



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEÍNAS
CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PRODUCIDAS POR
***Lactobacillus paraplantarum* AISLADA DE UN PRODUCTO**
CÁRNICO

T E S I S

Para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología

P r e s e n t a:

Q.A. Jessica Josefina Hurtado Ríos

Directora de Tesis: Dra. Edith Ponce Alquicira.

Asesores:

Dr. Israel García Cano.

Dr. Julio César Almanza Pérez.

CDMX a 26 de noviembre de 2019



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

Nº. 00262

Matrícula: 2173901826

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEINAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PRODUCIDAS POR *Lactobacillus paraplantarum* AISLADA DE UN PRODUCTO CÁRNICO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 26 del mes de noviembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA
DRA. MARIEL CALDERON OLIVER
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

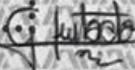
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: JESSICA JOSEFINA HURTADO RIOS

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

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

JESSICA JOSEFINA HURTADO RIOS
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA



DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA

VOCAL



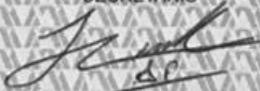
DRA. MARIEL CALDERON OLIVER

VOCAL



DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

SECRETARIO



DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

CDMX a 26 de noviembre de 2019

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PRODUCIDAS POR *Lactobacillus paraplantarum* AISLADA DE UN PRODUCTO CÁRNICO

que presentó:

Q.A. Jessica Josefina Hurtado Ríos

Sinodales:

Dra. Ma. De Lourdes Pérez Chabela
Biotecnología UAM-Iztapalapa

Dr. Julio César Almanza Pérez
Biología Experimental UAM-Iztapalapa

Dr. Ulises Carrasco Navarro
*Biología Celular y del Desarrollo,
Instituto de Fisiología celular, UNAM*

Dra. Mariel Caldaron Oliver
*Biotecnología Tecnológico de Monterrey,
Campus Toluca.*

“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 en el nivel internacional.”

DEDICATORIAS

A mis padres como testimonio de cariño y eterno agradecimiento por mi existencia, valores morales y formación profesional.

Papá, agradezco los consejos sabios que en el momento exacto has sabido darme para no dejarme caer y enfrentar los momentos difíciles, por ayudarme a tomar las decisiones que me ayuden a balancear mi vida y sobre todo gracias por el amor tan grande que me das.

Mamá, tu eres la persona que siempre me ha levantado los ánimos tanto en los momentos difíciles de mi vida estudiantil como personal. Gracias por tu paciencia y esas palabras sabias que siempre tienes en mis enojos, mis tristezas y mis momentos felices, por ser mi amiga y ayudarme a cumplir mis sueños, te amo.

A la familia Hurtado y Ríos, mi abuelita Carmelita y mi tía Socorro.

A Sac Nicté, mi compañera y amiga desde la licenciatura y en esta nueva etapa de mi vida, anécdotas que contar, gracias por haber estado a mi lado para ayudarme, escucharme, aconsejarme y en muchas ocasiones guiarme.

A Jorge, te agradezco por tantas ayudas y tantos aportes no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida, eres inspiración y motivación.

A mis amigos Nadia, Marisol, Palafox, Zelick, Yessa, Clara y Paco quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas.

A mis compañeros de laboratorio Adriana, Carmen, José Luis, Arquímedes, Yesica y Monse, así como a mis compañeros de generación en la Maestría por apoyarnos mutuamente en las buenas y malas tanto en lo profesional como en lo personal.

A la huella de tu vida que quedó grabada en mi alma eternamente.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Edith Ponce Alquicira por todo su apoyo, enseñanzas, consejos, confianza y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Todo mi respeto, agradecimiento y admiración.

A mis asesores de tesis, el Dr. Israel García y el Dr. Julio César por sus comentarios y apoyo en esta investigación.

A los sinodales de tesis por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por el interés mostrado para mejorarla.

A la Bióloga Mónica Rincón Guevara por su apoyo brindado como responsable del Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas.

A los Doctores Francisco Figueroa y Ulises Carrasco por la confianza y guía que me dieron durante el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE TABLAS.	1
ÍNDICE DE FIGURAS.	2
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.	8
1.1.1 GENERALIDADES DE LAS BAL.	8
1.1.2 LAS BAL EN LA INDUSTRIA.	9
1.1.3 METABOLISMO DE LAS BAL.	9
1.2 GÉNERO <i>LACTOBACILLUS</i>.	10
1.2.1 GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>LACTOBACILLUS</i> .	10
1.2.2 NECESIDADES NUTRITIVAS.	11
1.2.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE <i>LACTOBACILLUS</i> .	11
1.3 GENERALIDADES DE <i>LACTOBACILLUS PARAPLANTARUM</i>.	16
1.4 COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BAL.	17
1.4.1 BACTERIOCINAS.	17
1.4.2 PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS.	22
1.4.3 PROTEÍNAS RIBOSOMALES	23
1.4.4 APLICACIONES EN BIOTECNOLOGÍA.	24
1.4.5 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS.	25
1.5 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.	26
1.5.1 PCR MÚLTIPLE CON CEBADORES DERIVADOS DEL GEN <i>RECA</i> .	27
1.5.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	28
2. JUSTIFICACIÓN	30
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVO GENERAL	31
5. OBJETIVOS PARTICULARES	31

6. METODOLOGÍA **32**

6.1 METODOLOGÍA GENERAL.	32
6.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LA CEPA.	33
6.3 IDENTIFICACIÓN DE CEPA.	33
6.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN	33
6.3.2 IDENTIFICACIÓN POR EL GEN 16S ARNr Y GEN <i>RECA</i> .	34
6.3.3 IDENTIFICACIÓN DE CEPA POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	38
6.4 ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE <i>L. PARAPLANTARUM</i>.	39
6.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.	41
6.5.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO.	41
6.5.2 OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS TIPO BACTERIOCINA (ADSORCIÓN-DESORCIÓN).	41
6.5.3 OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS TIPO PEPTIDOGLUCANO HIDROLASA (PGH).	42
6.5.4 PRUEBA PRESUNTIVA POR DIFUSIÓN EN AGAR.	42
6.6 PERFIL PROTEICO PARA BACTERIOCINAS Y ZIMOGRAMA CONTRA <i>MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS</i>.	43
6.7 PERFIL PROTEICO PARA PGHS Y ZIMOGRAMA CONTRA <i>M. LYSODEIKTICUS</i>.	44
6.8 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	45
6.9 ACTIVIDAD DE <i>N</i>-ACETILMURAMIDASA.	45
6.9.1 EXTRACCIÓN DE PEPTIDOGLUCANO DE <i>M. LYSODEIKTICUS</i> .	46
6.10 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y CARBONO EN EL MEDIO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.	46
6.10.1 DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO.	48
6.10.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO.	48
6.10.3 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.	48
6.10.4 PH.	48
6.10.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	49

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS. **49**

7.2.1 EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL.	49
7.1 IDENTIFICACIÓN POR AMPLIFICACIÓN GEN DE REFERENCIA 16S DEL ARNr Y GEN <i>RECA</i>.	50
7.2 IDENTIFICACIÓN DE CEPA POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	53
7.4 ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE <i>L. PARAPLANTARUM</i>.	55
7.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.	56
7.6 PERFIL PROTEICO PARA COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS TIPO BACTERIOCINAS Y ZIMOGRAMA CONTRA <i>M. LYSODEIKTICUS</i>.	57
7.6.1 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE BAJO PESO MOLECULAR POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	59
7.7 PERFIL PROTEICO PARA COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS TIPO PGHS Y ZIMOGRAMA CONTRA <i>M. LYSODEIKTICUS</i>.	61
7.7.1 ACTIVIDAD DE <i>N</i> -ACETILMURAMIDASA.	63
7.7.2 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE ALTO PESO MOLECULAR POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	64
7.8 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y CARBONO EN EL CRECIMIENTO DE <i>L. PARAPLANTARUM</i>.	65
7.9 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y CARBONO EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>L. PARAPLANTARUM</i>.	70
7.10 EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO Y CARBONO EN EL PH DE <i>L. PARAPLANTARUM</i>.	72

RESUMEN DE RESULTADOS	76
8. CONCLUSIONES.	77
11. PERSPECTIVAS	78
12. BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXO A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES, GELES Y MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS.	93
ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.	96

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS Y SUS MICROORGANISMOS PRODUCTORES (CHEN Y HOOVER, 2003; DRIDER <i>ET AL.</i> , 2006; BALCIUNAS <i>ET AL.</i> , 2013).	19
TABLA 2. CEBADORES UNIVERSALES PARA AMPLIFICAR EL GEN <i>16S ARNR</i> .	34
TABLA 3. COMPONENTES DE LA REACCIÓN DE PCR.	35
TABLA 4. CONDICIONES DE PCR.	35
TABLA 5. CEBADORES PARA AMPLIFICACIÓN EL GEN <i>RECA</i> .	36
TABLA 6. COMPONENTES DE LA REACCIÓN DE PCR.	37
TABLA 7. CONDICIONES DE PCR.	38
TABLA 8. MICROORGANISMOS UTILIZADOS PARA LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA.	40
TABLA 9. CONCENTRACIÓN DE CARBONO Y NITRÓGENO APORTADAS POR CADA MEDIO DE CULTIVO (CGB).	47
TABLA 10. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS CONTRA <i>L. INNOCUA</i> .	57
TABLA 11. VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO Y CRECIMIENTO MÁXIMO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CARBONO Y NITRÓGENO EN MEDIO CGB.	68
TABLA 12. RESUMEN DE LAS COMPARACIONES DE MEDIAS POR DUNCAN DEL CRECIMIENTO DE <i>L. PARAPLANATRUM</i> .	69
TABLA 13. RESUMEN DE LAS COMPARACIONES DE MEDIAS POR DUNCAN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>L. PARAPLANATRUM</i> .	72
TABLA 14. RESUMEN DE LAS COMPARACIONES DE MEDIAS POR DUNCAN DE LA VARIACIÓN EN EL PH DURANTE EL CRECIMIENTO DE <i>L. PARAPLANATRUM</i> .	75
TABLA 15. SOLUCIONES CONCENTRADAS PARA TRIS-TRICINA-SDS-PAGE.	93
TABLA 16. COMPOSICIÓN DE LOS GELES PARA TRIS-TRICINA-SDS-PAGE AL 16%.	93
TABLA 17. SOLUCIONES CONCENTRADAS PARA TRIS-GLICINA-SDS-PAGE.	94
TABLA 18. COMPOSICIÓN DE LOS GELES PARA TRIS-GLICINA-SDS-PAGE AL 10%.	94
TABLA 19. RESUMEN DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS VARIABLES ANALIZADAS.	96

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. CURVA DE CRECIMIENTO. EL RECUENTO DE VIABLES MIDE LAS CÉLULAS QUE SON CAPACES DE DIVIDIRSE EN EL CULTIVO. LA DENSIDAD ÓPTICA (TURBIDEZ) ES UNA MEDIDA CUANTITATIVA DE LA DISPERSIÓN DE LA LUZ EN UN CULTIVO LÍQUIDO E INCREMENTA CUANDO AUMENTA EL NÚMERO DE CÉLULAS (MADIGAN <i>ET AL.</i> , 2009)	14
FIGURA 2. MODO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS (ADAPTADO DE COTTER <i>ET AL.</i> , 2005).	21
FIGURA 3. ESQUEMA GENERAL DE LAS AGRUPACIONES GÉNICAS QUE CODIFICAN BACTERIOCINAS DE LA CLASE II. GEN ESTRUCTURAL EN NEGRO, GEN TRANSPORTADOR EN GRIS, GEN DE INMUNIDAD RAYADO Y OTROS GENES EN BLANCO (ADAPTADO DE ALVAREZ-SIEIRO <i>ET AL.</i> , 2016).	22
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DEL PEPTIDOGLICANO. ESTE ES EL TIPO DE ESTRUCTURA QUE SE ENCUENTRA EN <i>L. LACTIS</i> Y NUMEROSOS LACTOBACILOS. EN OTRAS ESPECIES DE <i>BAL</i> , LA NATURALEZA DEL PUENTE CRUZADO INTERPÉPTIDO (REPRESENTADO COMO D-ASP / D-ASN EN LA FIGURA) PUEDE VARIAR, EL TERCER DIAMINOÁCIDO (L-LYS) PUEDE REEMPLAZARSE POR MDAP O L-ORNITINA, Y EL D-ALA EN LA POSICIÓN CINCO DEL PÉPTIDO DEL TALLO PUEDE SER REEMPLAZADO POR D-LACTATO. LAS POSIBLES MODIFICACIONES DE LA ESTRUCTURA DE PG, COMO LA O-ACETILACIÓN (O-AC), LA N-DESACETILACIÓN (QUE CONDUCE A GLCNH ₂) O LA AMIDACIÓN (NH ₂), SE INDICAN EN ROJO. LOS SITIOS DE ESCISIÓN DE LAS DIFERENTES CLASES DE HIDROLASAS PGH SE INDICAN CON FLECHAS. (ADAPTADO DE CHAPOT-CHARTIER Y KULAKAUSKAS, 2014).	23
FIGURA 5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO. ES-B, EXTRACTO SEMI PURIFICADO DE BACTERIOCINA, ES-PGH, EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE PGH.	32
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN GENERAL EN CAJA PETRI CON AGAR PARA PRUEBA ANTAGÓNICA DE <i>L. PARAPLANTARUM</i> .	39
FIGURA 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 0.8%. MARCADOR: GENERULE 1KB ADN (THERMO SCIENTIFIC). CARRIL 1: ADN EXTRAÍDO DE LA CEPA AISLADA DEL SALAMI. CARRIL 2: PRODUCTO DE PCR DEL GEN 16S ARNR CON ADN DE LA CEPA AISLADA DEL SALAMI. CARRIL 3: PRODUCTO PURIFICADO DE PCR DEL GEN 16S ARNR DE LA CEPA AISLADA DEL SALAMI.	50
FIGURA 8. RESULTADOS DE BLAST EN LA BASE DE DATOS NCBI DEL 16S ARNR DE CEPA AISLADA DE SALAMI.	51
FIGURA 9. PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN POR PCR OBTENIDOS A PARTIR DEL ENSAYO MÚLTIPLE RECA EN GEL DE AGAROSA AL 1.2%. MARCADOR: DE 100 PB ADN (PROMEGA). CARRIL 1: PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN CON CEBADOR DIRECTO PARAF DE LA CEPA AISLADA DE SALAMI (<i>L. PARAPLANTARUM</i>). CARRIL 2: AMPLIFICACIÓN CON CEBADOR DIRECTO PLANF. CARRIL 3: AMPLIFICACIÓN CON CEBADOR DIRECTO PENTF. CARRIL 4: PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN CON CEBADOR DIRECTO PLANF DEL CONTROL POSITIVO (<i>L. PLANTARUM</i>).	52
FIGURA 10. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS ESPECTROS DE MASAS MALDI-TOF DE <i>LACTOBACILLUS PARAPLANTARUM</i> .	53
FIGURA 11. SIGNIFICADO DEL VALOR DE PUNTUACIÓN MALDI-TOF MS.	54
FIGURA 12. ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE <i>L. PARAPLANTARUM</i> EN AGAR TSB CONTRA MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN ALIMENTOS. 1, <i>LISTERIA INNOCUA</i> . 2, <i>WEISSELLA VIRIDESCENS</i> . 3, <i>SALMONELLA SPP</i> . 4, <i>LEUCONOSTOC SPP</i> . 5, <i>ESCHERICHIA COLI</i> . 6, <i>LACTOBACILLUS SAKEI</i> . 7, <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> . 8, <i>BROCHOTHRIX THERMOSPACTA</i> . 9, <i>PSEUDOMONAS FLOURESCENS</i> .	55
FIGURA 13. GEL DE POLIACRILAMIDA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE BAJO PESO MOLECULAR. MARCADOR: DE AMPLIO ESPECTRO (BIO-RAD). CARRIL 1, TRIS-TRICINA AL 16%. CARRIL 2, ZIMOGRAMA CON <i>M. LYSODEIKTICUS</i> EN TRIS-TRICINA AL 16%. CARRIL 1 Y 2, EXTRACTO SEMI PURIFICADO DE BACTERIOCINA (ES-B) DE LA CEPA <i>L. PARAPLANTARUM</i> .	58

FIGURA 14. RESULTADO GENERAL DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN EL ANÁLISIS MEDIANTE EL SOFTWARE DE SCAFFOLD 3. _____	61
FIGURA 15. GEL DE POLIACRILAMIDA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE ALTO PESO MOLECULAR. MARCADOR: PRECISION PLUS PROTEINTM DUAL COLOR STANDARS (BIO-RAD). CARRIL 1, TRIS-GLICINA AL 10%. CARRIL 2, ZIMOGRAMA CON <i>M. LYSODEIKTICUS</i> EN TRIS-GLICINA AL 10%. CARRIL 1 Y 2, EXTRACTO SEMI PURIFICADO Y CONCENTRADO DE PGH (ES-PGH) DE LA CEPA <i>L. PARAPLANTARUM</i> . _____	62
FIGURA 16. RESULTADO DE LA PRUEBA DE <i>N-ACETILMURAMIDASA</i> . A, EXTRACTO SEMI PURIFICADO PGH DE <i>LACTOBACILLUS PARAPLANTARUM</i> . B, CONTROL NEGATIVO. C, CONTROL POSITIVO (LISOZIMA). _____	63
FIGURA 17. RESULTADO GENERAL DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN EL ANÁLISIS MEDIANTE LC-MS/MS POR ELECTROSPRAY. _____	64
FIGURA 18. CRECIMIENTO DE <i>L. PARAPLANTARUM</i> EN MEDIO CGB BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CARBONO Y NITRÓGENO: C1, BAJA CONCENTRACIÓN DE CARBONO; C2, CONTROL CONCENTRACIÓN DE CARBONO; C3, ALTA CONCENTRACIÓN DE CARBONO; N1, BAJA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO; N2, CONTROL CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y N3, ALTA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO. _____	67
FIGURA 19. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>L. PARAPLANTARUM</i> EN MEDIO CGB BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CARBONO Y NITRÓGENO: C1, BAJA CONCENTRACIÓN DE CARBONO; C2, CONTROL CONCENTRACIÓN DE CARBONO; C3, ALTA CONCENTRACIÓN DE CARBONO; N1, BAJA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO; N2, CONTROL CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y N3, ALTA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO. _____	71
FIGURA 20. VARIACIÓN EN EL PH EN CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE <i>L. PARAPLANTARUM</i> EN MEDIO CGB BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CARBONO Y NITRÓGENO: C1, BAJA CONCENTRACIÓN DE CARBONO; C2, CONTROL CONCENTRACIÓN DE CARBONO; C3, ALTA CONCENTRACIÓN DE CARBONO; N1, BAJA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO; N2, CONTROL CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y N3, ALTA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO. _____	74
FIGURA 21. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO Y RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS. ES-B, EXTRACTO SEMI PURIFICADO DE BACTERIOCINA, ES-PGH, EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE PGH. _____	76

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden producir compuestos de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana como bacteriocinas, peptidoglucano hidrolasas (PGHs) y recientemente identificadas, algunas proteínas ribosomales. Dentro de los géneros de BAL productoras de compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica se han reportado *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*. En el grupo de trabajo dirigido por la Dra. Edith Ponce Alquicira (UAM-Iztapalapa) se aisló una cepa de un producto cárnico (salami) con actividad antimicrobiana; por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si la actividad antimicrobiana presente en el extracto celular se debe a compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica, así como evaluar el efecto de la concentración de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo en la actividad antimicrobiana.

La cepa de estudio fue identificada como *Lactobacillus paraplantarum* mediante amplificación del gen de referencia 16S ARNr y del gen *recA*; además del perfil proteico obtenido por espectrometría de masas (MALDI-TOF-Biotyper). Se determinó la actividad antimicrobiana del extracto crudo producido por esta cepa, así como de los extractos de bacteriocinas y PGHs mediante la prueba de difusión en agar. Se observó la actividad antimicrobiana de las proteínas mediante el empleo de zimogramas contra *Micrococcus lysodeikticus*; las bandas correspondientes a la actividad antimicrobiana fueron identificadas por espectrometría de masas. Posteriormente, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la cinética de crecimiento, pH y la actividad antimicrobiana. Además, se determinó la actividad antagónica de *L. paraplantarum* frente a microorganismos de interés en los alimentos. Finalmente se identificó la naturaleza de la actividad antimicrobiana del extracto de PGH mediante el método de especificidad de sustrato.

En la identificación del gen 16S ARNr completo, el porcentaje de similitud de la cepa con respecto a una secuencia del BLAST-n fue del 92% para *L. plantarum* y *L. paraplantarum*, por lo que se realizó la amplificación del gen *recA* para la diferenciación de estas dos especies; siendo positivo para *L. paraplantarum* con un amplicón de 107 pb. La identificación por género y especie se corroboró por espectrometría de masas con un nivel de fiabilidad de 2.16 generado mediante MALDI-TOF Biotyper. Con respecto a la actividad antimicrobiana, los extractos obtenidos de *L. paraplantarum* mostraron actividad antibacteriana contra *Listeria innocua*, con una actividad 2.3 veces mayor en el extracto de PGH con respecto al extracto de la bacteriocina (proteína ribosomal). Por otra parte, *L. paraplantarum* presentó bandas de actividad antibacteriana en 13.1- y 66.6- kDa en geles de poliacrilamida, Tris-Tricina y Tris-Glicina,

respectivamente. Los resultados de la identificación por espectrometría de masas fueron para la proteína de bajo peso molecular, la 50S proteína ribosomal L14 y para la proteína de alto peso molecular, una muraramidasa, el cual se verificó mediante especificidad por sustrato al dar positivo para *N-acetilmuramidasa*. Los resultados obtenidos proporcionan relevancia, debido a la primera visión de actividad antimicrobiana por una proteína ribosomal y una PGH producida por *L. paraplantarum*, demostrando la capacidad de la cepa en producir nuevos compuestos antimicrobianos. Por lo que se sugiere su investigación para uso en la industria alimentaria como bioconservadores y en la industria farmacéutica como reemplazo a los antibióticos.

En cuanto al efecto de las diferentes concentraciones carbono y nitrógeno en el medio de cultivo, se obtuvo un mayor crecimiento y actividad antimicrobiana en *L. paraplantarum* al incrementar 2.1 veces la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. Por último *L. paraplantarum* presentó actividad antagónica contra microorganismos de interés en alimentos como *L. innocua*, *Weissella viridescens*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (BAL) can produce antimicrobial protein compounds like bacteriocins, peptidoglycan hydrolases (PGHs) and recently, some ribosomal proteins have been identified. Among the BAL genera that produce antimicrobial protein compounds are *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* and *Lactobacillus*. In the working group led by PhD Edith Ponce Alquicira (UAM-Iztapalapa) a strain of a meat product (salami) with antimicrobial activity was isolated. Therefore, the aim of this work was to determine if the antimicrobial activity present in the cell-free extract (supernatant) is due to antibacterial protein compounds, as well as to evaluate the effect of carbon and nitrogen concentration in the culture medium on antimicrobial activity.

The amplification of the 16S rRNA gene reference gene and the *recA* gene; in addition to the protein profile obtained by mass spectrometry (MALDI-TOF-Biotyper), they were used to identify the strain. Once the strain was identified as *Lactobacillus paraplantarum*, the antimicrobial activity of the cell-free extract (supernatant) produced by the strain was determined, as well as the bacteriocin and PGH extracts by agar diffusion test. Proteins with antimicrobial activity were identified using zymograms against *Micrococcus lysodeiktitikus* and polyacrylamide gels (SDS-PAGE), where bands corresponding to antimicrobial activity were sent to be identified by mass spectrometry. Subsequently, the effect of different carbon and nitrogen concentrations in the culture medium on growth kinetics, pH and antimicrobial activity. In addition, the antagonistic activity of *L. paraplantarum* was determined against microorganisms of interest in food. Finally, the nature of the antimicrobial activity of PGH extract was identified by the method of substrate specificity.

In the identification of the complete 16S rRNA gene, the percentage of similarity of the strain with respect to a BLAST-n sequence was 92% for *L. plantarum* and *L. paraplantarum*, so amplification of the *recA* gene was performed for differentiation of these two species; being positive for *L. paraplantarum* with an amplicon of 107 bp. The identification by genus and species was corroborated by mass spectrometry with a 2.16 score generated by MALDI-TOF Biotyper. With regard to antimicrobial activity, extracts obtained from *L. paraplantarum* showed antimicrobial activity against *Listeria innocua*, with an activity 2.3 times higher in PGH extract with regard to the extract of the bacteriocin (ribosomal protein). On the other hand, *L. paraplantarum* presented bands of antimicrobial activity in 13.1- and 66.6- kDa in polyacrylamide gels, Tris-Tricine and

Tris-Glycine, respectively, obtained as a result of mass spectrometry identification for the low protein molecular weight to the 50S ribosomal protein L14 and for the high molecular weight protein, a muramidase, which was verified by substrate specificity by testing positive for *N-acetylmuramidase*. These results provide relevance, due to the first vision of antimicrobial activity by a ribosomal protein and a PGH produced by *L. paraplantarum*; demonstrating the strain's ability to produce new antimicrobial compounds. Therefore, its research is suggested for use in the food industry as bioconservatives and in the pharmaceutical industry as a replacement for antibiotics.

Regarding the effect of different carbon and nitrogen concentrations on the culture medium, greater growth and antimicrobial activity in *L. paraplantarum* was obtained by increasing 2.1 times the concentration of nitrogen in the culture medium. Finally, *L. paraplantarum* presented antagonistic activity against microorganisms of interest in foods such as *L. innocua*, *Weissella viridescens*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Bacterias ácido lácticas.

El término de bacterias ácido lácticas (BAL) fue definido en 1919 por Orla-Jensen a partir de sus observaciones de las bacterias causantes de la fermentación y coagulación de la leche, siendo definidas como “*aquellas que forman un grupo natural de cocos y bacilos Gram-positivos, inmóviles, no esporulados que fermentan azúcares produciendo ácido láctico*” (Blanco *et al.*, 2006).

Hoy en día son utilizadas algunas BAL como probióticos, así como en la industria farmacéutica y alimentaria, siendo empleadas en esta última como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos tales como yogur, leche, mantequilla, quesos madurados; col agria, embutidos (salami y chorizo) y bebidas alcohólicas como la cerveza y sidra, entre otros, produciendo cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los mismos (Smith *et al.*, 2017; Bintsis, 2018; Vieco-Saiz *et al.*, 2019).

1.1.1 Generalidades de las BAL.

Las bacterias lácticas comprenden un amplio grupo de cocos, cocobacilos o bacilos Gram-positivos; catalasa y oxidasa negativas, anaerobios o aerobios facultativos, no esporulados y cuyo producto principal de la fermentación de carbohidratos es el ácido láctico (Madigan *et al.*, 2009).

Las BAL pertenecen al phylum bacteriano Gram-positivo Firmicutes con bajo contenido de G+C ($\leq 55\%$) en el ADN. Basado en el análisis de secuencia del gen 16S ARNr, *Firmicutes* se distinguen del otro phylum Gram-positivo, *Actinobacteria*, con un alto ($\geq 55\%$) contenido G+C (guanina y citosina) en su ADN (Holzapfel y Wood, 2014).

Las BAL han sido utilizadas consciente e inconscientemente desde hace siglos en procesos de elaboración de alimentos sin causar daños a los consumidores, por lo que la mayoría de las BAL no representan un riesgo para los seres humanos, debido a que están presentes en alimentos y su contribución como microbiota de las superficies mucosas humanas y animal (Madigan *et al.*, 2009). La mayoría de las BAL poseen el estatus de Generally Recognised As Safe (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos y de QPS (Qualified Presumption of Safety) por la Unión Europea. Sin embargo, el resto de BAL que no poseen el estatus GRAS, corresponden a las BAL patógenas, particularmente las que pertenecen a las

especies de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (Peterbauer *et al.*, 2011; Papadimitriou *et al.*, 2016).

1.1.2 Las BAL en la industria.

Las BAL son un grupo de microorganismos importantes en la producción de los alimentos. Diferentes países y regiones tienen sus propias tradiciones con respecto a la fermentación ácido láctica de sus alimentos; otorgándole características sensoriales deseables y únicas. Lo anterior, debido a que las BAL participan en la hidrólisis de proteínas, contribuyendo a la textura y sabor final de diferentes alimentos fermentados debido a que sintetizan compuestos que dan sabor y aroma, como ácidos orgánicos, acetaldehído, diacetilo, acetona, etc.; y la textura del producto con la producción de algunos agentes texturizantes, como exopolisacáridos (Salminen *et al.*, 2004; Tian, 2019).

Otro aspecto de las BAL es la producción de compuestos antimicrobianos como productos finales de su metabolismo, tales como ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno, péptidos antimicrobianos (AMP) o proteínas antimicrobianas y ácidos orgánicos, este último provoca un descenso en el pH, ocasionando daños en la membrana plasmática de la microbiota acompañante (Willey *et al.*, 2009). En cuanto a los AMP, se encuentran las bacteriocinas, estas son aplicadas en la industria alimentaria como conservadores al mejorar significativamente la preservación y seguridad de los alimentos, extendiendo su vida útil. Las bacteriocinas también son utilizadas en la industria farmacéutica como reemplazo de antibióticos en aves y otros animales mediante su suministro en forma encapsulada, disminuyendo al menos un millón de veces la población de *Campylobacter jejuni*, un microorganismo patógeno que se encuentra en el tracto intestinal de animales y es transmitido a humanos al ingerir (vía oral) carne o aves de corral crudas o sin la cocción adecuada, provocando campilobacteriosis (Yang *et al.*, 2014). Además de las bacteriocinas, las peptidoglucano hidrolasas (PGH) son otras proteínas antimicrobianas utilizadas en la industria alimentaria y farmacéutica. Su principal uso en la industria alimentaria es como compuesto antimicrobiano en pescado, carne, lácteos, frutas, verduras y vinos, siendo la lisozima el mejor ejemplo de PGH. Asimismo, las PGH son utilizadas en la producción de cosméticos y fármacos, como pomadas y cremas para la piel (Shrivastava *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019).

1.1.3 Metabolismo de las BAL.

El metabolismo de azúcares de las BAL se lleva a cabo por dos vías, la homoláctica y heteroláctica. La mayoría de las BAL obtienen su energía a partir del metabolismo de azúcares

y presentan un metabolismo biosintético (síntesis de proteínas a partir de fuente de carbono) limitado, por lo que requieren de medios de cultivos ricos en aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Marilley y Casey, 2004).

- Homolácticas.

La glucólisis (Vía de Embden Meyerhoff-Prans) resulta casi exclusivamente en la producción de ácido láctico como producto final de la fermentación de la hexosa y es nombrada como fermentación homoláctica o también llamado homofermentativo. Esta fermentación convierte un mol de glucosa en dos moles de ácido láctico (Almanza y Barrera, 1991). Especies de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, así como ***Lactobacillus*** son bacterias que llevan a cabo este metabolismo (Marilley y Casey, 2004).

- Heterolácticas.

Estas bacterias producen menor cantidad de ácido láctico en comparación a las homolácticas. Durante la fermentación, se obtiene a partir de un mol de glucosa produce un mol de ácido láctico, un mol de etanol y un mol de CO₂, o bien, a partir de hexosa monofosfato o la vía de las pentosas. Como ejemplo de este metabolismo, se encuentran los géneros *Lactococcus*, ***Lactobacillus***, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Gänzle, 2015).

1.2 Género *Lactobacillus*.

El phylum *Firmicutes*, al cual pertenecen las BAL se divide en tres clases: la clase I (Bacilos), la clase II (Clostridia) y la clase III (Erysipelotrichia). Dentro de la clase I se encuentran el orden I correspondiente a Bacillales y el orden II, *Lactobacillales*; en este último orden se encuentra el género *Lactobacillus*, dentro de éste género se encuentran las especies *plantarum*, *pentosus* y ***paraplantarum*** (Felis y Delagio, 2007; Drissi *et al.*, 2017).

1.2.1 Generalidades del género *Lactobacillus*.

El género *Lactobacillus* es el más abundante de las BAL (da Silva Sabo *et al.*, 2014); pertenece al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Lactobacillaceae*. Los miembros del género *Lactobacillus* son bacilos cortos y gruesos o largos y delgados Gram positivas, no formadoras de esporas, no móviles, anaerobios facultativos, tolerantes a las condiciones ácidas y catalasa negativos. Así mismo, se caracterizan por tener un bajo contenido de G C (33 a 52%) en el genoma. El género *Lactobacillus* lleva a cabo la fermentación de carbohidratos, siendo el ácido láctico el principal producto final de este metabolismo; no obstante también producen ácido acético y succínico pero en pequeñas cantidades (Goldstein *et al.*, 2015; Mesquita *et al.*, 2017). Según Bottazzi (1988), los distintos lactobacilos podrían

distinguirse por sus diferencias morfológicas, por ejemplo, los lactobacilos mesófilos son bacilos cortos, gruesos, regulares y unidos, formando filamentos (estreptobacilos). Mientras las especies termófilas son bacilos largos y rectos, de células separadas, en parejas o en empalizados. En las especies heterofermentativas obligadas, la morfología típica es la de bacilos cortos, rectos y separados.

Este grupo de microorganismos se encuentra en diferentes ambientes, tales como plantas, cavidad oral, piel y mucosa gastrointestinal en mamíferos, bebidas y alimentos, como el vino, leche, carne, cereales y productos lácteos, principalmente yogures y quesos (Mesquita *et al.*, 2017). Los lactobacilos tienden a crecer en una variedad de medios, como por ejemplo agar sangre (Summanen y Jobaron, 1993), Caldo Caseína-Glucosa (CGB) y principalmente, el agar de Man Rogose y Sharpe (MRS). Este último es utilizado para el aislamiento de *Lactobacillus*, debido a la selectividad que presenta al bajar el pH a 5.7 y por la presencia de ácido ascórbico en el medio. El aislamiento de colonias del género *Lactobacillus* en agar MRS producen colonias blancas generalmente mucoides, en consecuencia a la producción de exopolisacáridos, principal componente de la biopelícula bacteriana (Corry *et al.*, 2003; Monika *et al.*, 2017)

1.2.2 Necesidades nutritivas.

El género *Lactobacillus*, al igual que el resto de las bacterias lácticas, tiene requerimientos nutricionales complejos ya que además de necesitar una fuente de energía y de carbono (hidratos de carbono), requieren de nucleótidos, aminoácidos y vitaminas. Todas las especies del género requieren ácido pantoténico y nicotínico, mientras que la tiamina sólo es necesaria para el desarrollo de los lactobacilos heterofermentativos. Las necesidades de vitaminas son variables dependiendo de la especie, la mayoría necesita riboflavina y muy pocas, biotina o vitamina B2. Estos complejos requerimientos nutritivos de los lactobacilos actuales reflejan la selección natural de mutantes en determinadas rutas biosintéticas, lo que les permite crecer más rápidamente que las cepas originarias en medios de cultivo con muchos nutrientes (De Angelis y Gobbetti, 2016; Morishita *et. al.*, 1974).

1.2.3 Factores que influyen en el crecimiento de *Lactobacillus*.

Existen diversos factores que influyen en el crecimiento de la mayor parte de las especies del género *Lactobacillus*. Debido a que éste género de microorganismos son organismos extremadamente fastidiosos, es decir, no sólo se requiere de carbohidratos como fuente de energía, sino también se requieren nucleótidos, es por lo anterior que el medio de cultivo en

donde crecen se considera como un principal factor que influye en el crecimiento de estos. Como se mencionó anteriormente, los medios empleados para el crecimiento de los lactobacilos deben cubrir sus necesidades nutritivas y estar constituidos por hidratos de carbono fermentables, extractos de carne, peptonas y extracto de levadura. Los medios de cultivo con compuesto como el jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres de ácido oleico y especialmente Tween 20, se han reportado como compuestos que favorecen el crecimiento de estos microorganismos. Por otra parte, los compuestos mencionados anteriormente, a excepción del jugo de tomate, forman parte del medio de cultivo MRS que es sin duda es el más utilizado para el crecimiento de los lactobacilos. Así mismo se ha observado que las especies de lactobacilos también tienden a crecer bien en agar sangre y en CGB (De Man *et al.*, 1960; Summanen y Jobaron, 1993; de Vos *et al.*, 2009).

En relación al medio CGB, es un medio que también ha sido utilizado para el crecimiento de BAL, como por ejemplo en *L. paraplantarum*. La mayoría de los componentes y concentraciones del medio CGB son similares a los del medio de cultivo MRS. Las diferencias entre estos medios radican en la presencia de acetato de amonio en el medio MRS y en la concentración de glucosa, teniendo la mitad de concentración de glucosa el medio CGB con respecto al MRS (Bhunja *et al.*, 1988; Hoover y Harlander 1993).

El pH, es otro factor elemental en el crecimiento y comportamiento de *Lactobacillus*, debido a que su crecimiento es mejor en medios ligeramente ácidos entre 6.4 y 5.4. El crecimiento se detiene cuando se alcanza un pH entre 3.6 y 4.0, dependiendo de la especie y cepa. Generalmente estas bacterias lácticas pueden crecer en un amplio rango de pH, aún si se encuentran en valores lejanos a su pH óptimo, aunque sí hay variaciones dramáticas o sobrepasan sus límites de tolerancia, se puede ocasionar daños en las bacterias como alteraciones en la membrana plasmática, inhibición de la actividad enzimática o alterar la ionización de sustratos, por lo que se vería reducida su disponibilidad para las bacterias (de Vos *et al.*, 2009; Willey *et al.*, 2009).

Por otro lado, la temperatura es un factor de suma importancia en el crecimiento de los microorganismos, debido a que estos suelen ser muy susceptibles en los cambios de su temperatura óptima. Uno de los mayores efectos de la temperatura está en las propiedades catalíticas de las enzimas, las cuales poseen un punto óptimo de temperatura para su llevar a cabo su máxima actividad enzimática. Por debajo de este punto óptimo, pierden su velocidad de catálisis, mientras que a temperaturas superiores, se suelen desnaturalizar al igual que los transportadores y demás proteínas. Incluso, la temperatura puede causar daños en la

membrana celular, solidificándose a bajas temperaturas por la elevada concentración de lípidos o bien, se puede desintegrar a elevadas temperaturas. La mayoría de los lactobacilos crecen a temperaturas óptimas de 30 a 40°C, con un límite superior alrededor de 53°C. Algunos lactobacilos también crecen por debajo de 15°C y algunas cepas incluso por debajo de 5°C (de Vos *et al.*, 2009; Willey *et al.*, 2009).

Por último, pero no menos importantes, existen otros factores que influyen en el crecimiento de *Lactobacillus*, la actividad del agua y la aireación. En cuanto a la actividad del agua, los microorganismos al estar constituidos generalmente por valores del 70 al 80% de agua, pueden sufrir efectos hipertónicos o hipotónicos, generando en ambos casos la muerte del microorganismo. Por otro lado, el efecto de la aireación se debe a la incapacidad de las bacterias lácticas por sintetizar catalasas, por lo que sus necesidades de oxígeno son pequeñas o nulas, teniendo un crecimiento óptimo en condiciones microaerófilas o anaeróbicas. Dado que el oxígeno presente en el medio se reduce parcialmente a peróxido, este representa un riesgo para las bacterias lácticas, al ser un compuesto tóxico y por consiguiente, tiene un efecto inhibitorio hacia las bacterias por su toxicidad (Bamforth, 2005; de Vos *et al.*, 2009; Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

1.2.3.1 Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y metabolismo microbiano.

El crecimiento bacteriano se define como un aumento en el número de células microbianas de una población. En un cultivo en lote, graficando el logaritmo de células en función del tiempo, presenta una curva de crecimiento que, como se observa en la Figura 1, se divide en fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase muerte (Madigan y Martinko, 2006).

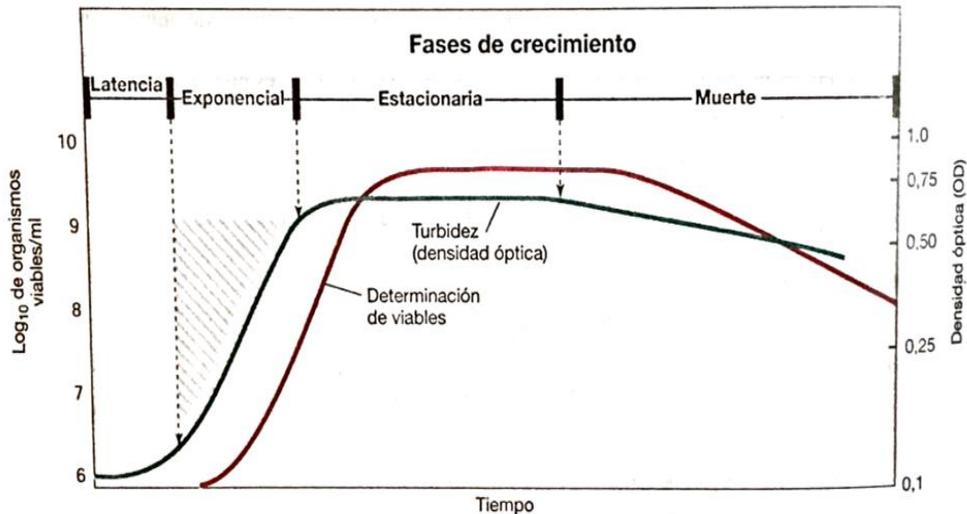


Figura 1. Curva de crecimiento. El recuento de viables mide las células que son capaces de dividirse en el cultivo. La densidad óptica (turbidez) es una medida cuantitativa de la dispersión de la luz en un cultivo líquido e incrementa cuando aumenta el número de células (Madigan *et al.*, 2009)

La fase de adecuación o de latencia se refiere al periodo de adaptación de los microorganismos a nuevas condiciones nutricionales y ambientales. Se presenta inmediatamente después de la inoculación de la célula bacteriano a un medio fresco, esta fase puede ser breve o larga dependiendo del estado fisiológico de la célula inoculada y de las condiciones ambientales. Si un cultivo que proveniente de una fase exponencial se inocula en un medio fresco y en las mismas condiciones de cultivo, no se observa una fase de adecuación y el crecimiento se inicia inmediatamente. Sin embargo, cuando se transfiere una población de un medio rico en nutrientes a otro con menor contenido de éstos, se presentará una fase de adecuación. Cuando se realizan mediciones del número de células en distintos tiempos dentro de esta fase, el valor no cambia significativamente. En cambio, interiormente las células se encuentran adaptando y preparando para hacer uso de los nutrientes que el medio le aporta, por lo que la masa celular incrementa pero no el número de células. Por lo anterior, la velocidad de crecimiento con respecto al tiempo en esta primera fase es nula.

En la fase exponencial, las células se dividen debido al proceso de fisión binaria y se multiplican a la máxima velocidad. Su crecimiento puede ser cuantificado con base en el número de células que se producen por unidad de tiempo o por el incremento en la biomasa por unidad de tiempo. En esta fase, la velocidad de crecimiento permanece constante e independiente de la concentración de sustrato, siempre y cuando se encuentre en exceso. La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente, pero las velocidades del crecimiento exponencial son muy variables ya que se ven afectadas por las condiciones ambientales y por

las características genéticas del organismo. El crecimiento no se puede prolongar de modo indefinido, ya que generalmente un nutriente esencial del medio de cultivo sea usado por completo y se convierte en un factor limitante, o bien, se empiezan a acumular en el medio productos finales del metabolismo (ácidos orgánicos o alcoholes) e incluso enzimas autolíticas del tipo de las proteasas y de las nucleasas, que actúan como inhibidores del crecimiento (frecuentemente pueden ocurrir ambos eventos).

Durante la fase estacionaria ocurre el crecimiento de algunas células, pero a su vez también ocurre la muerte de otras, por lo que estos procesos se equilibran, de modo que no hay aumento ni disminución en el número de células, fenómeno llamado crecimiento crítico. Por lo que en esta fase, la velocidad de crecimiento del microorganismo es igual a la velocidad de deceso, lo que conlleva a un equilibrio celular y por lo tanto, a una velocidad de crecimiento nula (Madigan y Martinko, 2006).

Si la incubación continúa después de que la población alcanzó la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero también pueden morir. Cuando el número de células que muere es mayor a las metabólicamente activas y cesa el crecimiento celular, la población entra en la fase de muerte, por lo tanto la velocidad de crecimiento es negativa.

El crecimiento celular y la acumulación de productos del metabolismo están fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo, fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales inorgánicas (Contreras, 2013).

El crecimiento se mide en función del incremento de la masa celular según la ecuación:

$$\mu X = \frac{dx}{dt}$$

Donde:

x= concentración celular (UFC/mL).

t=tiempo de incubación (h).

μ = velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

La velocidad específica de crecimiento (μ) es característica para cada tipo de microorganismo y medio de cultivo. Se utiliza para caracterizar el comportamiento de una población en determinadas condiciones de cultivo y depende principalmente de factores internos y externos como la capacidad de crecimiento y del ambiente en que se encuentra el microorganismo, respectivamente (composición del medio de cultivo, pH, temperatura y presencia de inhibidores).

Las bacterias quimioheterótrofas son organismos que llevan a cabo reacciones de oxidación y reducción de fuentes de carbono para obtener energía. Esta energía obtenida de las fuentes de carbono, servirá para la síntesis de componentes celulares (Chan *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2009).

El crecimiento celular y la acumulación de productos del metabolismo están directamente influenciados por la composición del medio de cultivo: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales inorgánicas. Dentro de los nutrientes que más se han investigado por su relación con la producción de compuestos antimicrobianos son la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y la concentración de NaCl (Contreras, 2013).

Algunos autores han reportado que las BAL son propensas a responder a cambios en la disponibilidad de nitrógeno mediante la regulación de sus sistemas proteolíticos para asegurar un equilibrio de nitrógeno apropiado para la célula (Savikoji *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la concentración o ausencia de la fuente de nitrógeno, contribuye al incremento de la producción de compuestos antimicrobianos (Pantev *et al.*, 2002).

Por ejemplo, De Vuyst y colaboradores (1996), determinaron que la producción de bacteriocina por *Lactobacillus amylovorus* muestra un incremento de la actividad durante la fase exponencial del crecimiento. Y también, Alquicira-Paez (2006), determinó que la producción de bacteriocinas por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 está asociada a la fase de crecimiento y se observa que la producción de bacteriocinas cesa al final de la fase exponencial. Esto puede ser atribuido a la adsorción de la bacteriocina en la membrana celular bacteriana o a la degradación de estas por proteasas.

1.3 Generalidades de *Lactobacillus paraplantarum*.

La cepa de *Lactobacillus paraplantarum* fue identificada por Curk y colaboradores (1996) al investigar el polimorfismo de genes de pirimidina entre tres cepas con similitud fenotípica, de las cuales dos habían sido previamente identificadas como *L. plantarum* y *L. pentosus*, quedando una sin identificar. Ellos decidieron nombrar a la nueva especie como *L. paraplantarum*.

Las células de *L. paraplantarum* son bacilos Gram-positivos no móviles que se presentan solas, en pares y en cadenas cortas; catalasa negativas, anaerobias facultativas y heterofermentativas, cuyo producto principal es el ácido láctico. Las colonias cultivadas en agar

MRS tienen una elevación convexa, borde entero, superficie lisa, forma circular y de color crema. Crece en medio MRS a valores de pH entre 5 y 7 y tolera el NaCl hasta una concentración del 8%. El intervalo de temperatura para su crecimiento va desde los 15°C hasta los 37°C, inhibiéndose por completo a 45°C (de Vos *et al.*, 2009; Winkelströter *et al.*, 2015;). En cuanto al genoma, *L. paraplantarum* contiene 3,139.729 pb con un contenido del 43.95% de GC y se han identificado 3,087 genes (Liu *et al.*, 2015 y Liu y Lli, 2016).

1.4 Compuestos con actividad antimicrobiana de las BAL.

Las BAL tienen la capacidad de inhibir microorganismos patógenos y por ende disminuir o retardar el deterioro de los alimentos. Lo anterior descrito en diversos mecanismos como la acidificación y producción de antimicrobianos. La acidificación es producida por un descenso del pH, debido a la producción de ácido láctico, acético y propiónico, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición (*Pseudomonas* spp., enterobacterias, *Alcaligenes* spp., etc) (De Vuyst y Vandame, 1994; López-Arvizu *et al.*, 2019). Este efecto antimicrobiano puede deberse a la disociación molecular de estos ácidos en el medio, lo que produce un aumento en el gradiente de protones y desestabiliza la permeabilidad de la membrana celular o bien a la disociación del ácido en el interior celular, interfiriendo con las funciones celulares de los microorganismos (Konings y Otto, 1983; Baird-Parker, 1980). Los antimicrobianos incluyen a los ácidos láctico, acético y propiónico, sin embargo, también incluyen una compleja gama de metabolitos como el peróxido de hidrógeno, diacetilo, ácidos grasos de cadena corta (antifúngicos), ácido piroglutámico, así como péptidos antimicrobianos conocidos como bacteriocinas y PGH (Salminen *et al.*, 2004; López-Arvizu *et al.*, 2019).

1.4.1 Bacteriocinas.

Jacob en 1953 designó el término de bacteriocinas a las proteínas con actividad antimicrobiana (Chen y Hoover, 2003). Esta definición ha sido modificada, incorporando su origen y propiedades origen, es decir, polipéptidos pequeños producidos por bacterias Gram positivas, generalmente bacterias ácido lácticas e inactivados por enzimas proteolíticas como la tripsina, α -quimotripsina, pepsina, pronasa, proteinasa K, etc. Aunque la sensibilidad a dichas proteasas es variable, siendo esta prueba la que refleja el origen proteico de las bacteriocinas. Estos polipéptidos son termoestables, activos contra otras bacterias (antimicrobianos) y la cepa productora tiene un mecanismo específico de inmunidad (Bogovič-Matijašić *et al.*, 1998, Chen y Hoover, 2003, Cotter *et al.*, 2005). Posteriormente, ese término bacteriocina se redefinió como

“un grupo diverso de péptidos antimicrobianos ribosómicos principalmente activos contra cepas bacterianas sensibles y estrechamente relacionadas por la formación de poros en la membrana citoplasmática que causa la reducción de los competidores microbianos” (López-Arvizu *et al.*, 2019). Algunos autores europeos han propuesto una nomenclatura para las bacteriocinas, la cual se basa en asignar a cada bacteriocina deriva del género o especie de la bacteria productora, agregando “cina”. Por ejemplo, plantaricina 423 de *Lactobacillus plantarum* (Chen y Hoover, 2003).

- Clasificación.

Muchas de las bacteriocinas de las BAL son moléculas catiónicas, hidrofóbicas o anfifílicas, compuestas de 20 a 60 aminoácidos de bajo peso molecular (por lo regular, de menos de 10 kDa), sintetizadas ribosomalmente (Cotter *et al.*, 2005). Estas bacteriocinas son clasificadas comúnmente en 3 grupos de acuerdo con sus características genéticas y bioquímicas (Tabla 1).

A partir de la clasificación de Kleanhammer en 1993, se han propuesto diferentes clasificaciones de bacteriocinas, como es el caso reciente de Alvarez-Sieiro y colaboradores (2016), quienes proponen una clasificación con base la identificación de bacteriocinas mediante análisis *in silico* y a la organización de las bacteriocinas por clusters, es decir, con respecto a la organización y regulación de los grupos de genes responsables de su producción y biosíntesis.

El análisis de un total de 238 genomas de BAL depositados en bases de datos públicas y pertenecientes a los géneros *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Weisella*, dió como resultado una lista de 785 grupos de genes de bacteriocinas, incluidos péptidos modificados postraduccionalmente y producidos ribosómicamente (RiPP) que no se habían identificado previamente en las BAL, además de presentar actividad antimicrobiana por bacterias que no encajan en ninguna de las clasificaciones a pesar de ajustarse a la definición de bacteriocina, resultando la siguiente clasificación (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016):

a) Clase I (RiPP; de bajo peso molecular, menos de 10 kDa): esta clase abarca todos los péptidos que sufren modificaciones postraduccionales, las cuales originan la aparición de aminoácidos modificados durante la biosíntesis. Consisten en un péptido líder que sirve para el

reconocimiento enzimático, el transporte y el mantenimiento del péptido inactivo, que se fusiona con un péptido central (Arnison *et al.*, 2013).

Tabla 1. Clasificación de las bacteriocinas y sus microorganismos productores (Chen y Hoover, 2003; Drider *et al.*, 2006; Balciunas *et al.*, 2013).

Clasificación	Características	Subcategorías	Microorganismo productor	Ejemplos
Clase I o lantibióticos	Lantionina o péptidos que contienen β -lantionina	Tipo A (moléculas lineales, <4 kDa)	<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Staphylococcus gallinarum</i>	Nisina, subtilina, epidermina
		Tipo B (molécula globular, 1.8 a 2.1 kDa)	<i>Bacillus sbtilis</i> , <i>Streptomyces ssp.</i>	Mersacidina
Clase II	Clase heterogénea de pequeños péptidos termoestables, <10 kDa	Subclase IIa (tipo de bacteriocinas antilisteriales-pediocinas)	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Pediocina, enterocina, sakacina
		Subclase IIb (compuesto por dos péptidos)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i>	Plantaricina, lactacina F
		Subclase IIc (otras bacteriocinas)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i>	Lactococina
Clase III	Péptidos termolábiles grandes, >30 kDa	---	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticina J, millericina B.

b) Clase II (de bajo peso molecular, menos de 10 kDa): son bacteriocinas termoestables, no contienen lantionina, sin aminoácidos modificados postraduccionalmente y son sintetizadas sin una secuencia líder o péptido señal. Es el grupo que comprende la mayor cantidad de bacteriocinas. Esta clase se divide a su vez en tres subgrupos:

Clase IIa: péptidos similares a la pediocina y contienen una secuencia de aminoácidos consenso en su extremo amino terminal. Bacteriocinas con potente actividad anti-*Listeria*.

Clase IIb: para llevar a cabo la actividad antimicrobiana, requiere de la acción complementaria de dos péptidos.

Clase IIc: sus péptidos se caracterizan por tener un grupo tiol (-SH) activos que requieren cisteína reducida para activarse.

c) Clase III: son bacteriocinas que no están bien caracterizadas. Sin embargo, se sabe que son termolábiles y no han sido sometidas a modificaciones enzimáticas durante la biosíntesis. Su peso molecular es mayor a los 30 kDa y presentan un mecanismo de acción bacteriolítico o no lítico. La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por el género *Lactobacillus*.

- Clasificación de bacteriocinas según su modo de acción.

Una clasificación propuesta por Cotter y colaboradores (2005), comprende tres clases de bacteriocinas (Figura 2). La clase I incluye a los lantibióticos que contienen residuos de lantionina o β -metil-lantionina. La estructura del lantibiótico, característica estructural importante de las bacteriocinas clase I, puede actuar de dos formas: se pueden enlazar al lípido II, el mayor transportador de subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular, lo que evita la síntesis correcta de la pared, con la consecuente muerte celular; además, pueden usar al lípido II como molécula de acoplamiento para insertarse en la membrana e iniciar la formación de poros, lo que lleva a una muerte rápida.

La clase II, o bacteriocinas que no contienen lantionina, deben su actividad bactericida principalmente a la desestabilización de las funciones de la membrana celular de las células sensibles, más que a la pérdida de la integridad de la membrana o la formación de poros. Dada su naturaleza catiónica, las bacteriocinas interactúan con la carga negativa de la superficie celular, mientras que la región hidrofóbica del péptido induce la permeabilización de la membrana y, consecuentemente, la salida de moléculas del interior de la bacteria (Figura 2). Y en la clase III se encuentran las bacteriolisinas o proteínas líticas, como la lisostafina; su modo de acción es directamente en la pared celular de bacterias Gram-positivas, llevando a cabo la muerte y lisis celular (Cotter *et al.*, 2005).

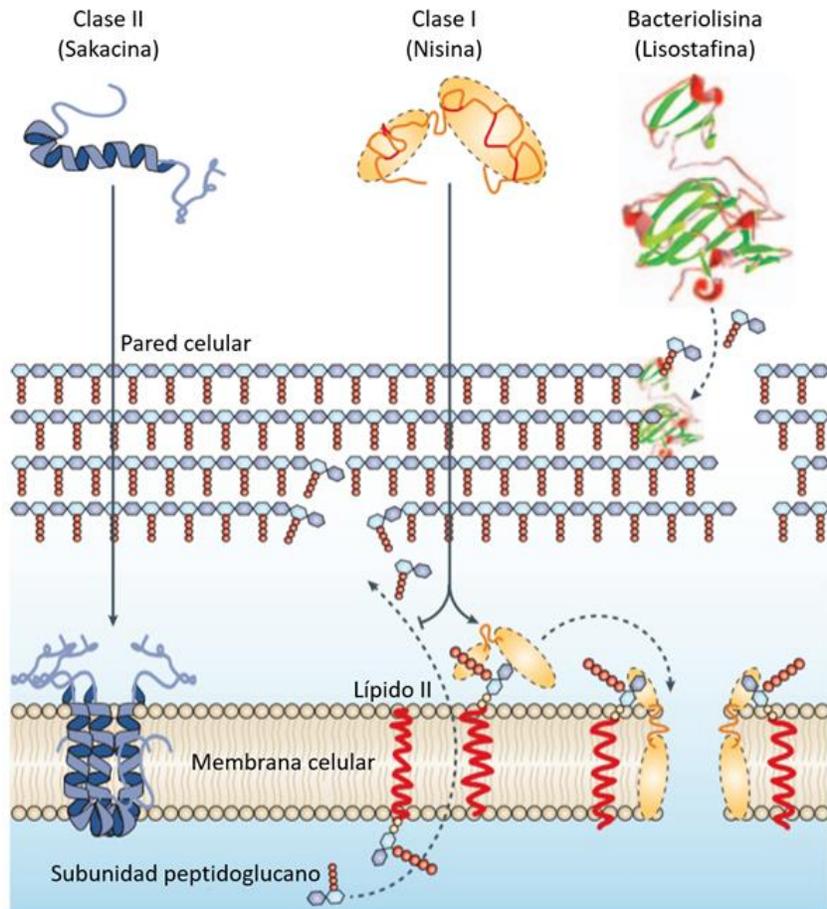


Figura 2. Modo de acción de las bacteriocinas (Adaptado de Cotter *et al.*, 2005).

- Clasificación de bacteriocinas según su organización genética.

Los determinantes genéticos asociados a la síntesis de bacteriocinas forman agrupaciones génicas (*clusters*) compuestas por varios genes agrupados en uno, dos o incluso tres operones. En el caso de las bacteriocinas de la clase IIa presentan agrupaciones génicas que constan de genes que codifican: (i) la prebacteriocina (gen estructural); (ii) la proteína de inmunidad que protege a la célula productora de la toxicidad de la bacteriocina; (iii) el transportador ABC y (iv) la proteína accesoria esencial para la función de estos transportadores (Sablon *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; And y Hoover, 2003; Skaugen *et al.*, 2003; Nes *et al.*, 2014) (Figura 3). Por lo que respecta a su localización, las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de bacteriocinas pueden localizarse en plásmidos, en el cromosoma o incluso en transposones. Cabe mencionar, que la estructura y localización de los genes que codifican bacteriocinas varía según la cepa productora de bacteriocinas.

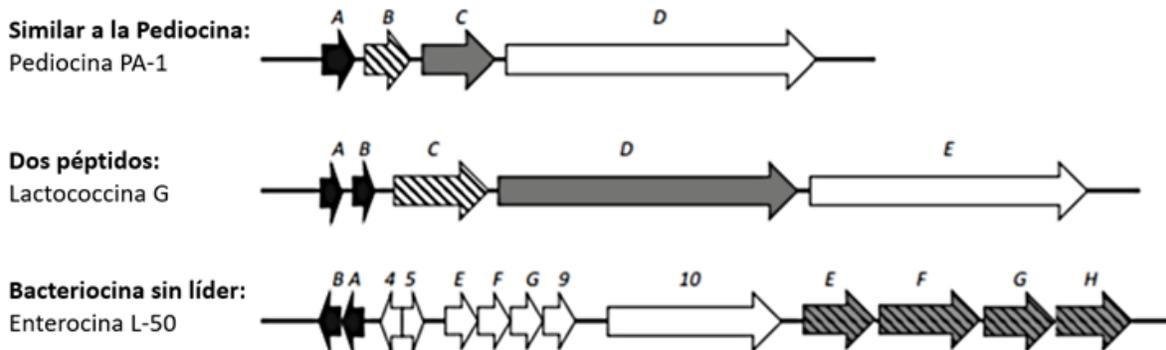


Figura 3. Esquema general de las agrupaciones génicas que codifican bacteriocinas de la clase II. Gen estructural en negro, gen transportador en gris, gen de inmunidad rayado y otros genes en blanco (Adaptado de Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

1.4.2 Peptidoglucano hidrolasas.

Las PGHs son enzimas que tienen pesos moleculares que pueden ir desde los 14 kDa hasta los 137 kDa. Estas enzimas hidrolizan el peptidoglucano, principal componente de la pared celular de bacterias Gram-positivas y -negativas. El peptidoglucano consiste en cadenas de residuos alternados de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) unidos mediante enlaces β -1,4, que se entrecruzan por péptidos cortos formados por L- y D-aminoácidos (Layec *et al.*, 2008; Götz *et al.*, 2014; López-Arvizu *et al.*, 2019).

Las PGHs están involucradas en funciones que requieren la modificación de la red rígida del peptidoglucano como la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células hijas durante la división y la autólisis, que generalmente se induce en condiciones adversas como la falta de nutrientes (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Eckert *et al.*, 2006; Vollmer *et al.*, 2008).

La clasificación de las PGHs se basa en el tipo de enlace que pueden hidrolizar en el peptidoglucano (Figura 4). Las N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasas rompen el enlace amida entre MurNAc y la L-alanina del péptido. Las peptidasas son capaces de hidrolizar el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos (carboxipeptidasas), o de romper completamente los puentes formados por los péptidos (endopeptidasas). Las N-acetilglucosaminidasas y las N-acetilmuramididasas hidrolizan los enlaces β -1,4 de la cadena de glicanos. Las primeras lo hacen dejando un extremo GlcNAc reductor, mientras que las segundas hidrolizan el enlace entre MurNAc y GlcNAc, dejando libre un extremo MurNAc reductor, llamadas lisozimas, o formando un anillo 1,6-anhidro en MurNAc, conocidas como transglicosilasas líticas (Layec *et al.*, 2008; Vollmer *et al.*, 2008).

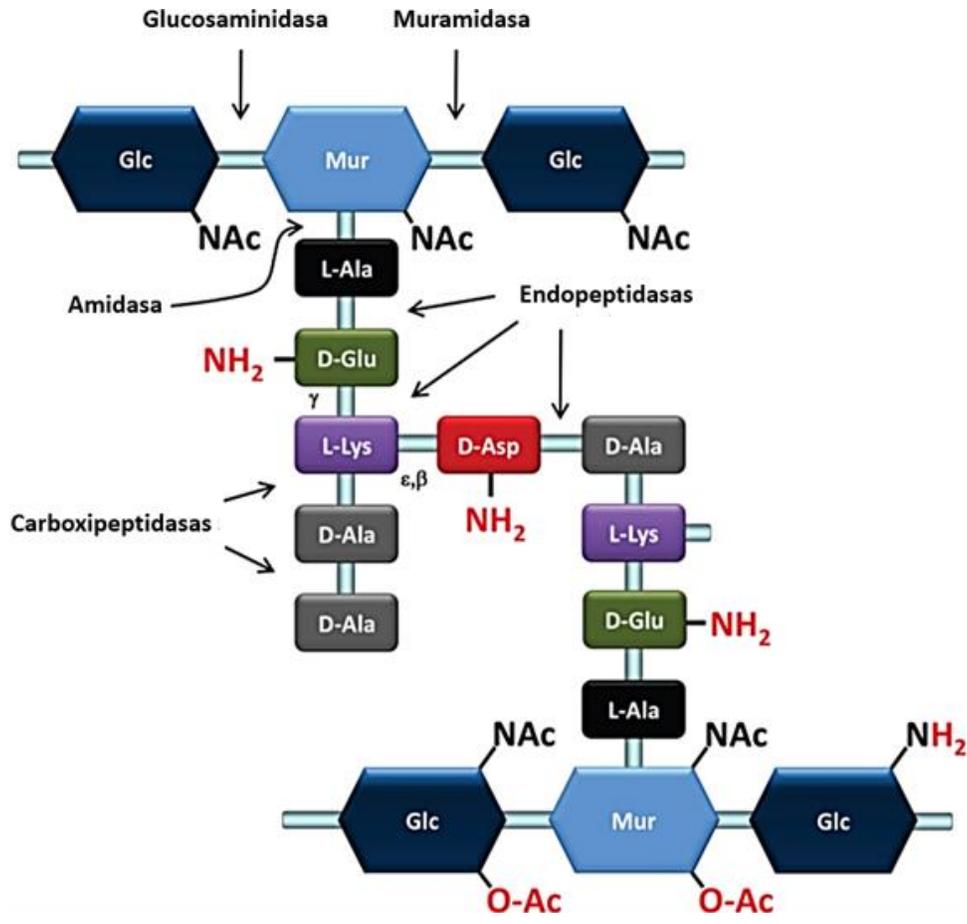


Figura 4. Representación esquemática de la estructura del peptidoglicano. Este es el tipo de estructura que se encuentra en *L. lactis* y numerosos lactobacilos. En otras especies de BAL, la naturaleza del puente cruzado interpéptido (representado como D-Asp / D-Asn en la figura) puede variar, el tercer diaminoácido (L-Lys) puede reemplazarse por mDAP o L-ornitina, y El D-Ala en la posición cinco del péptido del tallo puede ser reemplazado por D-lactato. Las posibles modificaciones de la estructura de PG, como la O-acetilación (O-Ac), la N-desacetilación (que conduce a GlcNH₂) o la amidación (NH₂), se indican en rojo. Los sitios de escisión de las diferentes clases de hidrolasas PGH se indican con flechas. (Adaptado de Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014).

1.4.3 Proteínas ribosomales.

Además de las bacteriocinas y PGHs, existen otros compuestos antimicrobianos, tales como las BLIS (Bacteriocin Like Inhibitory Substances), que por sus siglas en inglés se refiere a sustancias inhibitorias similares a la bacteriocina. Estos compuestos antimicrobianos son péptidos producidos por bacterias Gram-positivas, los cuales comparten características generales con las bacteriocinas, sin embargo, en la literatura se sugiere utilizar el acrónimo BLIS hasta que se haya obtenido la secuencia de aminoácidos y nucleótidos del gen estructural. Una

vez obtenida la información de las secuencias y establecido que el compuesto antimicrobiano (BLIS) difiere significativamente de las bacteriocinas reportadas en la literatura, entonces la denominación deberá basarse a la de bacteriocinas, teniendo en cuenta la designación del género o preferiblemente de la especie de la cepa productora (Jack *et al.*, 1995; Srionnual *et al.*, 2008).

Otros compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se han diferenciado de las bacteriocinas y BLIS, el cual ha sido recientemente identificado mediante secuenciación, son las proteínas ribosómicas 30S o 50S. Por ejemplo, de Carvalho y colaboradores (2010) obtuvieron tres compuestos antimicrobianos diferentes, los cuales fueron purificados por intercambio catiónico y por métodos cromatográficos e identificados mediante la degradación de Edman. Uno de estos compuestos con actividad antimicrobiana corresponde a la proteína ribosomal S21 de la subunidad 30S, la cual ellos sugieren que es secretada por la bacteria para participar en el ensamblaje ribosomal de bacterias estrechamente relacionadas filogenéticamente y puede ser vista como un nuevo ejemplo de proteína antimicrobiana. Más adelante, Pidutti y colaboradores (2018) hallaron dos proteínas ribosomales de la subunidad 50S con actividad antimicrobiana, la L27 y L30 producidas por *Lactobacillus salivarius* SGL03, las cuales fueron identificadas mediante nano-HPLC-Chip Ion Trap y espectrometría de masas. Recientemente, García-Cano y colaboradores (2019), identificaron a partir de *Pediococcus acidilactici* a la L36 como otra proteína ribosomal de la subunidad 50S con actividad antimicrobiana. Existe evidencia de que algunas de las proteínas ribosomales tienen una segunda función, aparte de la síntesis de ribosomas y proteínas. Por ejemplo, L4 regula la degradación del RNA (Singh *et al.*, 2009), S12 actúa como chaperona de ARN, lo que facilita el empalme de los intrones (Coetzee *et al.*, 1994), así como las proteínas ribosomales citadas por de Carvalho y colaboradores (2010). Por lo que estas proteínas de bajo peso molecular pueden clasificarse como un nuevo grupo de péptidos con actividad antimicrobiana.

1.4.4 Aplicaciones en biotecnología.

Se ha descubierto que ciertas BAL producen compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica, los cuales pueden tener un efecto bactericida o bacteriostático. Dentro de estos compuestos antimicrobianos, encontramos principalmente a las bacteriocinas, descritas anteriormente (Bintsis, 2018). La bacteriocina más conocida es la nisina, que ha tenido una amplia aplicación en los alimentos como conservador de alimentos está aprobado por la FDA (denominada tipo GRAS); es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Bintsis, 2018; Hansen, 1994). Otro ejemplo de bacteriocina producida para la industria alimentaria es la

pediocina PA-1, dado que inhibe el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos (Rodríguez *et al.*, 2002).

En el grupo de trabajo de la Dra. Edith Ponce Alquicira en la UAM-Iztapalapa, se ha llevado a cabo la caracterización bioquímica y molecular de bacteriocinas aisladas de productos cárnicos, por ejemplo:

- Enterocina A es una bacteriocina de clase IIa producida por *Enterococcus faecium* MXVK29 aislado de chorizo mexicano (Álvarez, 2011).
- Pediocina Ach es una bacteriocina de clase IIa producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 aislado de chorizo mexicano (Schneider, 2005b).
- Enterocina MXVK222 producida por *Enterococcus faecalis* aislada de chorizo mexicano (Schneider, 2005a).

Otro compuesto antimicrobiano que se emplea en la industria, son las PGH, por citar algunas de las más utilizadas, se puede mencionar a la lisozima que se encuentra en el huevo de gallina y es utilizada como conservador en quesos y vinos (Callewaert *et al.*, 2011) y la lisostafina, la cual es una endopeptidasa que hidroliza los enlaces glicina-glicina específicos de la pared celular de *S. aureus*, teniendo aplicaciones terapéuticas para tratar infecciones causadas por este microorganismo (Kumar, 2008).

1.4.5 Métodos de evaluación de actividad de compuestos antimicrobianos.

Cuando se estudian las bacteriocinas o cualquier otro metabolito antimicrobiano producido por las BAL, se debe tomar en cuenta que no son los únicos que pueden llegar a tener una actividad antimicrobiana (Alvarez-Cisneros *et al.*, 2011). Se pueden realizar algunas técnicas para eliminar la inhibición debida a otros metabolitos, como la neutralización y la adición de la enzima catalasa a los sobrenadantes del cultivo de las cepas productoras que permiten eliminar un posible efecto inhibitorio del crecimiento de la cepa sensible debido al ácido láctico y al peróxido de hidrógeno, respectivamente (este último también puede ser eliminado mediante incubación anaerobia; de Vuyst y Vandamme, 1994).

Los métodos para detectar la actividad bacteriocina se dividen en dos tipos: métodos directos y métodos indirectos. Los directos se utilizan para medir la actividad antimicrobiana de todos los metabolitos producidos por BAL e implican la incubación de bacterias productoras de compuestos antimicrobianos simultáneamente con el organismo sensible. El antagonismo depende de la liberación del inhibidor en los medios durante la fase de crecimiento del

organismo analizado. Por otro lado, los métodos indirectos se basan en la difusión de bacteriocinas a través de medios de cultivo sólido o semisólido, lo que resulta en la inhibición del crecimiento de un microorganismo indicador sensible. Por ejemplo, el método de difusión en agar utiliza diluciones de bacteriocinas colocadas en pozos hechos en agar pre-inoculados con un microorganismo sensible. El agente antimicrobiano difunde a través del medio de cultivo, produciendo halos de inhibición. La mayoría de los métodos utilizados se basan en la observación de estos halos de inhibición en placas con agar: la zona de inhibición es el resultado de la difusión de la proteína a través del agar, lo que resulta en la inhibición del crecimiento de células sensibles. La determinación de la actividad inhibidora en medios sólidos se usa con frecuencia debido a su simplicidad, bajo costo y al potencial inhibidor de la proteína (Alvarez-Cisneros *et al.*, 2011).

1.5 Técnicas de identificación de bacterias.

Hoy en día existen diversos métodos para la identificación de BAL, tal como las pruebas bioquímicas, como caso típico, el perfil de fermentación de azúcares. Sin embargo, se ha demostrado que puede haber diferencia en el metabolismo de azúcares entre cepas, a pesar de pertenecer al mismo género y especie. Tal es el caso de *L. paraplantarum*, que no pudo identificarse y diferenciarse de *L. plantarum* por la fermentación de L-arabinosa y sorbitol, ya que mientras *L. plantarum* podía fermentar estos carbohidratos, algunas cepas de *L. paraplantarum* pudieron fermentarlos, mientras que otras no pudieron (Curk *et al.*, 1996). Sin embargo, los avances en la biología molecular han permitido una identificación más rápida y eficiente de los microorganismos a través de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La técnica de la PCR consiste en la amplificación de una secuencia específica de un segmento de ADN en una simple reacción enzimática a través de la ADN polimerasa y dos cebadores de extensión, los cuales sintetizan el fragmento de ADN específico de una secuencia de ADN molde. Así, se obtienen varias copias de un fragmento de ADN, las cuales servirán para la identificación bacteriana, constituyéndose así, en una prueba diagnóstica sensible y rápida. Previo al uso de la PCR se extrae el ADN mediante una lisis de la pared celular y formación de complejos insolubles, se purifica el ADN y se remueven los productos de degradación, lo que conserva al ADN por mayores períodos (Woo *et al.*, 2003).

Se llevan a cabo tres pasos que se repiten cíclicamente, el inicial que implica la desnaturalización de la molécula de ADN, es decir, la separación de sus cadenas, lo cual se realiza aumentando la temperatura a 95 °C con el fin de que cada cadena sirva como molde

para sintetizar una nueva. En el segundo paso, la temperatura es reducida a 55 °C lo que permite la unión de los cebadores con la secuencia completa. En la tercera etapa, la temperatura es elevada alrededor de los 72 °C y la ADN polimerasa comienza la adición de nucleótidos en los extremos de los cebadores, sintetizando así las nuevas cadenas (Clarridge, 2004; Rodicio y Mendoza, 2004; Petti, 2007).

Por otra parte, la espectrometría de masas (EM) ha irrumpido recientemente en el laboratorio de microbiología, ofreciendo una alternativa rápida y fiable para la identificación de microorganismos mediante dos aproximaciones diferentes: la identificación basada en el perfil proteico específico de cada microorganismo (aproximación proteómica) o el análisis de sus ácidos nucleicos (Jordana-Luch *et al.*, 2012; Relloso *et al.*, 2015).

1.5.1 PCR múltiple con cebadores derivados del gen *recA*.

Curk y colaboradores (1996) describieron a *L. plantarum* como un taxón que exhibe heterogeneidad fenotípica y genómica. En estudios de hibridación de ácidos nucleicos se ha demostrado claramente las diferencias entre *L. plantarum* y *L. pentosus*, sin embargo, se han encontrado que algunas cepas no son de *L. plantarum* ni de *L. pentosus*. Por lo que las posiciones taxonómicas de estos organismos no identificados habían permanecido inciertas, hasta que se estudió el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de los genes de pirimidina biosintéticos, encontrando así una nueva especie diferente a *L. plantarum* y *L. pentosus*, proponiendo el nombre de *L. paraplantarum*. Estas especies estrechamente relacionadas no pueden distinguirse por el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr porque muestran un 99% de similitud en la secuencia (Zanoni *et al.*, 1987).

Sin embargo, cuando las especies que tienen un 70% o más de similitud generalmente tienen más del 97% de identidad de secuencias de RNAs; por lo tanto, la identidad de las secuencias del gen 16S ARNr puede no ser suficiente para garantizar que dos taxones pertenezcan a la misma especie, por lo que el análisis de la secuencia de ADN ribosómico 16S no es el método apropiado para reemplazar la reasociación del ADN para delinear especies y medir las relaciones intraespecíficas.

Una alternativa para diferenciar especies con porcentaje mayor de identidad de secuencias de RNAs al 97%, es el uso de del gen *recA* y la proteína RecA como marcador filogenético. Rec A es una proteína pequeña (352 aminoácidos en *Escherichia coli*) implicada en la recombinación

de ADN homólogo, la inducción de SOS y la mutagénesis inducida por daño en el ADN. Estas funciones implican múltiples actividades bioquímicas, incluida la unión al ADN (doble y monocatenario), el emparejamiento e intercambio de ADN homólogo, la hidrólisis del ATP y proteólisis de las proteínas LexA, Icl y UmuD. Debido a su papel fundamental como gen constitutivo, el gen *recA* y su producto genético ha sido propuesto como un marcador filogenético para especies emparentadas lejanamente (Torriani *et al.*, 2001; Bringel *et al.*, 2005).

1.5.2 Espectrometría de masas.

La técnica de espectrometría de masas conocida como *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosómicas, a través de la creación de un espectro de masas o huella peptídica que es específica para cada especie. Un microorganismo dado presentará siempre una serie de picos característicos en el espectro, y esto permite la creación de bases de datos con los espectros de masas que presentan los distintos microorganismos. El espectro obtenido para un determinado microorganismo se compara automáticamente con la base de datos, y el resultado se emite junto a un puntaje o score. Esta técnica, consta de cuatro pasos: la recuperación de una colonia aislada, la realización de un espectro de masas, la comparación con la base de datos y la entrega de resultados (Reloso *et al.*, 2015).

El estudio se puede realizar por dos metodologías diferentes: análisis de células intactas o transferencia directa y extracción previa de proteínas. Para el análisis de células intactas, se selecciona la colonia de interés y se aplica directamente sobre la placa de metal pulido; mientras que para la extracción con etanol-ácido fórmico, se resuspende la colonia de interés con agua bidestilada y etanol, centrifugando y eliminando el etanol, para posteriormente añadir ácido fórmico al 70% y la misma cantidad de acetonitrilo para la ruptura de la pared celular. Una vez centrifugada la muestra, se recoge el sobrenadante y se aplica en la placa de metal pulido. A continuación, para cualquiera de las metodologías empleadas, se cubre la muestra con la solución matriz (generalmente una solución saturada de ácido alfaciano-4-hidroxicinámico, acetonitrilo y ácido trifluoroacético) la que se cristaliza al dejarse secar a temperatura ambiente. Esta matriz es empleada para dos aspectos fundamentales; el primero expone las proteínas intracelulares mediante la ruptura de la membrana celular y el segundo, facilita la vaporización y la ionización de las proteínas mediante un haz de laser pulsante. Una vez ionizadas las proteínas, estas viajan por una cámara de vacío hasta llegar al detector. Dependiendo de la

relación masa/carga de cada fragmento ionizado, será el tiempo que la proteína ionizada demore en llegar al detector. Este "tiempo de vuelo" es utilizado para construir el espectro específico de las masas. La manera en que este espectro es analizado va a depender del *software* utilizado para realizar la identificación. Este espectro es comparado automáticamente con un archivo y el resultado es entregado automáticamente (García *et al.*, 2012, Jordana-Luch *et al.*, 2012).

Una vez obtenido el espectro de masas y comparado con los existentes en la base de datos, el *software* le adjudica una identificación y un valor indicativo de la fiabilidad de dicha identificación. En el caso de Biotyper, se emplea una escala logarítmica que va de 0 a 3 y se divide en tres intervalos: 2.0 o más es indicativo de una identificación confiable al nivel de especie (color verde); puntajes de 1.7 a 1.99 fueron confiables y aceptados para detección nivel de género (color amarillo) y puntajes por debajo de 1.69 se consideraron insatisfactorios y no confiables (color rojo) (Jordana-Luch *et al.*, 2012; Richter *et al.*, 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

Dentro de los péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana producidos por BAL, se encuentran las bacteriocinas y PGH. Estos compuestos antimicrobianos son trascendentes en la industria farmacéutica y alimentaria. En particular, en los alimentos se presentan como una alternativa potencial en la conservación de estos, debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolítica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus*, entre otras. Además, su naturaleza proteica les ha conferido ser considerados inocuos toxicológicamente.

Por otra parte, existen escasas investigaciones con respecto al efecto en el crecimiento y producción de compuestos antimicrobianos en la cepa de *L. paraplantarum* bajo diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo.

En investigaciones previas dentro del grupo de trabajo; Salas en el 2018 aisló y conservó (glicerol 50% a -70°C) a partir de muestras de salami comercial (Murgati, S.A de C.V.) una cepa bacteriana que mostró actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* y detectó proteínas de alto y bajo peso molecular con dicha actividad antimicrobiana a partir del extracto crudo de la cepa, evaluado mediante zimogramas de *Micrococcus lysodeikticus*. Por lo anterior, si se logra identificar y determinar el efecto de la concentración de carbono y nitrógeno en el crecimiento y actividad antimicrobiana de *L. paraplantarum*, en un futuro se podrán aplicar como antimicrobianos naturales en la industria alimentaria o farmacéutica, ya sea como bioconservadores o como reemplazo de antibióticos, respectivamente.

3. HIPÓTESIS

La actividad antimicrobiana que presenta *L. paraplantarum* se debe a la presencia de compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica, la cual varía en las fases de crecimiento celular y por las concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar los compuestos antimicrobianos de origen proteico producidos por *L. paraplantarum* y evaluar el efecto de la concentración carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la actividad antimicrobiana.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Corroborar la identificación molecular de la cepa en estudio mediante la amplificación de los genes 16S ARNr y *recA*, así como por espectrometría de masas.
- ◆ Verificar la actividad antagónica producida por *L. paraplantarum* frente microorganismos deteriorantes de alimentos y/o patógenos.
- ◆ Determinar la actividad antimicrobiana del extracto crudo, así como de los extractos de proteína ribosomal y PGH obtenidos de *L. paraplantarum* sobre *Listeria innocua*, mediante la prueba presuntiva por difusión en agar.
- ◆ Determinar el perfil proteínico de los compuestos antimicrobianos de *L. paraplantarum* a través de zimogramas y geles de poliacrilamida para su posterior identificación por espectrometría de masas y en su caso por especificidad de sustrato.
- ◆ Evaluar la influencia de la concentración de carbono y nitrógeno en la variación de la actividad antimicrobiana producida por *L. paraplantarum* durante el crecimiento celular.

6. Metodología

6.1 Metodología general.

La figura 5 resume la estrategia de trabajo experimental, la cual comprendió de tres etapas. La primera se caracterizó por la identificación de la cepa mediante métodos moleculares y espectrometría de más, la segunda por la extracción e identificación de los compuestos antimicrobianos producidos por *L. paraplantarum* y la tercera, por la determinación del efecto en la concentración de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo para la producción de compuestos antimicrobianos.

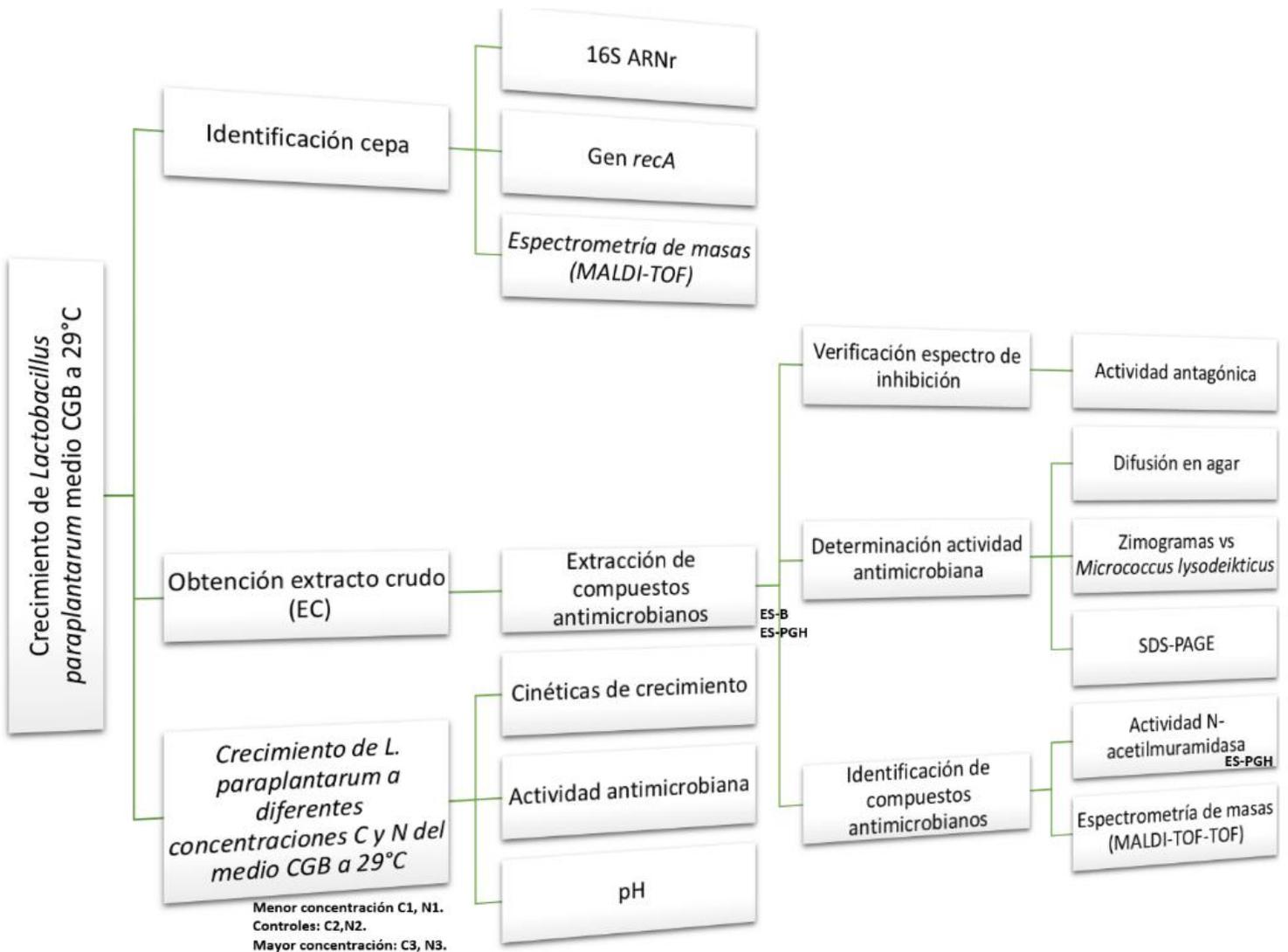


Figura 5. Esquema general de trabajo. ES-B, extracto semi purificado de bacteriocina, ES-PGH, extracto semipurificado de PGH.

6.2 Condiciones de crecimiento de la cepa.

La cepa con actividad antimicrobiana aislada a partir de salami fue reactivada (1% v/v de inóculo) en medio CGB pH 6.8, cuya composición consiste de peptona biotriptasa 20 g/L (Bioxon, México), glucosa 10 g/L (Bioxon, México), extracto de levadura 5 g/L (DIBICO S.A. de C.V.), citrato de amonio 2 g/L (J.T.Baker, México), fosfato disódico 2 g/L (J.T. Baker, México), sulfato de magnesio 0.1 g/L (J.T. Baker, México), sulfato de manganeso 0.05 g/L (J.T. Baker, México) y tween 80 al 0.01% (Hycel, México), durante 24 h a 30°C (Guzmán, 1999). Posteriormente se realizó una resiembra de la cepa reactivada (1% v/v de inóculo) en medio CGB a pH 6.8 y se incubó a 29°C durante 18 h.

Cabe mencionar que el criterio de incubación de la cepa a 30°C se basó en lo reportado por Nishida y colaboradores (2017), donde determinaron un mayor crecimiento de la cepa de *L. paraplantarum* a esa temperatura y se ha reportado que a un mayor crecimiento existe un aumento en la producción de compuestos antimicrobianos debido a que se entra a una etapa de estrés (Anderson y Jayaraman, 2003).

6.3 Identificación de cepa.

6.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN total se realizó con un kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, E.U.A.) conforme a las especificaciones del proveedor. La extracción se realizó a partir del pellet resultante de la centrifugación a 14,000 rpm de 1 mL de cultivo de 18 h durante 2 min a temperatura ambiente, siendo en el pellet donde se encuentra el ADN.

La verificación de la integridad del ADN se realizó mediante un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%), utilizando amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 10 mM; Bio-Rad, E.U.A.), EDTA 1 mM (J.T. Baker, México), pH 8.0. El gel se colocó en un sistema de electroforesis horizontal Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, Beijing, China), llevándose a cabo la electroforesis a 80 V durante 40 min y se empleó el marcador GeneRule 1kb ADN (Thermo Scientific). Posteriormente, se determinó la concentración y pureza del ADN total extraído, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm utilizando la placa Take3™ Multi-volume (Biotek Instruments GmbH, Vermont, E.U.A) en un espectrofotómetro Epoch Biotek (Synergy HT,

Vermont, E.U.A). Finalmente, se visualizó en un analizador de imágenes Molecular Imager Gel-Doc™ XR+ System (Bio-Rad, California, E.U.A), utilizando el *software* Image Lab versión 5.0.

6.3.2 Identificación por el gen 16S ARNr y gen *recA*.

La identificación por medio de la amplificación del gen de referencia 16S ARNr consiste en amplificar un segmento de la cadena de ADN a partir de cebadores universales para el gen 16S ARNr (Tabla 2) (Punina *et al.*, 2013). Se realizó la amplificación de las regiones V1 a la V8 del gen 16s ARNr utilizando la enzima *Taq* ADN polimerasa y cebadores específicos, obteniendo un amplicon con un tamaño de 1500 pb. Se realizó un master mix de reacción de PCR (Tabla 3) y se utilizaron las condiciones mencionadas en la tabla 4 en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Henderson Building, Singapur).

Tabla 2. **Cebadores universales para amplificar el gen 16S ARNr.**

Cebador	Secuencia 5'-- 3'	Temperatura de alineación (Tm)	Tamaño (pb)
27f	GTT TGA TCM TGG CTC AG	40 °C	1500
1492R	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	40 °C	

Abreviaturas de cebadores: f, hacia adelante; r, hacia atrás. Todas las secuencias de cebadores se presentan 5' a 3'.

Tabla 3. **Componentes de la reacción de PCR.**

Componente	Volumen final (µL)
Master Mix dNTPs, <i>Taq</i> amortiguador, Mg ²⁺ , <i>Taq</i> ADN polimerasa	12.5
ADN	1.0
Cebador 27f	0.7
Cebador 1492R	0.7
Agua libre de nucleasas	10.1

Tabla 4. **Condiciones de PCR.**

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	2	1
Desnaturalización	95	0.5	35
Alineación	40	0.5	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	5	1

Posteriormente se verificó el producto de PCR, un amplicon de 1,500 pb mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en las mismas condiciones del apartado 6.3.1, del cual se cortó la banda con un tamaño de 1,500 pb y se purificó siguiendo las indicaciones del manual de Thermo Scientific para el kit Gene JET Gel Extraction.

El producto de PCR amplificado y purificado se mandó a secuenciar a MacroGen Inc (Séul, Corea del Sur), en donde utilizó un secuenciador de 96 capilares 23 ABI 3730XL (Applied Biosystems, California). Una vez obtenida la secuencia del 16S ARNr mediante la

secuenciación, fue comparada con las secuencias depositadas en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI), para obtener el porcentaje de identidad. Este debe ser mayor del 97% para asegurar una identificación de la cepa por género y especie (Rocio y Mendoza, 2004).

Con relación a la identificación de la cepa por el gen *recA*, se siguió la metodología descrita por Torriani y colaboradores (2001) con modificaciones, la cual se basa en la diferenciación de especies del grupo *L. plantarum* utilizando la técnica de PCR. Esta técnica se llevó a cabo al realizar tres PCR por separado, utilizando para cada una un cebador directo específico de la especie, es decir, en la primer PCR se utilizó el cebador directo llamado planF, específico para *L. plantarum*, el segundo cebador corresponde a pentF, específico para *L. pentosus* y último cebador, paraF, específico para *L. paraplantarum*; mientras que solamente se utilizó un único cebador un cebador reverso (pREV) para todas las PCR, obteniendo así diferentes tamaños de amplicones (Tabla 5). Por consiguiente, se obtuvo uno de los tres posibles productos de amplificación específica de acuerdo a la especie identificada.

La amplificación del gen *recA* se realizó utilizando la enzima Platinum™*Taq* ADN polimerasa y cada uno de los tres cebadores directos específicos de la especie en combinación con el cebador reverso (pREV) en ensayos de PCR separados (Bringel *et al.*, 2005). Se realizaron las diferentes mezclas de reacción de PCR (Tabla 6) y se programaron las condiciones en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, California, E.U.A.) de acuerdo con la Tabla 7.

Tabla 5. **Cebadores para amplificación el gen *recA*.**

Cebador	Secuencia 5'-- 3'	Temperatura de alineación (Tm)	Tamaño amplicon(pb)
paraF	GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC	60.0 °C	107
pentF	CAG TGG CGC GGT TGA TAT C	64.0 °C	218
planF	CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA	61.9 °C	318
pREV	TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC	62.2 °C	-----

Cebadores sintetizados por Sigma Aldrich.

Tabla 6. **Componentes de la reacción de PCR.**

Componente	Volumen final (μL)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	36.8	
10X PCR Master Mix*, -Mg	5	1X
50 mM MgCl_2	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP Mix	1.0	0.2 mM, cada uno
10 μM cebador directo**		
paraF	1.0	0.2 μM
pentF	1.0	0.2 μM
planF	0.5	0.2 μM
10 μL cebador reverso (pREV)	1.0	0.2 μM
ADN templado	2.0 (216.017 ng/ μL)	
Platinum™ Taq ADN polimerasa	0.2	2 U por reacción

*PCR Master Mix (10X), Thermo Scientific, California.

**Se realizó un ensayo para cada uno de los cebadores directos.

Tabla 7. **Condiciones de PCR.**

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2	1
Desnaturalización	94	0.5	34
Alineación	*	0.5	
Extensión	72	0.5	
Extensión final	72	5	1
Enfriamiento	12	∞	

*La temperatura de alineación varía dependiendo del cebador directo (Tabla 5).

Por último, para verificar el tamaño de los amplicones, se realizó un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%), utilizando amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). La electroforesis se llevó a cabo a 70 V durante 50 min, utilizando un marcador 100 pb ADN (Promega). Se utilizó como control positivo una cepa de *L. plantarum*.

6.3.3 Identificación de cepa por espectrometría de masas.

La identificación se realizó en el laboratorio divisional de espectrometría de masas en la UAM-Iztapalapa mediante la técnica MALDI-TOF-TOF (Autoflex Speed, Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania) se realizó siguiendo la técnica de extracción etanol/ácido fórmico (Jordana-Luch *et al.*, 2012), a partir de colonias puras aisladas de la cepa en medio MRS (DIFCO, Cuautitlán Izcalli, México) tras 18 h de resiembra 29°C (como se menciona en el punto 6.2) (Corry *et al.*, 2003).

La colonia de interés se resuspendió en agua Milli-Q® y etanol. Después se centrifugó y eliminaron completamente los restos de etanol, se añadió ácido fórmico al 70% y la misma cantidad de acetonitrilo para la disrupción de la pared celular. Una vez centrifugada la muestra, se recogió el sobrenadante y se depositó 1 µL en la placa de metal pulido, se recubrió con 1 µL de la matriz (ácido alfaciano-4-hidroxicinámico), se dejó secar a temperatura ambiente y se procedió a su análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF. Finalmente, se obtuvo un espectro de masas el cual fue comparado con la base de datos (Bruker Daltonic MALDI Biotyper®, versión 4.1.60 (PYTH) 28 2016-04-18_11-26-19), donde el *software* adjudica una

identificación y valor indicativo de la fiabilidad de dicha identificación. En el caso de Biotyper, este valor se encuentra en un intervalo que va de 0 a 3; un valor en el intervalo de 2.0 a 3.0 indica una identificación fiable a nivel de especie, un valor entre 1.70 y 1.99 indica un parentesco muy cercano y una identificación fiable a nivel de género, y un valor <1.69 ofrece una identificación no posible.

Como estándar de calibración y optimización del espectro de masas Bruker MALDI-TOF-TOF, se utilizó IVD Bacterial Test Standard (denominado "IVT BTS") que contiene un extracto de *Escherichia coli* DH5 α , el cual muestra un perfil de péptidos y proteínas característico en los espectros de masas MALDI-TOF. El extracto está modificado con dos proteínas adicionales que amplían el límite superior del rango de masas cubierto por IVD BTS, donde el rango general de masa cubierto por IVD BTS va de 3.6 a 17 kDa.

6.4 Actividad antagónica de *L. paraplantarum*.

Salas (2018), evaluó la actividad antagónica mediante la inoculación vertical del microorganismo en estudio (*L. paraplantarum*) en el centro de una caja Petri al en medio TSB (Caldo Soya Tripticaseína, Dibico®, México). Una vez crecida la cepa de *L. paraplantarum* después de 24 h de incubación a 29°C, se realizaron estrías de forma perpendicular a la cepa en estudio (Tabla 8) (Figura 6), previamente resemebrados al 1% e incubados a 30°C durante 18h.

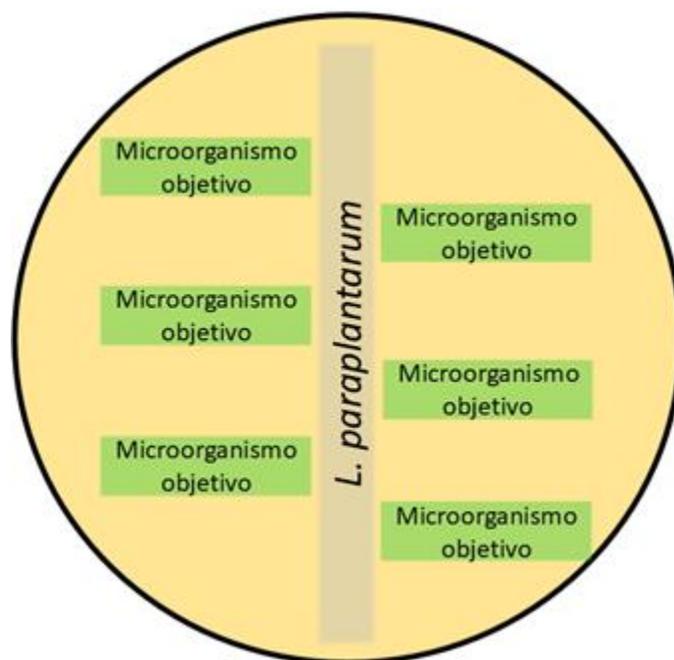


Figura 6. Representación general en caja Petri con agar para prueba antagónica de *L. paraplantarum*.

Tabla 8. **Microorganismos utilizados para la actividad antagónica.**

Microorganismo objetivo	Tipo de bacteria	Fuente	Medio de cultivo	Temperatura de incubación
<i>Listeria innocua</i>	Gram (+)	Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM	TSB* (Dibico®, México)	37°C
<i>Weissella viridescens</i>	Gram (+)	Departamento de Biotecnología, UAM-I	TSB* (Dibico®, México)	37°C
<i>Salmonella</i> spp.	Gram (-)	Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM	TSB* (Dibico®, México)	37°C
<i>Leuconostoc</i> spp.	Gram (+)	Departamento de Biotecnología, UAM-I	TSB* (Dibico®, México)	37°C
<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)	Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM	CGB** (ver apartado 6.2)	37°C
<i>Lactobacillus sakei</i>	Gram (+)	Departamento de Biotecnología, UAM-I	CGB** (ver apartado 6.2)	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram (+)	Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM	CGB** (ver apartado 6.2)	37°C
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Gram (+)	Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas, UAM-I	TSB* (Dibico®, México)	37°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Gram (-)	Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas, UAM-	Medio F	37°C

6.5 Determinación de la actividad antimicrobiana.

6.5.1 Obtención del extracto crudo.

El extracto crudo (EC) se obtuvo a partir de un cultivo de 18 h de *L. paraplantarum* seguido de una centrifugación a 7,500 rpm durante 15 min a 4°C. Una vez centrifugado, se colectó el sobrenadante y se ajustó el pH a un valor de 7 para eliminar la influencia de los ácidos orgánicos sobre la actividad inhibitoria. Posteriormente, se filtró a través de membranas estériles de tamaño de poro de 0.22 µm. Finalmente, el EC resultante se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

6.5.2 Obtención de compuestos antimicrobianos tipo bacteriocina (adsorción-desorción).

La extracción o semi purificación del compuesto antimicrobiano de tipo bacteriocina (ES-B) se llevó a cabo mediante la técnica de adsorción-desorción dependiente del pH (Yang *et al.*, 1992), con algunas modificaciones (Schneider, 2005a). Se inocularon 4 L de caldo CGB al 1% (v/v) de un cultivo de *L. paraplantarum* durante 18 h hasta la fase estacionaria, el cual posteriormente fue sometido a un tratamiento térmico a 70°C durante 30 min para la inactivación de las proteasas que pudieran estar presentes en el medio (Katla *et al.*, 2003). Posteriormente, se ajustó el pH del cultivo a 5 con una solución 10 M de NaOH y se mantuvo en agitación moderada durante 24 h permitiendo la adsorción del compuesto antimicrobiano a la membrana celular bacteriana. Transcurrido este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 3,100 rpm durante 20 min a 4°C y se recuperó el precipitado celular, se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos (5 mM fosfato de sodio, pH 6.5). Finalmente, las células se resuspendieron (5% del volumen original) en una solución 100 mM de NaCl a pH 1 (ajustada con ácido fosfórico al 5%); este valor de pH favoreció la desorción del compuesto antimicrobiano desde la membrana celular de las bacterias hacia el medio; para este proceso se mantuvieron las células en agitación a 4°C durante 24 h. Las cuales se sometieron a centrifugación a 3100 rpm durante 20 min a 4°C para descartar células y retener el sobrenadante, el extracto libre de células se dializó empleando membranas de celulosa (Spectra/Por7®, Arizona US) con un tamaño de poro de 1,000 Da con cambios frecuentes de agua destilada hasta eliminar las sales presentes y se filtró a través de membranas estériles (poro de 0.22 µm). A continuación, el sobrenadante se liofilizó (Scientz-10N Freeze Dryer, Zhejiang, China), la temperatura de muestra fue de -25.0°C, la temperatura de la trampa fría fue de -66.0°C y con una vacío de 1 Pascal. Los liofilizados se resuspendieron

en 400 μ L de amortiguador (Tris-HCl 100 mM, pH 8). Finalmente, los liofilizados resultantes se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.5.3 Obtención de compuestos antimicrobianos tipo peptidoglucano hidrolasa (PGH).

La obtención o purificación parcial de la PGH (ES-PGH) se realizó mediante la ultrafiltración del EC (apartado 6.4.1.) con una membrana de tamaño de corte de 50 kDa (Amicon® Millipore, Dramstadt, Alemania), siendo las condiciones de centrifugación a 6,500 rpm a 4°C durante 15 min. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.5.4 Prueba presuntiva por difusión en agar.

La actividad antimicrobiana se midió por el método de difusión en agar (Schillinger y Lücke, 1989), con modificaciones (Liu *et al.*, 2014). La técnica consistió en depositar 100 μ L del EC, ES-B o ES-PGH obtenido del cultivo de *L. paraplantarum* en pozos hechos con una punta de micropipeta (1000 μ L) estéril en medio TSB (Dibico, México) semisólido (0.8% de agar bacteriológico) superpuesto sobre una capa de medio TSB sólido (1.0% de agar bacteriológico), utilizando como control positivo 15 μ L de nisina al 10% y 15 μ L de lisozima al 10%. El medio TSB semisólido fue previamente inoculado con 140 μ L de *Listeria innocua* en fase logarítmica 10^6 - 10^7 UFC/mL (D.O._{600 nm}=0.3). La actividad antimicrobiana se evaluó determinando el halo de inhibición formado alrededor del pozo, una vez incubada la placa a 37°C durante 24 h para el crecimiento de la cepa sensible.

La actividad antimicrobiana específica se calculó midiendo los mm de los halos obtenidos en las cajas Petri por el método de difusión en agar y con los valores de proteína total determinados en un lector de placas como se menciona en el apartado 6.5.4.1. Con base a los valores obtenidos de la proteína total (mg/mL) en cada uno de los extractos utilizados, se calculó la proteína total presente en 100 μ L adicionados por muestra y cada uno de los extractos semi purificados obtenidos en las diferentes condiciones aplicadas.

6.5.4.1 Cuantificación de proteína.

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, California, E.U.A.) (Bradford, 1976) a una longitud de 595 nm en un lector de microplacas (Epoch, Biotek, Vermont, E.U.A). Se colocaron 160 μ L de los respectivos extractos y 40 μ L del

reactivo de Bradford concentrado en los pozos de la microplaca y posteriormente se mezclaron e incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un lector de placas, empleando una curva patrón de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, E.U.A.).

6.6 Perfil proteico para bacteriocinas y zimograma contra *Micrococcus lysodeikticus*.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y tricina (Tris-Tricina-SDS-PAGE) es una forma eficiente de separar proteínas de bajo peso molecular. Sin embargo, el sistema estándar descrito por Schägger y von Jagow (1987) es bastante complicado y específicamente puede no ser útil cuando las proteínas separadas requieren ser recuperadas del gel para el análisis cuantitativo. Haider y colaboradores (2012) describen un sistema simplificado por el cual estas proteínas más pequeñas pueden tener mayor separación y resolución, este sistema requiere solamente de un amortiguador, es decir, se utiliza el mismo amortiguador para el gel de separación, como para el gel concentrador (Anexo A). En cambio, en el sistema original se utilizan dos amortiguadores, uno para el gel de separación y otro para el gel concentrador.

El peso molecular de la bacteriocina se determinó siguiendo la técnica para geles de poliacrilamida Tris-Tricina-SDS descrita por Haider y colaboradores (2012), empleando geles de separación (ver la preparación en el Anexo A) con 2.67% de C (entrecruzamiento) y 16% de T (proporción de acrilamida/bisacrilamida) y los geles de concentración con 2.67% de C y 4% de T. Los geles fueron ensamblados en una cámara de electroforesis Mini-Protean® Tetra System (Bio-Rad, California, E.U.A.).

Las muestras fueron tratadas en condiciones no desnaturizantes, con el fin de evitar la pérdida de la actividad. La corrida del gel se realizó a 135 V durante 2 h, empleando una fuente de poder PowerPac (Bio-Rad, California, E.U.A.). Posteriormente se realizó la fijación de los geles con una solución de glutaraldehído al 5% durante 25 min en agitación. En seguida se tiñeron los geles con la solución de tinción Coomassie Brilliant Blue (0.027 g de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 100 mL de ácido acético al 10%) durante 20 min en agitación moderada. Finalmente, se destiñeron los geles con una solución de ácido acético al 10% durante 20 min en agitación. El peso molecular de las bandas de proteína se determinó por la comparación con un marcador preteñido de amplio espectro, SDS-PAGE Stradars (Bio-Rad, 161-0318).

Para la elaboración del zimograma, se prepararon geles de poliacrilamida Tris-Tricina-SDS al 16% de poliacrilamida co-polimerizada con 0.2% de células liofilizadas de *M. lysodeikticus*, como sustrato (Hardt *et al.*, 2003). Posteriormente, las células se resuspendieron con los reactivos mencionados anteriormente para la elaboración del gel. Una vez transcurrida la electroforesis, los geles se lavaron dos veces con agua Milli-Q durante 30 min y se incubaron a 37°C con amortiguador de renaturalización (100 mM Tris-HCl, pH 8.0 con 1% v/v Tritón X-100) durante un lapso de 12 a 16 h con agitación suave. Después, los geles se tiñeron con 0.01% de KOH y 0.1% de azul de metileno durante 20 min y se destiñeron con agua MilliQ.

Los geles obtenidos fueron visualizados en un analizador de imágenes Molecular Imager Gel-Doc™ XR+ System (Bio-Rad, California, E.U.A), utilizando *software* Image Lab versión 5.1.

6.7 Perfil proteico para PGHs y zimograma contra *M. lysodeikticus*.

El peso molecular aparente de las proteínas de interés se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida co-polimerizada en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE; Laemmli, 1970). Se prepararon Tris-Glicina-SDS-PAGE al 10% con los reactivos necesarios (30% Acrilamida/Bisacrilamida, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 10% SDS, agua Milli-Q, TEMED y 10% APS), ver la preparación en el Anexo A. Se tomaron 35 µL del ES-PGH (ver apartado 6.4.3) y se les adicionaron 15 µL de amortiguador de carga (50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 2.5% glicerol, y 0.5% de azul de bromofenol). Se cargaron en el gel y a su vez éste en una cámara Mini-Protean® Tetra System (Bio-Rad, California, E.U.A.), la cual se puso en funcionamiento a 80 V durante 30 min y 120 V durante 1.5 h. Después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua Milli-Q durante 30 min, se tiñó con azul de Coomassie (0.1% azul de Coomassie R-250, 45% metanol, 10% ácido acético glacial y 45% de agua Milli-Q) durante 24 h y se destiñó con 10% de metanol, 10% ácido acético glacial y 80% agua Milli-Q. El peso molecular de las bandas de proteína se determinó por la comparación con el marcador Precision Plus Protein Dual Color Standars (Bio-Rad, 161-0374).

Para la elaboración del zimograma, se prepararon geles SDS al 10% de poliacrilamida co-polimerizada con 0.2% de células liofilizadas de *M. lysodeikticus*, como sustrato (Leclerc y Asselin, 1989). Posteriormente, las células se resuspendieron con los reactivos mencionados anteriormente para la elaboración del gel. Una vez transcurrida la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua Milli-Q durante 30 min, se incubó a 37°C con amortiguador de renaturalización (100 mM Tris-HCl, pH 8.0 con 1% v/v Tritón X-100) durante 12-16 h en agitación suave. Finalmente, el gel se tiñó con 0.01% de KOH y 0.1% de azul de metileno durante 15 min

y se destiñó con agua Milli-Q. Ambos geles fueron visualizados en un analizador de imágenes utilizando el *software* Image Lab versión 5.1.

6.8 Identificación de proteínas por espectrometría de masas.

Una vez identificada la banda correspondiente a la proteína de bajo peso molecular con actividad en zimograma contra *M. lysodeikticus* (apartado 6.6), esta banda se identificó por espectrometría de masas y analizó en el “Institut De Recherches Cliniques De Montréal” (IRCM) en Montreal, Canadá. Se utilizó el método LC-MS/MS (cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas) en un LTQ-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemania). Los resultados de la secuenciación fueron entregados y analizados mediante la *software* Scaffold4 (versión 4.8.9.20181203, Proteoma Software Inc., Portland, OR).

En cuanto a la identificación de la proteína de alto peso molecular con actividad antimicrobiana (PGH), la banda de interés en gel de poliacrilamida Tris-Glicina se envió a secuenciar al Laboratorio Nacional Plan TECC en el CINVESTAV (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN) en Irapuato, México, donde se utilizó el método LC-MS/MS por electrospray.

6.9 Actividad de *N*-acetilmuramidasa.

Previamente a determinar la actividad por especificidad de sustrato de la PGH con actividad antimicrobiana en zimograma contra *M. lysodeikticus*, se calculó peso molecular aparente a través del gel Tris-Glicina-SDS-PAGE mediante el *Software* de Imagen Lab Versión 5.0, el cual fue de 66.6 kDa. Por otra parte, se analizó la secuencia del genoma de *L. paraplantarum* L-ZS9 (NCBI GenBank: CP013130.1), en donde se encontró una muramidasa (PGH) con un peso molecular de 67.212 kDa, similar al calculado a través del gel, el cual fue de 66.6 kDa. Por lo anterior, se realizó la actividad específica de sustrato de *N*-acetilmuramidasa.

En la determinación de la actividad de *N*-acetilmuramidasa se utilizaron 75 µL de peptidoglucano (apartado 6.9.1) tratado enzimáticamente y diluido en agua (4 mg/mL), 25 µL de la muestra (ES-PGH, apartado 6.5.3) y 400 µL de agua. La reacción se dejó a 37°C por 1 h a 70 rpm, una vez transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó 1 min a 14,000 rpm para eliminar el peptidoglucano insoluble. De cada tubo se tomaron 400 µL que se aforaron con 100 µL de agua.

Cada muestra se colocó en un tubo de vidrio con rosca de un volumen de 15 mL, a cada tubo se le adicionaron 3 mL de H₂SO₄ concentrado y se calentó a ebullición por 10 min. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron a cada tubo 50 µL de CuSO₄ (4 %) y 100 µL de pPp (p-fenilfenol, Sigma-Aldrich; 1.5 % en etanol al 96 %). La reacción se incubó por 30 min a temperatura ambiente y la actividad se cuantificó a 570 nm (Salas 2018; Kimberley y Taylor, 1996). Se utilizó como control positivo 25 µL de lisozima (10%) y como negativo 25 µL agua en lugar de la muestra.

6.9.1 Extracción de peptidoglucano de *M. lysodeikticus*.

A partir de un cultivo de *M. lysodeikticus* en medio Brain Heart Infusion (BHI, Difco, E.U.A.), el cual fue incubado 12 h a 37°C y 250 rpm, se centrifugó a 8500 rpm por 15 min a 4°C para recolectar las células. Las células fueron lavadas con agua estéril (1/10, p/v) hasta la obtención de un precipitado blanco, el cual se disolvió en ácido tricloroacético (TCA) al 10 % y se colocó en ebullición por 60 min, una vez concluido este tiempo la solución se centrifugó a 8,500 rpm por 20 min a 4°C.

El pellet fue resuspendido e incubado con un amortiguador de acetatos (ácido acético 0.5 M y acetato de sodio 0.2 M pH 4.5), cloroformo y metanol en una relación 4:5:10 a pH 4.6 durante 12 h y se centrifugó a 8,500 rpm por 10 min a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 con 4000 U de tripsina (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) y se incubó en baño de agua a 37°C y 140 rpm por 12 h, una vez transcurrido el tiempo la solución se centrifugó a 8,500 rpm por 20 min a 4°C. El sedimento se lavó 4 veces con agua estéril, se liofilizó y se almacenó a -20°C (Tian, *et al.*, 2015).

6.10 Efecto de la concentración de nitrógeno y carbono en el medio sobre la actividad antimicrobiana.

Ooi y colaboradores (2015) demostraron que una relación carbono/nitrógeno (C/N) de 3.33 producía la mayor actividad antimicrobiana para *L. plantarum* I-UL4, por lo que, para el presente trabajo se calculó la relación C/N aportada por el medio CGB, la cual fue de 2.2. Por lo anterior, se decidió incrementar y disminuir 1.1 unidades la relación C/N en el medio CGB, fijando la concentración de carbono para cada relación C/N (1.1, 2.2 y 3.3). Lo mismo se realizó para cada una de las relaciones C/N establecidas, variando en esta ocasión la concentración de nitrógeno y fijando la concentración de carbono. Sin embargo, al tener las mismas relaciones C/N, sería

complicado visualizar lo antes explicado, por lo que se decidió nombrar los cambios en el medio de cultivo, como las diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno, en lugar de relaciones C/N, además de que el objetivo es determinar el efecto de la composición del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana.

Se probaron dos condiciones con diferentes concentraciones de carbono (C1 y C3), una de menor concentración de carbono y otra de mayor concentración de carbono con relación a la concentración de carbono aportada por el medio de cultivo (C2). Lo anterior también se realizó para la concentración de nitrógeno aportada por el medio (Tabla 9).

Tabla 9. **Concentración de carbono y nitrógeno aportadas por cada medio de cultivo (CGB).**

	Condición					
	C1	C2	C3	N1	N2	N3
Concentración de carbono (g/L)	2.7	6.0	8.8	6.0		
Concentración de nitrógeno (g/L)	2.7			1.8	2.7	5.7
Relación C/N	1.1	2.2	3.3	3.3	2.2	1.1

Letras en negritas indican la concentración de nitrógeno y carbono proporcionada por el medio.

Se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre el crecimiento celular, actividad antimicrobiana en el extracto crudo (EC) y pH en la fermentación de *L. paraplantarum*. Por lo que se resembró al 1% (v/v) la cepa de estudio, previamente reactivada, estandarizando el pre-inóculo a una D.O.600 nm= de 0.5 en matraces de 175 mL de medio de cultivo para las diferentes condiciones de concentración carbono y nitrógeno (Tabla 9). Se tomaron alícuotas de 25 mL a las 0, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 h de crecimiento microbiano en los medios de cultivo a base de diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno (Tabla 9) a 29°C durante 24 h sin agitación como condiciones de crecimiento.

6.10.1 Determinación de la curva de crecimiento.

Como medida indirecta del crecimiento microbiano, se cuantificó la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro Synergy HT (BioTek, Vermont, E.U.A.) durante 24 h a 30°C, tomando lecturas cada 30 min para cada una de las diferentes condiciones de los medios de cultivo (Tabla 9).

Los parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de las curvas de crecimiento, ajustando los datos de crecimiento al modelo de Gompertz mediante en el programa NCSS V.97.

6.10.2 Obtención del extracto crudo.

A partir de cada medio de cultivo bajo diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno se obtuvieron extractos crudos (EC) por triplicado, siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.5.1 a las 0, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 h de crecimiento de *L. paraplantarum*.

6.10.3 Detección de la actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos bajo diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo se midió por el método de difusión en agar (apartado 6.5.4). La técnica consistió en realizar diluciones seriadas el extracto crudo y depositar 100 μ L de las diluciones en pozos en medio TSB semisólido (0.8% de agar bacteriológico) superpuesto sobre una capa del mismo medio, pero con 1.5% de agar bacteriológico. El medio semisólido fue previamente inoculado con 140 μ L (D.O. 600nm=0.3) de un cultivo de la cepa sensible *Listeria innocua*. La actividad se evaluó determinando el halo de inhibición formado en la cepa sensible, una vez incubada la placa a 37°C durante 24 h, como se menciona en el apartado 6.5.4.

6.10.4 pH.

Se tomaron alícuotas de 50 mL a las 0, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 h de crecimiento de *L. paraplantarum* a las diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno para medir el pH (Orion Versa Star, E.U.A.).

6.10.5 Análisis estadístico.

Para el análisis de los resultados se realizaron dos análisis de varianza (ANOVA), de un (diferentes concentraciones de C y N) y dos factores (diferentes concentraciones de C, N y tiempo), ambos con un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el método de Duncan para la comparación de medias entre tratamientos, así como para cada tiempo de maduración, empleando el paquete estadístico SPSS V.18.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

7.2.1 Extracción del ADN total.

El ADN total extraído de la cepa aislada de salami se puede visualizar en la Figura 7 (carril 1), en la cual se observa una banda que corresponde al ADN, el cual es mayor a las 10000 pb, lo que significa que el ADN total tiene la integridad idónea para realizar la amplificación de gen 16S ARNr y *recA* mediante PCR. Previamente a la amplificación de los genes, se determinó la concentración de ADN, la cual fue de 216 ng/μL. Así mismo se obtuvo la relación de absorbancia 260/230, dicha relación es una manera común para expresar un valor representativo de la pureza del ADN, un valor de 1.65 a 1.9 indican una muestra pura. El resultado de la absorbancia fue de 1.807, lo que indicó la obtención de ADN con pureza aceptable, ya que valores menores a 1.65 indican una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas (Kumari *et al.*, 2019). Una vez determinada la integridad, concentración y pureza del ADN extraído se realizó la amplificación del gen de referencia 16S del ARNr y del gen *recA* específico para cada especie mediante PCR.

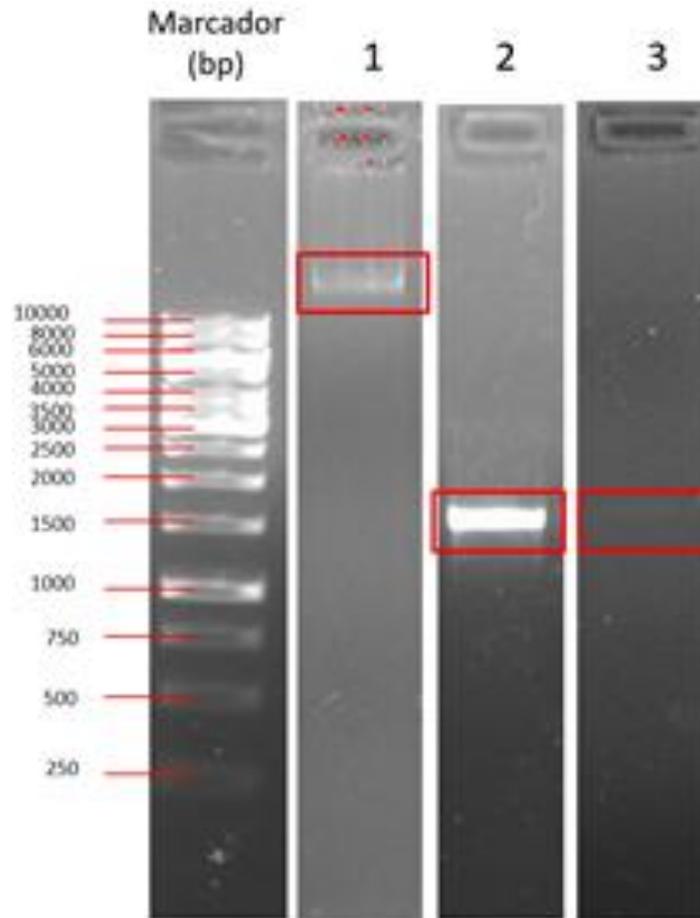


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Marcador: GeneRule 1kb ADN (Thermo Scientific). Carril 1: ADN extraído de la cepa aislada del salami. Carril 2: producto de PCR del gen 16S ARNr con ADN de la cepa aislada del salami. Carril 3: producto purificado de PCR del gen 16S ARNr de la cepa aislada del salami.

7.1 Identificación por amplificación gen de referencia 16S del ARNr y gen *recA*.

La cepa en estudio fue aislada por Palafox (2015) y Salas (2018) a partir de salami en trabajos previos. Ambos autores determinaron características generales de las cepas como tinción Gram, morfología y producción de compuestos antimicrobianos. En este trabajo se verificó la identificación de secuencias del gen 16S ARNr, analizando el ADN total del microorganismo.

Se verificó la integridad del ADN total en un gel de agarosa al 0.8%, posteriormente se realizó la amplificación del gen completo 16S ARNr con cebadores universales mediante la PCR. Se comprobó la amplificación mediante un gel de agarosa al 0.8% como se puede observar en la Figura 7, en donde el amplicon obtenido fue de un tamaño alrededor de los 1,500 pb, lo que

concuerta con el tamaño de amplicon esperado al utilizar los cebadores universales 27f y 1492R. La banda del carril 2 (Figura 7) correspondiente al amplicon de 1,500 pb se cortó, purificó y mandó a secuenciar a Macro Gen Inc. (Séul, Corea del Sur).

Una vez obtenida la secuencia del gen 16S ARNr, se comparó en la base de datos de NCBI y se determinó el porcentaje de similitud, siendo de 92, 92, y 91% con *L. paraplantarum*, *L. plantarum* y *L. pentosus*, respectivamente (Figura 8). Un porcentaje de similitud menor al 94.5 solamente define el género, mientras que valores mayores al 98.5% definen una especie (Yarza *et al.*, 2015). Debido al bajo y similar porcentaje de identidad entre estos microorganismos, se realizó la identificación específica que permite discernir entre *L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus* mediante la amplificación del gen *recA*.

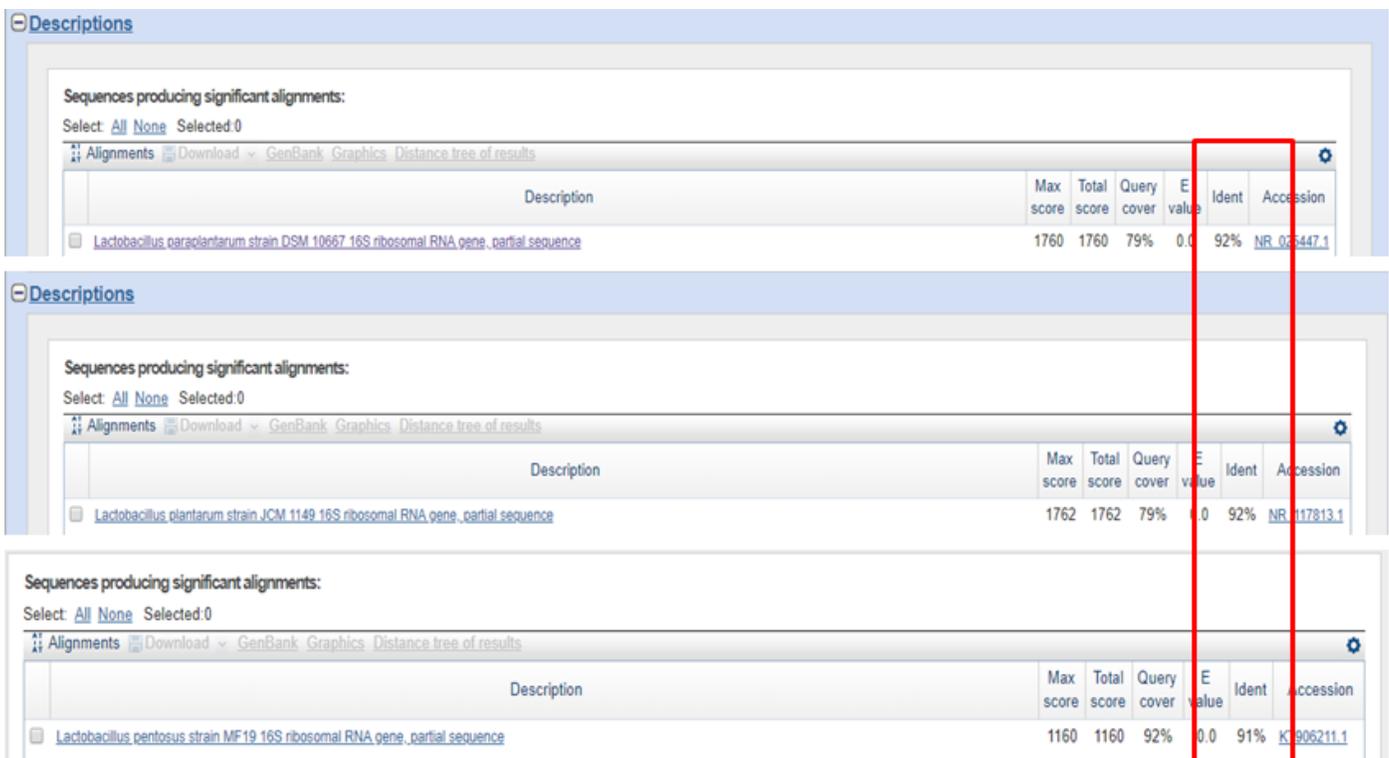


Figura 8. Resultados de BLAST en la base de datos NCBI del 16S ARNr de cepa aislada de salami.

En cuanto a la identificación de la cepa mediante la amplificación del gen *recA*, cuyo tamaño es de 322 pb, se realizó utilizando un único cebador reverso (pREV) y tres cebadores directos (paraF, pentF y planF) en la prueba de PCR (Tabla 5). Por lo que al numerar las secuencias de fragmentos de 1 a 322 pb, los cebadores específicos hacia adelante se localizaron de la siguiente manera: planF, el cebador específico para *L. plantarum*, con posiciones de nucleótidos

9 a 28; pentF, el cebador específico para *L. pentosus*, con posiciones de nucleótidos 109 a 127; y paraF, el cebador específico para *L. paraplantarum*, con posiciones de nucleótidos 220 a 239. Consecuentemente, los tamaños esperados de los amplicones son de 318 pb para *L. plantarum*, 218 pb para *L. pentosus* y 107 pb para *L. paraplantarum* (Torriani *et al.*, 2001).

En la Figura 9, se observa un solo amplicon con un tamaño de 107 pb en el carril 1, el cual corresponde a la amplificación del gen *recA* de la cepa aislada del salami cuando se utilizó el cebador directo para *L. paraplantarum* (paraF), por consiguiente, la cepa aislada del salami corresponde a *L. paraplantarum*. Con respecto al control positivo, como era de esperarse, se observa un amplicon con un tamaño de 318 pb para el control positivo, el cual corresponde a *L. plantarum*.

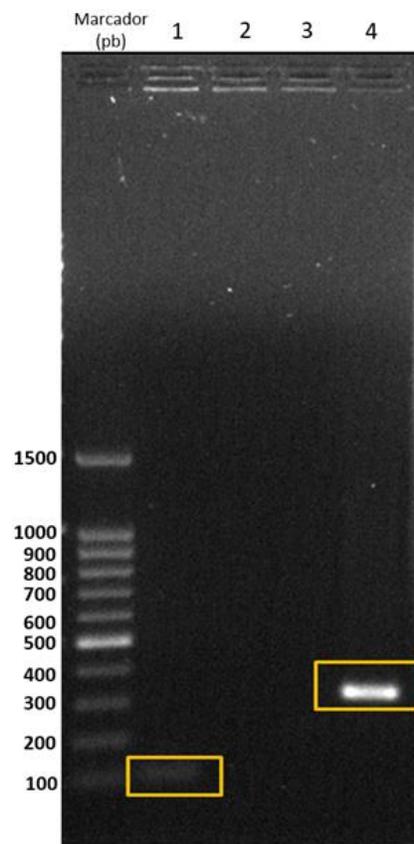


Figura 9. Productos de amplificación por PCR obtenidos a partir del ensayo múltiple *recA* en gel de agarosa al 1.2%. Marcador: de 100 pb ADN (Promega). Carril 1: producto de amplificación con cebador directo paraF de la cepa aislada de salami (*L. paraplantarum*). Carril 2: amplificación con cebador directo planF. Carril 3: amplificación con cebador directo pentF. Carril 4: producto de amplificación con cebador directo planF del control positivo (*L. plantarum*).

7.2 Identificación de cepa por espectrometría de masas.

El estudio realizado en el Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas en la UAM-Iztapalapa, identificó a la cepa obtenida de un cultivo puro aislado del salami mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF. Por estriado se aislaron colonias puras de la cepa en medio TSB, seleccionando seis colonias con morfología similar y posteriormente por sextuplicado se realizaron las lecturas correspondientes a cada colonia seleccionada en una placa de metal pulido para obtener mayor precisión de los resultados. Con lo anterior, se examinó la reproducibilidad del equipo y observando consistencia entre las muestras. La identificación se obtuvo mediante la comparación de dos espectros del perfil de proteínas, el cual es único para cada especie. El espectro que se muestra en la Figura 10, contiene la información de la base de datos comercial de MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) de la muestra conocida de *L. paraplantarum* (espectro inferior) y el segundo corresponde al espectro generado de la espectrometría de masas de la cepa a identificar (espectro superior, Figura 10). En ambos espectros se detectaron de 10 a 20 picos de los iones de proteínas más abundantes en el espectro de masas. Los picos prominentes de iones se presentaron en la región entre 3,000 y 11,000 m/z, con los picos de mayor intensidad consistentemente en el intervalo de 3,000-8,000 m/z.

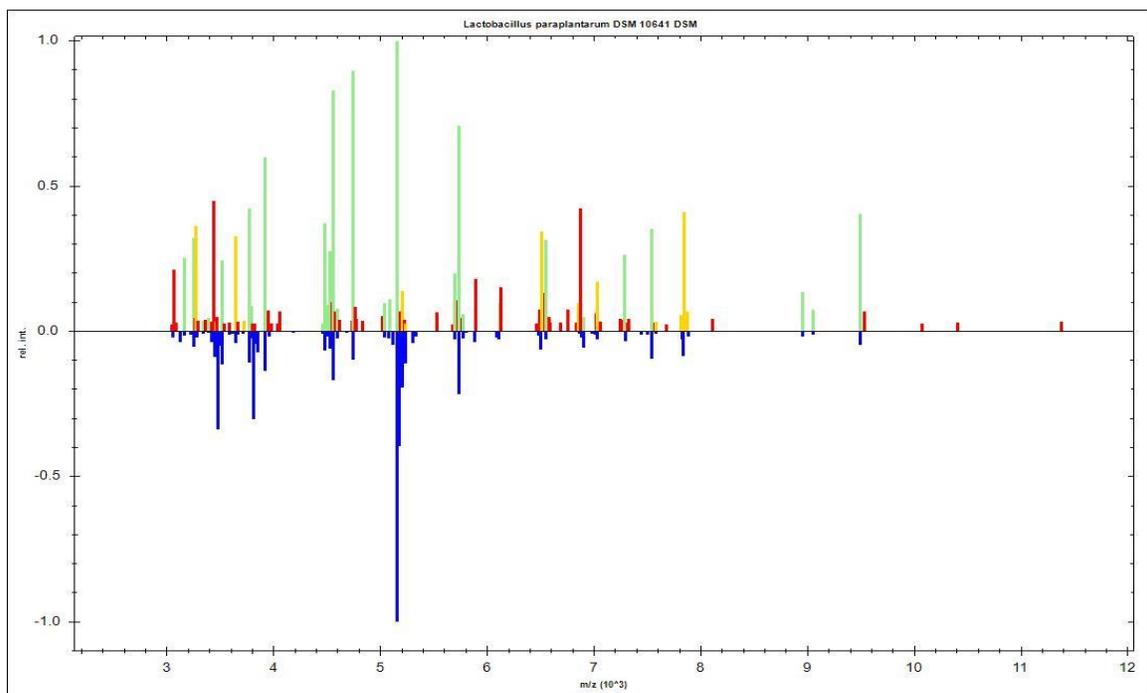


Figura 10. Descripción general de los espectros de masas MALDI-TOF de *Lactobacillus paraplantarum*.

El *software* con el cual cuenta Biotyper realiza la comparación de los picos (iones de proteínas) entre los espectros de masas obtenidos mediante una ecuación logarítmica, generando valores de 0 a 3, los cuales cuantifican la similitud entre la muestra analizada y la base de datos. Los resultados de la ecuación logarítmica para los espectros obtenidos se muestran en la Figura 11, por lo que se puede concluir que *L. paraplantarum* corresponde a la cepa aislada del salami, debido a que el espectro obtenido y el valor indicativo de fiabilidad es de 2.16, asegurando una identificación por género y especie.

Gama de valores	Descripción	Simbolos	Color
2.00 - 3.00	Identificación de alta confianza	(+++)	verde
1.70 - 1.99	Identificación de baja confianza	(+)	amarillo
0.00 - 1.69	Sin identificación posible	(-)	rojo

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Organismo (mejor candidato)	Puntuación Valor	Organismo (segundo mejor candidato)	Puntuación Valor
<u>J6</u> (+++)(A)	JHR 1.1 (standard)	Lactobacillus paraplantarum	2.16	Lactobacillus paraplantarum	1.95
<u>J7</u> (+++)(A)	JHR 1.2 (standard)	Lactobacillus paraplantarum	2.25	Lactobacillus paraplantarum	2.12
<u>J8</u> (+++)(A)	JHR 1.3 (standard)	Lactobacillus paraplantarum	2.22	Lactobacillus paraplantarum	2.21
<u>K6</u> (+++)(A)	JHR 2.1 (standard)	Lactobacillus paraplantarum	2.27	Lactobacillus paraplantarum	2.18
<u>K7</u> (+++)(B)	JHR 2.2 (standard)	Lactobacillus paraplantarum	2.19	Lactobacillus plantarum	2.04
<u>K8</u> (+++)(A)	JHR 2.3 (standard)	Lactobacillus paraplantarum	2.21	Lactobacillus paraplantarum	2.12

Figura 11. Significado del valor de puntuación MALDI-TOF MS.

Existen varios reportes que han realizado la comparación sobre el rendimiento de MALDI-TOF MS con respecto a los métodos convencionales para la identificación de microorganismos. Seng y colaboradores (2009) realizaron un estudio en donde por medio de MALDI-TOF MS identificaron el 84.1% de microorganismos a nivel de especie. Cuando se producen discrepancias entre MALDI-TOF MS y los métodos de identificación convencionales, la secuenciación de 16S ARNr tiende a favorecer la identificación MALDI-TOF MS en la mayoría de los casos, lo que otorga a la espectrometría de masas MALDI-TOF una herramienta rápida, confiable y precisa para la identificación y diferenciación rutinaria de microorganismos. Siendo la única falla de la técnica MALDI-TOF MS, en la identificación de un microorganismo, la falta de espectros de referencia adecuados en la base de datos (Bourassa y Butler-Wu, 2015).

7.4 Actividad antagónica de *L. paraplantarum*.

Este ensayo consistió en estriar verticalmente al centro de la placa de agar TSB al 1.5% la cepa de estudio (*L. paraplantarum*) y de manera perpendicular se estriaron los microorganismos de interés en los alimentos, como se aprecia en la Figura 12. Cabe mencionar que la elección de medio TSB para esta prueba, se debió a que es un medio enriquecido para microorganismos aerobios no exigentes, siendo fundamental la presencia del fosfato de potasio y de sales en baja concentración en el medio, donde el primer compuesto actúa como amortiguador para el control del pH y las concentraciones bajas de sales provocan un ligero descenso del pH en el medio (Contreras, 2013); por consiguiente la actividad antagónica observada no se debe al pH del medio sino a los compuestos producidos por *L. paraplantarum* durante la fermentación.

La cepa de estudio, *L. paraplantarum*, mostró actividad antagónica contra microorganismos patógenos como *Listeria innocua*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, (Figura 12). Estos patógenos presentes en los alimentos son considerados nocivos e incluso letales para las personas (Koochmaraie *et al.*, 2005). Además, presentó actividad antagónica contra un solo microorganismo responsable del deterioro en los alimentos, *Weissella viridescens*, el cual es bien conocido por causar deterioro en la superficie de productos cárnicos envasados al vacío (Martins *et al.*, 2016).

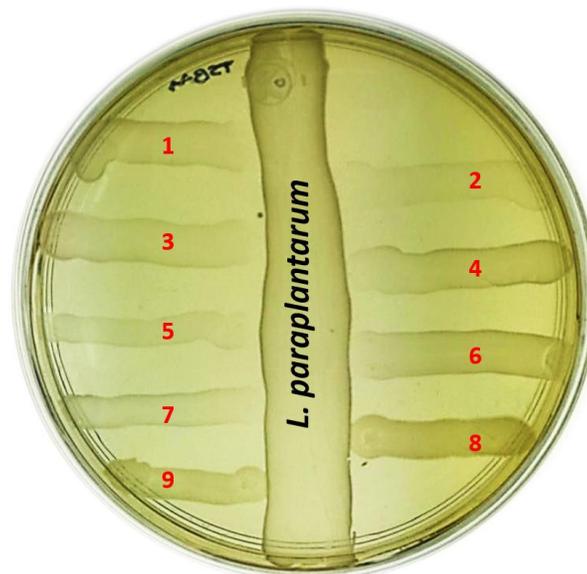


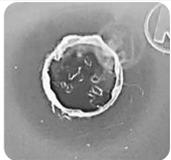
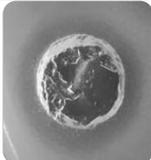
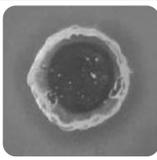
Figura 12. Actividad antagónica de *L. paraplantarum* en agar TSB contra microorganismos de interés en alimentos. 1, *Listeria innocua*. 2, *Weissella viridescens*. 3, *Salmonella* spp. 4, *Leuconostoc* spp. 5, *Escherichia coli*. 6, *Lactobacillus sakei*. 7, *Staphylococcus aureus*. 8, *Brochothrix thermosphacta*. 9, *Pseudomonas flourescens*.

7.5 Determinación de la actividad antimicrobiana.

La técnica de difusión en agar descrita por Liu y colaboradores (2014) se empleó para determinar la actividad antimicrobiana producida por los diferentes extractos obtenidos de *L. paraplantarum*, siendo EC, para el extracto crudo, ES-B, para el extracto semi purificado de bacteriocina y ES-PGH para el extracto semi purificado de PGH contra el microorganismo objetivo, *Listeria innocua*. En la Figura 13 se observan los halos de inhibición formados por cada uno de los extractos obtenidos, de los cuales, el de mayor actividad antimicrobiana lo presentó el EC, esta actividad antimicrobiana se atribuye a bacteriocinas y/o PGHs producidas por *L. paraplantarum* y no por ácidos orgánicos u otros productos finales de la fermentación, los cuales tienen influencia sobre la actividad inhibitoria, dado que lo anterior se eliminó al ajustar el pH a 7 del EC (Magnusson, 2003; Salminen, 2004).

Debido a la actividad antimicrobiana presentada por el EC, se realizó la extracción o semi purificación del compuesto antimicrobiano de bacteriocina (ES-B) debido a que algunos autores han encontrado genes relacionados con bacteriocinas en *L. paraplantarum* (Liu y Li, 2016). Asimismo se realizó la extracción o semi purificación de PGH (EPGH), con el fin de hallar si existe una o más PGHs que confieran dicha actividad antimicrobiana. Aunque no existen reportes de PGHs producidas por *L. paraplantarum*; Rolain y colaboradores (2012), así como van den Nieuwboer y colaboradores (2016) identifican PGHs en *L. plantarum*; cabe mencionar que existe una alta relación fenotípica y genómica entre *L. plantarum* y *L. paraplantarum* (Curk *et al.*, 1996). El EC fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana, seguido por el extracto de PGH y menor actividad antimicrobiana para el extracto de proteína ribosomal; siendo una actividad 1.6 veces mayor el extracto de PGH con respecto al de proteína ribosomal (Tabla 10).

Tabla 10. **Actividad antimicrobiana de extractos contra *L. innocua*.**

Muestra	Extracto crudo (EC)	Extracto semi purificado de PGH (ES-PGH)	Extracto semi purificado de bacteriocina (ES-B)	Nisina
Actividad antimicrobiana (mm halo de inhibición/mg proteína)	798.79	494.74	303.20	-----
Imagen de actividad antimicrobiana				

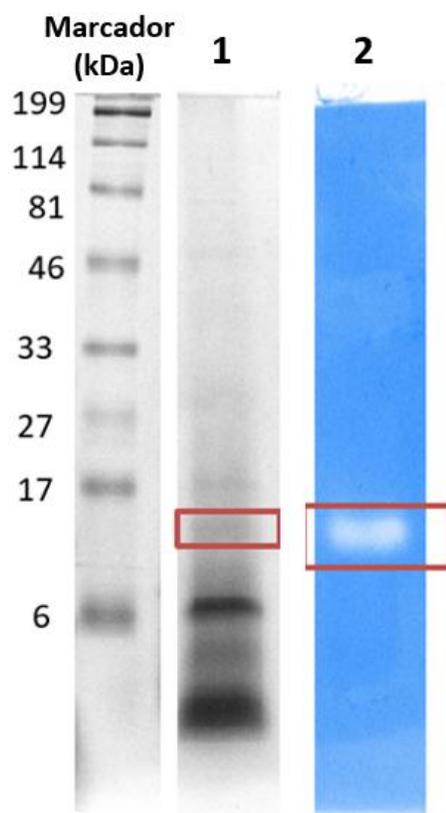
7.6 Perfil proteico para compuestos antimicrobianos tipo bacteriocinas y zimograma contra *M. lysodeikticus*.

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS se emplea para separar con mayor resolución aquellas proteínas con peso molecular entre 1 a 30 kDa (Haider *et al.*, 2012). Por esa razón, se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida Tris-Tricina-SDS al 16% para separar las proteínas de bajo peso molecular presentes en la muestra de ES-B. Los resultados del gel de poliacrilamida Tris-Tricina-SDS se observan en la Figura 13, donde se presentan bandas mayormente definidas por debajo de los 17 kDa. Por otro lado, en el zimograma del gel de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS al 16% (Figura 13), la muestra de ES-B presentó una banda traslúcida correspondiente a la actividad sobre el sustrato (células liofilizadas de *M. lysodeikticus*), con un peso molecular aparente menor a los 17 kDa respecto al marcador. Posteriormente, con base en los resultados obtenidos, se calculó el peso molecular aparente de la proteína con actividad antimicrobiana (Figura 13) utilizando el *software* Image Lab 6.0.1, obteniendo un peso molecular de 13.1 kDa.

Autores como da Silva Sabo y colaboradores (2014) reportan una lista de bacteriocinas producidas por *L. plantarum*, las cuales tienen un peso molecular que va de los 2.5 kDa a los 10 kDa. Salas (2018) identificó de la misma cepa una bacteriocina con un peso molecular alrededor a los 3 kDa; que a diferencia de lo obtenido en el presente trabajo, donde se identificó

una bacteriocina con un peso molecular aparente a los 13.1 kDa (Figura 13). Lo anterior podría estar relacionado a lo reportado por Amortegui y colaboradores (2014) para cepas de *L. plantarum*, en donde bacteriocinas identificadas con pesos moleculares entre 10 y 14 kDa se encuentran acompañadas por otras bacteriocinas con pesos moleculares alrededor de los 3.0 kDa. Cabe mencionar que puede haber una relación entre las bacteriocinas producidas por *L. paraplantarum* y *L. plantarum* debido a su estrecha relación genómica reportada por Curk y colaboradores en 1996.

Con los resultados obtenidos, la banda correspondiente a la actividad antimicrobiana en zimograma se cortó del gel Tris-Tricina-SDS-PAGE y se envió a identificar por espectrometría de masas al IRCM.



En la espera de los resultados de secuenciación se realizaron análisis *in silico* con base al peso molecular calculado de 13.1 kDa para identificar a la posible bacteriocina de acuerdo al peso molecular. En primer lugar, se utilizó la base de datos de bacteriocinas, BACTIBASE (Hammami *et al.*, 2010), en donde no se encontró ninguna bacteriocina con pesos moleculares entre 12.1 a 14.1 kDa, tanto para *L. plantarum* y *L. paraplantarum*. Posteriormente, se realizó un análisis *in silico* en el genoma de *L. paraplantarum* L-ZS9 (NCBI GenBank: CP013130.1) en busca de bacteriocinas presentes con un peso molecular similar al calculado anteriormente, donde no se encontró ninguna bacteriocina con pesos moleculares alrededor de los 13.1 kDa, solamente se encontraron tres proteínas de inmunidad bacteriocina identificadas como ALO03085.1, ALO05217.1 y ALO05227.1 con pesos moleculares de 12, 13.5 y 12.6 kDa, respectivamente. La biosíntesis de las bacteriocinas de las clases I y II se encuentra regulada por un sistema regulador de tres componentes (un factor de inducción, un regulador de respuesta y una proteína sensora), de modo que los determinantes genéticos de estas bacteriocinas poseen un tercer operon, que contiene los genes responsables de dicha regulación, dentro de estos se encuentran los genes de inmunidad que codifican para las proteínas de inmunidad de bacteriocina (Skuagen *et al.*, 2003). Por lo anterior, a pesar de no encontrar referencias bibliográficas de actividad antimicrobiana atribuidas a proteínas de inmunidad bacteriocina, la proteína en estudio podría estar asociada de acuerdo al análisis *in silico*, a una de las proteínas de inmunidad antes mencionadas.

7.6.1 Identificación de proteína de bajo peso molecular por espectrometría de masas.

Con base a los resultados obtenidos en el apartado anterior, se identificó a través del gel de poliacrilamida Tris-Tricina a la proteína de bajo peso molecular con actividad sobre sustrato en zimograma (Figura 13). Para la identificación se utilizó la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) en un equipo LTQ-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemania). Este análisis fue realizado en el Institut De Recherches Cliniques De Montréal (IRCM) en Montreal, Canadá. Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron entregados a través del *Software* proteómico Scaffold4 (versión 4.8.9.20181203, Proteoma Software Inc., Portland, OR).

Keller y colaboradores (2012) refieren que para validar la identificación de péptidos y proteínas enlistados en el *software* de Scaffold4, se deben establecer parámetros estandarizados en el *software*, los cuales son 3. Para el primero, se debe establecer mínimamente un 95% en el algoritmo peptid prophet, este refiere a la probabilidad de que los péptidos identificados por

espectrometría se encuentren en la secuencia de la proteína enlistada. En el segundo parámetro, se establece 99% como mínimo de probabilidad de que sea la proteína, en donde el programa utiliza el algoritmo protein prophet descrito por Nesvizhskii y colaboradores en 2003. Por último que la proteína identificada por Scaffold contenga en su secuencia al menos 5 péptidos identificados por espectrometría.

Con base a lo anterior, se obtuvo como resultado de la secuenciación de la proteína 50S ribosomal L14 (Figura 14), que fue identificada con 5 péptidos únicos exclusivos, derivados de la digestión de la proteína y se obtuvo un porcentaje de cobertura del 35% con una proteína de 122 aminoácidos en el genoma de *L. plantarum* WCFS1. Ésta proteína tuvo un peso molecular experimental de 13 kDa, dato que es similar con el peso molecular aparente calculado mediante el *software* Image Lab 6.0.1, el cual fue de 13.1 kDa. En el año 2010, de Carvalho y colaboradores identificaron por primera vez una proteína ribosomal con actividad antimicrobiana aislada de *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 23 K. Posteriormente, Pidutti y colaboradores (2017) descubrieron otras proteínas ribosomales con actividad antimicrobiana, la L27 y L30, las cuales fueron aisladas de *Lactobacillus salivarius* SGL 03 con actividad antimicrobiana. Finalmente, García-Cano y colaboradores (2019) identifican a partir de *Pediococcus acidilactici* OSU-PECh-3A a la 50S proteína ribosomal L36 con actividad antimicrobiana. Aunque aún no está claro el mecanismo de acción de las proteínas ribosomales con actividad antimicrobiana, se tiene una hipótesis en donde estas proteínas ribosomales interfieren en el ensamblaje y función ribosomal, dificultando así la síntesis de proteínas, llevando así a la muerte celular de bacterias (Pidutti *et al.*, 2017).

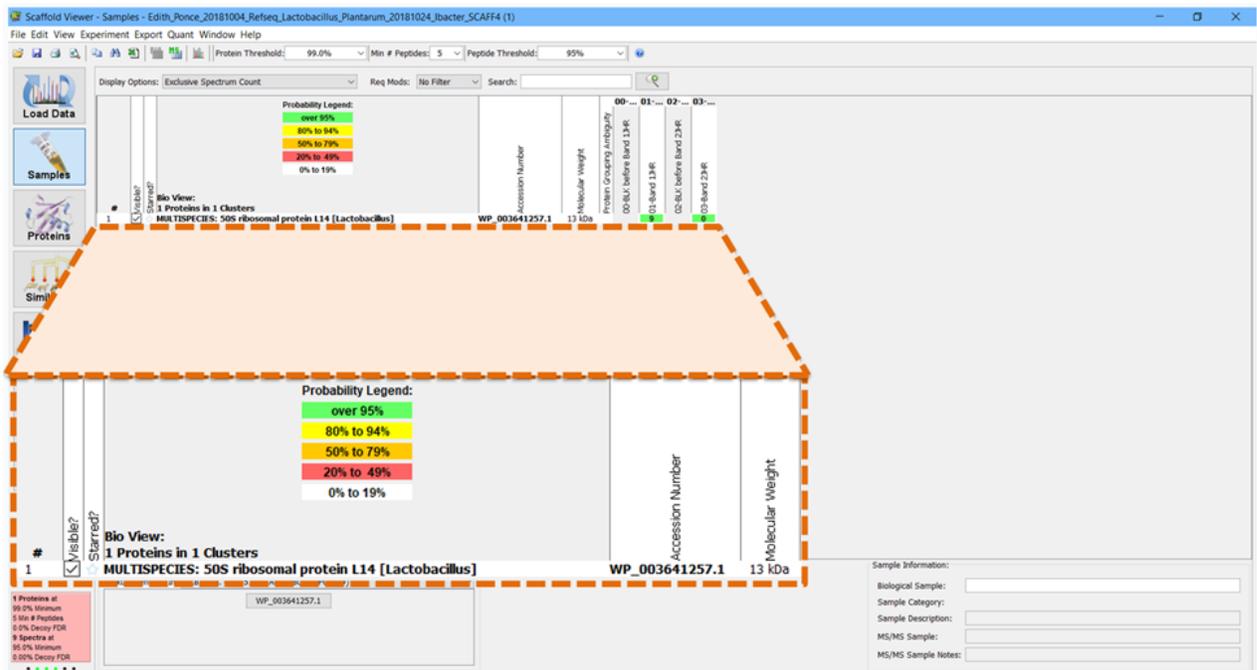


Figura 14. Resultado general de las proteínas identificadas en el análisis mediante el Software de Scaffold 3.

Por otra parte, se realizó un análisis *in silico* en el genoma de *L. paraplantarum* L-ZS9 (NCBI GenBank: CP013130.1) donde se encontraron tres posibles proteínas de inmunidad bacteriocina de acuerdo con el peso molecular aparente de 13.1 kDa. Se realizó por medio de la plataforma MultAlin (Multiple sequence alignment, 1988) un alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de los péptidos identificados en espectrometría de masas y las posibles proteínas de inmunidad bacteriocina, obteniendo como resultado ningún alineamiento entre las secuencias, quedando completamente descartado que la actividad antimicrobiana proceda de una bacteriocina. Mientras que el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los péptidos identificados por espectrometría de masas mostraron un alineamiento con la secuencia en aminoácidos de la 50S proteína ribosomal L14 identificada en el genoma de *L. paraplantarum* L-ZS9 (NCBI GenBank: CP013130.1)

7.7 Perfil proteico para compuestos antimicrobianos tipo PGHs y zimograma contra *M. lysodeikticus*.

Una vez determinada la actividad antimicrobiana del ES-PGH se utilizó la técnica de electroforesis para obtener el perfil proteico mediante un gel de poliacrilamida Tris-Glicina-SDS

al 10%. Este gel se muestra en la Figura 15, en donde se observan en el carril 1, correspondiente al ES-PGH concentrado, una banda con peso molecular aparente de 66.2 kDa con respecto al marcador de peso molecular utilizado. Así mismo, en el zimograma de Tris-Glicina-SDS-PAGE (Figura 15), la muestra de ES-PGH concentrado presentó una banda traslúcida correspondiente a la mencionada anteriormente en el gel poliacrilamida inferior a los 75 kDa respecto al marcador empleado, indicando la actividad lítica sobre el sustrato de células liofilizadas de *M. lysodeikticus*. La banda puede corresponder a una peptidoglucano hidrolasa (PGH), debido a que se han encontrado PGHs con un peso molecular alrededor de los 60 a 110 kDa para *L. plantarum* (van den Nieuwboer *et al.*, 2016; Rolain *et al.*, 2012).

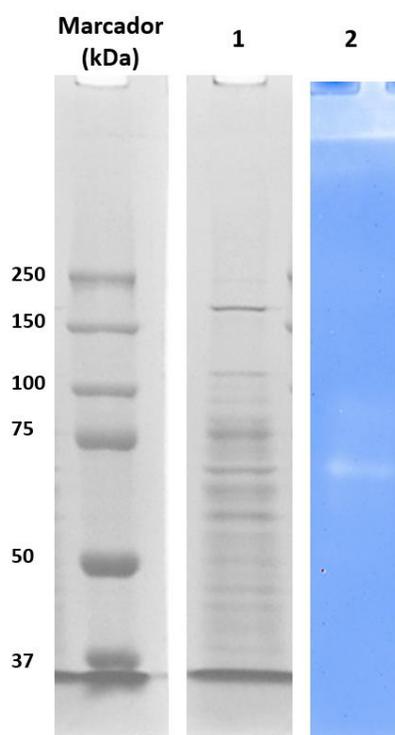


Figura 15. Gel de poliacrilamida para la identificación de proteínas de alto peso molecular. Marcador: Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad). Carril 1, Tris-Glicina al 10%. Carril 2, zimograma con *M. lysodeikticus* en Tris-Glicina al 10%. Carril 1 y 2, extracto semi purificado y concentrado de PGH (ES-PGH) de la cepa *L. paraplantarum*.

Se calculó el peso molecular aparente de la banda que mostró actividad antimicrobiana (Figura 15, carril 1) por medio del *Software Image Lab 6.0.1*, el cual fue de 66.2 kDa. Lo anterior, sirvió como base para realizar un análisis *in silico* en el genoma de *L. paraplantarum* L-ZS9 (NCBI GenBank: CP013130.1). La búsqueda en el genoma se restringió a localizar únicamente PGHs con el peso molecular similar al calculado anteriormente. En la búsqueda se encontró una muramidasa (NCBI Protein id: ALO05578.1), cuyo peso molecular es de 67.2 kDa, por lo tanto,

se procedió a ratificar el tipo de PGH mediante la especificidad de sustrato, es decir, a partir de la determinación de la actividad de *N*-acetilmuramidasa, como se menciona en el siguiente apartado (7.7.1).

7.7.1 Actividad de *N*-acetilmuramidasa.

Las PGHs se clasifican según el tipo de enlace que hidrolizan. Dentro de las tres clases principales, se incluyen las glucosidasas, las amidasas y las peptidasas. En el grupo de las glucosidasas se encuentra la *N*-acetil- β -D-muramidasa o muramidasa que hidrolizan los enlaces β -1,4-glucosídicos entre los residuos *N*-acetilmurámicos y *N*-acetilglucosamina del peptidoglucano presente en la pared celular de los microorganismos (López-Arvizu *et al.*, 2019; Layec *et al.*, 2008). Por consiguiente, se identificó la especificidad de sustrato del extracto semi purificado de PGH (ES-PGH) mediante el ensayo de *N*-acetilmuramidasa, el cual se basa en una prueba colorimétrica del ácido murámico libre que depende de la hidrólisis del peptidoglucano liofilizado presente en la reacción por la *N*-acetilmuramidasa proveniente del ES-PGH. Los residuos generados de ácido murámico libre son degradados a ácido láctico, este último es oxidado a acetaldehído mediante el tratamiento térmico con ácido sulfúrico concentrado, donde el acetaldehído reacciona con el 4-fenilfenol dando un cromógeno púrpura en presencia de los iones metálicos del sulfato de cobre y cuya absorbancia es leída a 570 nm (Hadzija, 1974; Barnett, 1951; Barker y Summerson, 1941). En la Figura 16 se observan los resultados de la prueba de especificidad por sustrato (*N*-acetilmuramidasa), siendo positiva para el extracto semi purificado de PGH (ES-PGH) y para el control positivo (lisozima). Por otro lado, en caso contrario, la prueba resultó negativa para el control negativo. Estos resultados atribuyen a que la actividad antimicrobiana del compuesto de alto peso molecular se debe a una muramidasa. Con base a lo anterior y a lo discutido en el apartado 7.7, se secuenció la banda correspondiente al peso molecular de 66.2 kDa del gel de poliacrilamida Tris-Glicina-SDS.

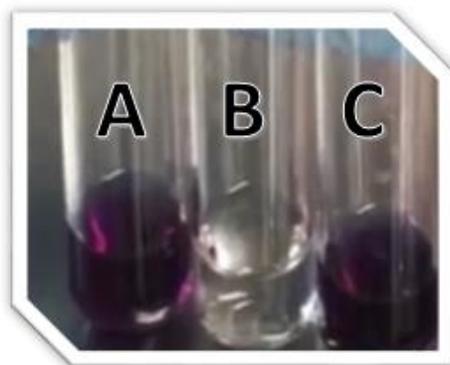


Figura 16. Resultado de la prueba de *N*-acetilmuramidasa. A, Extracto semi purificado PGH de *Lactobacillus paraplantarum*. B, Control negativo. C, Control positivo (lisozima).

7.7.2 Identificación de proteína de alto peso molecular por espectrometría de masas.

La identificación de la proteína de alto peso molecular con actividad antimicrobiana se llevó a cabo por espectrometría de masas, utilizando el método LC-MS/MS con ionización por electrospray. Se identificaron dos péptidos que pertenecen a la proteína chaperona DnaK (Figura 17, Anexo B), los cuales tiene un 91% y un 100% de identidad con respecto a la proteína chaperona DnaK (NCBI Protein id: AYJ38813.1) encontrada en el genoma *L. paraplantarum*. Además se obtuvo un porcentaje de cobertura del 6.62% con una proteína de 619 aminoácidos y un peso molecular teórico de 67.2 kDa.

La identificación resulta contradictoria a la proteína que se suponía era una muramidasa, de acuerdo al resultado positivo por especificidad de sustrato y al análisis *in silico* en el genoma de *L. paraplantarum* para muramidasa, discutido en los apartados anteriores. Sin embargo, para no descartar la probabilidad de la identificación de una nueva proteína con actividad antimicrobiana, como ocurrió con la proteína 50S ribosomal L14, se realizó una investigación bibliográfica de proteínas chaperonas con actividad antimicrobiana, del cual no se encontró ningún antecedente. Cabe mencionar que la función de la proteína chaperona DnaK es promover el plegamiento y desagregación de proteínas dentro de la célula (Fredriksen *et al.*, 2013).

Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW (kDa)	calc. pI				
ABA1992594	Chaperone protein DnaK, <i>CeL</i> , <i>Leishmania paraplantarum</i> CV-40	67.63	6.62	1	2	2	8	619	67.2	4.58				
	all			# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCn	XCn	Charge	Mw (kDa)	ΔM (ppm)	RT (min)	# Missed Cleavages
	High			1	1	ABA1992594	1426(Oxidation)	0.0000	5.07	-3	2335.29038	-47.45	34.34	0
	High			18	1	ABA1992594		0.0000	4.14	2	1944.85527	236.50	28.38	0

Figura 17. Resultado general de las proteínas identificadas en el análisis mediante LC-MS/MS por electrospray.

Con base a lo discutido anteriormente, la muramidasa, es una proteína que se encuentra glicosilada, debido a la modificación postraduccional que sufren algunas proteínas como parte importante de la regulación de los procesos celulares, incluida la localización celular de las proteínas, regulación de la función de proteínas y la formación de complejos de proteínas. La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más desafiantes que entorpecen la identificación de proteínas por espectrometría de masas, debido a la variabilidad en los glucanos unidos. A menudo, los glucanos se eliminan mediante glucosidasas y su estructura de ramificación se determina por separado de la proteína. Como desafío en la identificación de proteínas glicosiladas, es que los glucanos intactos también son modificaciones de alto peso

molecular (hasta varios miles de Da), que pueden desplazar los pesos moleculares de los péptidos. A menudo, los péptidos glicosilados no aparecen en los espectros de digestión de la proteína, además de que los péptidos glicosilados también son difíciles de extraer de los geles PAGE (Parker *et al.*, 2010; Latousakis y Juge, 2018).

Fredriksen y colaboradores (2013) analizaron a través de la espectrometría de masas Orbitrap XL las células de *L. plantarum* WCFS1, en busca de proteínas glicosiladas, mejorando la metodología para la identificación de estas proteínas. Estos autores utilizaron un método, basado en la fragmentación por colisión con mayor energía del espectro de masas, también llamado Orbitrap XL (Higher-energy Collisional Dissociation, HCD), para generar iones glicano y así obtener información de una secuenciación de péptidos significativa que pudiera ser utilizada para la identificación de nuevas glicoproteínas. Ellos identifican diez proteínas glicosiladas, dentro de las cuales dos eran proteínas peptidoglucano hidrolasas.

Con base a lo anterior, se propone como perspectiva para la identificación de la “muramidasa”, la identificación mediante la técnica de espectrometría de masas Orbitrap XL (HCD). Esta técnica presenta un alto rendimiento de detección, debido a que induce la fragmentación en sus componentes más pequeños. La mayoría de las técnicas de disociación en espectrometría de masas se basa en analizadores de masas específicos, aunque algunas técnicas se combinan con distintos procesos de ionización, tal es el caso de la disociación HCD, la cual se usa para fragmentar los iones, después estos son acelerados y se almacenan dentro de una trampa. Posteriormente, los iones se inyectan y separan dentro del Orbitrap en función de sus diferencias de rotación (Ford *et al.*, 2015).

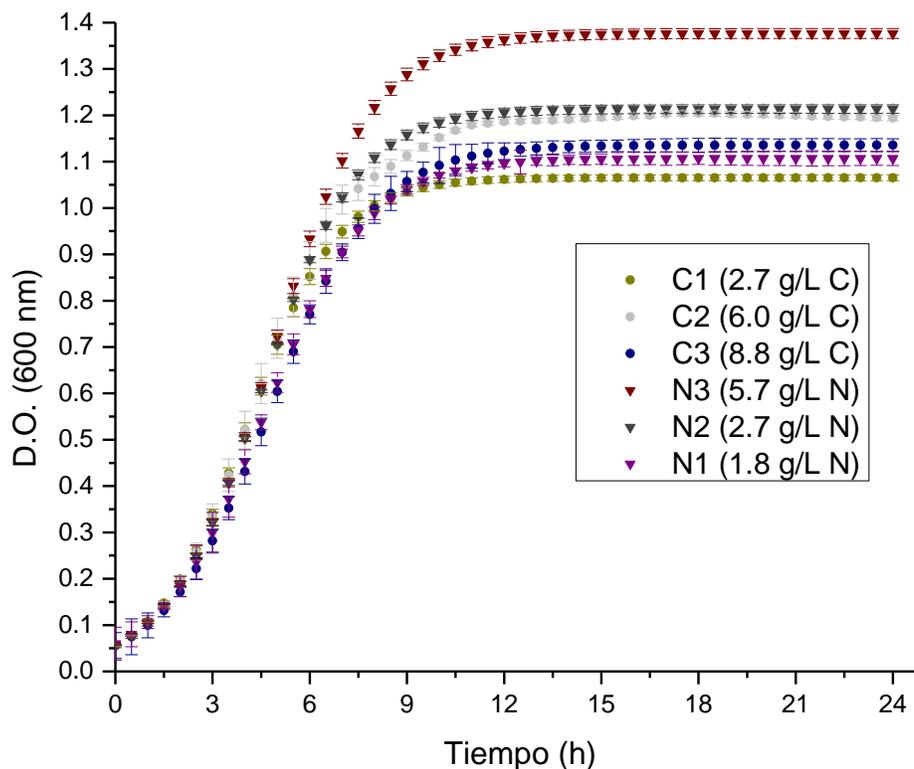
7.8 Efecto de la concentración de nitrógeno y carbono en el crecimiento de *L. paraplantarum*.

Uno de los factores que afectan la fermentación de las BAL, así como su crecimiento, es la concentración de sustratos empleados en los medios de cultivo, principalmente la concentración de la fuente de carbono y de nitrógeno. Como se mencionó anteriormente, con el fin de evaluar el efecto de la concentración de carbono y nitrógeno en el crecimiento de *L. paraplantarum* en el medio de cultivo (CGB), se trabajaron diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno.

Los resultados obtenidos para las distintas concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo (CGB) presentaron un comportamiento similar en el crecimiento de *L. paraplantarum*

(Figura 18), mostrando así la capacidad del microorganismo en adaptarse y crecer bajo diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno. En cuanto al efecto de la fuente de carbono, en la condición C3 (mayor concentración de carbono) hubo un incremento en el crecimiento de *L. paraplantarum* con una D.O.600nm de 1.1462 en comparación con la condición C1 (menor concentración de carbono), la cual presentó un crecimiento con una D.O.600nm de 1.0728. A pesar de haber un ligero incremento en el crecimiento de la cepa, no hubo diferencia significativa entre estos dos tratamientos, pero si con respecto a la condición C2 (Tabla 11). Con respecto a la condición control (C2), se esperaba un incremento del crecimiento de *L. paraplantarum* en la condición C3 (mayor concentración de carbono), debido a la mayor disposición de carbono en el medio de cultivo y así el crecimiento el microorganismo se vería beneficiado al obtener mayores fuentes de energía (Abbasiliasi *et al.*, 2017). Sin embargo, la disminución del crecimiento microbiano en la C3 con respecto a la C2, se puede explicar al efecto de la presión osmótica en el crecimiento bacteriano, donde el medio de cultivo presenta una concentración de solutos mayor que la concentración intracelular, provocando pérdida de agua en la célula y en consecuencia se ve inhibido el crecimiento bacteriano (Rodríguez *et al.*, 2005). Otro factor que pudiese haberse presentado es la represión catabólica, esta permite a las células utilizar principalmente a los nutrientes más eficientes para su crecimiento, como la glucosa. Sin embargo, esto tiene un costo, ya que el cambio a nutrientes no preferidos de carbono requiere la eliminación de la represión (desrepresión) de genes específicos para la síntesis de enzimas involucradas directa o indirectamente en el uso de fuentes de carbono más complejas, como la lactosa y durante esta transición las células deben dejar de dividirse temporalmente provocando un retraso en su crecimiento (New *et al.*, 2014; Lengeler, 2001).

El crecimiento microbiano también es afectado por la concentración de nutrientes en el medio del cultivo. A menudo se consideran como sustratos limitantes en el medio a las fuentes de



carbono y nitrógeno. Altas concentraciones de sustrato en el medio, puede inhibir el crecimiento microbiano, llamado, inhibición por sustrato. Es decir, aunque el medio e cultivo se mejore mediante la adición de algún nutriente, puede ser difícilmente absorbido por la célula al haber un exceso de este nutriente. Esto pudiese estar pasando en la condición C3, al haber incrementado la concentración de carbono en el medio como se muestra en la Figura 18, donde el crecimiento fue menor, en comparación a la condición C2 (control), la cual contiene la concentración de carbono que aporta el medio CGB (Doran, P.M, 2013; Khay *et al.*, 2013).

Figura 18. Crecimiento de *L. paraplantarum* en medio CGB bajo diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno: C1, baja concentración de carbono; C2, control concentración de carbono; C3, alta concentración de carbono; N1, baja concentración de nitrógeno; N2, control concentración de nitrógeno y N3, alta concentración de nitrógeno.

En cuanto al efecto de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, la condición que contenía mayor concentración de fuentes de nitrógeno (N3) fue la que produjo el máximo crecimiento de *L. paraplantarum* ($D.O._{600nm}=1.3885$); en contraste con la condición de que

contenía la menor concentración de fuente de nitrógeno (N1) cuyo crecimiento fue con una D.O. (600nm) de 1.0819. Con base a lo anterior, se puede observar que la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo afecta el crecimiento de *L. paraplantarum*, esto se puede deber a lo reportado por Sepahy y Jabalameli en 2011, en donde el incremento del crecimiento de un cultivo es influenciado por la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, obteniendo un mayor crecimiento al utilizar extracto de levadura, seguido por licor de maíz fermentado, extracto de carne, proteína de suero y peptona como fuente de nitrógeno; por lo que el incremento de crecimiento microbiano en el presente trabajo se puede deber al incremento de la concentración de los compuestos de extracto de levadura y peptona biotriptasa, los cuales constituyen mayoritariamente al medio CGB. Las fuentes de nitrógeno proporcionan al medio de cultivo aminoácidos libres y péptidos que son proporcionados, estos al estar en el medio de cultivo son absorbidos por la célula, favoreciendo la producción de proteasas ancladas a la pared celular, generando un uso más eficiente de las fuentes de nitrógeno mejorando la permeabilización de los péptidos de gran tamaño por su hidrólisis extracelular, lo que conlleva a un mayor y rápido crecimiento celular, así como la síntesis de proteínas, para llevar a cabo sus funciones metabólicas (Abbasiliasi *et al.*, 2017; Leveau y Bouix 2000).

La constante de velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}) es empleada para interpretar el comportamiento de una población en determinadas condiciones de cultivo. Su valor depende principalmente de la composición y concentración de nutrientes en el medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH. Los resultados de las μ_{max} para cada una de las condiciones utilizadas se muestran en la Tabla 11, donde la condición C3 presentó un mayor valor en relación con las otras concentraciones de carbono (C1 y C2). Por otra parte, para las condiciones con diferentes concentraciones de nitrógeno, se obtuvo una mayor μ_{max} para N3 con relación a N1 y N2, las cuales no presentaron diferencias significativas (Tabla 11). Esto quiere decir que al incrementar μ_{max} , la cantidad de células que se generan por mL de medio de cultivo por unidad de tiempo será mayor, lo cual se verá reflejado también en un mayor crecimiento del cultivo como se muestra en la Figura 18, donde las condiciones C2 y N2 presentaron mayor crecimiento en el medio de cultivo, debido a lo discutido anteriormente para cada una de las condiciones.

Tabla 11. **Velocidades específicas de crecimiento y crecimiento máximo en diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno en medio CGB.**

Parámetro	Condición					
	C1 (2.7▲)	C2 (6.0▲)	C3 (8.8▲)	N1 (1.87▲)	N2 (2.7▲)	N3 (5.7▲)

D.O. máx.	1.0733 ^a	1.2029^b	1.1467 ^c	1.0824 ^d	1.1993^e	1.3890 ^e
μ max (h ⁻¹)	0.4251 ^a	0.4438^b	0.4575 ^c	0.4950 ^d	0.4460^e	0.4831 ^f

Donde: ▲, especifica la concentración en g/L.

Letras desiguales significan que existe diferencia significativa.

Los valores se obtuvieron ajuntando los datos de crecimiento al modelo de Gompertz en el programa NCSS V.97.

Los valores se analizaron estadísticamente en el programa SPSS V.18 mediante una ANOVA de 1 factor.

El resumen de los resultados del análisis estadístico se encuentra en el Anexo C. Primero, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor del crecimiento máximo (Tabla 11), este análisis estadístico mostró que hay diferencia significativa en el crecimiento de *L. paraplantarum* al variar la concentración de carbono y nitrógeno en el medio, solamente no presentó diferencia significativa entre las condiciones C2 y N2, las cuales son los controles, al no haber mantenido la concentración de carbono y nitrógeno aportada por el medio de cultivo. En cuanto a los valores de μ_{max} , las condiciones N1 y N2 fueron las únicas que no presentaron diferencia significativa. Por otro lado, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores como se muestra en la Tabla 16 en donde hubo diferencia significativa entre el crecimiento de *L. paraplantarum* bajo las diferentes concentraciones en el medio de cultivo (carbono y nitrógeno) y el tiempo de fermentación.

Por último, se compararon las medias obtenidas por método de Duncan (Tabla 12) del crecimiento de *L. paraplantarum* en los diferentes tratamientos de carbono y nitrógeno, obteniendo únicamente diferencia significativa en el tratamiento N3, mayor concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, el cual fue el tratamiento con un mayor crecimiento como se muestra en la Figura 18.

Tabla 12. Resumen de las comparaciones de medias por Duncan del crecimiento de *L. paraplantarum*.

	Condición					
	C1	C2	C3	N1	N2	N3
D.O. a 600 nm	0.875143 ^{a,b}	0.955424 ^b	0.898008 ^{a,b}	0.861612 ^a	0.962478 ^b	1.08730 ^c

Medias con diferentes letras de subíndice representan diferencia significativa (Pr<0.05)

7.9 Efecto de la concentración de nitrógeno y carbono en la actividad antimicrobiana de *L. paraplantarum*.

En la fermentación láctica se requiere de la fuente de carbono y nitrógeno tanto para el crecimiento del microorganismo como para la formación de los productos finales. Entre ellos compuestos antimicrobianos, por ejemplo, ácido láctico, bacteriocinas, peptidoglucano hidrolasas (Abbasiliasi *et al.*, 2017; Contreras, 2013). Anderson y Jayaraman (2003) observaron que existe una relación directa entre la producción de compuestos antimicrobianos que se ve reflejada en la actividad antimicrobiana y el crecimiento celular, es decir, al incrementar el crecimiento celular, se incrementaba la actividad antimicrobiana. Sin embargo, esto no se obtuvo en el presente trabajo, donde la condición C2 (control) presentó un incremento en el crecimiento de *L. paraplantarum* (Figura 18) en comparación con la condición C1 (menor concentración de carbono), por lo que se esperaría una mayor actividad antimicrobiana para la condición C2. No obstante, la condición C2 presentó menor actividad antimicrobiana con respecto a la condición C1 (Figura 19). Es probable que esté incremento en la actividad antimicrobiana de la condición C1 se deba a los aminoácidos libres y los factores de crecimiento presentes en la fuente de nitrógeno, los cuales estimularan la producción de los compuestos antimicrobianos (Abbasiliasi *et al.*, 2017).

Por otro lado, como se muestra en la Figura 19, durante toda la fermentación se obtuvo la mayor actividad antimicrobiana para la condición C3 (mayor concentración de carbono) este hecho puede estar relacionado a una rápida adsorción de la glucosa, fuente principal de carbono, que se encuentra en mayor proporción en la condición C3 y es utilizada rápidamente para la formación de productos, por lo tanto de compuestos antimicrobiano, esto se puede observar en la Figura 19, donde la condición con mayor concentración de carbono produjo una mayor actividad antimicrobiana y por ende mayor compuestos antimicrobianos durante las primeras 9 h. Otra observación con respecto a la actividad antimicrobiana producida en la condición C3, es que esta presentó un menor crecimiento en comparación con la concisión C2 (control), por lo que se esperaría una menor actividad antimicrobiana para la condición C3, ya que como lo mencionan Anderson y Jayaraman (2003), existe una relación entre el crecimiento microbiano y la producción de compuestos antimicrobianos. Así mismo, al haberse disminuido el crecimiento de *L. paraplantarum* en la C3 por una inhibición por sustrato, también se hubiera visto disminuida la actividad antimicrobiana como lo mencionan Khay y colaboradores (2013). Sin embargo, este incremento en la actividad antimicrobiana por la condición C3 en comparación con la condición C2 (control), puede atribuirse a un mecanismo de síntesis de

metabolitos como bacteriocinas inducido por *L. paraplantarum* en condiciones de estrés, este estrés es consecuencia al incremento en la concentración de nutrientes presentes en el medio, en este caso, el incremento en la concentración de la fuente de carbono (Da Costa *et al.*, 2019)

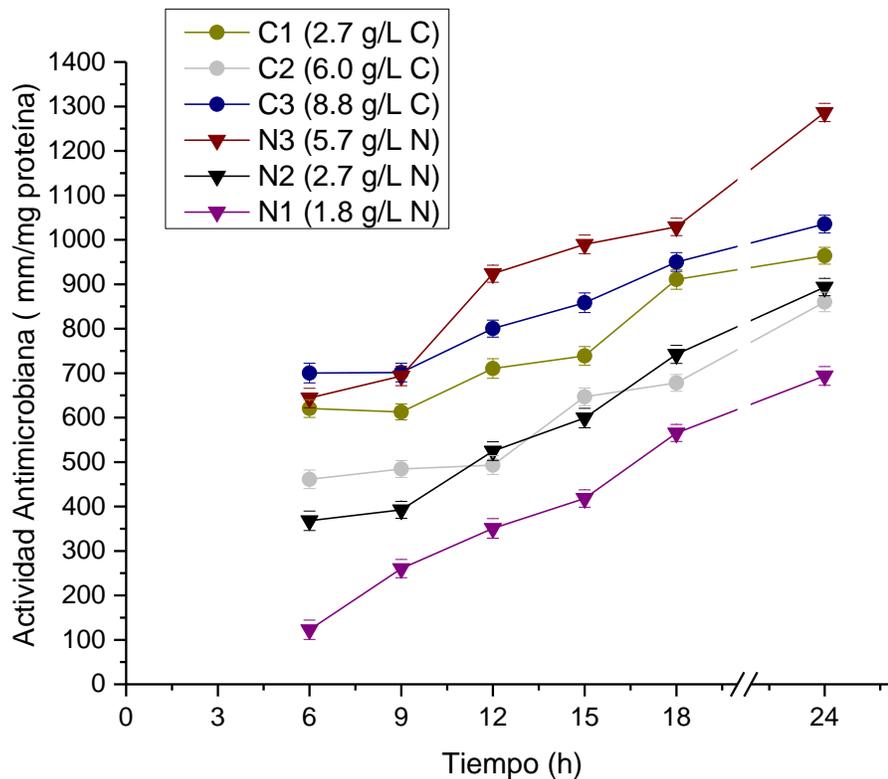


Figura 19. Actividad antimicrobiana de *L. paraplantarum* en medio CGB bajo diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno: C1, baja concentración de carbono; C2, control concentración de carbono; C3, alta concentración de carbono; N1, baja concentración de nitrógeno; N2, control concentración de nitrógeno y N3, alta concentración de nitrógeno.

En cuanto al efecto de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo sobre la actividad antimicrobiana, la condición N3 (Figura 19) obtuvo la mayor actividad antimicrobiana en relación con la condición N2 y N1. Pantev y colaboradores en el 2002 demostraron que el aumento en la fuente de nitrógeno contribuye al incremento de la producción de compuestos antimicrobianos. Esto concuerda con los resultados obtenidos (Figura 19), debido a que hubo una mayor producción de compuestos antimicrobianos, es decir, incrementó la actividad antimicrobiana de *L. paraplantarum* al aumentar la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. Lo anterior se debe a la mayor disposición de aminoácidos y péptidos principalmente, así como carbohidratos y sales proporcionados por la fuente de nitrógeno (extracto de levadura,

extracto de carne, peptona, brotes de malta y soja) en el medio de cultivo, en este caso particular por el extracto de levadura y la peptona biotriptasa, los cuales actúan como inductores o precursores para la síntesis de compuestos antimicrobianos por BAL (Abbasiliasi *et al.*, 2017).

En la comparación de medias obtenidas por el método de Duncan de la actividad antimicrobiana de *L. paraplantarum* en los diferentes tratamientos de carbono y nitrógeno (Tabla 13), se obtuvieron mayores actividades antimicrobianas en las condiciones N3 y C3, los cuales presentaron diferencia significativa con respecto al resto de las condiciones. Por otro lado, el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (Anexo C, Tabla 19) mostró que no hubo diferencia significativa entre las actividades antimicrobianas producidas por *L. paraplantarum* bajo las diferentes concentraciones en el medio de cultivo (carbono y nitrógeno) y el tiempo de fermentación.

Tabla 13. Resumen de las comparaciones de medias por Duncan de la actividad antimicrobiana de *L. paraplantarum*.

	Condición					
	C1	C2	C3	N1	N2	N3
Actividad antimicrobiana	759.6397 ^c	603.8924 ^b	840.8889 ^{c,d}	401.7453 ^a	586.5687 ^b	927.8514 ^d

Medias con diferentes letras de subíndice representan diferencia significativa (Pr<0.05)

7.10 Efecto de las concentraciones de nitrógeno y carbono en el pH de *L. paraplantarum*.

En la Figura 20 se observa una disminución del pH a partir de las 6 h de fermentación, la cual se prolonga al finalizar la misma en el medio de cultivo para todas las condiciones (C1, C2, C3, N1, N2 y N3). Este descenso de pH es debido a la producción de ácido láctico como producto mayoritario y final del metabolismo fermentativo de las BAL; en éste caso en particular, se debe al metabolismo heterofermentativo facultativo de *L. paraplantarum*, es decir fermenta casi en su totalidad a las hexosas proporcionadas por el medio de cultivo en ácido láctico (Parra-Huertas, 2010; De Angelis y Gobbetti, 2016). Así mismo, este descenso de pH repercute en la disminución del crecimiento celular, debido a que los valores bajos pH tienen efecto sobre la membrana plasmática del microorganismo, la inhibición en la actividad enzimática y la alteración

en la ionización de sustratos, lo que reduciría su disponibilidad para el crecimiento microbiano (Willey *et al.*, 2009). Esto se puede observar mejor en el caso de las diferentes concentraciones de carbono en el medio de cultivo (C1, C2 y C3), donde la condición C1, con baja concentración de carbono en el medio de cultivo, produjo el menor descenso de pH debido a la pequeña producción de ácido láctico al tener menor disposición de fuentes de carbono en el medio de cultivo. Por consiguiente, al haber un menor decaimiento de pH en la C1, se esperaría que el crecimiento microbiano no se hubiera afectado, obteniendo un mayor crecimiento al resto de las condiciones, sin embargo, la baja concentración de la fuente de carbono limita el crecimiento microbiano (Abbasiliasi *et al.*, 2017).

Una de las clasificaciones de las BAL está dada por el tipo de fermentación de carbohidratos que llevan a cabo; el primero, es homofermentativo, caracterizándose por la producción casi exclusiva de ácido láctico y heterofermentativo, en donde además de la producción de ácido láctico se producen otras sustancias (Parra-Huertas, 2010). La producción de ácido láctico provoca un descenso del pH en el medio de cultivo. En la Figura 20 se observa un mayor descenso de pH en la condición C3 (mayor concentración de carbono) y menor descenso en la condición C1 (menor concentración de carbono), esto se puede deber a que la C1 al tener un mayor contenido de carbohidratos (glucosa) disponibles en el medio de cultivo, este será transformado mayoritariamente en ácido láctico como producto final. Sin embargo, a pesar de lo señalado anteriormente, las condiciones N1 y N2, menor concentración de nitrógeno y control sin modificación de concentración de nitrógeno, respectivamente, presentaron una ligera disminución de pH en el medio de cultivo en comparación con las diferentes condiciones de concentración de carbono. El descenso de pH en las condiciones N1 y N2 puede deberse al metabolismo heterofermentativo de *L. paraplantarum*.

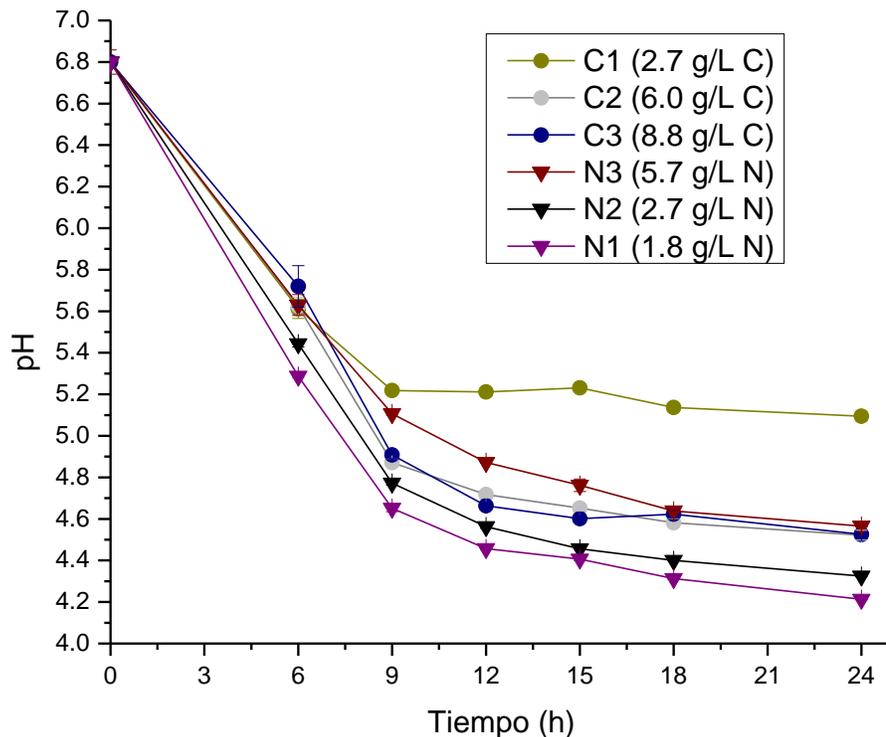


Figura 20. Variación en el pH en cinéticas de crecimiento de *L. paraplantarum* en medio CGB bajo diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno: C1, baja concentración de carbono; C2, control concentración de carbono; C3, alta concentración de carbono; N1, baja concentración de nitrógeno; N2, control concentración de nitrógeno y N3, alta concentración de nitrógeno.

Por otra parte, Abbasiliasi y colaboradores (2017) mencionan que existe una relación entre la producción de compuestos antimicrobianos y los valores de pH durante la fermentación. Lo anterior se observa en los resultados obtenidos, donde la mayor actividad antimicrobiana se produce a las 24 h de crecimiento de *L. paraplantarum* (Figura 19) y los valores de pH oscilan entre 4.2 y 5.1 (Figura 20); estos valores de pH se encuentran entre los valores de pH óptimo para las BAL, los cuales oscilan de 5.5 a 6.0, por lo tanto, las BAL tienen una mayor actividad antimicrobiana Todorov y Dicks (2006).

Las medias de pH calculadas para cada una de las condiciones durante el crecimiento de *L. paraplantarum* por el método de Duncan (Tabla 14), mostraron diferencia significativa solamente con el tratamiento C1, menor concentración de carbono en el medio de cultivo, siendo la condición con menor descenso de pH durante la fermentación en el medio cultivo, como se

muestra en la Figura 20. Por último, los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de dos factores como se muestra en la Tabla 19 (Anexo C), muestran diferencia significativa entre el pH presentado por *L. paraplantarum* en el transcurso de la fermentación bajo las diferentes concentraciones en el medio de cultivo (carbono y nitrógeno) y el tiempo de fermentación.

Tabla 14. Resumen de las comparaciones de medias por Duncan de la variación en el pH durante el crecimiento de *L. paraplantarum*.

	Condición					
	C1	C2	C3	N1	N2	N3
Variación de pH	5.4724 ^b	5.1097 ^a	5.1202 ^a	4.8753 ^a	4.9657 ^a	5.1848 ^a

Medias con diferentes letras de subíndice representan diferencia significativa ($P < 0.05$)

RESUMEN DE RESULTADOS

La Figura 21 recapitula la estrategia de trabajo experimental la cual comprendió de tres etapas, así como los resultados obtenidos. El objetivo de la primera etapa fue la identificación por métodos moleculares y espectrometría de masas de la cepa aislada de salami comercial, obteniendo como resultado a *L. paraplantarum*. La segunda etapa comprendió la extracción e identificación de los compuestos antimicrobianos producidos por *L. paraplantarum*, teniendo como resultado una proteína 50S ribosomal y una muramidasa, las cuales se identificaron mediante espectrometría de masas y sustrato específico, respectivamente. Por último en la tercera etapa, se determinó el efecto en la concentración de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo para la producción de compuestos antimicrobianos, obteniendo una mayor actividad antimicrobiana y crecimiento celular al incrementar la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo.

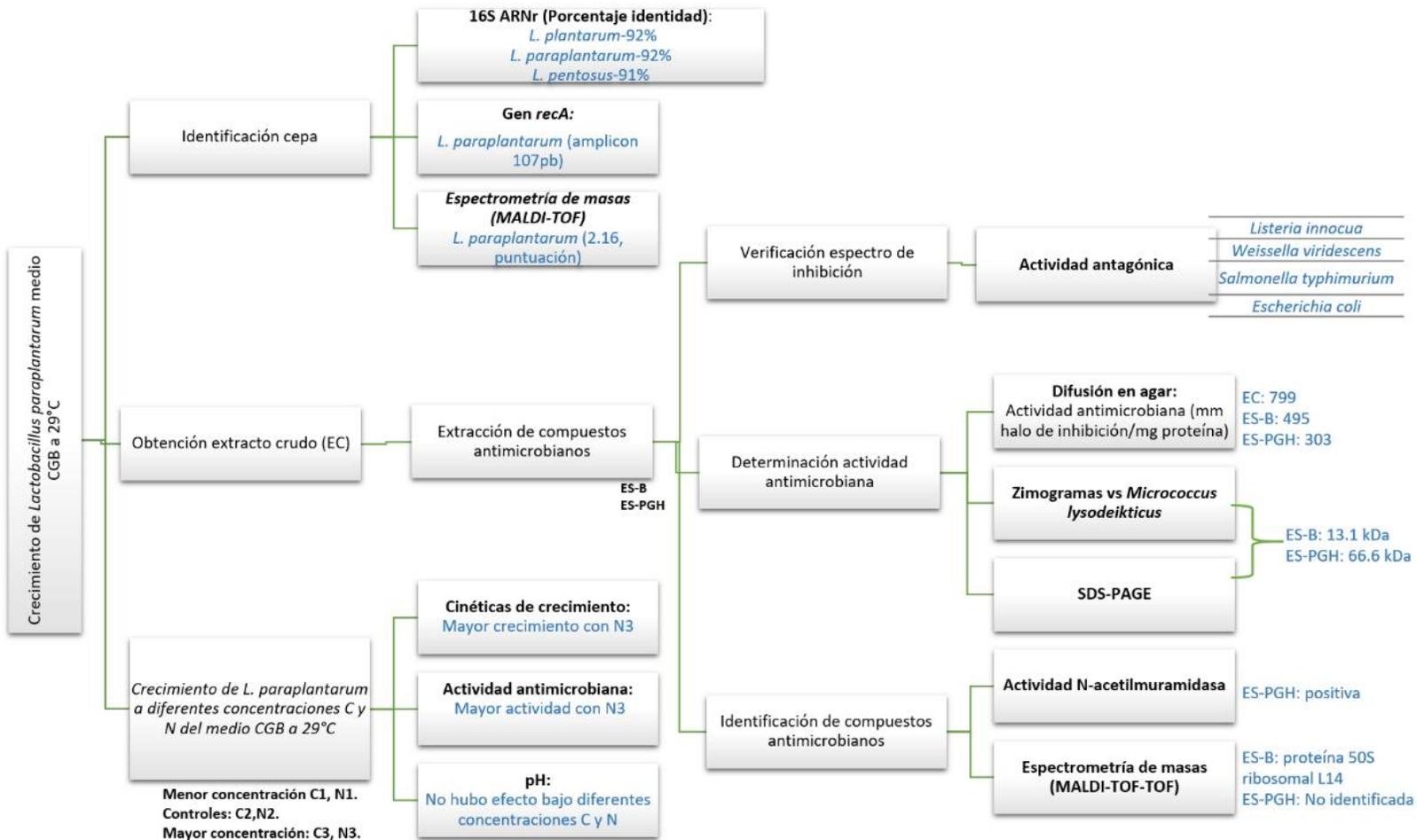


Figura 21. Esquema general de trabajo y resumen de resultados obtenidos. ES-B, extracto semi purificado de bacteriocina, ES-PGH, extracto semipurificado de PGH.

8. CONCLUSIONES.

El uso combinado de técnicas moleculares, como el gen 16S y de secuencias cortas del gen *recA*, permitieron la identificación de *L. paraplantarum*, la cual se rectificó mediante el análisis MALDI-TOF-MS.

L. paraplantarum presentó actividad antagónica contra microorganismos patógenos y de descomposición en alimentos como *Listeria innocua*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Weissella viridescens*.

El extracto libre de células y los extractos obtenidos de *L. paraplantarum* mostraron actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*, siendo 1.6 veces mayor en el extracto de PGH con respecto al de la proteína ribosomal.

Se detectaron dos bandas que presentaron actividad antimicrobiana con pesos moleculares de 13.1 y 66.6 kDa en geles de poliacrilamida. La primera banda corresponde a la proteína 50S ribosomal L14, identificada mediante secuenciación por espectrometría de masas y la segunda banda, a una muramidasa, identificada mediante la actividad específica por sustrato de *N*-acetilmuramidasa.

El incremento en la concentración de nitrógeno en el medio favoreció significativamente el crecimiento de *L. paraplantarum*. No obstante, la variación en la concentración de carbono en el medio disminuyó el crecimiento de la cepa con respecto al control.

La actividad antimicrobiana en *L. paraplantarum* incrementó significativamente al aumentar la concentración de nitrógeno o al variar la concentración de carbono en el medio de cultivo.

11. PERSPECTIVAS

Existen diversos estudios que han publicado sobre las sustancias antimicrobianas y su aplicación eficaz como antimicrobianos en los alimentos, ya sea como sustancias purificadas o por su aplicación directa como cultivos iniciadores en los alimentos. Por ejemplo, la pediocina, utilizada como bioconservador, inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. Por otra parte, la bacteriocina OR-7 encapsulada para la alimentación de pollos reduce al menos un millón de veces la población de *Campylobacter jejuni* en comparación a pollos no tratados con alimentos encapsulados de OR-7, ilustrando el potencial para utilizar estos compuestos en la alimentación animal.

Por otro lado, se han estudiado las características genéticas y moleculares de estas sustancias, aportando información relevante sobre los procesos de síntesis, transporte, mecanismos de acción, resistencia e inmunidad, por mencionar algunos. Es por ello, que los resultados obtenidos en el presente trabajo son relevantes, debido a la identificación de nuevas sustancias antimicrobianas producidas por la cepa de *L. paraplantarum* aislada del salami; resaltando la identificación de la 50S proteína ribosomal L14 debido al reciente descubrimiento de proteínas ribosomales con actividad antimicrobiana.

Por lo anterior, como perspectivas se proponen:

- La caracterización bioquímica de las sustancias antimicrobianas identificadas en el presente trabajo, para posteriormente llevar a cabo su aplicación como agentes de bioconservación en los alimentos.
- La clonación y expresión en un microorganismo heterólogo de los genes que codifican para la 50S proteína ribosomal L14 y la muramidasa, para así incrementar y controlar la producción de estas proteínas antimicrobianas.

12. BIBLIOGRAFÍA

Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Ibrahim, T.A.T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N.R., Mustafa, 468 S. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *Royal Society of Chemistry*. 7(47). 29395-29420.

Almanza, F. y Barrera, E. (1991). Tecnología de leche y derivados. Bogotá, *Unisur*. 61-66.

Alquicira P.L. (2006). Tesis de Maestría. Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Álvarez, C.Y.M. (2011). Tesis de Doctorado. Aspectos de seguridad de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aislados de productos cárnicos y caracterización molecular de sus bacteriocinas. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Alvarez-Cisneros, Y.M., Sáinz, E. T.R., Wachter, C., Fernandez, F.J. and Ponce-Alquicira, E. (2011). Enterocins: Bacteriocins with applications in the food industry, Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. In: Méndez-Vilas, A., Ed., Formatex, *Microbiology Series*, No. 3, Vol. 1, Spain, 1330-1341.

Alvarez-Sieiro, P.; Montalbán-López, M.; Mu, D. and Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100. 2939–2951.

Amortegui, J., Rodríguez-López, A., Rodríguez, D., Carrascal, A. K., Alméciga-Díaz, C. J., Melendez, A. D. P., (2014). Characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* LE5 and LE27 isolated from ensiled corn. *Appl Bi ochemBiotechnol*.

And, H.C., Hoover, D. g., (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2. 82–100.

Anderson, R.K.I. and Jayaraman, K. (2003). Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *Galleriae* for biopesticide production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 17(3): 225-231.

Arnison, P.G.; Bibb, M.J.; Bierbaum, G.; Bowers, A.A.; Bugni, T.S.; Bulaj, G.; Camarero, JA, Campopiano DJ, Challis GL, Clardy J, Cotter PD, Craik DJ, Dawson M, Dittmann E, Donadio S, Dorrestein PC, Entian K-D, Fischbach MA, Garavelli JS, Göransson U, Gruber CW, Haft DH, Hemscheidt TK, Hertweck C, Hill C, Horswill AR, Jaspars M, Kelly WL, Klinman JP, Kuipers OP,

Link AJ, Liu W, Marahiel MA, Mitchell DA, Moll GN, Moore BS, Müller R, Nair SK, Nes IF, Norris GE, Olivera BM, Onaka H, Patchett ML, Piel J, Reaney MJT, Rebuffat S, Ross RP, Sahl H-G, Schmidt EW, Selsted ME, Severinov K, Shen B, Sivonen K, Smith L, Stein T, Süßmuth RD, Tagg JR, Tang G-L, Truman AW, Vederas JC, Walsh CT, Walton JD, Wenzel SC, Willey JM, van der Donk WA. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports* 30. 108–160.

Baird-Parker, A.C. (1980). Organic acids. En “*Microbial ecology of foods*”. Eds. J.H. Silliker, R.P. Elliot, A.C. Baird-Parker, F.L. Brian, J.H.B. Christian, D.S. Clark, J.C. Olson, Jr. y T.R. Roberts. Academic Press, Nueva York. 26-135.

Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. M., Converti, A., y Oliveira, R. P. S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134-142.

Barker, S.B., Summerson, W.H., (1941). The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.* 138, 535–554.

Barnett AJG. (1951). The colorimetric determination of lactic acid in silage. *Biochemical Journal* 49, 524–529.

Bhunja, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. (1988). Purification, characterization, and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* J. *Appl. Bacteriol.*, 65: 261–268.

Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*. 6(2): 89-94.

Blanco, S., Delahaye, P., Fragenas, N. (2006). Evaluación física y nutricional del yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Revista Facultad de Agronomía*. (Maracay) Venezuela 32. 131-132.

Bogovič-Matijašić, B.; Rogelj, I.; Nes, I.F. and Holo H. (1998). Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49. 606 – 612.

Botazzi, V. (1988). An introduction to rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochemistry* 70. 303-315.

Bourassa L, Butler-Wu SM. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. In: Tang AS, Y-W, ed. *Methods in Microbiology*, vol 42. *Current and Emerging*

Technologies for the Diagnosis of Microbial Infections. Cambridge, MA: Academic Press: 37–85.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72(2):248-254.

Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D.K., Felis, G.E., Torriani, S., and Dellaglio F. (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (55): 1629–1634.

Callewaert L, Walmagh M, Michiels CW and Lavigne R (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*. 22. 164–171.

Chan, L.; Bal, L.; Cai, Z. and Ouyang, F. (2002). Optimization of a culture medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of biotechnology* 83. 27-34.

Chapot-Chartier, MP; Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 13 (Suppl 1):S9.

Chen H. and Hoover D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2. 82 -100.

Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E., (2001). Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *International Journal Food Science & Technology* 7. 281–305.

Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Journal of Clinical Microbiology* 17 (4). 840-862.

Coetzee, T., Herschlag, D. and Belfort, M. (1994). *Escherichia coli* proteins, including ribosomal protein S12, facilitate in vitro splicing of phage T4 introns by acting as RNA chaperones. *Genes Dev*. 8: 1575–1588.

Contreras, M. (2013). Efecto del medio de cultivo en la producción de enzimas de interés biotecnológico por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. UNAM, México, Ciudad de México.

Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., Baird, R.M. (Eds.), (2003). Handbook of Culture Media for Food Microbiology. *Progress in Industrial Microbiology*, second ed., vol. 37. Elsevier, Amsterdam.

Cotter PD.; Hill C. and Ross, RP. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3. 777-788.

Curk, M.-C., J.-C. Hubert, and F. Bringel. (1996) *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:595–598.

Curk, M.-C., J.-M. Boeufgras, B. Decaris, F. Gavini, K. Kersters, J. P. Larpent, P. Le Bourgeois, P. Renault, H. de Roissart, and C. Rouvier (1996). Méthodes d'identification des bactéries lactiques. In H. de Roissart and F. M. Luquet (coordinators), *BactCries lactiques*. *Lorica ed.*, Uriage, France, 1: 141-168.

Da Costa, R. J., Voloski, F. L. S., Mondadori, R. G., Duval, E. H., & Fiorentini, Â. (2019). Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *Journal of Food Quality*. 1–12.

da Silva Sabo, M.; Vitolo, González; J.M.D. and de Souza, R.P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International* 64, 527-536.

de Angelis, M y Gobbetti. M. (2016). *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. *Reference Module in Food Science*. 1-12.

de Carvalho KG, Bambirra FHS, Kruger MF, Barbosa MS, Oloveria JS, Santos AM et al. (2010). Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian meat product. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37: 381–390.

de Man, J. C.; Rogosa, M.; and Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. 3. *Journal of applied bacteriology*. 23. 130-135.

de Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., et al. (2009). "The Firmicutes," in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Vol. 4, ed A. C. Parte (Athens, GA: *Bergey's Manual Trust, Springer*), 464-511.

de Vuyst L, Callewaert R, CrabbeÂ K (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 142. 817-827.

de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En Bacteriocins of lactic ac: id bacteria. *Microbiology, Genetics and Applications*. Eds. L. De Vuyst y E.J. Vandamme. Blackie Academic & Professional, Londres. 91-142.

Diep, D.B., Nes, I.F., (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets* 3. 107–122.

Doran, Pauline M. (2013). *Bioprocess engineering principles*. Waltham, MA : Academic Press.

Drider, D., Fmland, G., Hechard, Y., McMullen, L., y Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (70): 564-582.

Drissi, F., Raoult, D. and Merhej, V. (2017). Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. *Microb. Pathog.* 1-13.

Eckert, C.; Lecerf, M.; Dubos, t L.; Arthur, M. and Mesnage, S. (2006). Functional analysis of AtlA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *Journal Bacteriology* 188. 8513-8513.

Felis, G. E. and Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of *Lactobacilli* and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* (8:2) 44-61.

Ford, K. L.; Zeng, W.; Heazlewood, J. L. and Bacic, A. (2015). Characterization of protein N-glycosylation by tandem mass spectrometry using complementary fragmentation techniques. *Front. Plant Sci.* (6) 674.

Fredriksen, L., Moen, A., Adzhubei, A.A., Mathiesen, G., Eijsink, V.G., and Egge-Jacobsen, W. (2013). *Lactobacillus plantarum* WCFS1 O-linked protein glycosylation: an extended spectrum of target proteins and modification sites detected by mass spectrometry. *Glycobiology*. 23: 1439–1451.

Fuente S.N., Barboza C.J. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria* 20: 43-52.

Gänzle, M.G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* (2): 106–117.

García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M. y Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista Chilena Infectol* 29 (3): 263-72.

García-Cano I, Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E. y Jiménez-Flores, R. (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potencial producers of lipolytic,

proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 113 (13): 5243-5257.

Goldstein, E.J.C.; Tyrrell, K.L. y Citron, D.M. (2015). *Lactobacillus* species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases* (60): S98–S107.

Götz, F.; Heilmann, C. and Stehle, T. (2014). Functional and structural analysis of the major amidase (*Atl*) in *Staphylococcus*. 304(2). 156-163.

Guzmán, S. (1999). Empleo de la fermentación láctica en músculo fresco de cazón para aumentar el tiempo de anaquel. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México.

Hadzija, O. (1974). A simple method for the quantitative determination of muramic acid. *Anal Biochem*. 60:512–517.

Haider, S. R., Reid, H. J., Sharp, B. L., (2012). *Methods in Molecular Biology*. (869): 81–91.

Hammami R., Zouhir A., Le Lay C., Ben Hamida J. and Fliss I., (2010). BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization, *BMC Microbiology*. 10:22.

Hansen, J.N. (1994). Nisin as a model food preservative. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* (34): 69–93.

Hardt, M., Guo, Y., Henderson, G. and Laine, R.A. (2003). Zymogram with Remazol brilliant blue-labeled *Micrococcus lysodeikticus* cells for the detection of lysozymes: example of a new lysozyme activity in Formosan termite defense secretions. *Analytical Biochemistry*. (312): 73–76.

Holzappel, W. H., and Wood, B. J. B. (2014). *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. New York, NY: Wiley-Blackwell. 1, 2.

Hoover, D.G. and Harlander, S.K. (1993). Screening Methods for Detecting Bacteriocin Activity. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* (29-39). San Diego, California. *Academic Press, Inc.*

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. (1995). A review, Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59: 171-200.

Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. y Wollman, E. (1953). Définition de quelques termes relatifs a la lysogénie. *Ann. Institute Pasteur (Paris)* 84: 222–224.

Jordana-Lluch, E.; Martró Català, E. y Ausina Ruiz V. (2012). La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30. 635–44.

Katla, T., Netersatd, K., Vancanneyt, M., Swings, J. and Axelsson L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to Sakacin P, Sakacin A, Pediocin PA-1, and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8): 4431–4473.

Keller, A., Nesvizhskii, A.L., Kolker, E. and Aebersold, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptid identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem*. 74(20):5383-5392.

Khay, E. Q., Ouhsassi, M., Harsal, A. E., Idaomar, M., and Abrini, J. (2013). Optimisation of bacteriocin-like production by *Enterococcus durans* E204 isolated from camel milk of Morocco. *Current Research in Microbiology and Biotechnology* 1(4), 155-159.

Kimberley, A.C. and Taylor (1996). A simple calorimetric assay for muramic acid and lactic acid *Appl. Biochem. Biotechnol*, 56: 49-58.

Klaenhammer TR (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12. 39–85.

Konirigs, W.N. y Otto, R. (1983). Energy transduccion and solute transport in streptococci. *Antonie van Leeuwen hock* 40. 247-257.

Koohmaraie M., Arthur, T., Bosilevac, J., Guerini, M., Shackelford, S. and Wheeler, T. (2005). Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science*, 71: 79-91.

Kumar JK (2008). Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80. 555–561.

Kumari, S., Rani, R., Kumar, J., Ranjan, R. and Ranjan, T. (2019). A rapid and inexpensive method of DNA extraction from Palmyra Palm (*Borassus flabellifer*). *Journal of Applied Science and Technology* 32(3): 1-5.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15. 680-685.

Latousakis, D. and Juge, N. (2018). How sweet are our gut beneficial bacteria? A focus on protein glycosylation in *Lactobacillus*. *Int J Mol Sci*. 19, 136.

Layec, S., Decaris, B. and Leblond-Bourget, N. (2008). Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Research in Microbiology*, 159, 507-515.

Layec, S.; Decaris, B. and Leblond-Bourget, N. (2008). Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Research in Microbiology* 159. 507-515.

Leclerc, D. and Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing gel electrophoresis. *Journal of Microbiology*, 35: 749-753.

Lengeler, J. W. (2001). Catabolite Repression. *Encyclopedia of Genetics*, 281–284.

Leveau, J.Y., Bouix, M. (2000). Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 163-187, 206-207, 228-240.

Lewus, C., Montville, T (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 13(2). 145-150.

Liu C-J, Wang R, Gong F-M, Liu X-F, Zheng H-J, Luo Y-Y (2015). Complete genome sequences and comparative genome analysis of *Lactobacillus plantarum* strain 5-2 isolated from fermented soybean. *Genomics* (106):404-11.

Liu W, Zhang L, Yi H, Shi J, Xue C, Li H, Jiao Y, Shigwedha N, Du M & Han X (2014). Qualitative detection of class IIa bacteriocinogenic lactic acid bacteria from traditional Chinese fermented food using a YGNGV-motif-based assay. *Journal of Microbiological Methods* (100):121-127.

Liu, L. and Li, P. (2016). Complete genome sequence of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9, a probiotic starter producing class II bacteriocins. *Journal of Biotechnology* (222): 15–16.

López-Arvizu, A., García-Cano, I., Pérez-Chabela, M. de L. y Ponce-Alquicira, E. (2019). Antimicrobial Bacteriocins and Peptidoglycan Hydrolases: Beneficial Metabolites Produced By Lactic Acid Bacteria. En *The Many Benefits of Lactic Acid Bacteria*. New York: Nova Science Publishers, Inc. pp.1-38.

Lortal S and Chapot-Chartier MP (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal* 15. 857-871.

Madigan, M.T. and Martinko, J.M. (2006). Microbial growth, Chapter 6. In Brock: biology of microorganisms, Prentice Hall, Upper Saddle River, New York. 329-418.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2009). Crecimiento microbiano, Capítulo 6. En Brock: Biología de los microorganismos 10a ed. Ed. Prentice Hall. Madrid, España, 122, 352, 400.

Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. Ph. D. Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences. Upsala, Suecia. 3-10.

Marilley, M. and Casey, M.G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90. 139-159.

Martins, W.F., Longhi, D.A., Menezes, N.M.C., Camargo, A., Laurindo, J.B., and de Aragao, G.M.F. (2016). Predicting growth of *Weissella viridescens* in culture medium under dynamic temperature conditions. *Procedia Food Science* 7: 37-40.

Mesquita, A.R.C., Silveira, L.P., da M., Cruz Filho, I.J., Lima, V. F., Araújo, A. A. y da Silva Macedo, L. (2017). Metabolism and physiology of *Lactobacilli*: a review. *Journal of Environmental Analysis and Progress*. 2(2): 125-136.

Monika, Savitri, Kumar, V., Kumari, A., Angmo, K., and Bhalla, T. C. (2017). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. *J. Food Sci. Technol.* 54, 1945–1952.

Morishita, T.; Fudada, T.; Shiota, M.; and Yura, T.; (1974). Genetic basis of nutritional requirements in *Lactobacillus cxcxi*. 3. *J Bacteriol.* 120. 1078-1084.

Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. F. CORPET, (1988). *Nucl. Acids Res.*, 16 (22), 10881-10890.

Nes, I.F., Diep, D.B. and Ike, Y., (2014). *Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control*, in: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (Eds.), *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston.

Nesvizhskii, A.L., Keller, A., Kolker, E. and Aeberold, R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 75(17):4646-4658.

New, A.M, Cerulus, B., Govers, S., Perez-Samper, G., Zhu, B., et al. (2014). Different levels of catabolite repression optimize growth in stable and variable environments. *PLoS Biol* 12(1): e1001764.

Ooi MF, Mazlan N, Foo HL, Loh TC, Mohamad R, Rahim RA, (2015). Effects of carbon and nitrogen sources on bacteriocin inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Malaysian Journal of Microbiology* 11:176-184.

Orla-Jensen, S. (1919). The lactic acid bacteria. *Anhr. Fred. Host y Son.*, Copenhagen.

Palafox Berrios, M. (2015). Identificación molecular de los microorganismos de descomposición en productos cárnicos. Instituto Tecnológico de los Mochis: Informe de Residencia Profesional.

Pandey, A., Negi, S. and Soccol, C.R. (2016). Current developments in biotechnology and bioengineering: Production, isolation and purification of industrial products, *Elsevier, Amsterdam, The Netherlands*.

Pantev, A. (2002). Effects of Nitrogen Sources on Bacteriocin Production by *Enterococcus faecium* A 2000. *Folia Microbiology* 47(6). 659-662.

Parker, C.E., Mocanu, V., Mocanu, M., Dicheva, N. and Warren, M.R. (2010). Mass spectrometry for post-translational modifications, Chapter 6. In: Neuroproteomics. Alzate O (ed) *CRC Press, Boca Raton, FL*.

Parra-Huertas, A.R., (2010). Review lactic acid bacteria: functional role in the foods. *Facultad de Ciencias agropecuarias*. 8: 93-105.

Peterbauer, C., Maischberger, T. and Haltrich, D. (2011) Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnology Journal* 6. 1147-1161.

Petti, C.A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*. 44 (8). 1108-1114.

Pidutti, P., Federic, F., Brandi, J., Manna, L., Rizzi, E., Marini, U. and Cecconi, D. (2018). Purification and characterization of ribosomal proteins L27 and L30 having antimicrobial activity produced by the *Lactobacillus salivarius* SGL 03. *Journal of Applied Microbiology*. 124: 398-407.

Punina, N.V., Zotov, V.S., Parkhomenko, A. L., Parkhomenko, T. U. and Topunov, A.F. (2013). Genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* from Different Geo-Ecological Regions of Ukraine by analyzing the 16S rRNA and gyrB Genes and by AP-PCR and saAFLP. *Acta Naturae*. 5 (1): 90-100.

Relloso, M.S.; Nievas, J. y Fares Taiea S. (2015). Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología* 47:103–7.

Richter, C., Hollstein, S., Woloszyn, J., Kaase, M., Gatermann, S. G., and Szabados, F. (2012). Evaluation of species-specific score cut-off values for various *Staphylococcus* species using a MALDI Biotyper-based identification. *Journal Medical Microbiology* (61): 1409–1416.

Rodicio, M.R., Mendoza, M.C. (2004). Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(4), 238-245.

Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., and García, J. (2005). Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio. *Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica*. 157.

Rodriguez, J. M., Martinez, M. I. & Kok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical reviews in food science and nutrition* 42. 91-121.

Rolain T, Bernard E, Courtin P, Bron PA, Kleerebezem M, Chapot Chartier MP, Hols P. (2012). Identification of key peptidoglycan hydrolases for morphogenesis, autolysis, and peptidoglycan composition of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories* (11). 137.

Sablon, E., Contreras, B. and Vandamme, E. (2000). Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (68): 21–60.

Salas, V. (2018). Tesis de licenciatura. Identificación de la actividad antibacteriana producida por una bacteria ácido láctica aislada de un producto cárnico. Universidad Nacional Autónoma de México, México, Ciudad de México.

Salminen S., von Wright A. and Ouwehand A. (2004). Lactic acid bacteria microbiological and Functional Aspects. 3ª edición. *Marcel Dekker Inc*. Nueva York, NY. 375-398.

Savikoj, K.; Ingmer, h. and Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71. 394-406.

Schägger, H. y Von Jawon, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* (166): 368-379.

Schillinger, U. y Lucke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-1906.

Schneider S.R. (2005a). Tesis de Doctorado. Caracterización bioquímica y molecular de las bacteriocinas producidas por *Pediococcus parvulus* MXVK133 y *Enterococcus faecalis* MXVK22

aisladas de MXVK22 aisladas de productos cárnicos mexicanos. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Schneider, R., Fernández, F.J., Aguilar, M.B., Guerrero-Legarreta, I., Alpuche-Solís, A. and Ponce-Alquicira, E. (2005b). Partial characterization of a class II pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican “chorizo”). *Food Control*, 17 (11): 909-915.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* 49(4): 543–551.

Sepahy, A.A. and Jabalmeli, L. (2012). Effect of culture conditions on the production of an extracellular protease by *Bacillus sp.* isolated from soil sample of Lavizan jungle park. *Enz. Res.* 7: 1-7.

Shrivastava, A., Shrivastava, N., and Singh, P. K. (2019). Enzymes in Pharmaceutical Industry. *Enzymes in Food Biotechnology*, 591–602.

Singh, D., Chang, S.J., Lin, P.H., Averina, O.V., Kaberdin, V.R. and Lin-Chao, S. (2009). Regulation of ribonuclease E activity by the L4 ribosomal protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 864–869.

Skuagen, M., Cintas, M.L. and Nes, I. F. (2003). Genetics of bacteriocina production in lactic acid bacteria. In Genetics of Lactic Acid Bacteria. *Kluwer Academic/Plenum Publishers, N.Y.* Edited by Brian J.B. Wood and Philip J. Warner. 225-260.

Smith E. E., Gui-Cheng H., John O. I. and Xin B. (2017). Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food and Nutrition Research*, 61:1, 1-16.

Sriunnual, S., Chen, Y.S. and Yanagida, F. (2008). Serching for bacteriocina-like inhibitory substances (BLISs)-producing lactic acid bacteria in Thai fermented foods. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*. 19(2):89-95.

Summanen, P. and Jobaron, E. (1993). In Wadsworth anaerobic bacteriology manual. Star Publishing Company, Belmont, CA. Appendix A. 145.

Tian P.J., Li. L., Shan Y.J., Zhang J.N., Chen J.Y., Yu M., y Zhang L.W. (2015). Extraction of Peptidoglycan from *L. aracasei subsp. paracasei* X12 and its Preliminary Mechanisms of Inducing

Immunogenic cell Death in HT-29 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16:8, 20033-20049.

Tian, F. (2019). Introduction. En *Lactic Acid Bacteria, Omics and Functional Evaluation*. Singapore: Science Press Beijing. 1-35.

Todorov, S. D., and Dicks, L. M. T. (2006). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiology Research*. 161.102- 108.

Torriani, S., Felis, G.E. and Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 67. 3450–3454.

van den Nieuwboer M, van Hemert S; van Hemert, S.; Claassen, E. y M. de Vos W. (2016). *Lactobacillus Plantarum* WCFS1 and its host interaction: a dozen years after the genome. *Microbial Biotechnology*. 9. 452–65.

Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., et al. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Front. Microbiol.* (10) 57. 1-20.

Vollmer, W; Joris, B.; Charlier, P. and Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology*. Review 32(2). 259-86.

Willey J., Sherwood L. and Woolvertonn C. (2009). *Microbiología*: Prescott, Harley y Klein. Editorial McGraw Hill. 7 ed. España.

Winkelstroter, L. K., Tulin, F. L., De Martinis, E. C. P. (2015). Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *LWT. Food Science Technology*. 64. 586-592.

Woo, PC., Ng, KH.; Lau, SK.; Yip, KT.: Fung, AM. and Leung, KW. (2003). Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles. *Journal of Clinical Microbiology* 41. 1996-2001.

Wu, T., Jiang, Q., Wu, D., Hu, Y., Chen, S., and Ding, T. (2019). What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. *Food Chemistry*, (274): 698–709.

Yang S.-C., Lin C.-H., Sung C. T., Fang J.-Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.* (5:241).

Yang, R., Johnson, M. and Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 58. 3355-3359.

Yarza, P., Yilmaz, P., Prüße, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea by means of 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev.* 12, 635–645.

Zanoni, P., J. A. E. Farrow, B. A. Phillips, y M. D. Collins. (1987). *Lacto- bacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson). *Int J Syst. Evol Microbiol.* 32339-341.

ANEXO A. Preparación de soluciones, geles y muestras para electroforesis.

Tabla 15. **Soluciones concentradas para Tris-Tricina-SDS-PAGE.**

Amortiguador	Tris (M)	Tricina (M)	pH	SDS ^c (%)	CBB ^d (%)	Glicerol (%)
de gel	2.5	-	8.8 ^b	-	-	-
de corrida ^a (1X)	0.025	0.025	-	0.05	-	-
de la muestra (2X)	0.100	-	6.8 ^b	1.0	0.02	24

^a No es necesario ajustar pH; ^b Ajustado con HCl; ^c dodecilsulfato sódico; ^d Coomassie Brilliant Blue G-250.

Mezcla	Acrilamida (% p/v)	Bisacrilamida (% p/v)
30.0%T, 2.67%C	29.2	0.8

Tabla 16. **Composición de los geles para Tris-Tricina-SDS-PAGE al 16%.**

Componente	Gel de separación	Gel de concentración
Acrilamida/BIS 30% (mL)	4.531	0.66
2.5M Amortiguador Tris pH 8.8 (mL)	3.655	0.76
Agua Milli-Q (mL)	0.187	3.42
TEMED (μL)	5.1	5.0
APS 30 mg/mL (μL)	85.0	150.0
Volumen final (mL)	8.5	5.0

Tabla 17. **Soluciones concentradas para Tris-Glicina-SDS-PAGE.**

Amortiguador	Tris (M)	pH
de gel separador ^a	1.5	8.8 ^b
de gel concentrador ^a	0.5	6.8

^a Ajustado con HCl.

Mezcla	Acrilamida (% p/v)	Bisacrilamida (% p/v)
30.0%T, 2.67%C	29.2	0.8

Tabla 18. **Composición de los geles para Tris-Glicina-SDS-PAGE al 10%.**

Componente	Gel de separación	Gel de concentración
Acrilamida/BIS 30% (mL)	2.805	0.510
Amortiguador del gel (mL)	2.125	0.750
Agua Milli-Q (mL)	3.485	1.71
10% SDS (μL)	85	30.0
10% APS (μL)	42.5	15.0
TEMED (μL)	4.25	3.0
Volumen final (mL)	8.5	3.0

Amortiguador de carga: se preparó una solución que contenía 2.0 mL de SDS al 10%, 2.5 mL de glicerol, 1.25 mL de 0.5 M Tris-HCl a pH 6.8 y 0.2 mL azul de Coomassie al 0.5%. Las muestras se diluyeron en viales (1:1) con la mezcla anterior.

Amortiguador de corrida (10X): se preparó una solución que contenía 30.3 g Tris Base, 144.0 g de glicina y 10.0 g de SDS, para 1.0 L con agua Milli-Q a pH 8.3. No ajustar pH con ácido o base.

Anexo B. Resultado espectrometría

Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# FSMs	# AAs	MW [Da]	calc pI										
A0A302JF04	Chaperone protein DnaK, DE-1, <i>Lactobacillus plantarum</i> DX-607	67.43	6.62	1	2	2	19	618	67.2	4.96										
	A2	Sequence	# FSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	ΔCn	XCarr	Charge	M+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]	# Missed Cleavages						
	High	A4QNDPAVTHVLGGEP	1	1	1	A0A302JF04	MS(Oxidation)	0.0000	5.07	3	3226.38048	-47.43	34.64	0						
	High	DGEIDVGEVAK	18	1	1	A0A302JF04		0.0000	4.14	2	1944.66627	238.50	28.98	0						

Anexo C. Análisis estadísticos.

Para el análisis de los resultados se realizaron dos análisis de varianza (ANOVA), de uno y dos factores, ambos con un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el método de Duncan para la comparación de medias entre tratamientos, así como para cada tiempo de maduración, empleando el paquete estadístico SPSS V.18.

En las tablas con los resultados estadísticos los grupos con la misma letra indican que no hay diferencias significativas.

Tabla 19. **Resumen del análisis de varianza para las variables analizadas.**

Fuente de variación		D.O. máx.	Actividad antimicrobiana	pH
Modelo	R ²	0.990	1.000	0.996
	F	194.190	239985.437	464.274
	Pr>F	<0.05	<0.05	<0.05
Concentraciones	F	542.208	876871.463	922.011
	Pr>F	<0.05	<0.05	<0.05
Tiempo	F	771.464	748051.727	2186.772
	Pr>F	<0.05	<0.05	<0.05
Concentraciones*tiempo	F	9.131	10994.974	28.227
	Pr>F	<0.05	<0.05	<0.05

Efecto significativo (Pr<0.05)

Efecto no significativo (Pr>0.05)