del tracto intestinal (Macfarlane y Steed, 2008). Los carbohidratos son fermentados principalmente por diferentes bacterias en el colon, produciendo ácidos orgánicos, CO₂ y H₂, productos que tienen efecto la fisiología colónica. Por otro lado la fermentación de proteínas y aminoácidos por bacterias proteolíticas genera ácidos orgánicos ramificados, CO₂, CH₄ y H₂, fenoles y aminas (Figueroa-González 2010).



El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) funciona como un oxidante produce radicales libres que atacan los componentes celulares esenciales, lípidos, proteínas, ADN y produce la destrucción de la membrana celular, al perder su impermeabilidad y fluidez por alteración de los gradientes iónicos, con lo que se pierde su capacidad de barrera selectora e induce célula muerte. La habilidad de producir H_2O_2 es común entre las bacterias ácido lácticas. En algunos cultivos, el H_2O_2 puede acumularse hasta niveles que resultan autoinhibitorios o inhibitorios para otras bacterias. Algunos investigadores han sugerido que la producción de H_2O_2 por bacterias ácido lácticas involucra acciones oxidativas en los azúcares y compuestos relacionados (Villegas y Gilliland, 1998).

El peróxido de hidrógeno puede reaccionar con otros componentes para formar sustancias inhibitorias. En la leche cruda, el peróxido de hidrógeno generado por las bacterias lácticas reacciona con el tiocianato endógeno en una reacción catalizada por la lactoperoxidasa, lo que genera productos intermediarios de la oxidación que inhiben el desarrollo de muchos microorganismos. Este mecanismo de inhibición se conoce como “sistema antibacteriano lactoperoxidasa” (Moreira dos Santos, 1993)

2.4 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son metabolitos sobre los que se han desarrollado diversas investigaciones en torno a su detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles y aplicación con éxito en la biopreservación de alimentos. El término bacteriocinogenicidad está definido como la capacidad de las bacterias de sintetizar y excretar sustancias proteicas antagónicas de otros microorganismos (Vásquez y Suarez, 2008).

Existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada para la manipulación de poblaciones bacterianas a nivel de tracto digestivo (Monroy *et al.*, 2009). En la figura 1 se muestra el árbol filogenético de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas.



Las bacteriocinas, son productos del metabolismo de las BAL con función antimicrobiana, de naturaleza peptídica, sintetizadas ribosomalmente y que afectan a bacterias relacionadas filogenéticamente. De igual forma se ha comprobado que pueden actuar sobre bacterias patógenas, especialmente en Gram positivas y en algunas Gram negativas. Estudios recientes afirman que pueden actuar contra algunas especies de hongos y parásitos. Además de su acción antimicrobiana contra bacterias indeseables, se cree que las bacterias productoras de bacteriocinas contribuyen a favorecer la competitividad (Monroy *et al.*, 2009; Figueroa-González, 2010).

La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Cintas, 2001). Las variaciones de las condiciones de cultivo, como por ejemplo temperatura y tiempo, ejercen un efecto en la producción de bacteriocinas activas. Generalmente, hay una mayor producción cuando se cultiva a su temperatura óptima de crecimiento. El desarrollo de la bacteria a temperaturas elevadas puede suprimir completamente la producción de bacteriocina y algunas veces, eliminar irreversiblemente esta propiedad (Moreira dos Santos, 1993).

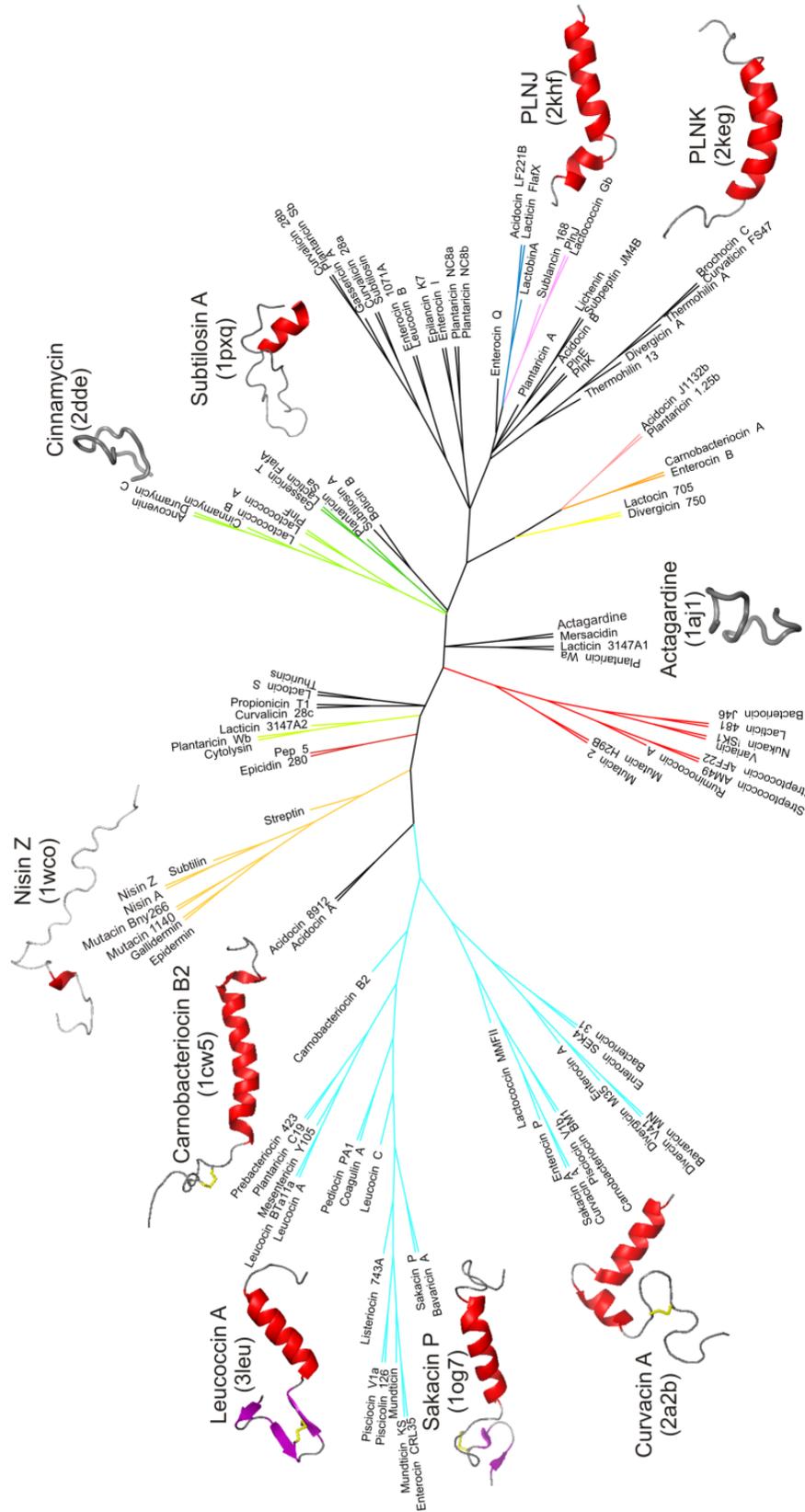


Figura 1 Bacteriocinas Gram positivas (Zouhir et al., 2010).



2.4.1 Bacteriocinas producidas por BAL

Las bacteriocinas producidas por BAL son las que tienen una mayor atención ya que estos organismos son considerados como seguros.

Las bacteriocinas de BAL son generalmente estables a pH ácido o neutro, lo que indica una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen. Además, algunos extractos de bacteriocinas presentan estabilidad al calentamiento, propiedad que es importante para asegurar el control de microorganismos en algunos procesos de la industria alimentaria. Se ha considerado que el espectro de inhibición de estas proteínas es reducido y en particular demostrando que la susceptibilidad de bacterias Gram negativas a bacteriocinas producidas por BAL es mucho más limitada. Hasta hace poco no se conocían bacteriocinas producidas por BAL utilizadas en alimentos activas naturalmente frente a bacterias Gram negativas (Vásquez y Suárez, 2008).

2.4.2 Clasificación de bacteriocinas de BAL

Existen diferentes formas para clasificar a las bacteriocinas, Balciunas *et al.*, (2013) establecieron que las bacteriocinas se pueden clasificar en 4 clases. La clase I, llamados lantibióticos y representado por la nisina, son péptidos de peso molecular muy bajo (<5 kDa) y son termoestables.

La clase II se compone de pequeños péptidos termoestables (<10 kDa), dividido a su vez en tres subclases: IIa (pediocina y enterocina), IIb (lactocina G) y IIc (lactocina B). La clase III está representada por péptidos de alto peso molecular (> 30 kDa) son termolábiles tales como la helveticina J, mientras que en la clase IV podemos encontrar péptidos grandes unidos con hidratos de carbono o lípidos.

La clasificación más frecuentemente utilizada es la propuesta por Drider, *et al.*, (2006) en la cual sugieren tres grandes clases de bacteriocinas de acuerdo con sus características bioquímicas y genéticas.



2.4.2.1 Clase I

La clase I o lantibióticos poseen entre 19 y 38 residuos de aminoácidos, son termoestables debido a su composición de aminoácidos resultado de la combinación de dos alaninas por enlace disulfuro o de un ácido amino butírico unido a una alanina por un enlace disulfuro como es el β -metil-lantionina (Jarvis *et al.*, 1968). La bacteriocina principal de esta clase es la nisina, que es producida por algunas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y se compone de 34 residuos de aminoácidos (Mulders *et al.*, 1991). Debido a la naturaleza ácida de su molécula, la nisina es completamente estable en solución a pH 2 y se puede almacenar durante mucho tiempo en el intervalo de temperatura de 2 a 7°C, mientras que por encima de pH 7 la inactivación se produce incluso a temperatura ambiente.

Los estudios toxicológicos mostraron que la ingesta de la nisina no causa ningún efecto tóxico para los seres humanos cuando se administran por vía oral (Jozala *et al.*, 2007). La nisina se utiliza en gran medida en la industria alimentaria como agente antibiótico en el queso, los huevos procesado, salsas y alimentos enlatados; tiene un amplio espectro antimicrobiano contra *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y otros patógenos (Rilla *et al.*, 2004).

2.4.2.2 Clase II

Esta clase está compuesta por péptidos termoestables, con estructura anfifílica helicoidal que permite su inserción en la membrana citoplasmática de la célula blanco, promoviendo así la despolarización de la membrana y la muerte celular. Se proponen tres subdivisiones de esta clase, de acuerdo con Drider *et al.* (2006).

La subclase IIa está compuesta por bacteriocinas que tienen alta especificidad contra *L. monocytogenes*, tienen entre 37 y 48 residuos de aminoácidos con una porción C- terminal que contiene una o dos α -hélices a (Fimland *et al.*, 2005).

La subclase IIb incluye bacteriocinas heterodiméricas por ejemplo bacteriocinas que requieren la actividad combinada de dos péptidos. Normalmente los genes están ubicados en el mismo operón y se expresan simultáneamente, éstos muestran un importante efecto sinérgico (Balciunas *et al.*, 2013).



La subclase IIc tienen una unión covalente entre el C y N terminal dando como resultado una estructura cíclica (Kawai *et al.*, 2004).

2.4.2.3 Clase III

Esta clase reúne grandes bacteriocinas termolábiles que tienen una estructura más compleja. Su porción N-terminal es similar a una endopeptidasa implicada en la síntesis de la pared celular, mientras que la parte C-terminal es responsable del reconocimiento de la célula blanco (Lai *et al.*, 2002).

2.4.3 Síntesis de bacteriocinas

Las bacteriocinas se sintetizan generalmente como pre-peptidos inactivos con una secuencia N-terminal. Estos precursores son transportados a la superficie celular, durante la fase de crecimiento exponencial se convierten enzimáticamente en sus formas activas. Los transportadores contienen una porción peptídica N-terminal responsable de la escisión del péptido guía, así como una porción C-terminal responsable de la hidrólisis del ATP y del suministro de energía. El sistema de regulación de la producción de bacteriocinas se compone de tres componentes: un péptido inductor (o factor de feromona de activación), la histidina cinasa transmembranal (receptor de feromona) y un regulador de respuesta. El péptido inductor se sintetiza en el ribosoma en niveles de baja concentración como un pre-peptido, que se escinde y se excreta al medio. Cuando este compuesto alcanza una concentración umbral, se activa la histidina cinasa transmembranal, lo que conduce a la autofosforilación del residuo de histidina, por lo tanto, se produce la transferencia de fosfato a una proteína reguladora de respuesta. El regulador fosforilado activa la transcripción de la bacteriocina, además de los elementos que componen el sistema de regulación, iniciando una retroalimentación positiva.

Tagg, *et al.*, (1976) señalaron que la acción de las bacteriocinas sobre las células sensibles ocurre en dos etapas. En la primera fase, la bacteriocina se adsorbe en receptores específicos de la célula hospedera. En este estadio, las bacteriocinas son sensibles a las proteasas. En una segunda fase, irreversible, la bacteriocina origina alteraciones celulares en las células sensibles de acuerdo con cada tipo de bacteriocina. No obstante, no está



suficientemente claro que este modo de acción, descrito de una manera general para las bacterias Gram-positivas, sea aplicable a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas (Balciunas *et al.*, 2013).

2.4.4 Modo de acción

En general, el modo de acción de una sustancia inhibitoria frente a alguna célula puede ser de tres tipos; bacteriolítico, bacteriostático o bactericida. El primero implica la muerte celular seguida de lisis, representado por la disminución de la absorbancia. El segundo no produce muerte celular pero detiene el crecimiento, por lo cual, sin muerte celular el conteo de colonias y la absorbancia se mantienen constantes. Y finalmente el bactericida produce muerte celular que se manifiesta por la disminución de colonias pero sin lisis y por consiguiente la absorbancia se mantiene constante (Jaramillo *et al.*, 2010)

La mayoría de las bacteriocinas de las BAL ejercen su acción antimicrobiana desestabilizando y permeabilizando la membrana citoplasmática de las células sensibles por medio de la formación de poros o canales iónicos que provocan la disipación de la fuerza protón motriz. Las bacterias lácticas bacteriocinogénicas se autoprotegen de los efectos tóxicos de sus bacteriocinas mediante la expresión de una proteína de inmunidad específica codificada generalmente por el mismo operón que la bacteriocina (Cintas *et al.*, 2001)

El poder que ejercen las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos puede tener diferentes comportamientos. Algunos microorganismos pueden ser sensibles mientras que otros son resistentes, inclusive una cepa que parece ser sensible puede tener células que presentan resistencia.

Las mismas bacterias productoras de compuestos antimicrobianos pueden ser sensibles a la acción de otra bacteriocina (Cintas *et al.*, 2001).

En cuanto al modo de inhibición utilizado por las bacteriocinas, existen diferencias por su clase (figura 2), se sugiere que existe una unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada fundamentalmente en uno de los extremos. Luego se produce



la inserción de la bacteriocina en la bicapa lipídica (Jaramillo *et al.*, 2010). La formación de poros en la membrana citoplásmica de las células sensibles parece ser un mecanismo de acción común presentado por las bacteriocinas producidas por las BAL. La estructura de estos péptidos, α -helice o β -laminar, presenta dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica, creando oligómeros que atravesarían la membrana formando poros, el lado apolar de la molécula se ubicaría próximo a los lípidos de la membrana, mientras que el lado polar miraría al centro del poro. Como consecuencia se observa, en general, una pérdida de iones K, ATP y, en algunos, casos aminoácidos y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de membrana, el consumo de las reservas energéticas celulares, descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Vasquez y Suárez, 2008). En el intento de mantener o restablecer la fuerza motriz de protones, hay aceleración en el consumo de ATP y en consecuencia la muerte celular (Kaiser y Montville, 1996).

Las bacteriocinas de la clase III tienen un modo de acción y una estructura compleja. Su mecanismo de acción es diferente al de otras bacteriocinas. Su porción N-terminal es homóloga a una endopeptidasa implicada en la síntesis de la pared celular, mientras que la parte C-terminal es responsable del reconocimiento de la célula blanco (Lai *et al.*, 2002).

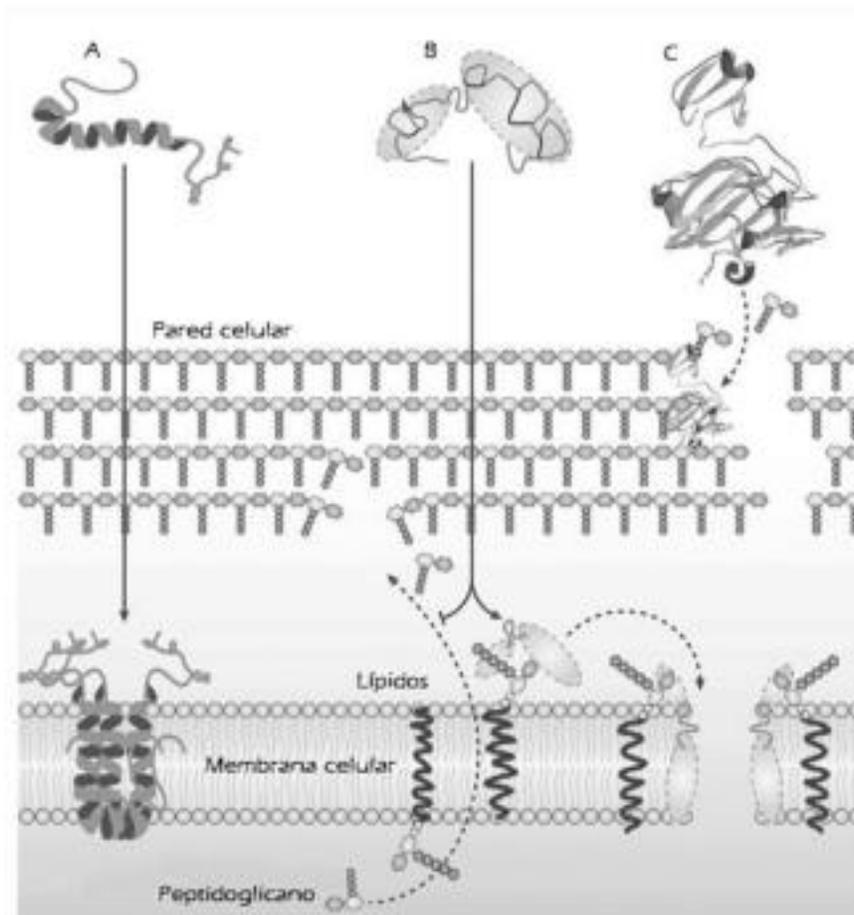


Figura 2 Modo de acción de las bacteriocinas. (A) Bacteriocinas clase I; (B) Bacteriocinas clase II y (C) bacteriocinas clase III (Cotter *et al.*, 2005)

2.4.5 Métodos de purificación

Para llevar a cabo la caracterización de una bacteriocina es importante implementar una estrategia de purificación. Muchas bacteriocinas de BAL no se producen en grandes cantidades por la cepa productora, por lo que es importante concentrar el sobrenadante que contiene la sustancia antimicrobiana en los pasos iniciales.

Los procesos de separación y purificación dependen del medio utilizado para la producción y del microorganismo utilizado. La estabilidad de las bacteriocinas disminuye a medida que aumenta su purificación (Moreira dos Santos, 1993). Es necesario realizar estudios de producción y contar con grandes proporciones de cultivo antes de iniciar la purificación (Monroy *et al.*, 2009).



Una limitante acerca de la purificación y uso de bacteriocinas, en el desarrollo de metodologías de precipitación de la proteína que permitan obtenerla de forma fácil y reproducible y que sea con la garantía de que no haya residuos de los productos químicos que se utilizan en las diferentes etapas. Debido a la dificultad de la purificación algunos investigadores trabajan con el extracto crudo que contiene la bacteriocina después de ser neutralizado para inhibir la acción de los ácidos orgánicos. La eficiencia de cada técnica depende de las características del péptido con el que se trabaje y de la cantidad de sustancias antagónicas producidas (Vásquez, 2008).

Independientemente del procedimiento de purificación empleado, los rendimientos de cada bacteriocina disminuyen durante todo el proceso, por lo tanto, es recomendable optimizar la producción mediante el ajuste de las condiciones experimentales (por ejemplo, la composición del medio, temperatura, tiempo, pH final, la aireación, agitación, el tamaño de inóculo, etc.)

Las técnicas normalmente utilizadas para la obtención de las bacteriocinas son precipitación con sulfato de amonio, absorción-desorción y la precipitación con solventes orgánicos (Cintas *et al.*, 2001). La precipitación con sulfato de amonio tiene su fundamento en la naturaleza proteínica de las bacteriocinas. Estas pueden ser concentradas a través de la aplicación de los métodos de precipitación con sales, donde el sulfato de amonio es la más utilizada. Las proteínas precipitadas se obtienen mediante centrifugación y se disuelven en volúmenes pequeños. Las sales de la suspensión se pueden eliminar mediante diálisis (Rajaram *et al.*, 2010; Tiwari y Srivastava, 2008; Drider *et al.*, 2006; Maldonado *et al.*, 2003; Cintas *et al.*, 2001).

El método de absorción-desorción fue desarrollado por Yang *et al.*, (1992) se fundamenta en la propiedad de las bacteriocinas para adsorberse a las células productoras a pH neutro y su liberación después de ser modificado el pH disminuyendo su valor (entre pH 2-2.5). Este protocolo fue utilizado para purificar nisina, pediocina Ac H, sakacina A y leuconocina LCM1 con las mismas BAL productoras, las cuales se cultivaron durante la noche, el sobrenadante se calentó a 70°C durante 25 minutos para inactivar las células. El



pH del medio se ajustó a pH 7 para permitir la adsorción de la bacteriocina a las células productoras. Las células se recolectaron por centrifugación, se lavaron dos veces y se resuspendieron en solución de NaCl 0.1M a pH 2 durante 1 h para liberar las moléculas de bacteriocina de la superficie de la célula. Las células se separaron por centrifugación y al sobrenadante con la bacteriocina se le evaluó la actividad inhibitoria. Una de las ventajas de este método de purificación es que se obtiene un menor número de proteínas contaminantes en comparación con la precipitación con sulfato de amonio descrito antes.

Las metodologías descritas anteriormente producen un extracto parcialmente purificado de bacteriocinas. Estos extractos deben ser sometidos a otra etapa de purificación, que incluye el uso de diferentes estrategias. La técnica más utilizada es la cromatografía. La selección del tipo de cromatografía dependerá del conocimiento de las características de los péptidos.

Algunas bacteriocinas aparecen en su estado natural como agregados de alto peso molecular (30-300 kDa). Estos agregados pueden enmascarar parcial o totalmente la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas en la purificación de ellos y también inducir a errores en la determinación de su peso molecular.

Para comprobar la naturaleza proteica de la bacteriocina producida se tratan las muestras obtenidas con diferentes proteasas como son α -quimitripsina, tripsina, proteinasa k y pronasa E. Otras enzimas como la α -amilasa, la lipasa A, la lisozima, la aminopeptidasa, la mutanolasa, la DNAsa y la RNA-sa revelan información sobre la formación de complejos de la bacteriocina junto con otros componentes como carbohidratos, lípidos o ácidos nucleicos (Tiwari y Srivastava, 2008).

2.5 Potencial z

El potencial z se define como el potencial electrocinético en el límite del plano de cizallamiento hidrodinámico (deslizamiento plano) de una partícula cargada como es el caso de las proteínas. En una solución, las partículas se cargan negativamente o positivamente por adsorción de iones y la disociación de grupos superficiales polares (figura 3). Por lo tanto, alrededor de las partículas, los iones con polaridad opuesta se



acumulan para neutralizar el potencial interfacial y los iones con una pequeña carga de la misma polaridad se distribuyen difusamente, formando una doble capa eléctrica.

La doble capa se forma con el fin de neutralizar el coloide cargado y a su vez, provoca un potencial electrocinético entre la superficie del coloide y cualquier punto en la masa del líquido de suspensión. Esta diferencia de tensión es del orden de milivoltios y se conoce como el potencial de la superficie. La magnitud del potencial de superficie está relacionada con la carga de la superficie y el espesor de la doble capa. (Wongsangonsup *et al.*, 2005). El punto donde se unen la capa difusa y la de Stern es conocido como potencial Z, el cual puede ser medido de una manera muy simple. La relación entre el potencial Z y el potencial de superficie depende del nivel de iones en la solución. El potencial Z puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento de un coloide. Wongsangonsup *et al.* (2005) demostraron que el valor del potencial Z se relaciona con la cantidad de proteína, así como con la cantidad de iones que estén en el medio. A mayor concentración de proteína a pH alcalino, es más negativo el potencial Z. A concentraciones constantes, se puede realizar determinaciones de la carga neta de las proteínas a diferentes rangos de pH.

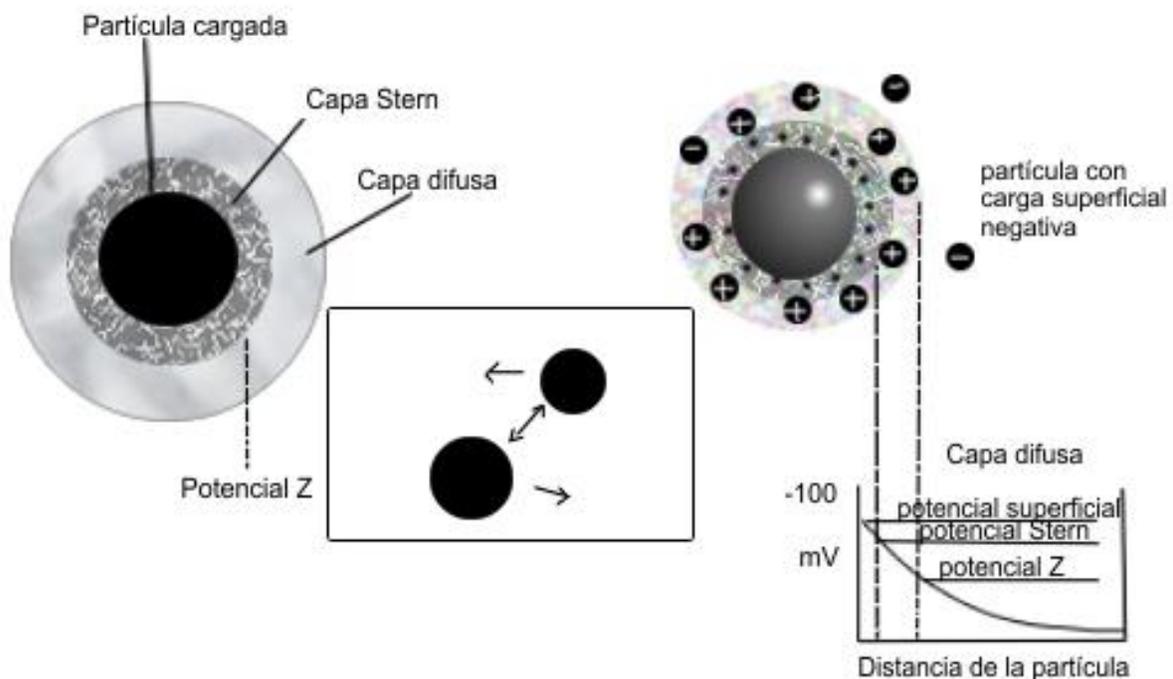


Figura 3. Dibujo esquemático de la doble capa electroquímica y potencial Z de una partícula cargada. Adaptado de Wongsangonsup *et al.*, 2005.



2.6 Prebióticos

Los prebióticos son carbohidratos que no son digeribles y producen efectos benéficos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon. Son principalmente de origen vegetal como el trigo, cebolla, ajo, durazno, entre otros. Estos Son fundamentalmente fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS), como la inulina y la oligofructosa, clasificadas como fibra dietética (Macfarlane *et al.*, 2008).

En el mercado se comienza a observar una tendencia hacia la elaboración de productos que promuevan, aparte de una función nutricional, propiedades que mejoran la salud; haciendo alimentos funcionales. Este es el caso de productos como yogures y jugos, productos de consumo masivo que dentro de sus ingredientes aluden la utilización de inulina, oligofructosa y polidextrosa en su manufactura (Figuroa-González *et al.*, 2010). Aunque muchas preparaciones de oligosacáridos se utilizan en los alimentos funcionales en Japón, dos clases generales se utilizan ampliamente en Europa, estos son los fructanos, tales como la inulina y los fructooligosacáridos y los β -galacto-oligosacáridos (Rabiu *et al.*, 2001).

En la actualidad, diversos estudios involucran oligosacáridos que pueden ser prebióticos potenciales y que pueden clasificarse de acuerdo a sus constituyentes químicos y grado de polimerización, e incluyen manooligosacáridos, pectino oligosacáridos, oligosacáridos de la soya, isomaltoligosacáridos, xilooligosacáridos y lactulosa. Sin embargo, recientemente, la mayoría de los estudios de prebióticos se han enfocado a la inulina, los fructooligosacáridos (FOS), los galactooligosacáridos (GOS) y los transgalactooligosacáridos (TOS) (Macfarlane *et al.*, 2008).

Los TOS han sido producidos comercialmente para ser incorporados en productos como el Oligomate 55 que es el nombre comercial de un azúcar formado por la acción de la galactosidasa sobre la lactosa para formar galactooligosacáridos. El Oligomate 55 se utiliza ampliamente en un gran número de productos alimenticios como leches fermentadas, helados, bebidas frutales, galletas, dulces, edulcorantes, jaleas, carnes procesadas, entre



otros. Consiste principalmente de TOS, en los cuales el principal componente es la 4'-galactosil-lactosa además de son lactosa y monosacáridos (Figuroa-González *et al.*, 2010).

El Oligomate 55 contiene al menos 55% de 4' y 6'-galactosil-lactosa. Estos TOS son muy estables a altas temperaturas, permanecen sin cambios después de un tratamiento térmico a 160°C por 10 minutos y a pH neutro y después de un tratamiento a 120°C por 10 minutos a pH 3 ó 100°C por 10 minutos a pH 10. También permanecen estables durante periodos largos de almacenamiento. Por ello, se ha sugerido que los TOS son más estables que los FOS. En experimentos *in vitro* se ha mostrado que los TOS no se digieren y permanecen estables al contacto con la α -amilasa de la saliva, al contenido del intestino delgado de las ratas y a jugos gástricos humanos artificiales (Thammarutwasik *et al.*, 2009)



3 JUSTIFICACIÓN

Las BAL juegan un papel importante en la producción de alimentos fermentados, como lo son el yogurt, quesos, embutidos entre otros; siendo los *Lactobacillus* uno de los más usados en la elaboración de éstos. Las BAL no sólo son importantes desde un punto de vista organoléptico, sino también por presentar efectos antimicrobianos frente a patógenos.

El antagonismo entre BAL y las bacterias patógenas se debe a la disminución del pH, la competencia por sitios de adhesión a los receptores epiteliales, los nutrientes y la producción de otros metabolitos con efecto antibacteriano. Las bacteriocinas son uno de los metabolitos mayormente estudiado en la actualidad debido a que, por su naturaleza peptídica, se inactivan enzimáticamente y no resultan tóxicas para el ser humano; además de que estas pueden ser utilizadas como conservadores en alimentos, con la ventaja de no ser antibióticos (Balciunas *et al.*, 2013). Estudios previos evidenciaron una mayor producción de bacteriocinas usando una fuente prebiótica (Oligomate 55) a partir de diferentes BAL principalmente *Lactobacillus heveticus* (Figueroa- González, 2010)

Por estas razones se creció *Lactobacillus helveticus* en un medio con Oligomate 55 para producir bacteriocinas y lograr así su caracterización y parcial purificación. Así mismo se evaluó el modo de acción de la bacteriocina y su la estabilidad al efecto de la temperatura y el pH.



4 HIPÓTESIS

Se producirán uno o varios péptidos por *Lactobacillus helveticus*, en presencia de Oligomate 55 como fuente de carbono, que cumplirán con las características de una bacteriocina.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

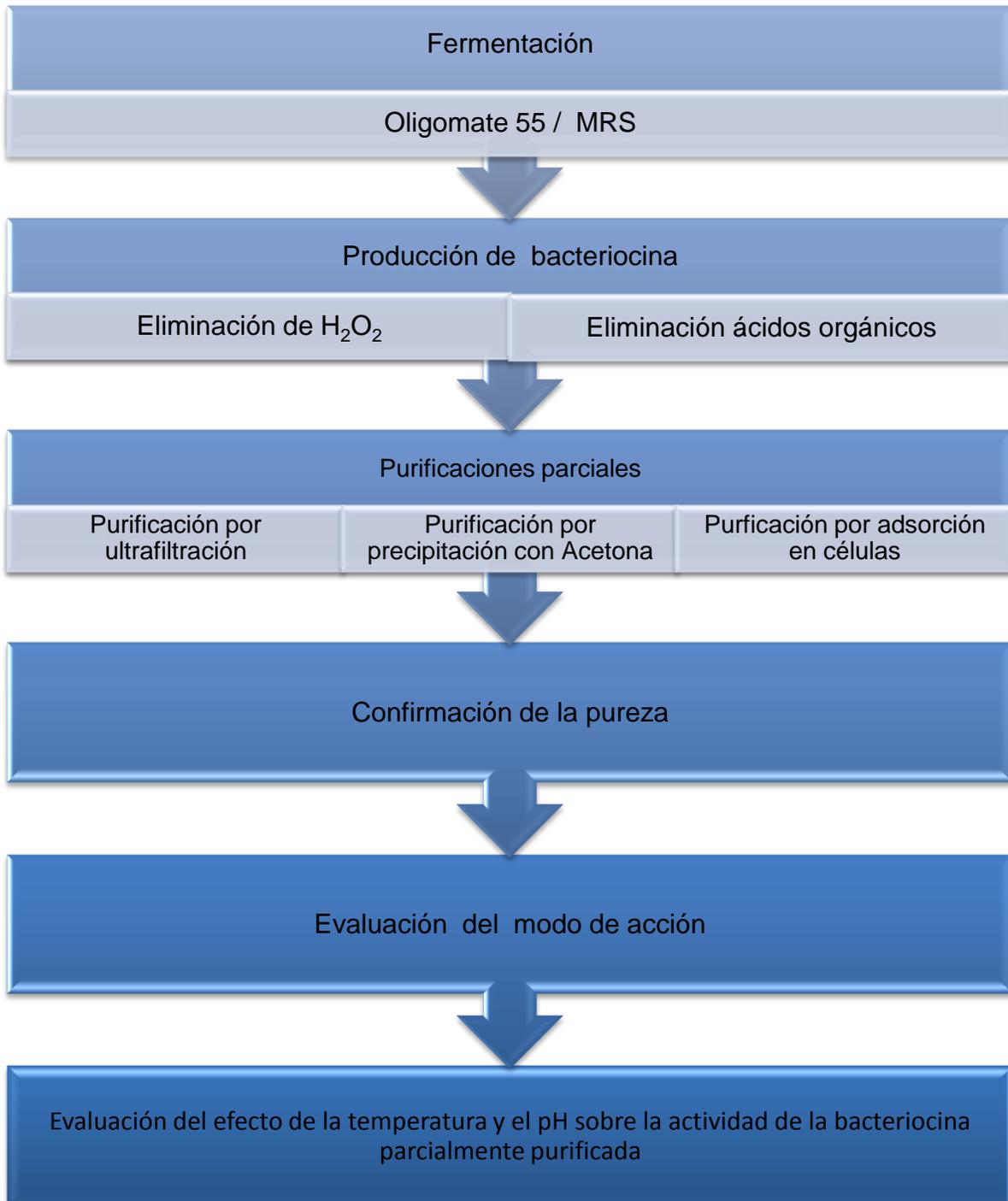
Caracterizar y purificar la o las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus helveticus* utilizando como fuente de carbono el Oligomate 55.

5.2 Objetivos particulares

- Producir bacteriocinas durante la fermentación de *Lactobacillus helveticus* usando Oligomate 55 como fuente de carbono.
- Purificar parcialmente las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus helveticus*.
- Evaluar el modo de acción (bacteriostático, bactericida o bacteriolítico) que presentan las bacteriocinas frente a *Listeria innocua* ATCC33090 y *Escherichia coli* K12.
- Evaluar el efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de la bacteriocina usando *Listeria innocua* ATCC33090 como microorganismo indicador.



6 Estrategia experimental





7 METODOLOGÍA

7.1 Activación de las cepas

Se empleó una cepa de *Lactobacillus helveticus* como bacteria productora de bacteriocinas previamente aislada en la UAM-I, de una muestra leche fermentada comercial. *Lactobacillus helveticus* fue activada en medio Litmus milk (Difco) a 37°C por 24 h.

Como microorganismo indicador se utilizó *Listeria Innocua ATCC33090* y *Escherichia coli K12*. Ambas conservadas en glicerol a -4°C. Para la activación *L. innocua* se creció en medio nutritivo adicionado con 2.5 g/L de glucosa, 5g/L NaCl y 15 g/L de peptona de caseína por 24hrs a 37°C. *E. coli K 12* se creció en medio nutritivo (Difco) 24h a 37°C.

7.2 Producción de la bacteriocina

Se inocularon 15 µL de las cepa de *L. helveticus*, activada en Litmus milk, en botellas serológicas de 100 mL con 50 mL de medio de cultivo que contenían: Oligomate 55 (1% p/v), extracto de levadura (0.3% p/v) y peptona de caseína (0.5% p/v). Se incubó a 42°C y una agitación de 50 rpm por 48 h (Figuroa-González, 2010) Así mismo se realizó una fermentación en caldo MRS (Difco) a las mismas condiciones de tiempo, temperatura y agitación.

Para obtener el extracto de bacteriocina, se trató el caldo de la fermentación con NaOH 2M para ajustar el pH a 6.5 y así excluir el efecto del ácido láctico. La actividad inhibitoria del peróxido de hidrógeno se eliminó por la adición de 1mg/mL de catalasa el cual fue incubado a 25°C por 90 min. Posteriormente se llevó a cabo la inactivación de esta enzima (60°C/10 min).

El extracto tratado se centrifugó a 10,000 rpm durante 25 min. en tubos estériles; seguido por la filtración del sobrenadante a través de un de filtro de acetato de celulosa con 0.2 µm de tamaño de poro (Figuroa-González, 2010).



Para determinar que el efecto inhibitorio se debe a la presencia de bacteriocinas se realizó la adición de proteinasa K (0.1 mg/mL) la cual se incubó 37°C por 120 min y posteriormente se inactivó la enzima (60°C/10 min).

7.3 Determinación de la bacteriocina

Para determinar la actividad de bacteriocina en los extractos se utilizó la técnica reportada por Figueroa-González (2010) modificada, usando como microorganismo indicador *L. innocua* ATCC33090. Este microorganismo se sembró en caldo nutritivo adicionado con 2.5 g/L de glucosa, 5g/L NaCl y 15 g/L de peptona de caseína durante 24 h a 37°C. Posteriormente 10 mL del cultivo se transfirieron a un matraz con 50 mL de medio fresco y se incubaron por 3 h a 37°C con agitación a 150 rpm para obtener células en fase de crecimiento logarítmica. Se tomó una alícuota de 0.5 mL del extracto a analizar, de medio estéril como control junto con 2 mL del caldo de cultivo con el microorganismo indicador. Después de 3 h de incubación a 37°C se midió la absorbancia a las muestras a 650 nm. La inhibición del crecimiento de *L. innocua* (%) se determinó mediante la siguiente ecuación Ecuación 1:

$$\begin{aligned} & \text{Inhibición del crecimiento de } L. innocua(\%) \\ & = 100 - \frac{\text{densidad óptica de la muestra después de 3 h}}{\text{densidad óptica del control después de 3 h}} \times 100 \end{aligned}$$

7.4 Purificación de la bacteriocina

7.4.1 Purificación por ultrafiltración

Se tomaron 2 mL del extracto de bacteriocina tratado y se realizó una purificación por ultrafiltración en una membrana con un corte de 10 KDa por centrifugación en una



centrífuga J2-MI marca Bekman, a 5,000 rpm a 4°C. Se determinó la actividad de la bacteriocina en el permeado y en el retenido.

7.4.2 Purificación por acetona fría

Se utilizó la metodología sugerida por Pal y Ramana (2010) para la precipitación de proteínas. El sobrenadante de la fermentación libre de células (500 mL); se mantuvo en agitación en cámara fría, durante la adición de acetona fría hasta llegar a un 60% de concentración con agitación constante y se incubó por 15 minutos a 4°C. La proteína precipitada fue recuperada y reconstituida en agua destilada y sometida a agitación a temperatura ambiente por 16 h para la evaporación de restos de acetona.

Al precipitado obtenido se le determinó la actividad de la bacteriocina mediante la inhibición de *L. innocua*.

7.4.3 Purificación por adsorción- desorción en células

Para la purificación de las o la bacteriocinas se usó el método modificado de Pal y Ramana (2010). Se realizó la fermentación de 500 mL *L. helveticus* en medio MRS y 500 mL en medio con Oligomate como fuente de carbono. Una vez fermentado el medio se calentó a 70 °C durante 30 min para inactivar las proteasas. Posteriormente se ajustó el pH a 6.5 por adición gradual de NaOH 4M. Las muestras se agitaron durante 3 horas a temperatura ambiente para permitir que las bacteriocinas se adsorbieran en la células. El extracto se centrifugó a 5,000 rpm para colectar las células y estas se lavaron dos veces por resuspensión en 100 mL de buffer de fosfato de sodio 5 mM (pH 6.5). Las células lavadas fueron resuspendidas en una solución de 50 mL de NaCl 100 mM pH 2 y se mantuvieron en agitación en cámara fría (4°C) durante 18 h para la desorción de las bacteriocinas. Las células fueron eliminadas por centrifugación a 5,000 rpm durante 25 minutos a 4°C. El pH de los sobrenadantes se ajustó a 6.5 y se les determinó la actividad de la bacteriocina mediante la inhibición de *L. innocua* de cada de uno de los sobrenadantes.



7.5 Determinación del potencial Z

Para el cálculo del punto isoeléctrico de la bacteriocina en la purificación de adsorción-desorción, a partir de una primera purificación de los extractos producidos con la fermentación de *L. helveticus* en MRS y en Oligomate 55 se determinó el potencial z en un equipo Zetasizer nano de la marca Malvern Instruments Ltd. U.K.

Las muestras de la bacteriocina se ajustaron a pH 2, 4, 6, 8 y 10. Se enjuagó el electrodo y la celda con agua desionizada, se llenó la celda con la muestra y se insertó el electrodo lentamente en la celda verificando que no quedaran burbujas atrapadas dentro de la celda. Se insertó la celda dentro del equipo y se analizaron las muestras usando agua como dispersante a una temperatura de 25°C. El potencial zeta se calculó a partir de las medidas de la movilidad electroforética.

7.6 Determinación del peso molecular por electroforesis

El peso molecular de la bacteriocina se determinó mediante la electroforesis SDS-PAGE con un gel de concentración al 4% de acrilamida (0.15 M Tris, pH 6.8) y gel de separación al 12% de acrilamida (0.375 M Tris, pH 8.8). Se usó un estándar de proteínas de peso molecular conocido, (Miosina 200 kDa, β -galactosidasa 116.25 kDa, fosforilasa b 97.4 kDa, seroalbúmina 66.2 kDa, ovoalbúmina 45kDa, anhidrasa carbónica 31kDa, Inhibidor de tripsina 21.5 kDa, lisozima 14.4 kDa y aprotinina 6.5 kDa) un estándar de seroalbúmina y las bacteriocinas obtenidas a partir de la purificación adsorción-desorción de las fermentaciones en MRS y con Oligomate 55 como fuente de carbono. La electroforesis fue realizada a 200 V en un sistema de electroforesis Mini Protean II, Bio-Rad E.U.A. El gel se tiñó con azul de Coomassie y se destiñó usando ácido acético-metanol (40:10) El peso molecular de la bacteriocina se calculó a partir de la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular que se corrieron simultáneamente.



7.7 Determinación del peso molecular por HPLC

Se realizó una nueva determinación del peso molecular mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) inyectando un volumen de 20 μ L de la bacteriocina purificada de adsorción desorción en células fermentadas en MRS y en Oligomate 55; mediante una columna de exclusión molecular, lo que permite separar las moléculas de acuerdo a su tamaño. La columna está compuesta de cuentas esféricas de gel con poros de tamaño específico (Mine y Shahidi, 2006).

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Lab Alliance, E.U.A.) compuesto por una bomba, un desgasificador, un sistema de mezclado y un detector de arreglo de diodos UV- visible (Spectra System UV6000 LP). Se utilizó una columna (BioSep SEC-S-2000) con un tamaño de 300 x 7.80 mm. Se utilizó un buffer de fosfatos de 0.1 M a un pH de 6.8. El flujo de trabajo fue de 0.9 mL/min. La temperatura de la columna osciló entre 22 y 25°C

Se inyectó un estándar externo de peso molecular de polipéptidos que contenía trifosfato isomerasa de 26.625 kDa, mioglobina de 16.95 kDa, α -lactoalbúmina de 14.43 kDa, aprotinina de 6.512 kDa, cadena B de la insulina oxidada de 3.496 kDa y bacitracina de 1.42 kDa, para conocer el peso de cada uno de los picos obtenidos de las muestras inyectadas.

7.8 Evaluación del modo de acción

Se realizó la curva de crecimiento de los microorganismos indicadores *L. innocua* ATCC33090 y de *E. coli* K12. Estos microorganismos se cultivaron en 50 mL de caldo nutritivo para *E. coli* y caldo nutritivo adicionando con 2.5 g/L de glucosa, 5g/L NaCl y 15 g/L de peptona de caseína durante 24 h a 37° para *L. innocua*.

La evaluación del modo de acción se realizó mediante la evolución del crecimiento de los microorganismos mediante densidad óptica a 650 nm. después de la adición de 20 mL del extracto purificado de *L. helveticus* crecido en caldo MRS.



7.9 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de la bacteriocina parcialmente purificada

El diseño compuesto central rotatable (DCCR) fue propuesto por Box y Wilson en 1951 como una alternativa al factorial 3^k ; básicamente consiste de un núcleo factorial 2^k , cuyos niveles de los factores se codifican con +1 y -1, así como niveles α que pueden variar de acuerdo al número de factores a evaluar y garantiza además, una propiedad estadística de rotabilidad (Bustamente *et al.*, 2006). Se probaron 2 factores, pH en el rango de 3 a 8 y temperatura entre 70 a 90 °C. El DCCR cuenta con cinco niveles y dos variables (temperatura y pH) para estudiar la influencia combinada de la temperatura y el pH sobre la estabilidad de la bacteriocina.

El diseño consistió en 12 experimentos factoriales con cuatro puntos axiales con puntos centrales cuadruplicados, los cuales se muestran en la tabla 2., los factores de la ecuación de regresión son codificados de acuerdo con la ecuación 2:

Ecuación 2:

$$xi = \frac{Xi - Xo}{\partial Xi}$$

Donde xi es el valor adimensional codificado de la variable independiente a la i-ésima variable independiente, Xi es el valor natural de la variable i-ésima independiente, Xo es el valor natural i-ésimo de la variable independiente en el punto central y ∂Xi es el valor de cambio escalonado.

Una vez que los experimentos se realizaron, los resultados experimentales se ajustaron con una función polinómica de segundo orden:

Ecuación 3:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

Donde Y es la variable respuesta; b_0 es la intersección; b_1 y b_2 son los coeficientes lineares; b_{11} y b_{22} son los cuadrados de los coeficientes y b_{12} es la interacción de los coeficientes.



Los niveles de las variables experimentales estudiados se presentan en la tabla 3. Los resultados experimentales se ajustaron a un modelo cuadrático que permite la predicción de la actividad de la bacteriocina (% de inhibición) en función del rango de pH desde 3 hasta 8 y cualquier rango de temperatura desde 70°C hasta 90°C.

Las muestras de bacteriocina extraídas de adsorción-desorción en células de la fermentación con MRS y con Oligomate 55 se ajustaron a los valores de pH con H_3PO_4 o con NaOH y se incubaron durante 15 min a las temperaturas de acuerdo con el diseño experimental. Después de la incubación, las muestras se ajustaron a pH 6.5 y se determinó la actividad de la bacteriocina (% inhibición del crecimiento de *L. innocua*) por duplicado.

Tabla 2. Diseño compuesto central rotatorio (DCCR) para evaluar la interacción del pH y la temperatura sobre de la actividad de la bacteriocina.

Experimento	Temperatura	pH	X1	X2
	°C		Temperatura	pH
1	80	5.5	0	0
2	80	8.5	0	+ α
3	70	8	-1	+1
4	90	8	+1	+1
5	80	5.5	0	0
6	80	5.5	0	0
7	80	2.47	0	- α
8	80	5.5	0	0
9	92.1	5.5	+ α	0
10	67.9	5.5	- α	0
11	70	3	-1	-1
12	90	3	+1	-1



Tabla 3. Dominio del diseño experimental

Dominio del experimento						
Variables independientes	Símbolo	Rango y nivel				
		-α	-1	0	1	+α
Temperatura (°C)	X_1	67.9	70	80	90	92.1
pH	X_2	2.475	3	5.5	8	8.525



8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Producción de bacteriocinas

Antes de comenzar la producción de bacteriocinas se confirmó la morfología de *L. helveticus* por tinción de Gram y se encontraron que eran bacilos Gram positivos como lo reportó Figueroa-González (2010).

La producción de la bacteriocina y de los compuestos antimicrobianos por la cepa de *L. helveticus* usando Oligomate 55 y MRS, se confirmó mediante la prueba de la inhibición en el crecimiento del microorganismo indicador *L. innocua* ATCC 33090 tanto en el caldo de la fermentación así como con el extracto tratado con catalasa y ajustado a pH 6.5 al cual se le nombró como extracto de bacteriocina. En la figura 4 se puede observar la inhibición de *L. innocua* del caldo de fermentación y del extracto de bacteriocina.

El sobrenadante del caldo de fermentación con Oligomate 55 tiene una mayor inhibición (32.59%) que el sobrenadante del caldo de fermentación con MRS (26.52%). El pH al terminar la fermentación fue de 3.5 para el caldo de fermentación con Oligomate 55, mientras que para MRS el pH final fue de 4.2. El caldo de fermentación de Oligomate 55 presentó mayor inhibición posiblemente al cambio en el pH, a la concentración del H₂O₂, así como de las bacteriocinas presentes.

Por otro lado se puede observar que el porcentaje de inhibición causada por el extracto de Oligomate 55 (13.55%) es mayor que la producción que el del MRS (6.14%).

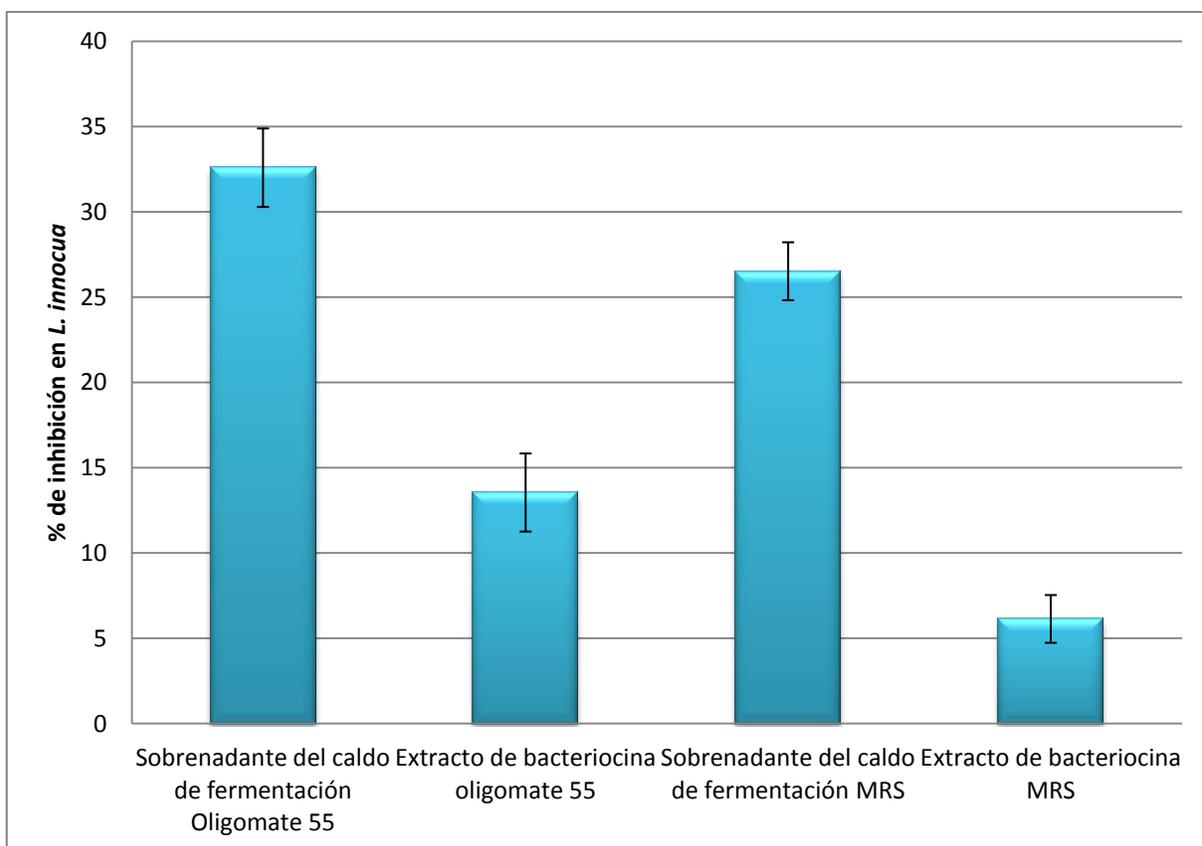


Figura 4 Determinación del % Inhibición del crecimiento de *L. innocua* en extractos libres de células y en extractos tratados de dos diferentes medios de cultivo.

Figueroa-González (2010) reportó que la inhibición del caldo de fermentación en Oligomate 55 para *L. innocua* fue de 58.7% bajo condiciones similares de fermentación, éste corresponde al efecto generado por H_2O_2 y/o bacteriocinas ya que la inhibición por ácido láctico fue descartada al neutralizar sus muestras obtenidas hasta un valor de pH de 7. Figueroa-González (2010) reportó que la inhibición por acción de las bacteriocinas fue del 22.3% utilizando Oligomate 55 como fuente de carbono.

Estos resultados pueden ser diferentes debido al efecto de las temperatura de fermentación empleada en el presente trabajo fue de 42°C mientras que Figueroa-Gonzales empleó una temperatura de fermentación de 37°C.

Kashket (1987) reportó que el principal factor de inhibición se debe al descenso en el pH por la producción de ácido láctico; el peróxido de hidrógeno es el segundo factor que



contribuye con la inhibición. La acción bactericida del peróxido de hidrógeno se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura molecular básica de proteínas celulares. Cintas *et al* (2001) reportan que el diacetilo también contribuye a la inhibición, desactivando enzimas microbianas por bloqueo o por modificación de la zona catalítica.

Chang *et al.* (2007) explican que las condiciones de producción deben ser específicas para cada organismo productor. En este caso se probaron dos medios de cultivo. Se utilizó un medio con Oligomate 55 y un medio nutritivo, el MRS. Es importante elegir un medio de crecimiento correcto ya que éste puede inhibir o aumentar la producción de la bacteriocina.

De acuerdo a la figura 4, el medio de cultivo puede ser un factor importante para la producción de la bacteriocina ya que el extracto de bacteriocina con Oligomate 55 presentó una mayor inhibición del crecimiento de *L. innocua*.

Fooks y Gibson (2002) señalaron que el potencial antimicrobiano de los probióticos parece depender de la fuente de carbono utilizada. Figueroa- González (2010) reportó que, usando el Oligomate 55 como fuente de carbono produjo una mayor inhibición comparada con la lactosa.

Para comprobar la naturaleza peptídica de la bacteriocina producida se trataron las muestras con proteinasa K; después se determinó el % de inhibición en *L. innocua*. Se comprobó la pérdida en la inhibición y por lo tanto la naturaleza peptídica del compuesto antimicrobiano (resultados no mostrados).

Yang *et al.* (2012) comprobó la pérdida de la actividad de 34 bacteriocinas aisladas de 7 quesos comerciales y 3 muestras de yogurt comercial utilizando varias enzimas proteolíticas; con proteinasa K todas las muestras con actividad antimicrobiana la perdieron después de la incubación con la enzima.

8.2 Purificación de la bacteriocina

Para llevar a cabo la purificación de la bacteriocina se probaron diferentes métodos de purificación. Las técnicas utilizadas en esta investigación fueron ultrafiltración,



precipitación con de acetona fría y adsorción-desorción en células. La purificación por ultrafiltración fue una de las primeras técnicas empleadas para separar por exclusión molecular, a la bacteriocina; ya que permite seleccionar las fracciones que presentan actividad antimicrobiana (Zapata *et al.*, 2009). Por medio de técnicas de ultrafiltración los sobrenadantes libres de células se pueden fraccionar de acuerdo al tamaño de los péptidos (Cintas *et al.*, 2001).

En la figura 5 se muestra el resultado de la purificación por ultrafiltración de la bacteriocina producida en Oligomate 55 con una membrana de 10 kDa. Se comparó la inhibición del extracto de bacteriocina (12.48%) contra la inhibición del permeado (5.7 %) y del extracto concentrado (8.37%). Se observa cómo se fracciona el porcentaje de la inhibición después de la ultrafiltración con lo cual se puede concluir que este método de purificación es poco eficiente, se encontró inhibición tanto en el permeado como en el concentrado estos resultados no son contundentes por lo tanto se llevó a cabo la purificación por acetona fría.

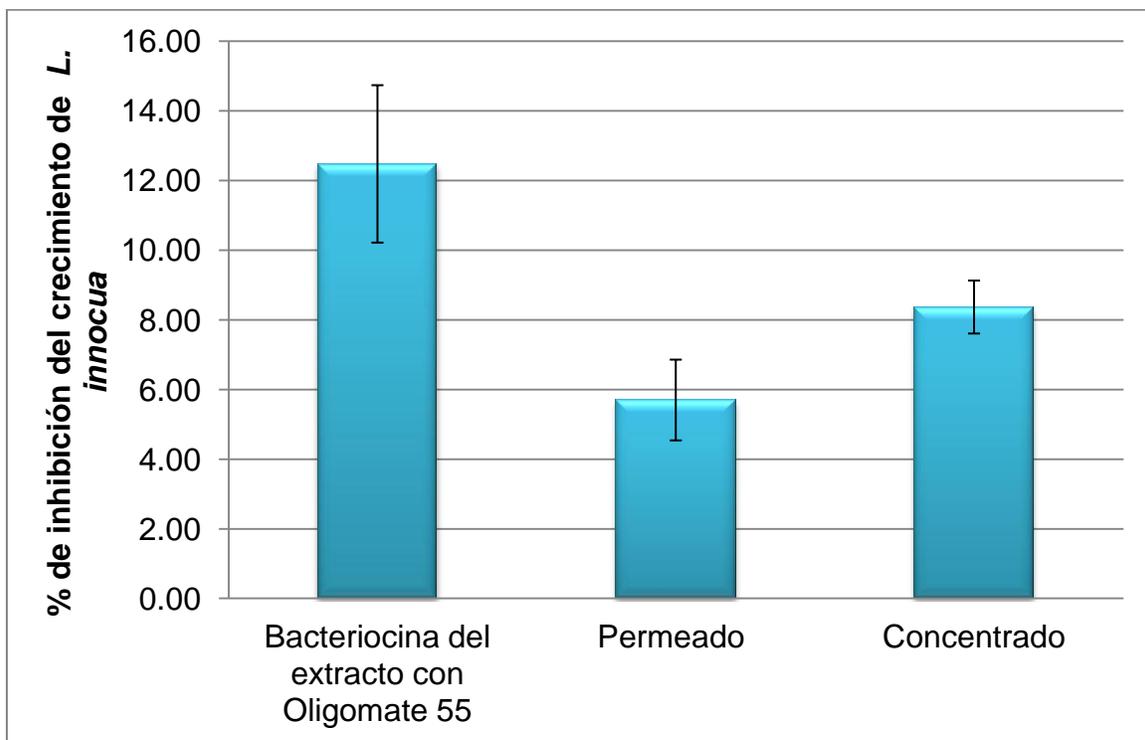


Figura 5 Determinación del % Inhibición de las fracciones obtenidas por ultrafiltración con una membrana de 10 kDa.



Tras realizar la purificación con exceso de acetona, se evaluó la actividad de la bacteriocina en el precipitado reconstituido. En la determinación del % de inhibición en el crecimiento de *L. innocua* se encontró la pérdida total de la actividad de la bacteriocina (resultados no mostrados). Este efecto se puede deber a que entre los péptidos precipitados no se encontró la bacteriocina; o bien que la bacteriocina precipitada pierda su actividad debido al efecto del solvente.

Pal y Ramana (2010) probaron la precipitación con acetona fría logrando una purificación de la bacteriocina producida por *Weissella paramesenteroides*; sin embargo esta metodología no resultó para la purificación de la bacteriocina producida por *L. helveticus*.

Pal y Ramana (2010) del mismo modo probaron el efecto de diferentes solventes orgánicos por 2 h a 35 °C y reportan la pérdida de la actividad en la bacteriocina (95% de pérdida con acetona y 50% de pérdida con etanol). Esta pérdida la adjudican al cambio de la estructura nativa de la proteína por la pérdida de agua.

Khali *et al.* (2009) probaron el efecto de los solventes orgánicos (acetona, cloroformo, alcohol etílico, hexano y metanol) sobre una bacteriocina producida por *Bacillus megaterium* y a excepción del hexano y el etanol, la bacteriocina fue completamente sensible a los solventes empleados en el estudio.

Otra metodología para la purificación de bacteriocinas fue la basada en adsorción-desorción en células; esta metodología se llevó a cabo con valores de pH de 6 para la adsorción y de 2 para la desorción en un medio fermentado con Oligomate 55 y en otro con MRS; los resultados de esta purificación se muestran en la figura 6.

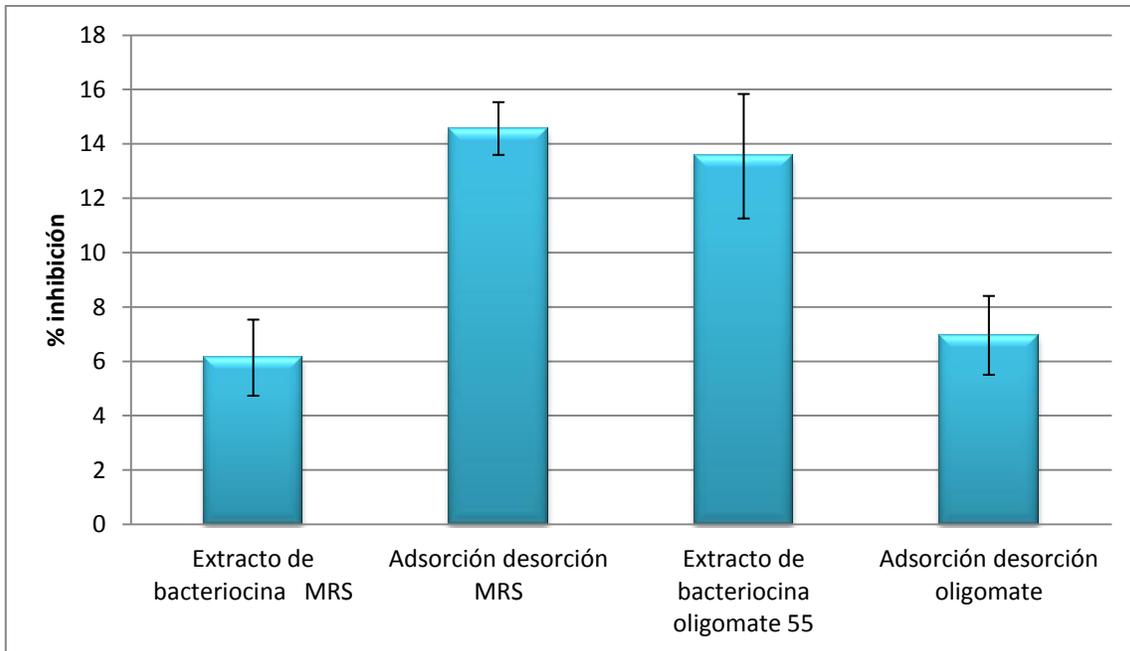


Figura 6 Determinación del % Inhibición de *L. innocua* de la bacteriocina purificada por adsorción-desorción en células de *Lactobacillus helveticus*.

Al realizar esta purificación se encontró un 14.57% de inhibición en el extracto purificado de la fermentación con MRS y un 6.96 % en el extracto purificado de la fermentación con Oligomate 55.

Se observó un descenso en la actividad de la bacteriocina purificada a partir de Oligomate 55 en comparación con el extracto de bacteriocina producida por esta misma fuente (13.55%) al contrario que con la bacteriocina purificada con MRS (6.14%) donde se encontró más actividad que en el extracto de bacteriocina de MRS. Este efecto se puede deber a dos factores, el soporte para la adsorción de la bacteriocina (cantidad de células) y los valores de pH utilizados para la adsorción y la desorción de la bacteriocina, tomados de otros autores (Pal y Pamana, 2010).

Se ha demostrado que con un medio con Oligomate 55 existe una pobre producción de biomasa, se generan más bacteriocinas; sin embargo las células para la adsorción no son suficientes. En una fermentación con MRS existe una gran producción de células y se comprobó un % de inhibición menor para la producción de bacteriocina; sin embargo existe



una mayor superficie para la adsorción de las bacteriocinas las cuales se recuperaron con mayor eficacia.

Para obtener un mejor rendimiento en la purificación por adsorción-desorción en células para la bacteriocina producida en Oligomate 55, con los extractos se realizó la determinación del potencial z. Se realizó un cambio en el valor de pH para la desorción a 1.5

En la figura 7 se muestra la actividad de la bacteriocina (% de inhibición del crecimiento de *L. innocua*) purificada por adsorción-desorción a partir de una nueva fermentación con MRS y con Oligomate 55, después de realizar los ajustes en el pH a 1.5 para la desorción. El % de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador en la fermentación con MRS fue de 13.29%, un comportamiento similar a la primera purificación (14.57%); Para la bacteriocina purificada de caldo con Oligomate 55 como fuente de carbono se obtiene un 11.96%, un porcentaje mayor con respecto a la primera purificación (6.96%).

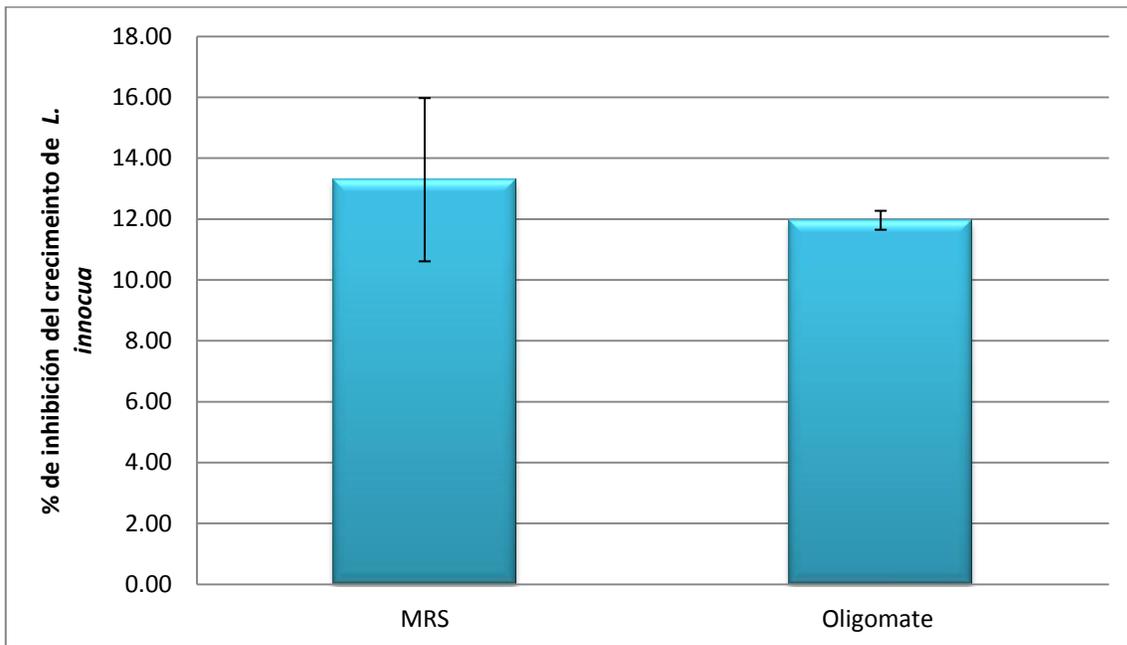


Figura 7. Determinación del % de inhibición de *L. innocua* para la purificación de la bacteriocina por adsorción-desorción en células de *Lactobacillus helveticus* con ajuste de pH para la desorción.



Pal y Ramana (2010) utilizaron el método basado en la naturaleza catiónica de las bacteriocinas y su habilidad de absorberse reversiblemente y no específicamente sobre células de bacterias Gram-positivas. Este método sugiere cambios de pH para adsorber las bacteriocinas con una máxima adsorción a pH superiores a 6 y mínimas a pH de 2. Si la adsorción se lleva a cabo por medio de la carga neta del péptido como lo sugieren Yang *et al.* (1992), para obtener un mayor % de inhibición en el crecimiento del microorganismo indicador era necesario disminuir el pH para la desorción de la bacteriocina debido a que, a un pH de 2, la bacteriocina aún se encontraba muy cercana a su punto isoelectrico, lo cual se corroboró determinando el potencial z, por lo tanto se empleó la misma metodología con el cambio pH a 1.5 para la desorción.

Existen varios factores que contribuyen a la adhesión de las bacteriocinas a los *Lactobacillus*, uno de éstos pueden ser por la carga positiva de las. Por ejemplo, la hidrofobicidad de la superficie celular y la autoagregación (Cesena *et al.*, 2001; Ehrmann *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2002; Kos *et al.*, 2003), los ácidos lipoteicoicos (Sherman y Savage, 1986; Granato *et al.*, 1999) y las proteínas de la superficie celular (Walter *et al.*, 2005) también contribuyen a las propiedades de unión de los probióticos. Especies de *Lactobacillus* como *Lactobacillus brevis*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum* y *L. helveticus* poseen proteínas de la capa superficial situadas fuera de la pared celular externa en una capa paracrystalina (Avall-Jäskeläinen y Palva, 2005) los cuales se agregan para formar la capa de la superficie en una estructura cristalina de dos dimensiones con una red regular, que podrían contribuir a la adhesión (Sara y Sleytr, 2000).

En la tabla 4 se muestra la actividad específica de las bacteriocinas purificadas por adsorción-desorción en células producidas en MRS y en Oligomate 55 como fuente de carbono, con una desorción a pH 2 y con una desorción a pH 1.5.

Al llevar a cabo las purificaciones se buscó obtener la mayor cantidad posible de bacteriocina, evitando impurezas de otras proteínas. La actividad específica se calculó como el cociente entre la actividad total (%/mL) y la proteína (mg) presente en esa preparación. A mayor valor, se recupera más bacteriocina que otras proteínas.



El incremento de la actividad específica (tabla 4) se calculó dividiendo la actividad específica recuperada en cada paso de la purificación entre la que se encontró en la preparación original, para saber cuántas veces se incrementó la actividad de la bacteriocina en cada etapa de la purificación. Por lo tanto el valor de la primera actividad fue igual a la unidad, ahí la bacteriocina conserva la pureza correspondiente al extracto original, puesto que no fue tratada.

El rendimiento (%) se refiere a cuánto de la bacteriocina que se purificó, se está recobrando en cada paso. Se utiliza el cociente del % de la actividad de la bacteriocina con respecto a actividad inicial por el volumen de la fracción sobre el volumen inicial. Por lo tanto en la primera purificación se obtiene el 100% del rendimiento de la bacteriocina.

Tabla 4 Rendimientos y actividad específica de las bacteriocinas de la fermentación en Oligomate 55 y MRS. Los valores de las mediciones son de tres experimentos independientes con una desviación estándar inferior al 10%. EXB, extracto de bacteriocina; ADC1, adsorción-desorción en células; ADC2, adsorción-desorción en células con ajuste de pH a 1.5

Tipo de purificación	Volumen (mL)	Actividad de la bacteriocina	Actividad total(%/mL)	Proteína (mg/mL)	Total de proteína (mg)	Actividad específica (%/mg)	Incremento de la actividad específica	Rendimiento (%)
EXB oligomate	500.00	13.55	0.03	7.40	3700.00	3.66E-03	1.00	100.00
ADC1	20.00	6.96	0.35	6.42	128.40	5.42E-02	14.80	2.05
ADC2	20.00	11.96	0.60	11.09	221.80	5.39E-02	14.72	3.53
EXB MRS	500.00	6.14	0.01	7.70	3850.00	1.59E-03	1.00	100.00
ADC1	20.00	14.57	0.73	24.11	482.20	3.02E-02	8.25	9.49
ADC2	20.00	13.29	0.66	23.60	472.00	2.82E-02	7.69	8.66

Se puede observar que después de realizar la purificación por adsorción-desorción en células de las fermentaciones en Oligomate 55 no existe una gran diferencia en cuanto a la actividad específica; sin embargo existe un pequeño incremento en el rendimiento, con esto datos se puede decir que por medio de esta técnica solo se recupera más proteína. En el caso de la bacteriocina purificada del medio de MRS después del cambio de pH se observa un decremento, tanto en la actividad específica como, en el rendimiento, en este caso no se recomienda el cambio en el pH.



D'Angelis *et al.* (2009) realizaron la metodología sugerida por Yang *et al.* (1992) para la purificación de sakaicina producida por *Lactobacillus sakei*; al realizar las purificaciones encontraron un incremento en la actividad específica final de 235 con un rendimiento del 2%. Pal y Ramana al realizar la purificación de la bacteriocina producida por *Weisiela paramenseroides* por esta misma técnica encontraron un incremento en la actividad específica de 56.7 y un rendimiento de 5.34 %.

8.3 Determinación del potencial Z

En la figura 8 se muestra la curva de la determinación del potencial Z considerando la carga total de la bacteriocina de las muestras obtenidas por absorción-desorción en células del medio fermentado con MRS y del medio fermentado con Oligomate 55 como fuente de carbonobh en función del pH. A pH de 2 las muestras extraídas de MRS y de Oligomate 55 tienen un potencial zeta positivo o muy cercano a 0 lo cual indica que está muy cercano al punto isoelectrico. A un pH de 3 la muestra de Oligomate aun se encuentra cercana a su punto isoelectrico. Rebasando este pH las muestras extraídas de ambos medios de cultivo mostraron un carácter negativo.

Con los resultados obtenidos se confirmó que, el pH 1.5 utilizado para la desorción de los péptidos fue el más adecuado porque está más alejado del punto isoelectrico y las bacteriocinas pueden tener cierta carga; con la cual se pueden desorber de las células.

Se puede observar como, el potencial zeta del extracto de MRS tiene potenciales mayormente negativos a todos los pH por encima de 3 comparados con los potenciales del extracto de Oligomate 55. El potencial zeta mide la carga neta total, por lo tanto el efecto de la concentración repercute directamente con el potencial, la muestra con mayor concentración muestra cambios más evidentes en la magnitud de su carga.

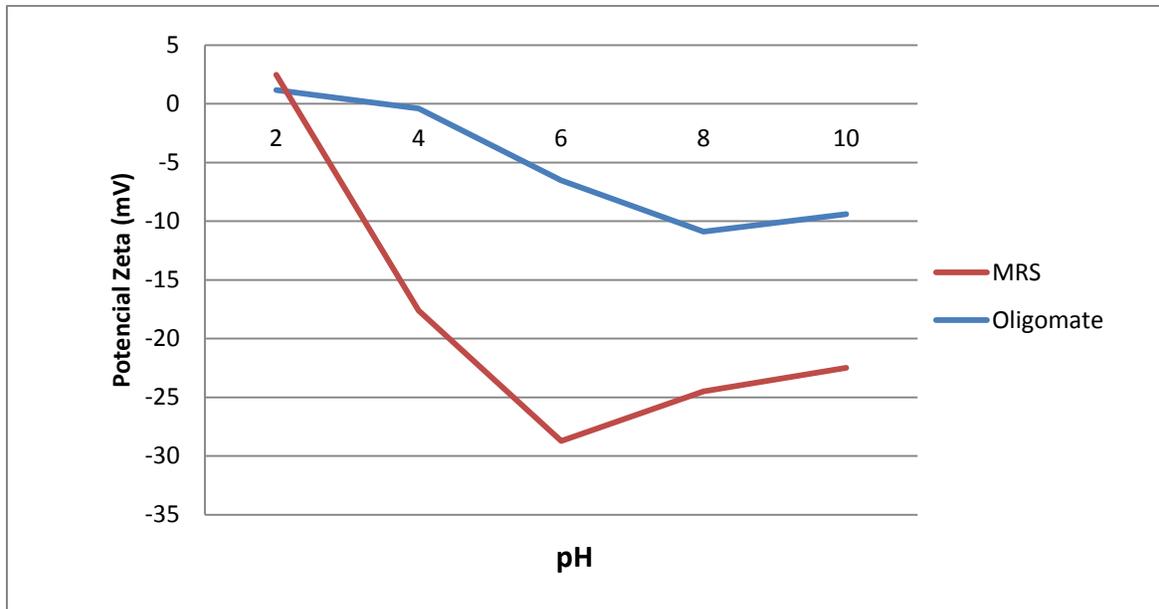


Figura 8 Determinación del potencial Z en función del pH para las muestras purificadas de la fermentación de MRS y de Oligomate 55.

8.4 Determinación del peso molecular por electroforesis

El peso molecular de la bacteriocina fue determinado mediante una electroforesis en SDS-PAGE. En la figura 9 se muestra el gel de electroforesis donde se observan las bacteriocinas purificadas por adsorción-desorción en células obtenidas de la fermentación de MRS y de Oligomate 55. En ambos casos se encontraron 4 bandas con las mismas distancias de migración (RF) a las cuales se les determinó su peso molecular.

En la tabla 5 se muestran los pesos moleculares de las bandas purificadas que corresponden a compuestos de alto peso molecular; esto se puede deber a que no se utilizó β -mercaptoetanol como agente desnaturalizante. Se ha reportado que algunas bacteriocinas aparecen en su estado natural como agregados de alto peso molecular (30-300 kDa). Estos agregados pueden inducir a errores en la determinación de su peso molecular. Por esta razón la forma más adecuada para determinar el peso molecular es por medio de una cromatografía por exclusión de tamaños en HPLC.

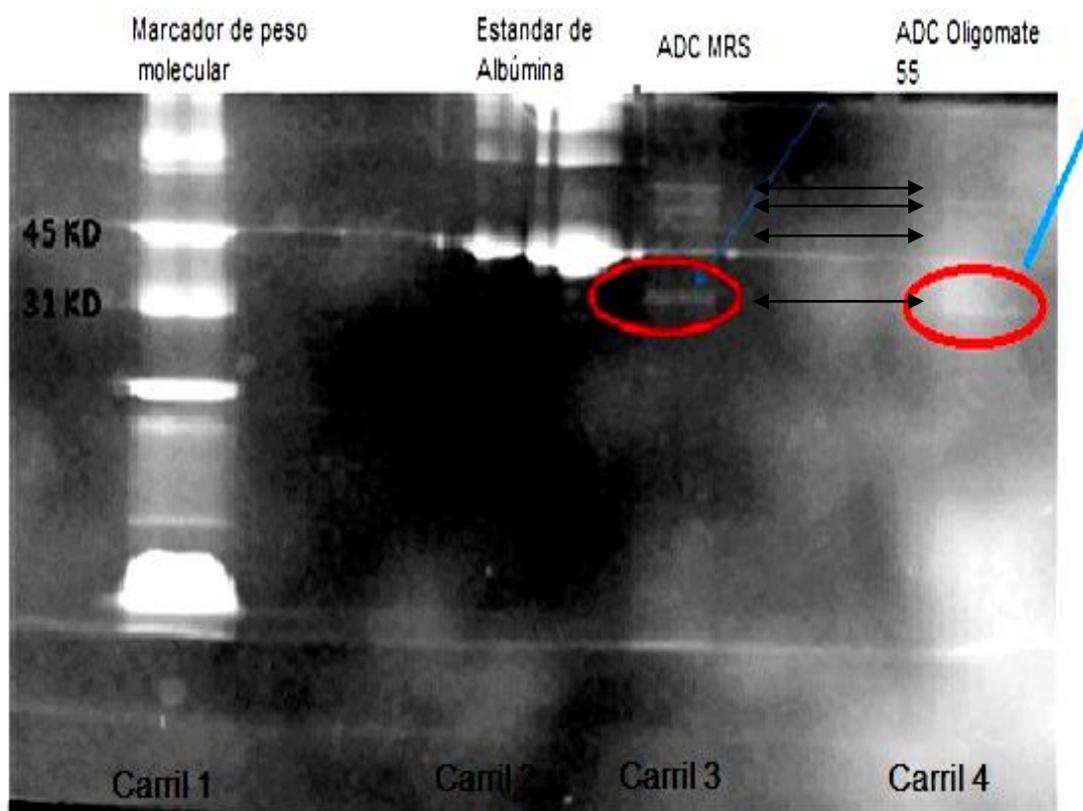


Figura 9 Estimación del peso molecular de los péptidos obtenidos por adsorción-desorción en un gel de electroforesis SDS-PAGE (12% poliacrilamida) Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2 Estándar de albúmina; carril 3 muestra purificada por adsorción-desorción en células (ADC) en MRS y carril 4 muestra purificada por adsorción-desorción (ADC) en células con Oligomate 55.

Tabla 5 Peso molecular de los péptidos obtenidos por adsorción-desorción en células de la fermentación en Oligomate 55 y en MRS calculado mediante electroforesis.

Muestra		RF	log Mw	MW (KDa)
Oligomate 55	MRS			
1	1	13	4.95	89.37
2	2	16	4.89	78.43
3	3	20	4.82	65.90
4	4	31	4.61	40.83



8.5 Determinación del peso molecular por HPLC

Para poder conocer la fracción en la cual se encontraba la actividad de la bacteriocina así para conocer el perfil peptídico de la bacteriocina parcialmente purificada y su peso molecular se hizo una inyección de 20 μ L de cada muestras de adsorción desorción en MRS y de Oligomate 55 (Figura 10 y 11). Para determinar el peso exacto de la bacteriocina se inyectó un estándar externo con pesos moleculares conocidos; en la figura 12 se muestra el cromatograma del estándar, en la tabla 6 se muestran los pesos moleculares de cada una de las fracciones obtenidas.

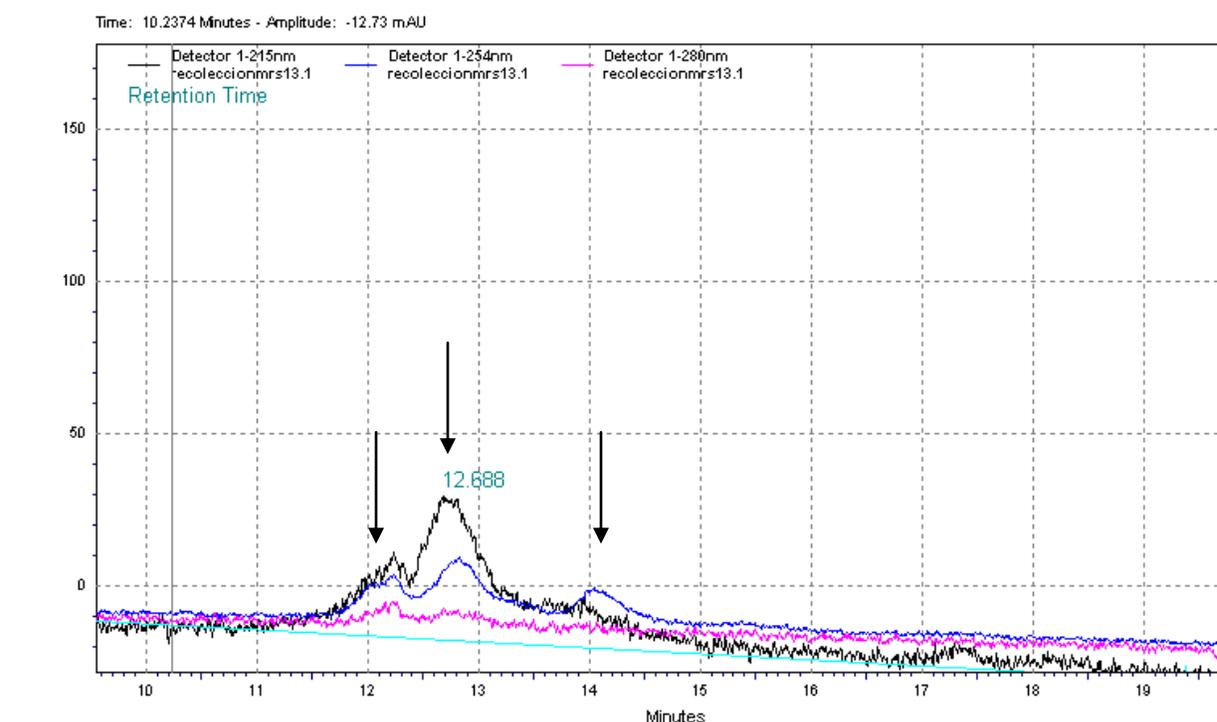


Figura 10 Cromatograma de los péptidos obtenidos adsorción-desorción en células producidas en MRS. $\Lambda=215, 254$ y 280 nm

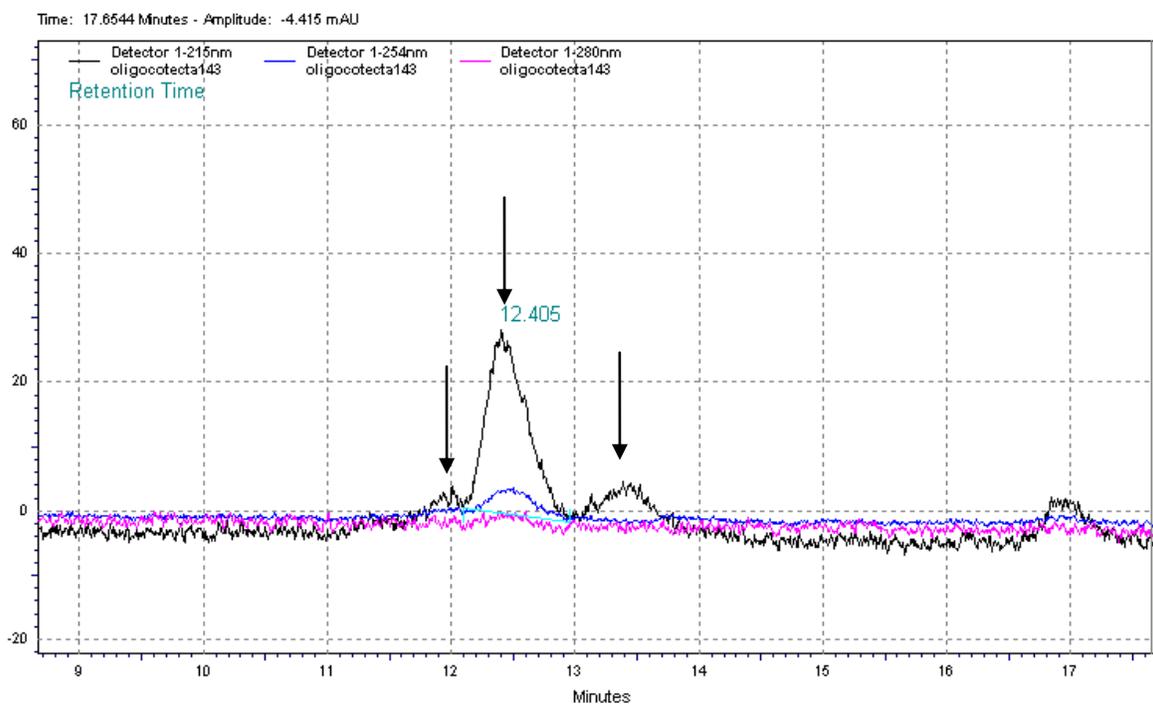


Figura 11 Cromatograma de los péptidos obtenidos adsorción-desorción en células producidas en Oligomate 55. $\lambda=215, 254$ y 280 nm

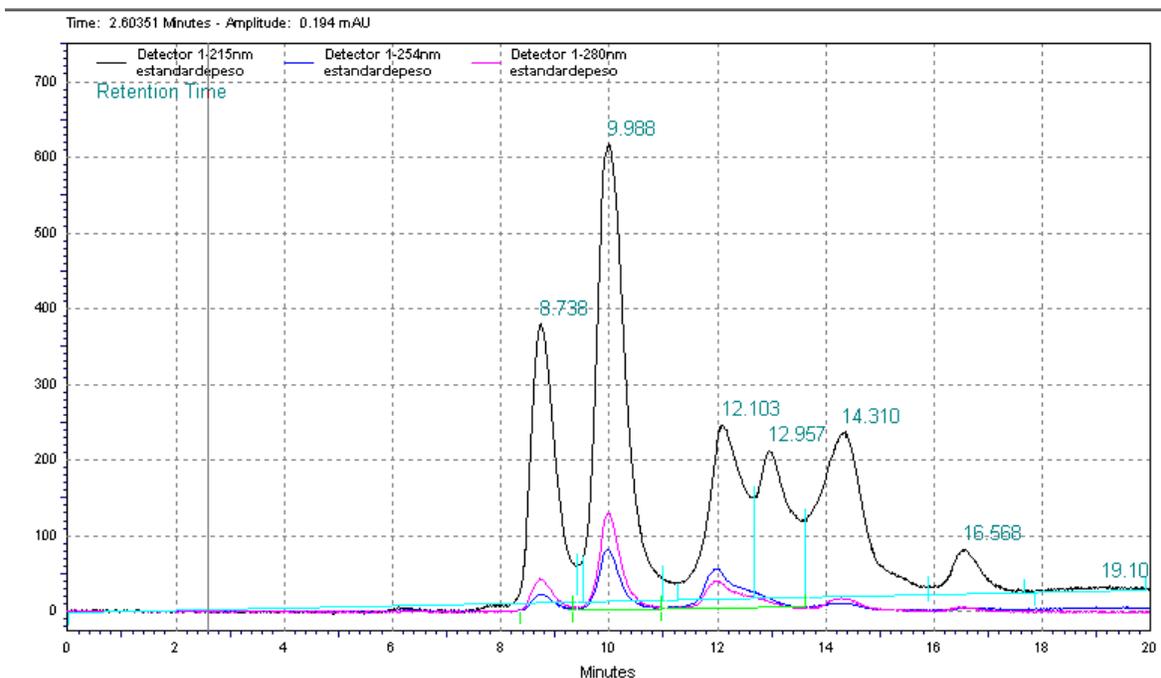


Figura 12 Cromatograma del estándar de polipéptidos Bio-Rad con triosefosfato isomerasa de 26.625 kDa, mioglobina de 16.95 kDa, α -lactoalbúmina de 14.43 kDa, aprotinina de 6.512 kDa, cadena B de la insulina oxidada de 3.496 kDa y bacitracina de 1.42 kDa (215, 254 y 280 nm).



Tabla 6 Peso molecular de los péptidos purificados por adsorción-desorción en células de Oligomate 55 y MRS mediante HPLC

Péptidos purificados de MRS	Tiempo	PM (KDa)
Pico 1	12.34	11.90
Pico 2	12.68	10.81
Pico 3	14.23	5.87
Péptidos purificados Oligomate 55		
Pico 1	12.01	12.95
Pico 2	12.40	11.69
Pico 3	13.39	8.55

Por medio de HPLC se puede determinar el peso molecular, las partículas pequeñas se difunden mejor en los poros que las moléculas de mayor tamaño y por eso sus tiempos de retención son más altos, en consecuencia las moléculas son eludidas en orden inverso a su peso molecular (Mine y Shahidi, 2006). Los pesos moleculares de las muestras evaluadas se encuentran entre los 5 y 12 kDa a diferencia de los resultados con electroforesis. Debido a los diferentes métodos y al tratamiento previo se puede decir que los resultados del peso más confiable es por HPLC. En base a estos resultados se puede decir que la bacteriocina producida por esta cepa de *L. helveticus* es diferente a helveticina J, reportada por Joerger y Klaenhammer, (1986) con un peso molecular aproximado de 37 kDa.

Vaughan *et al.* (1992) realizaron la purificación de una bacteriocina aislada de *L. helveticus* 1829 mediante una sonda de ADN específica para el gen estructural de helveticina J, compararon con el gen de su cepa y no encontraron concordancia entre ambos, lo que indicó que la helveticina V-1829 no se relaciona con la helveticina J.

Por otro lado Bonadè *et al.* (2001) también realizaron la purificación parcial de una bacteriocina de *L. helveticus* G55 aislada de queso Granada y encontraron una bacteriocina con un peso molecular de 12.5 kDa, la cual es parecida en tamaño la bacteriocina que se



estudió. Por otro lado Thompson *et al.*, (2008) aislaron una bacteriocina de *L. helveticus* CNRZ450 con un peso molecular de 17 kDa.

8.6 Evaluación del modo de acción

Las bacteriocinas tienen diferentes modos de acción; bactericida, bacteriostático o bacteriolítico y principalmente muestran una inhibición con aquellas bacterias que están relacionadas taxonómicamente. Las Figuras 13 y 14 muestran la inhibición del crecimiento de *L. innocua* ATCC33090 y *Escherichia coli* K12 frente a los péptidos purificados por adsorción-desorción, producido con Oligomate 55 y MRS. Se puede observar que en el caso de la curva de crecimiento de *L. innocua*, después de la adición de los péptidos existe un descenso en la absorbancia, sin embargo no existe un descenso aparente en la curva de crecimiento de *Escherichia coli*.

Se ha comprobado que las bacteriocinas tienen un efecto antibacteriano contra especies filogenéticamente relacionadas, por ello las bacteriocinas de BAL tienen una mayor actividad frente a bacterias Gram positivas (Cintas *et al.*, 2001). Sin embargo no se puede descartar por completo el efecto de la bacteriocina contra *Escherichia coli*, ya que el método de evaluación para la actividad de la bacteriocina fue por diferencias entre las absorbancias y pueden existir células que no son viables pero si reflejan un valor en la absorbancia. Para comprobar la actividad en *Escherichia coli* es necesario hacer un conteo de bacterias viables sin embargo los resultados no fueron contundentes.

En cuanto a *L. innocua* se puede decir que la bacteriocina tiene un modo de acción bacteriolítico, este modo de acción implica la lisis de la bacteria, y como consecuencia se observó un decremento en la absorbancia. Todas las bacteriocinas caracterizadas contienen un componente proteico esencial para su actividad biológica. Algunas son simples proteínas, mientras que otras son moléculas complejas con componentes lipídicos o carbohidratos (Medina *et al.*, 1992). Jaramillo *et al.* (2010) establecieron que la membrana bacteriana se permeabiliza mediante atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y la bacteriocina con una carga neta positiva, la cual conduce a la inserción



de la bacteriocina en la bicapa lipídica, formando poros en la membrana. Las células permeabilizadas permiten filtraciones de metabolitos fundamentales además de iones, provocando la eventual muerte de la bacteria.

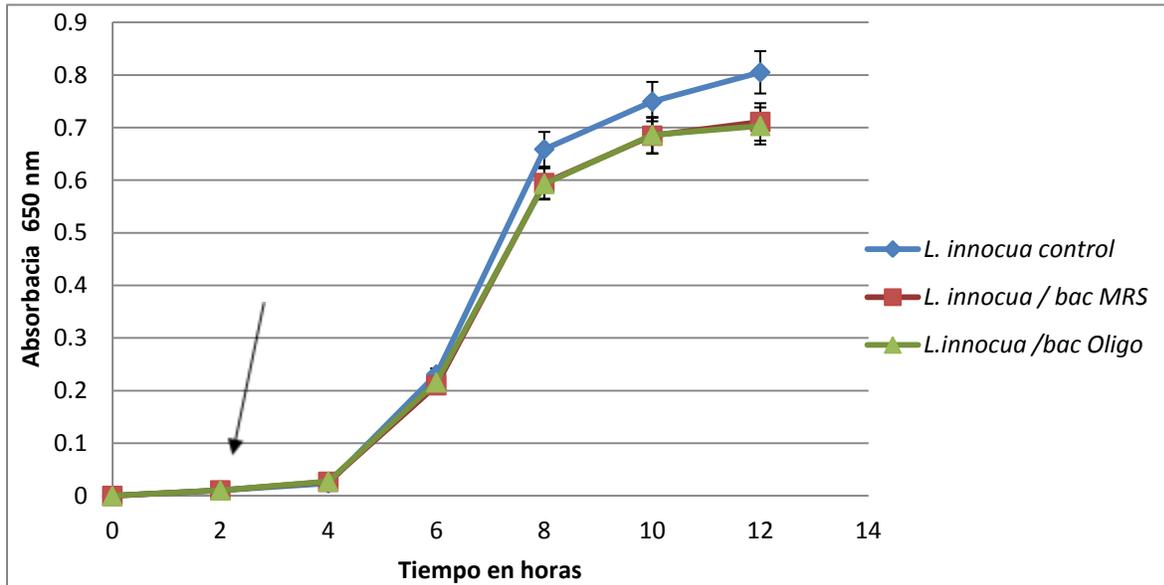


Figura 13 Curva de crecimiento de *Listeria innocua* en presencia y ausencia de la bacteriocina. La flecha indica el momento en el cual la bacteriocina de los diferentes extractos, fue añadida.

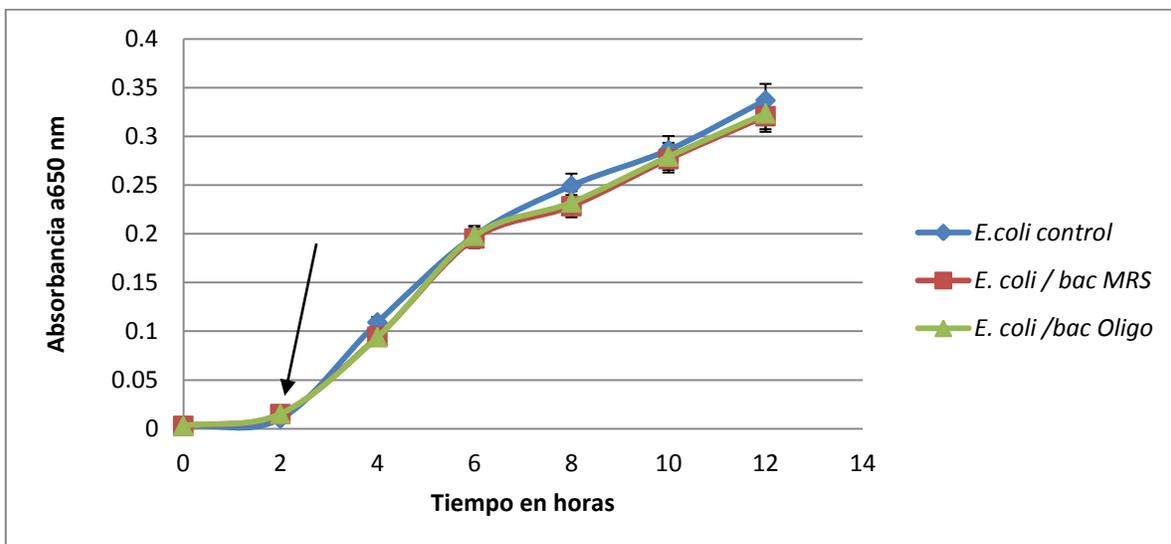


Figura 14 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* K12 en presencia y ausencia de la bacteriocina. La flecha indica el momento en el cual la bacteriocina de los diferentes extractos, fue añadida.



8.7 Evaluación del efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de la bacteriocina parcialmente purificada

Los parámetros más importantes que afectan a la estabilidad de una bacteriocina son la temperatura y el pH. Diversos estudios sugieren los efectos individuales de pH y de la temperatura en la estabilidad de las bacteriocinas, de este modo se decidió estudiar el efecto de ambos factores.

Para determinar el efecto de la temperatura y del pH sobre la actividad de las bacteriocinas tanto en MRS como en Oligomate 55, se aplicó un diseño experimental estadístico. Los rangos de temperatura y de pH probados fueron de 67.9 a 92.1°C y de 2.47 a 8.5 respectivamente, con un total de 12 experimentos (tabla 2). La aplicación del diseño experimental en ambas bacteriocinas dieron como resultado las siguientes ecuaciones:

a) Ecuación para la bacteriocina purificada parcialmente de MRS

$$\text{Inhibición del crecimiento de } L. \text{ innocua } (\%) = -37.0556 + 9.75845 * \text{pH} - 0.883767 * \text{Temperatura} - 0.534664 * \text{pH}^2 - 0.0832 * \text{pH} * \text{Temperatura} + 0.00753015 * \text{Temperatura}^2$$

b) Ecuación para la bacteriocina purificada parcialmente en Oligomate 55

$$\text{Inhibición del crecimiento de } L. \text{ innocua } (\%) = -24.9472 + 13.6364 * \text{pH} + 0.0501404 * \text{Temperatura} - 0.387046 * \text{pH}^2 - 0.1256 * \text{pH} * \text{Temperatura} + 0.00360825 * \text{Temperatura}^2$$

En la tabla 7 y 8 se observan los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el diseño experimental de las bacteriocinas parcialmente purificada de MRS y Oligomate 55. Se puede observar el efecto de los factores independientes (pH y temperatura) así como la interacción de estos. La tabla ANOVA divide la variabilidad de la inhibición del crecimiento de *L. innocua* (%) en factores separados.



Tabla 7. ANOVA para evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la bacteriocina del extracto de adsorción-desorción en MRS.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	334.373	1	334.373	23.11	0.0030
B:Temperatura	12.917	1	12.917	0.89	0.3812
AA	47.8734	1	47.8734	3.31	0.1188
AB	17.3056	1	17.3056	1.20	0.3161
BB	2.43097	1	2.43097	0.17	0.6961
Error total	86.8185	6	14.4698		
Total (corr.)	501.718	11			

$$R^2 = 82.6958\%$$

Error estándar del est. = 3.80391

Tabla 8. ANOVA para evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la bacteriocina del extracto de adsorción-desorción en Oligomate 55.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	19.3856	1	19.3856	6.52	0.0433
B:Temperatura	2.77954	1	2.77954	0.93	0.3710
AA	25.0875	1	25.0875	8.43	0.0272
AB	39.4384	1	39.4384	13.26	0.0108
BB	0.558168	1	0.558168	0.19	0.6800
Error total	17.8457	6	2.97428		
Total (corr.)	105.095	11			

$$R^2 = 83.0195\%$$

Error estándar del est. = 1.72461

Los resultados indican que con el modelo empleado para la bacteriocina de MRS solo el pH tiene un efecto significativo ($P < 0.05$). El coeficiente de correlación (R^2) es de 0.8260, lo que significa que el modelo explica el 82.6% de la variabilidad en la actividad de la bacteriocina.



En la bacteriocina de Oligomate 55 el factor pH también es significativo; sin embargo también existe un efecto significativo de la interacción del pH con la temperatura ($P < 0.05$). En este modelo la correlación es de 0.8301, lo que explica el 83.01% de la variabilidad en la actividad de la bacteriocina.

La Figura 15 muestra el gráfico de contornos de superficies de respuesta así como la superficie de respuesta, del efecto de la temperatura y el pH sobre la bacteriocina y su inhibición del crecimiento del microorganismo indicador, después de 15 min de tratamiento. Se observó una inhibición máxima a temperaturas de 70°C y 80 °C y a pH entre 3 y 5. El aumento adicional de la temperatura y el valor de pH resultó en una disminución de la actividad bacteriocina. La figura 16 muestra la superficie de respuesta y los contornos de la superficie de respuesta, sobre la inhibición del crecimiento del microorganismo indicador con la bacteriocina producida en Oligomate 55 bajo las mismas condiciones de tratamiento. Se encontró una actividad máxima a pH entre 4 y 8 y a temperaturas de 70 a 78 °C. En este caso como el efecto de ambos factores (pH y temperatura) es significativo.

Las diferencias entre los dos extractos parcialmente purificados pueden deberse al efecto de la concentración, ya que la concentración de proteínas del extracto de Oligomate 55 fue de 11.09 mg/mL mientras que el extracto de MRS fue de 23.6 mg/mL. En futuras investigaciones, el efecto de la concentración también debe de ser evaluado.

Entre los estudios que se han realizado con bacteriocinas de *L. helveticus*, Vaughan *et al.* (1992) encontraron que la helveticina 1829 fue lábil al calor, inactivándose a 50 °C durante 30 min, sin embargo se mantuvo estable a un intervalo de pH 2.5 a 6.5.

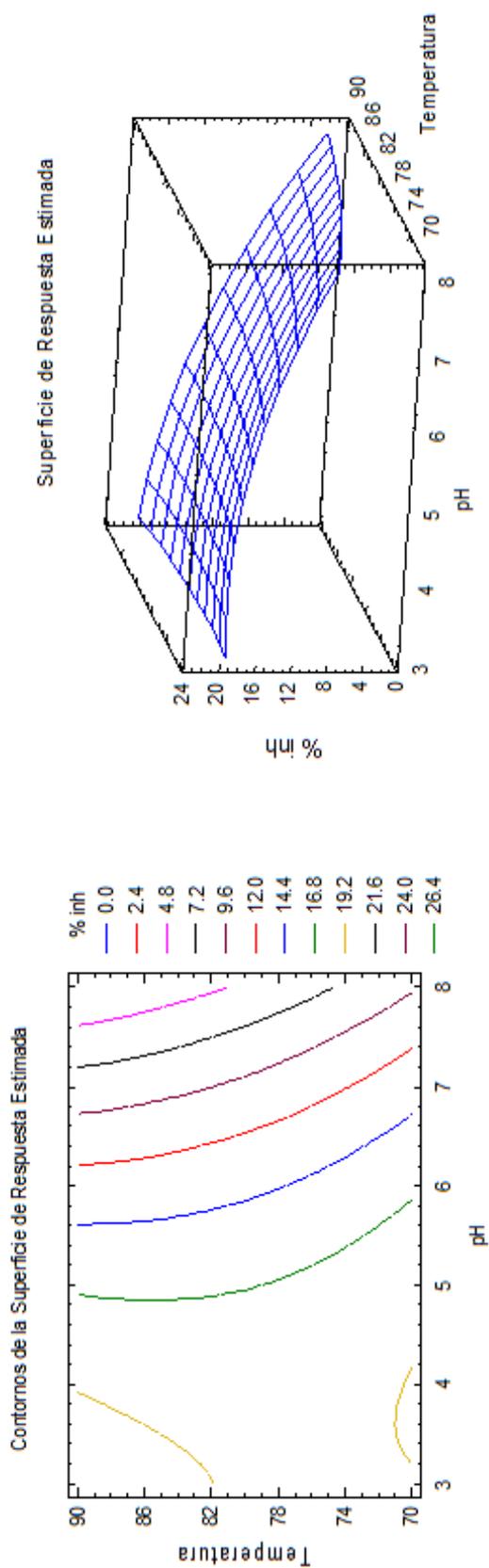


Figura 15 Contornos de la superficie y superficie de respuesta estimada para la bacteriocina purificada por adsorción desorción en células producidas en MRS

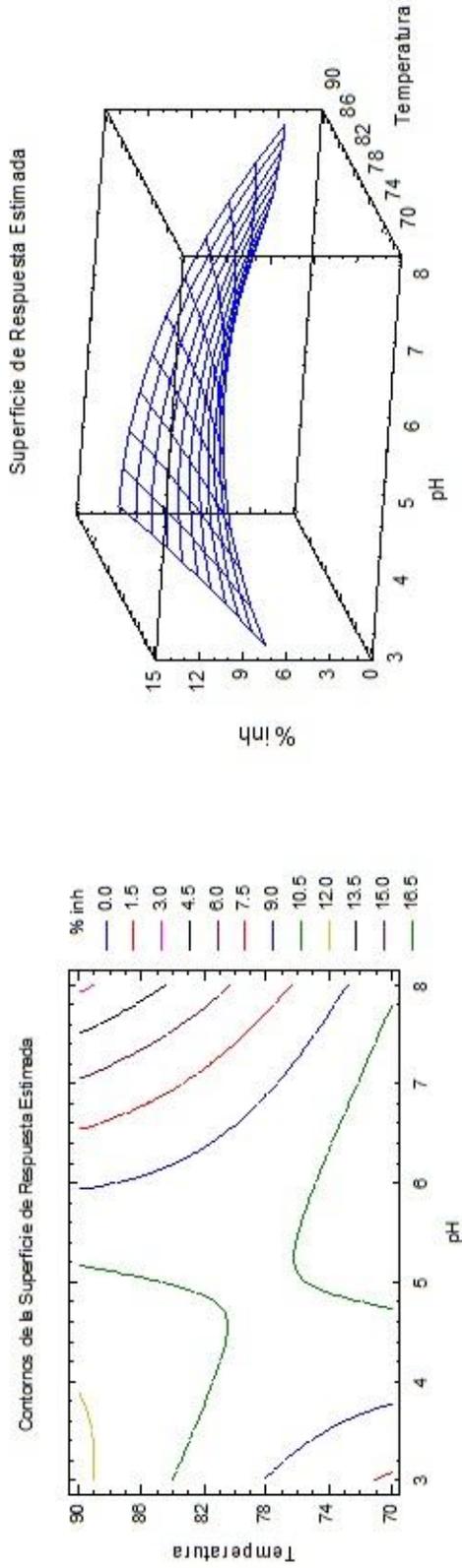


Figura 16 Contornos de la superficie y superficie de respuesta estimada para la bacteriocina purificada por adsorción desorción en células producidas en Oligomate 55



9 CONCLUSIONES

Se comprobó la producción de bacteriocinas al realizar la fermentaciones de *L. helveticus* usando un medio con Oligomate 55 así como con un medio más complejo (MRS) para el crecimiento de lactobacilos (MRS).

Se realizaron purificaciones parciales de estos péptidos con características de bacteriocina, demostrando que el método de purificación más adecuado es por medio de adsorción-desorción en células. Al extracto de estas purificaciones parciales con actividad se les determinó el tamaño molecular, encontrando péptidos con pesos de entre 5kDa y 14 kDa determinado por HPLC

Se determinó que el modo de acción que presentan estas bacteriocinas producidas por *L. helveticus* frente a *L. innocua* es bacteriolítico.

El extracto parcialmente purificado de la bacteriocina tiene una mayor actividad en un rango de pH de 3 a 5 y a temperaturas de 70°C a 80°C además de comprobar estadísticamente que el pH es la variable que afecta la actividad de la bacteriocina producida en Oligomate 55 como fuente de carbono, como en MRS.



10 Perspectivas

- Es recomendable optimizar las condiciones de producción de la bacteriocina para obtener mejores actividades, así como determinar cuál es la fase de la producción de estos péptidos (fase exponencial media tardía o fase estacionaria)
- Realizar la determinación de la fracción peptídica con actividad inhibitoria
- Determinar el espectro de acción en contra de otros microorganismos, tanto los relacionados filogenéticamente así como los que no lo son.
- Evaluar el efecto de la concentración de la bacteriocina sobre su actividad



11 Bibliografía

- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17(6), 454–461.
- Åvall-Jääskeläinen, S., & Palva, A. (2005). Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiololy Review*, 26, 511–529.
- Balciunas, E. M., Castillo, F. A., & Dimtrov Todorv, S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food control*, 32, 134-142.
- BioRad. (2000). *Mini Protean II Electrophoresis Cell Instrucción Manual*.
- Bonadè, A., Murelli, F., Vescovo, M., & Scolari, G. (2001). Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 153-158.
- Bustamante, R., Vielma, M., & Mora, A., (2006) Aplicación del Diseño Compuesto Central Rotable en el Establecimiento In Vitro de Ápices de Plátano Musa sp. variedad Harton (AAB) *Agroalimentación & Desarrollo Sustentable 10 (1)* 1690-4753
- Callanan, M., Kaleta, P., O'Callaghan, J., O'Sullivan, O., Jordan, K., McAuliffe, O., Sangrador-Vegas, A., Slattery, L., Fitzgerald, G., Beresford, T., Ross, R., (2008). Genome Sequence of *Lactobacillus helveticus*, an Organism Distinguished by Selective Gene Loss and Insertion Sequence Element Expansion. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 727–735.
- Cesena, C.; Morelli, L.; Alander, M.; Siljander, T.; Tuomola, E.; Salminen, S.; Mattila-Sandholm, T.; Vilpponen-Salmela, T.; von Wright, A (2001). *Lactobacillus crispatus* and it's non aggregating mutant in human colonization trials. *Journa ofl Dairy Science*, 84(5), 1001–1010.
- Chang, J. Y., Lee, H. J., & Chang, H. C. (2007). Identification of the agente from *Lactobacillus platarum* KFRI454 tha enhaces bacteriocin production by *Leuconostoc citreum*. *Applied Microbiology*(103), 2504- 2515.
- Christensen, J. E., Broadbent, J. R., & Steele, J. L. (2003). Hydrolysis of Casein-Derived Peptides α S1-Casein(f1-9) and β -Casein(f193-209) by *Lactobacillus helveticus* Peptidase Deletion Mutants Indicates the Presence of a Previously Undetected Endopeptidase. *Applied Enviromental Microbiology*, 66(2), 1283–1286.
- Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I. F., & Hernández, P. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), 281-305.
- Corporation, B. I. (1994). *Intruccion Manual for ZetaPlus, Zeta Potencial Analyzer*.



- Cotter, P., Hill, C., & R.P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. . *Nature Reviews Microbiology.*, 3, 777-787.
- D'Angelis, C., Polizello, A. C., Nonato, M., Spadaro, A., & Martinis, E. (2009). Purification, characterization and N-terminal amino acid sequencing of sakacin 1, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* 1. *Journal of Food Safety*, 29, 636- 649.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H. (2006). The continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 565-581.
- Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., & Vogel, R. F. (2002). Caracterización de los lactobacilos hacia su uso como complementos probióticos en las aves de corral . *Journal of Applied of Microbiology*, 92, 966-975.
- Figueroa-González, I. (2010). Estudio de prebióticos en el crecimiento de bacterias probióticas comerciales y en la síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana. Tesis de doctorado. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.
- Figueroa-González, I., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2010). ANTIMICROBIAL EFFECT OF *Lactobacillus casei* STRAIN SHIROTA. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9(1), 11-16.
- Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., & Nissen-Meyer, J. (2005). Pediocin-like antimicrobial peptides (clase IIa bacteriocins) an ther immunity proteins: biosynthesis , structure and mode of action. *Journal of Peptide Science*, 11, 688-696.
- Fooks, L., & Gibson, G. (2002). In vitro investigations of effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. . *FEMS Microbiology Ecology*, 67-75.
- Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A., & Brassart, D. (1999). Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Applied of l Environ Microbiol* , 65, 1071–1077.
- Helander, I., von Wright, A., & T.M., M.-S. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trend in Food Science & Technology*, 8, 146-150.
- Hoffmann, A., Schneider, T., Pag, U., & Sahl, H.-G. (2004). Localization and Functional Analysis of PepI, the Immunity Peptide of Pep5-Producing *Staphylococcus epidermidis* Strain 5. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3263-3271.
- Jaramillo, D., Meléndez, A., & Sánchez, O. (2010). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2, 193-209.
- Jarvis, B., Jeffcoat, J., & Cheeseman, G. (1968). Molecular weigth distribution of nisin. *Biochemical Biophysiology Acta*, 168, 153-155.



- Joerger, M. C., & 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(2), 439-446 .
- Jozala, A., Andrade, M. S., Arauz, L. J., Pessoa, A., & Vessoni- Penna, T. (2007). Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. *Applied Biochemical biotechnology*, 136, 515- 528.
- Kaiser, A. L., & 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*, 62, 4529- 4535.
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters*, 46(3), 233–244.
- Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., & Nishimura, J. (2004). Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2906-2911.
- Khalil, R., Elbahloul, Y., Djadouni, F., & Omar, S. (2009). Isolation and Partial Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus megaterium* 19 Strain. *Pakistan Journal of nutricion*, 8(3), 242-250.
- Kylä-Nikkilä, K., Hujanen, M., Leisola, M., & Palva, A. (2000). Metabolic Engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for Production of Pure 1-(+)-Lactic Acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3835–3841.
- Lai, A. C., Tran, S., & Simmonds, R. S. (2002). Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 215, 133 - 138.
- Macfarlane, G., Steed, H., & S., M. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 1365-2672.
- Maldonado, A., Ruíz-Barba, J., & Jiménez-Díaz, R. (2003). Purification and genetic Characterization of Plantaricin NC8 a Novel coculture -inducible Two- peptide Bacteriocin fro *Lactobacillus Plantarum* NC8. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 383-389.
- Medina, M., Gaya, P., & Núñez, M. (1992). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas. *Revista Española de Lechería.*, 34, 28-32.
- Mine, Y., Shahidi, F., (2006). The estimation of the bactericidal power of blood. *The journal oh hygiene* 648- 650.



- Monroy Dosta, M., Castro Barrera, T., Fernández Perrino, F. J., & Mayorga Reyes, L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ConcactoS*, 73, 63-72.
- Moreira dos Santos, W. L. (1999). *Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp 347, de origen cárnico*. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.
- Mulders, J. W., Boerrigter, I. J., Siezen, J., R., & Vos, M. W. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*, 201, 581-584.
- Pal, A., & Ramana, K. V. (2010). Purification and characterization of bacteriocin from *Weissella paramesenteroides* DFR-8, an isolate from cucumber (*cucumis sativus*). *Journal of Food Biochemistry*, 34(8), 932-948.
- Prajapati, J. B., D., K. C., Chitra, J., Suja, S., Mishra, W., Sreeja, V., Joshi, C. G. (2012). Whole-Genome Shotgun Sequencing of *Lactobacillus rhamnosus* MTCC 5462, a Strain with Probiotic Potential. *Journal of Bacteriology*, 194(5), 1264–1265.
- Rabiu, B. A., Andrew, J. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). Synthesis and Fermentation Properties of Novel GalactoOligosaccharides by b-Galactosidases from *Bifidobacterium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2526-2530 .
- Rajaram, G., Manivasagan, P., & Thilagavathi, B. S. (2010). Purification and characterization of a Bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environmental. *Advanced Journal of food Science and Tecnology*, 2(2), 138- 144.
- Rilla, N., Martinez, D., & Rodriguez, A. (2004). Inhibition of a methicillin-resistan *Staphylococcus aerus* strain in Afuega'l pitu Cheese by the nisin Z producing strain *lactococcus lactis lactis* IPLA 729. *Journal of food protection*, 67, 928-933.
- Sára, M., & Sleytr, S. (2000). UB proteínas de la capa S. *Journal of Bacteriology*, 182, 859-868.
- Sherman, L., & Savage, D. (1986). Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium. *Applied of Environmental Microbiology*, 52, 302–304.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriology Reviews*, 40(3), 722–756. .
- Thammarutwasik, P., Hongpattarakere, Chantachum, Kijroongrojana, S., Itharat, K., Reanmongkol, A., Ooraiku, B. (2009). Prebiotics- A review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 31, 401-408.
- Thompson, J. K., Collins, M., & Mercer, W. (2008). Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. *Journal of Applied Microbiology*, 80(3), 338–348.



- Tiwari, S. K., & Srivastava, S. (2008). Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Applied Microbiology Biotechnology*, 79, 759-767.
- Vásquez, M., & Suárez, H. (2008). *Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne*. Recuperado el 11 de 11 de 2011, de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0717-75
- Vaughan, E. E., Daly, C., & Fitzgerald, G. (1992). Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *Journal of applied Microbiology*, 73(4), 299-308.
- Ventura, M., Jankovic, I., Walker, C., Pridmore, R., & Zink, R. (2002). Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied of Environmental Microbiology*, 68, 6172–6181.
- Villegas, E., & Gilliland, S. E. (1998). Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Lactis* I at 5°C. *Journal of Food Science*, 66(3), 1365-2621.
- Walter, J., Chagnaud, P., Tannock, G., Loach, D., Dal Bello, F., & Jenkinson, H. (2005). A high-molecular-mass surface protein (Lsp) and methionine sulfoxide reductase B (MsrB) contribute to the ecological performance of *Lactobacillus reuteri* in the murine gut. *Applied of Environmental Microbiology*, 71, 979–986.
- Wongsangonsum, R., Shobsngob, S., Oonkhanond, B., & Varavinit, S. (2005). Zeta Potential (z) Analysis for the Determination of Protein Content in Rice Flour. *Weinheim Starch – Stärke*, 57 (1), 25–31.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., & Fillmore, S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB expres, a springer open journal*, 48(2), <http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>. Obtenido de (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>)
- Yang, R., Johnson, M., & Ray, B. (1992). Novel Method to extract large amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 3355-3359.
- Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O., Montoya, O. I., & Gutiérrez, P. A. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10Y caracterización parcial de su bacteriocina. *Revista de la facultad de química farmaceutica*, 16(1), 75- 82.
- Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., & Hamida, J. (2010). A New Structure-based Classification of Gram-positive Bacteriocins. *The Protein Journal*, 29(6), 432-439



12 Anexos

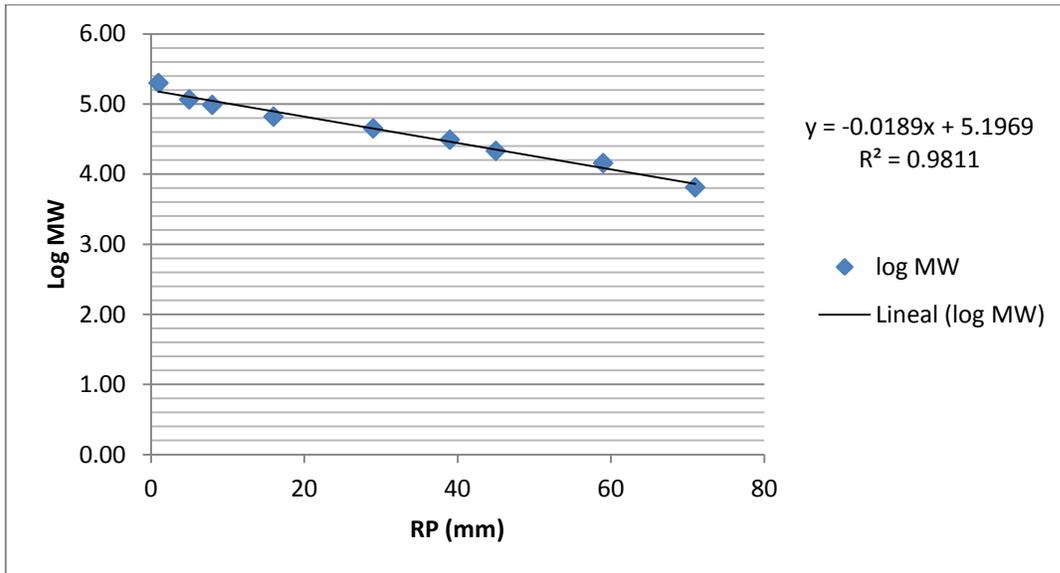


Figura 17 Curva patrón de estándar de proteínas BIORAD para la determinación del peso molecular por electroforesis SDS page

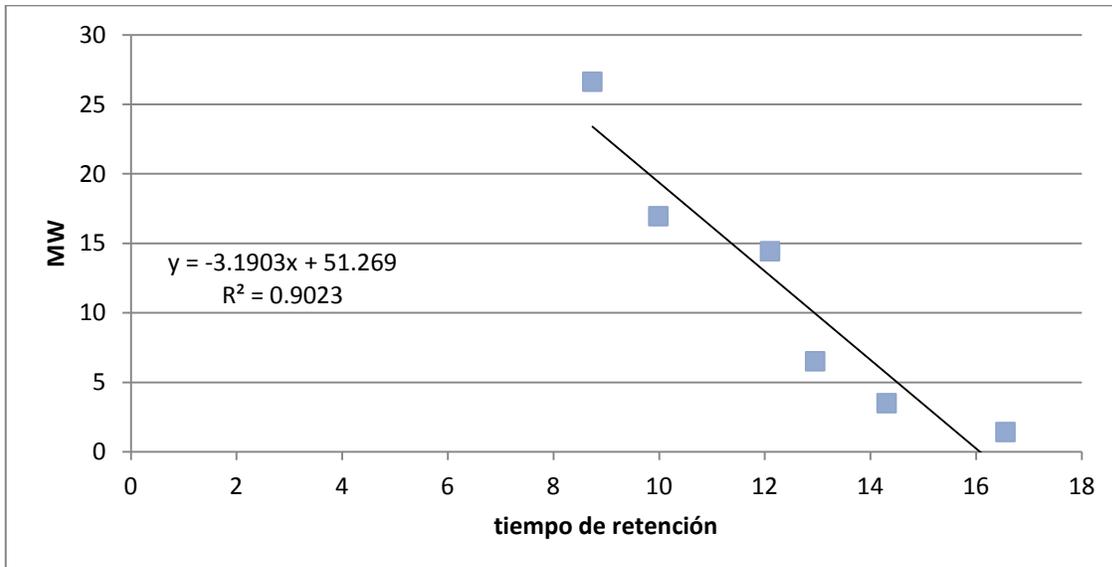


Figura 18 Curva patrón de estándar de polipéptidos de BIORAD para la determinación del peso molecular por HPLC



México D.F. a 19 de Agosto del 2013

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Caracterización de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus helveticus*

que presentó

Olivia Lugo Magaña

Comité Tutorial:

Director: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Asesor: Dr. Humberto Hernández Sánchez

Asesor: Dra. Gabriela Rodríguez Serrano

Jurado:

Presidente: Dr. José Ramón Verde Calvo

Secretario: Dra. Mariana Rodríguez Serrano

Vocal: Dra. Rina María Gonzales Cervantes

Vocal: M. en C. Lorena Gómez Ruiz