



**“Evaluación del nejayote para el crecimiento de
probióticos y producción de bacteriocinas”**

Tesis que presenta

I.B.I. Miguel Reyes Velazquez

Para obtener el grado de

Especialista en Biotecnología

Asesores

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Dr. Marco Antonio Gerardo Ramírez Romero

Sinodal

M. en C. Lorena Gómez Ruiz

Esta Tesis fue elaborada en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la asesoría de la Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero (UAM-Iztapalapa) y el Dr. Gerardo Ramírez Romero (UAM-Iztapalapa)



Nombre del alumno: Miguel Reyes Velazquez

Departamento: Biotecnología

Proyecto de la especialidad

*Evaluación del nejayote para el crecimiento de probióticos y
producción de bacteriocinas*

Asesores y firma de Vo. Bo.

Dr. Marco Antonio Gerardo Ramírez Romero

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

10/02/2011

Agradecimientos

Quiero agradecer a dios por que hace tres años me permitió continuar disfrutando de la vida, y de darme la oportunidad de hoy dar por completo este nivel.

Quiero agradecer a mis padres Armando Reyes Mendosa y Alejandra Velazquez Conde, por su cariño y apoyo incondicional, por sus consejos invaluable y por toda su paciencia gracias.

Quiero agradecer a mis asesores el Dr. Gerardo Ramirez Romero, por sus consejos, confianza, tiempo y todo el apoyo que me ha brindado. A la Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero por su paciencia, tiempo y apoyo en todo momento que lo he necesitado, por sus sugerencias y consejos. Les doy gracias por ayudarme a concluir este nivel y a seguir preparándome y superándome profesionalmente. Sé que he tenido múltiples fallas pero en este nuevo paso que daré con ustedes a mi lado, prometo ser una mejor persona y un mejor profesionista.

Quiero agradecer a la M. en C. Lorena Gómez Ruiz por sus valiosos comentarios y tiempo que me brindo como lectora de tesis.

Quiero agradecer a mis compañeros y amigos de la de la PP2, Erik por esas aventuras locas, Angy chinitos, Annel, Angy chiquita, Yolanda, Claudia, Olivia, Nalle, Viry, Julio, Francisco, Oscar y demás personas que hacen mi estancia en la PP2 un lugar muy ameno para mi.

Quiero agradecer a mis amigas del Diplomado en Sistemas de Gestión de Calidad y su Mejora, a Lidia, Gabriela y Maribel gracias por esas fiestas y momentos muy agradables que pasamos.

Gracias Fabiola G.B. por tus sugerencias y comentarios, pues han sido los que más me han y siguen impulsándome a ser mejor, se que aun tengo mucho que aprender y que madurar. Fues una inspiración para mi y una persona muy especial.

Tabla de contenido	página
Agradecimientos	ii
Tabla de contenido	iv
Índice de Tablas	vi
Índice de Gráficas	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Maíz.....	2
2.2. La Nixtamalización.....	3
2.3. Nejayote	4
2.4. Probióticos	5
2.5. Bacteriocinas.....	6
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPOTESIS.....	12
5. OBJETIVOS.....	12
5.1. Objetivo general.....	12
5.2. Objetivos particulares:	12
6. MATERIAL Y METODOS	13
6.1. Nejayote	13
6.2. Acondicionamiento del nejayote.....	13
6.3. Caracterización del nejayote	13
6.3.1. Cuantificación de azúcares reductores	13
6.3.2. Cuantificación de carbohidratos totales	14
6.3.3. Cuantificación de proteína.....	14
6.4. Condiciones de la fermentaciones en nejayote.....	14
6.5. Rendimiento obtenido de las bacterias probióticas	15
6.6. Evaluación de bacteriocinas	15
6.6.1. Acondicionamiento de los sobrenadantes de la fermentación.....	15

6.6.2.	Determinación de la presencia de bacteriocinas	16
6.7.	Comprobación de la presencia de sustancias proteicas (bacteriocinas)	16
7.	RESULTADOS	17
7.1.	pH del nejayote colectado	17
7.2.	Caracterización de los nejayotes	17
7.3.	Fermentaciones	18
7.3.1.	Fermentaciones utilizando el nejayote como medio de cultivo	18
7.3.2.	Comparación del crecimiento de los lactobacilos obtenido en nejayote con respecto al control.	19
7.4.	Consumo de carbohidratos y proteína en las fermentaciones	20
7.5.	Rendimiento celular de las bacterias probióticas utilizando el nejayote como medio de cultivo (biomasa/sustrato)	21
7.6.	Evaluación de bacteriocinas	22
7.6.1.	Inhibición de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	22
7.7.	Comprobación de la presencia de bacteriocinas	25
7.7.1.	Crecimiento de <i>E. coli</i> K 12.	25
7.7.2.	Crecimiento de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090.	26
8.	CONCLUSIONES.....	27
9.	Bibliografía	28
10.	ANEXO.....	30
10.1.	Curva patrón de azúcares reductores	30
10.2.	Curva patrón de proteína (Lowry).....	30
10.3.	Curva patrón de azúcares totales	31
10.4.	Curva patrón de para determinar biomasa	32

Índice de Tablas

Tabla 1 Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (Cintas <i>et al.</i> , 2001)	9
Tabla 2. Contenido de azúcares reductores, proteína y carbohidratos totales en nejayote de diferentes molinos.....	18
Tabla 3. Consumo de azúcares reductores, carbohidratos totales y proteína después de la fermentación con <i>Lactobacillus casei</i> IMAU60214, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG y <i>Lactobacillus helveticus</i> IMAU70129	21
Tabla 4. Rendimiento de las bacterias probióticas utilizando el nejayote como medio de cultivo	22

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> IMAU60214, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG y <i>Lactobacillus helveticus</i> IMAU70129 en muestras de nejayote.....	19
Gráfica 2. Crecimiento de los <i>Lactobacillus casei</i> IMAU60214, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG y <i>Lactobacillus helveticus</i> IMAU70129 en nejayote y en caldo MRS..	20
Gráfica 3. Inhibición del crecimiento de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 por los sobrenadantes de fermentación de las bacterias ácido lácticas.	23
Gráfico 4. . Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> K12 por los sobrenadantes de fermentación de las bacterias ácido lácticas.....	24
Gráfica 5. Crecimiento de <i>E. coli</i> K 12 en los sobrenadantes de fermentación tratados con proteinasa K.	25
Gráfico 6. Crecimiento obtenido de <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 después de evaluar los sobrenadantes de fermentación con los tres tratamientos.	26

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el nejayote (residuo de la nixtamalización del maíz) como medio de cultivo para el crecimiento de bacterias probióticas y producción de bacteriocinas. Para este propósito, Se caracterizaron los nejayotes de tres molinos obteniéndose: azúcares reductores 0.166-0.785 g/L, azúcares totales 10.28-60 g/L y proteína 2.35-34 g/L. Se observó que el consumo en las muestras de nejayote de azúcares reductores fue 60-65%, de azúcares totales 5-30% y de proteína 1-15%. El nejayote se acondicionó a pH 5,0. Se realizaron fermentaciones a 37 ° C durante 48 h con: *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 aisladas de productos lácteos comerciales. Para determinar la producción de bacteriocinas en las fermentaciones se utilizaron como microorganismos indicadores a *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Escherichia coli* K-12.

Se evaluó el crecimiento de los lactobacilos en tres nejayotes que procedían de molinos de nixtamal diferentes y en todos los casos fue posible observar un crecimiento de las bacterias. Además, con los sobrenadantes de las fermentaciones se evaluó la producción de bacteriocinas y se observó la inhibición de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*. Las mayores inhibiciones por la presencia de bacteriocinas se obtuvieron con los sobrenadantes de las fermentaciones de *L. casei* y *L. helveticus*. La inhibición máxima fue del 14% para *Listeria innocua* fue y del 10% para *Escherichia coli*. .

Se corroboró que la inhibición obtenida fue a causa de la presencia de bacteriocinas (péptidos de bajo peso molecular), debido a que se llevó a cabo un tratamiento con proteinasa K para la hidrólisis de proteínas y péptidos, donde se observó la pérdida de actividad. En conclusión el nejayote se puede utilizar para la producción de probióticos y bacteriocinas.

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the nejayote (by product from the nixtamalización of corn) as a culture medium for the growth of probiotic bacteria and production of bacteriocins. Nejayotes obtained from three mills were characterized: reducing sugars 0166-0785 g / L, total sugars 10.28-60 g / L and protein 2.35-34 g / L. Achievement was observed that consumption of reducing sugars was 60-65%, total sugars 5-30% and protein 1-15%. The nejayote was conditioned at pH 5.0 and the fermentation was performed at 37 ° C for 48 h by: *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 commercial dairy culture. To determine the presence of bacteriocins in fermentations *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Escherichia coli* K-12 were used as indicators.

The growth of lactobacilli was evaluated in three nejayotes coming from different corn mills. In all cases it was possible to observe a growth of bacteria. Furthermore, with the supernatants of fermentation bacteriocin production was evaluated. The greatest inhibition by the presence of bacteriocins was obtained with the supernatants of fermentation of *Lactobacillus casei* IMAU60214, y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129. The Highest inhibition was 14% for *Listeria innocua* and 10% for *Escherichia coli*.

It was confirmed that the inhibition was obtained due to the presence of bacteriocins (peptides of low molecular weight), because it is carried out a treatment with proteinase K for the hydrolysis of proteins and peptides and the activity was lost. In conclusion, nejayote can be used in the production of probiotics and bacteriocins.

1. INTRODUCCIÓN

Las tortillas de maíz son consideradas uno de los alimentos básicos más importantes para la población mexicana. En México, las tortillas representan el 47% de la ingesta media de calorías, (Gutierrez-Uribe *et al.*, 2010). Para la obtención de las tortillas de maíz, y otros alimentos a base de maíz, el grano de maíz es cocido en una solución de hidróxido de calcio del 1 al 2%, después de cocido el grano se deja reposar de 1 a 15 h, finalmente el grano es lavado para la remoción del exceso de cal y materia orgánica. (Valderrama-Bravo *et al.*, 2012). Este proceso se conoce como nixtamalización. Durante la nixtamalización, partes del grano de maíz: pericarpio, germen y fracciones de endospermo son inevitablemente perdidas en el líquido de cocción (nejayote). Adicionalmente el exceso de calcio está depositado en este líquido. (Valderrama-Bravo *et al.*, 2012). El nejayote se considera como altamente contaminante debido a que su DBO y DQO son grandes 2,692 mg O₂ / L y 10,200-20, 000 mg / L respectivamente, y tiene un pH > 10 (Gutierrez-Uribe *et al.*, 2010). Basándose en que el uso promedio de agua es de tres veces más que el maíz (3:1), se obtiene que una tonelada de maíz genera entre 2.8 y 3.3 m³ de nejayote.

En las últimas décadas a una serie de microorganismos que proporcionan efectos benéficos al hospedero se les ha denominado probióticos y pueden definirse de la siguiente manera “organismos vivos que al ingerirse afectan benéficamente al hospedero mejorando la microbiota intestinal” (Simmering y Blaut, 2001). Los probióticos pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos, y suplementos dietéticos. El uso de probióticos y el efecto de manipular la microflora intestinal de su huésped ha sido el motivo para el estudio de esta gama de microorganismos, lo que llevo al descubrimiento de sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana conocidas como bacteriocinas, estas sustancias pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos. Existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares.

El objetivo del trabajo fue utilizar el nejayote como medio de crecimiento de bacterias probióticas y producción de bacteriocinas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Maíz

El maíz es un cereal nativo de América, cuyo centro original de domesticación fue Mesoamérica, de donde difundió hacia todo el continente. No hay datos sobre cuándo se empezó a domesticar el maíz, pero los indígenas mexicanos dicen que esta planta representa, para ellos, diez mil años de cultura. Debido a su productividad y adaptabilidad, el cultivo del maíz se ha extendido rápidamente a lo largo de todo el planeta después de que los españoles y otros europeos exportaran la planta desde América durante los siglos XVI y XVII. El maíz es actualmente cultivado en la mayoría de los países del mundo y es la tercera cosecha en importancia (después del trigo y el arroz). Los principales productores de maíz son Estados Unidos, la República Popular de China y Brasil. Independientemente de su uso industrial, el maíz constituye un componente importante de la vida de los pueblos de América. Por ser el sustento de la dieta alimenticia de los pueblos indígenas y mestizos de nuestro continente, este cultivo ha dado lugar a una serie de sistemas agrícolas muy variados. Es abundante en carbohidratos, tiene también proteínas. Mezclado con frijol (rico en proteínas, hierro y otros minerales) y calabaza (que posee grasas insaturadas y proteínas), suministra prácticamente todas las vitaminas necesarias para el hombre, integra una nutrición muy completa y balanceada. Otra ventaja poco conocida del maíz es que antes de molerlo para hacer las tortillas en el caso de Mesoamérica, se remoja en agua con cal y de ese modo se enriquece con calcio. Por ello, en las zonas de alto consumo de tortilla de maíz son raros los casos de raquitismo. El maíz también es ampliamente utilizado en medicina popular contra la hepatitis, la hipertensión, la diabetes, la menorragia, los padecimientos renales, los cálculos, el reumatismo, las verrugas, los tumores y otros padecimientos, en forma de cataplasmas, cocciones, ungüentos y emplastos. La infusión de los denominados pelos de choclo o cabellos de elote, como también es conocido, esos filamentos que crecen al extremo de la mazorca, es un excelente diurético y se usa en caso de trastornos renales (Asturias, 2004)

El maíz ha constituido la base de la alimentación del mexicano desde tiempos prehispánicos, y actualmente en México se produce una gran variedad de tipos de maíz, blancos, amarillos, azules y rojos, con una composición promedio de 70% de carbohidratos, 8% de proteínas, 4% de minerales, 4% de lípidos y 3% de celulosa. A partir de este cereal se elabora un alimento denominado tortilla, que constituye el producto de mayor consumo en el país. Se estima que en México, el consumo *per cápita* de maíz es de 120 kg de tortilla por año (Ochoa y Viniegra, 2009)

2.2. La Nixtamalización

La palabra nixtamalización castellanizada del náhuatl (*nextli*: cal de cenizas y *tamalli* masa cocida de maíz) significa maíz cocido con cal (Cabrera, 1972). Las tortillas se obtienen a partir de tres diferentes procesos de fabricación: forma tradicional, comercial y de harina de masa seca. Independientemente del tipo de proceso, el maíz es cocido en cal con grandes cantidades de agua que se desecha como efluente alcalino rico en sólidos solubles e insolubles (Gutierrez-Urbe *et al.*, 2010).

La nixtamalización es el proceso en el que el grano de maíz se cuece en una solución alcalina, normalmente se utiliza hidróxido de calcio Ca(OH)_2 o “cal” al 2% y agua a 90°C. Una vez que se mezclan el maíz, la cal y el agua, se tiene un periodo de reposo de entre 12 y 24 horas. Durante el reposo, el grano de maíz se hidrata y se suaviza el pericarpio. Al mismo tiempo, se controla la actividad microbiana al tener un valor de pH entre 10.5-11.6, se desnaturalizan las proteínas y el almidón se gelatiniza parcialmente. (Ochoa y Viniegra, 2009)

Durante el proceso de nixtamalización, parte de la cal se absorbe sobre todo en el germen del grano y éste se hincha debido al efecto combinado de la gelatinización del almidón, la degradación parcial de la estructura del endospermo y la solubilización parcial de la pared celular y de la matriz protéica. Cuando el grano nixtamalizado es lavado, se logra la remoción del pericarpio, así como la eliminación del exceso de cal y de partes externas del grano como germen, parte de endospermo y pedicelo. Estos subproductos

(agua de cocción, agua de lavado y sólidos) constituyen el “nejayote” el cual es desechado.

2.3. Nejayote

El nejayote tiene altas concentraciones de materia orgánica en suspensión y en solución (5 a 50 g/L) gracias a la lixiviación ocurrida en el proceso de cocción, debido a la utilización de hidróxido de calcio en el proceso el pH está cerca del límite máximo de la alcalinidad (10 a 14).

Algunos autores reportan que la pérdida de sólidos en el nejayote, depende de las operaciones comerciales de tortilla, encontrándose una variación desde 8,5 hasta 12,5%. En otras investigaciones se determinó que la pérdida de sólidos en el efluente varió de 5,5 a 10,8%. Se ha encontrado que aproximadamente el 50% de los sólidos del nejayote se suspenden; estos contienen 64% de polisacáridos, 20% de almidón y 1.4% de proteína. El otro 50% estaba compuesto de sólidos solubles a base de proteínas, azúcares, vitaminas y fitoquímicos ricos en polifenoles y carotenoides (Gutierrez-Urbe *et al.*, 2010)

El nejayote se considera como altamente contaminante debido a que su DBO y DQO son 2,692 mg O₂ / L y 10,200-20, 000 mg / L, respectivamente. Este efluente es una de las aguas residuales más difíciles de tratar debido a que tiene un pH > 10, contiene aproximadamente el 3% de materia orgánica insoluble y soluble y restos de cal (80% de la cal usada originalmente durante el proceso de cocción) (Gutierrez-Urbe *et al.*, 2010). Basándose en que el uso promedio de agua es de tres veces más por tanto de maíz (3:1), se estima que una tonelada de maíz genera entre 2.8 y 3.3 m³ de nejayote. Calculando que una planta con una capacidad de 600 ton de maíz/día genera entre 1500 y 2000 m³ de nejayote. Consecuentemente considerando que el grano de maíz absorbe del 14 al 48 % del agua utilizada durante el proceso de la nixtamalización, el volumen estimado de nejayote que se produce en México es de 1.2 millones de m³/día (Valderrama-Bravo *et al.*, 2012).

2.4. Probióticos

El concepto de probióticos ha evolucionado en torno a 1900, cuando el premio Nobel Elie Metchnikoff da la hipótesis de que la vida larga y saludable de los campesinos búlgaros fue el resultado del consumo de productos lácteos fermentados y más tarde estaba convencido de que el yogur contenía los organismos necesarios para proteger el intestino de los efectos dañinos de bacterias patógenas. Sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la microbiota intestinal y utilizando microorganismos útiles para sustituir a los microorganismos proteolíticos como *Clostridium* productores de sustancias tóxicas que surgen de la digestión de proteínas, entre las que se encuentran fenoles, indoles, y amoníaco. Desarrolló entonces una dieta con leche fermentada por la bacteria, a la que denominó “bacilo búlgaro.” (Guarner, 2008)

El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Fuller enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto benéfico para el huésped. Finalmente, Guarner y Schaafsma en 1989 acuñaron el término probiótico para aquellos microorganismos con actividad benéfica en el huésped más allá de su función nutricional básica. (Vrese, 2008)

El término probiótico puede definirse de la siguiente manera “organismos vivos que al ingerirse afectan benéficamente al hospedero mejorando la microbiota intestinal” (Simmering y Blaut, 2001).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos Gram-positivos, prefieren las condiciones anaerobias pero son aerotolerantes, ácido tolerantes, y estrictamente fermentativos, produciendo ácido láctico como producto principal. Los géneros más importantes son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, y *Bifidobacterium*. Las BAL se dividen generalmente en dos grupos de acuerdo a la forma de metabolizar los carbohidratos. El grupo homofermentativo formado

por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y varios *Lactobacillus* que utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (glucolítica) para transformar una fuente de carbono principalmente en ácido láctico. A diferencia de los homofermentadores, las bacterias heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO₂, etanol o acetato a partir de la utilización de la vía de la fosfoacetolasa. Entre las bacterias de este grupo se incluyen *Leuconostoc*, *Weisella* y algunos *Lactobacillus* (Ranadheera *et al.*, 2010).

2.5. Bacteriocinas

La primera descripción de actividades relacionadas con las bacteriocinas se publicó hace más de ochenta años, cuando se descubrió un antagonismo entre cepas de *Escherichia coli*. Originalmente, estas sustancias fueron llamadas colicinas. En el caso de las BAL las primeras observaciones comenzaron en 1928, cuando se describió que ciertas cepas de *Lactococcus* empleadas en la fabricación de quesos producían un efecto inhibidor del crecimiento de otras BAL y potencialmente podían inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y nocivas para la conservación del queso. En 1933 se describió por primera vez una sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que posteriormente se denominó nisina. La nisina es por tanto la bacteriocina que tiene un historial más largo de uso seguro en alimentación y la que ha sido más estudiada. En 1953 se comercializó por primera vez en Inglaterra, en 1969 se aprobó su uso en alimentación por la OMS (Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives) y en 1983 se incluyó en la lista de aditivos de la Unión Europea; poco después, en 1988, fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) norteamericana.

Durante los últimos 20 años el uso de probióticos en diferentes campos productivos y de investigación se ha generalizado, esto debido al efecto que han demostrado tener en la prevención de enfermedades tanto en el ser humano como en muchas especies de animales, así como su uso en la conservación de alimentos, siendo una alternativa para contrarrestar el uso de químicos y antibióticos en la alimentación

Las bacteriocinas producidas por diferentes bacterias probióticas (Tabla 1) pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos. Existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada para la manipulación de poblaciones bacterianas a nivel de tracto digestivo con el fin de excluir patógenos, mejorar la digestibilidad e incrementar la actividad inmunológica de muchas especies animales y son ampliamente utilizadas en la cría de cerdos, aves y recientemente ha surgido un interés sobre su aprovechamiento en la producción de organismos acuáticos.

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidas por síntesis ribosomal y son segregadas para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores. Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas. Sin embargo estudios recientes afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos. Aun dentro de una especie podrían producirse diferentes tipos de bacteriocinas.

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas. A continuación se presenta la clasificación de estos compuestos.

Clase I: Lantibióticos.- Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, β -metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Con poca estabilidad al calor, péptidos poli cíclicos (< 5 KDa) con aminoácidos modificados. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroamino ácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina. A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos:

Clase I A: Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibióticos de un solo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.

Clase I B: Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos

Clase II: No lantibióticos.- bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

Clase II a: Péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

Clase II b: Formadores de complejos para la formación de poros que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.

Clase II c: péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III: bacteriocinas de elevado peso molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J, V, acidofilicina A y lactacinas A y B.

Clase IV: bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).

Clase V: bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasericina A. (Monroy-Dosta et al., 2009)

Tabla 1 Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (Cintas et al., 2001)

Bacteriocina	Microorganismo productor
Clase I (lantibióticos) Nisina A Nisina Z Lactocococina Lactocina S	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> CNRZ481 <i>Lactobacillus sakei</i> L45
Clase IIa Pediocina PA1 Acidocina A Curvacina A Sakacina A Clase IIb Acidocina J1132 Lactacina F Plantaricina S Clase IIc Acidocina Enterocina P Clase IId Diacetina B Acidocina 8912 Péptido A Péptido B	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC-1.0 <i>Lactobacillus acidophilus</i> TK9201 <i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174 <i>Lactobacillus sakei</i> LB706 <i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132 <i>Lactobacillus johnsonii</i> VPI11088 <i>Lactobacillus plantarum</i> LCP010 <i>Lactobacillus acidophilus</i> M46 <i>Enterococcus faecium</i> P13 <i>Lactococcus lactis</i> UL720 <i>Lactobacillus acidophilus</i> TK8192 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LF221 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LF221
Clase III Helveticina J Caseicina 80 Enterolisina	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481 <i>Lactobacillus casei</i> B80 <i>Enterococcus faecalis</i> LMG23333
Clase IV Thuricina	<i>Bacillus thuringiensis</i> NEB17

Aunque el blanco de las bacteriocinas también pueden ser los lipopolisacáridos de la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas, generalmente sólo son activas contra células Gram-positivas (Caplice y Fitzferald, 1999). Hasta ahora sólo se han reportado algunas bacteriocinas de las BAL que tienen actividad sobre bacterias Gram-negativas y que son producidas por *L. plantarum*, *L. paracasei* y *Lactococcus lactis* (Todorov y Dicks, 2005).

El creciente interés en las bacteriocinas de las BAL se deriva de su potencial para modificar y controlar los ecosistemas microbianos de los alimentos. Además de sus aplicaciones en la industria alimentaria y su relevancia en la mejora de la calidad y

seguridad alimentaria, una de las cepas más estudiadas de probióticos es *L. rhamnosus* GG originalmente aislado de la flora intestinal humana. Keersmaecker *et al* (2006) reportan que este lactobacilo produce péptidos termoestables de bajo peso molecular como sustancias bactericidas. Dimitrijevic *et al* (2009), estudiaron el *L. rhamnosus* 68 en donde encontró que el péptido denominado rhamnocin A inhibió el crecimiento de *Micrococcus lysodeikticus*, y el modo de acción es bacteriostático, concluyendo que rhamnocin A es una bacteriocina de clase II. Simova *et al* (2009) reportaron la inhibición de *Listeria innocua* CCP17 y *E. coli* WF por bacteriocinas producidas por *L. rhamnosus* PC5. Otro probiótico ampliamente utilizado es el *L. casei*, algunos estudios reportan que el *L. casei* CRL705 (aislado de la carne) produce la bacteriocina llamada lactocin 705. Castellano *et al* (2002) estudiaron el modo de acción la lactocin 705 en donde se utilizó como microorganismo indicador al *Lactobacillus plantarum* CLR705. Simova *et al* (2009) reportaron la inhibición de *Listeria innocua* CCP17 por bacteriocinas producidas por la cepa de *L. casei* BCZ2. Además también se ha mostrado el interés en bacterias productoras de bacteriocinas como es el *L. helveticus*, Vásquez *et al* (2005) encontraron que este lactobacilo tenía un buen rendimiento en la producción de bacteriocinas.

3. JUSTIFICACIÓN

El agua residual procedente de la nixtamalización conocido como nejayote es un subproducto altamente contaminante de efluentes y de suelo por su $\text{pH} > 10$ y por el DBO y DQO altos, pero además se considera una fracción rica nutrimentalmente ya que contiene una gran cantidad de materia orgánica soluble y insoluble. Entre los desechos orgánicos insolubles se encuentran polisacáridos, almidón y proteínas. Entre los compuestos solubles se encuentran proteínas, azúcares, vitaminas y fitoquímicos ricos en polifenoles y carotenoides. El volumen estimado de nejayote que se produce en México es de 1.2 millones de $\text{m}^3/\text{día}$ los cuales son desechados en su mayoría sin recibir algún tratamiento para reducir su nivel de contaminación.

En base a lo anterior puede evaluarse la posibilidad de realizar una fermentación con microorganismos probióticos debido a la gran cantidad de nutrientes disponibles y así pasar de un desecho altamente contaminante a su utilización para la producción de bacterias probióticas y consecuentemente de bacteriocinas que son de interés para el ser humano.

4. HIPOTESIS

Si se logra obtener el crecimiento de bacterias probióticas en nejayote de diferentes molinos existe la posibilidad de su utilización como medio de cultivo.

5. OBJETIVOS

5.1.Objetivo general

Estudiar el crecimiento de probióticos en nejayote de diferentes molinos y cuantificar la producción de bacteriocinas sintetizadas en la fermentación.

5.2.Objetivos particulares:

1.- Acondicionar y caracterizar el nejayote para su utilización como medio de crecimiento microbiano.

2.- Estudiar el crecimiento de tres probióticos: *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 utilizando el nejayote como medio de cultivo.

3.- Cuantificar la bacteriocinas producidas durante la fermentación con los probióticos.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Nejayote

El nejayote utilizado fue colectado de tres molinos diferentes (1, 2 y 3) ubicados en la Ciudad de México. El nejayote fue tomado de un conducto de aguas residuales cuando se decanto la tina de reposo en donde se encontraba el nixtamal. El nejayote fue colectado en diferentes días, se tomaron 4 muestras del molino 1 (A, B, C y D) y tres muestras del molino 2 y 3 (A, B y C), se colocaron en botellas de 1.5 L para ser transportadas al laboratorio. En el laboratorio se midió el pH con un potenciómetro que fue ajustado con una solución reguladora pH 4 y 7.

6.2. Acondicionamiento del nejayote

El nejayote fue filtrado con una gasa para eliminar la mayor cantidad de sólidos suspendidos grandes, se midió el pH y se ajustó a 5 mediante la adición de HCL 1N concentrado. Una vez ajustado el pH a 5 se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min, finalmente se recuperó el sobrenadante para su posterior uso como medio de cultivo.

6.3. Caracterización del nejayote

El Nejayote acondicionado se caracterizó en base a azúcares reductores, carbohidratos totales y proteína.

6.3.1. Cuantificación de azúcares reductores

Los azúcares reductores fueron cuantificados mediante la técnica de DNS que consiste en lo siguiente: se adicionó 1 mL de DNS a 1 mL de muestra, después se colocó en baño María con agua hirviendo durante 5 min, una vez concluido el tiempo las muestras se enfrían en hielo, posteriormente se le adicionaron 8 mL de agua destilada, por último se

leyó la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm. Se elaboró una curva patrón de glucosa en un rango de concentración de 0.2-1 mg/mL (Anexo).

6.3.2. Cuantificación de carbohidratos totales

Los carbohidratos totales fueron medidos utilizando la técnica de Fenol-Sulfúrico (Dubois, *M et al*, 1956) y fue realizada de la siguiente manera: se adicionó 1 mL de fenol al 5% a 1 mL de muestra, posteriormente se adicionaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado procurando que resbale por las paredes del tubo en un tiempo de 10 a 15 segundos y se agitó, por último se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. Se realizó una curva patrón de glucosa con una concentración de 10 a 50 µg/mL (Anexo).

6.3.3. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó utilizando la técnica de Lowry (1951) la cual se describe a continuación: se preparó una solución con: Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1N, y se adicionó CuSO₄ al 1%, y tartrato sodio y potasio al 1%. Se tomaron 5 ml de la solución anterior y se adicionaron a 1 ml de muestra, se dejó reposar durante 5 min en la oscuridad, se adicionó 0.5 ml de Folin-Ciocalteu al 50% y se dejó reposar 30 min en la oscuridad, por último se midió la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm. Se elaboró una curva patrón de seroalbúmina en un rango de concentración de 100 a 500 µg/mL (Anexo).

6.4. Condiciones de la fermentaciones en nejayote

Las fermentaciones se realizaron en botellas serológicas de 100 mL y se colocaron 50 mL de nejayote para posteriormente ser esterilizado (15 min a 121 °C). Se inocularon con: *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Se monitoreó el crecimiento mediante turbidimetría a 650 nm de cada microorganismo y se calculó el crecimiento en peso seco de acuerdo a la ecuación 1. Se tomaron muestras a las 0, 24 y 48

horas. Después de haber concluido las 48 horas se centrifugó el nejayote fermentado a 10,000 rpm durante 30 min para eliminar los lactobacilos, el sobrenadante fue retirado de los tubos de centrifuga cuidadosamente y almacenado a -20°C para posteriormente cuantificar bacteriocinas.

$$x = \frac{y - 0.0327}{0.2195} \quad \text{Ec. 1}$$

En donde;

x = g/L de biomasa

y = absorbancia del caldo de cultivo

6.5. Rendimiento obtenido de las bacterias probióticas

El rendimiento celular fue calculado utilizando la ecuación 2.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Ec. 2}$$

En donde;

$Y_{X/S}$ = Rendimiento celular (gX/gS)

ΔS = Sustrato consumido (gramos de sustrato consumido; gS)

ΔX = biomasa producida (gramos de biomasa producida; gX)

6.6. Evaluación de bacteriocinas

6.6.1. Acondicionamiento de los sobrenadantes de la fermentación

Se ajustó el pH de los sobrenadantes de la fermentación a 7 para eliminar el efecto inhibitorio atribuido a los ácidos orgánicos. Posteriormente se adicionó catalasa a una concentración de 0.1 mg/mL (SIGMA, 3809 units/mg solid) y se incubó a 25°C durante 90 min, y la inactivación se llevo a cabo a 60°C durante 10 min, este tratamiento se realizó con la finalidad de eliminar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

6.6.2. Determinación de la presencia de bacteriocinas

Para determinar la presencia de bacteriocinas en los sobrenadantes de la fermentación analizados se utilizó la técnica modificada de Papagianni *et al* (2006). Se utilizaron como microorganismos indicadores *Escherichia coli* K12 y *Listeria innocua* ATCC 33090 para determinar la presencia de bacteriocinas; estos microorganismos se cultivaron por separado, *E. coli* K12 en caldo nutritivo y *L. innocua* ATCC 33090 en infusión de cerebro y corazón, durante 24 horas a 37°C. Posteriormente 1 mL de cada uno de los cultivos se transfirió a un matraz que contenía 50 mL de medio fresco y se incubaron por 3 h a 37°C y con una agitación de 150 rpm para obtener células en fase de crecimiento logarítmica. Los tubos donde se realizó la prueba contenían 0.5 mL de los sobrenadantes de fermentación a analizar o bien nejayote estéril (control) y 2 mL de caldo de cultivo con el microorganismo indicador con una absorbancia inicial de 0.120. Se midió la absorbancia a 650 nm de todos los tubos después de 3 h de incubación (37°C). El porcentaje de inhibición fue calculado utilizando la ecuación 3.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{D.Op}{D.Oc} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

En donde:

D.Op = densidad óptica de prueba a las 3 horas

D.Oc = densidad óptica del control a las 3 horas

6.7.Comprobación de la presencia de sustancias proteicas (bacteriocinas)

Para eliminar la presencia de sustancias protéicas (bacteriocinas) en los sobrenadantes de fermentación acondicionados, se adicionó proteasa K a una concentración de 0.1 mg/mL (SIGMA-ALDRICH, 6.1 units/mg solid) y se incubó a 37°C durante 90 minutos, la inactivación de la enzima se llevo a cabo a 60°C durante 10 min. Las muestras fueron evaluadas después del tratamiento para determinar la presencia de bacteriocinas con la técnica mencionada.

7. RESULTADOS

7.1. pH del nejayote colectado

Después de filtrar el nejayote con una gasa para la eliminación de sólidos grandes se midió el pH obteniéndose valores entre 11.86 y 12.6 indicándonos una alta alcalinidad debido al hidróxido de calcio utilizado. Algunos autores como Gutierrez-Urbe *et al* (2010) reportan que el pH es superior a 10, mientras que Valderrama-Bravo *et al* (2012) reportan valores de pH entre 11.39 ± 0.49 .

7.2. Caracterización de los nejayotes

Después de la colecta y acondicionamiento de los nejayotes de diferentes molinos se llevó a cabo la cuantificación de azúcares reductores, de azúcares totales y de proteína. En la tabla 2 podemos observar que los nejayotes se encuentran dentro de un rango, en azúcares reductores de 0.166 a 0.818 g/L, la proteína de 2.35 a 34.52 g/L y los azúcares totales de 10.28 a 60.8 g/L. Niño Medina *et al* (2009) reportaron una concentración de azúcares de totales de 90.5 g/L y de proteína 4.5 g/L, que tienen una aproximación con lo obtenido en este estudio. Ruiz-Gutiérrez *et al* (2010) reportan una concentración de 600 mg/mL de azucares totales, mientras que Velazco-Martínez *et al* (1997) reportaron una concentración de proteína 7.2 %.

Tabla 2. Contenido de azúcares reductores, proteína y carbohidratos totales en nejayote de diferentes molinos.

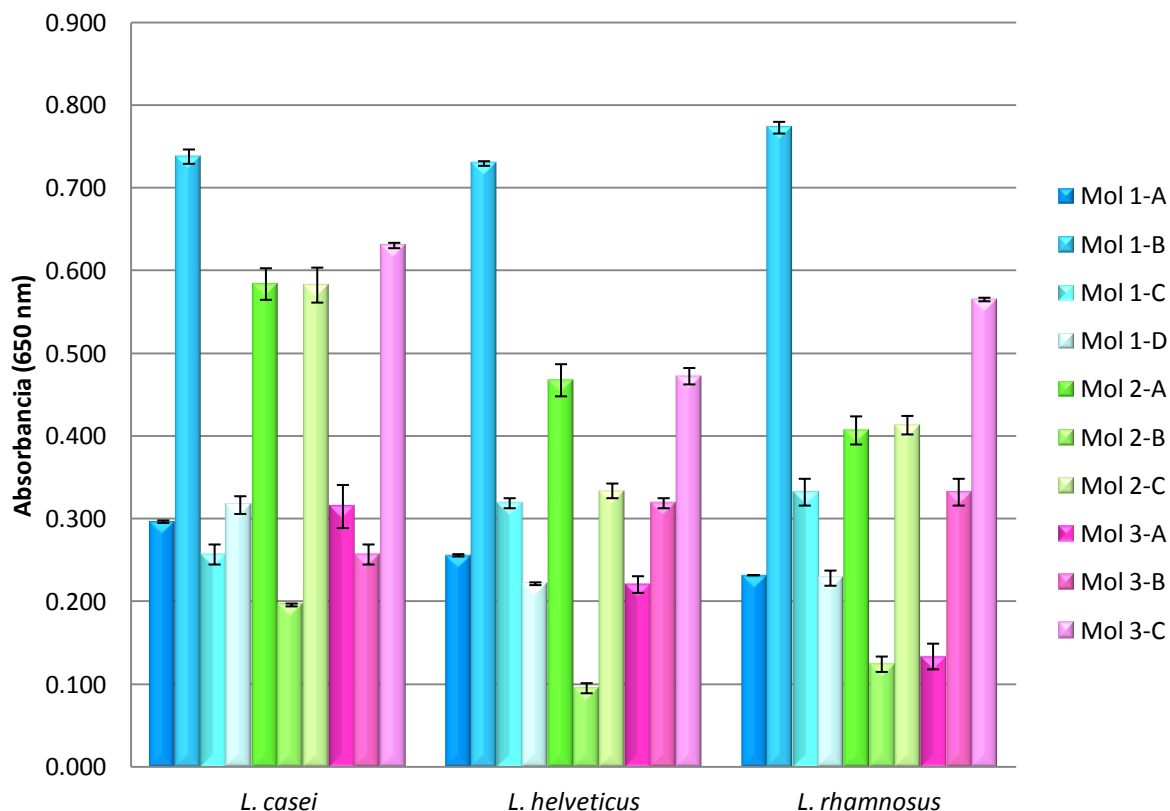
Molino	Azúcares reductores	Proteína	Carbohidratos totales
	(g/L)	(g/L)	(g/L)
1-A	0.29	5.66	10.28
1-B	0.62	9.74	30.83
1-C	0.213	12.66	42.51
1-D	0.424	6.958	17.644
2-A	0.397	7.17	22.1
2-B	0.303	6.64	15.23
2-C	0.785	12.915	60.805
3-A	0.242	2.35	28.1
3-B	0.166	6.62	11.54
3-C	0.818	34.552	11.591

Una respuesta a la variación obtenida en los valores de azúcares y proteína con respecto a otros autores (Niño Medina *et al.*, 2009; Velazco-Martínez *et al.*, 1997) es que en la mayoría de los casos reportados el nejayote fue obtenido en el laboratorio y en nuestro caso fue colectado de fábricas de nixtamal en las cuales se cuenta con un método tradicional de nixtamalización que varía de una fábrica a otra en variables importantes como: cantidad de maíz por tina de reposo, agua utilizada durante el proceso, cantidad de cal, tiempo de cocción y reposo, etc.

7.3.Fermentaciones

7.3.1. Fermentaciones utilizando el nejayote como medio de cultivo

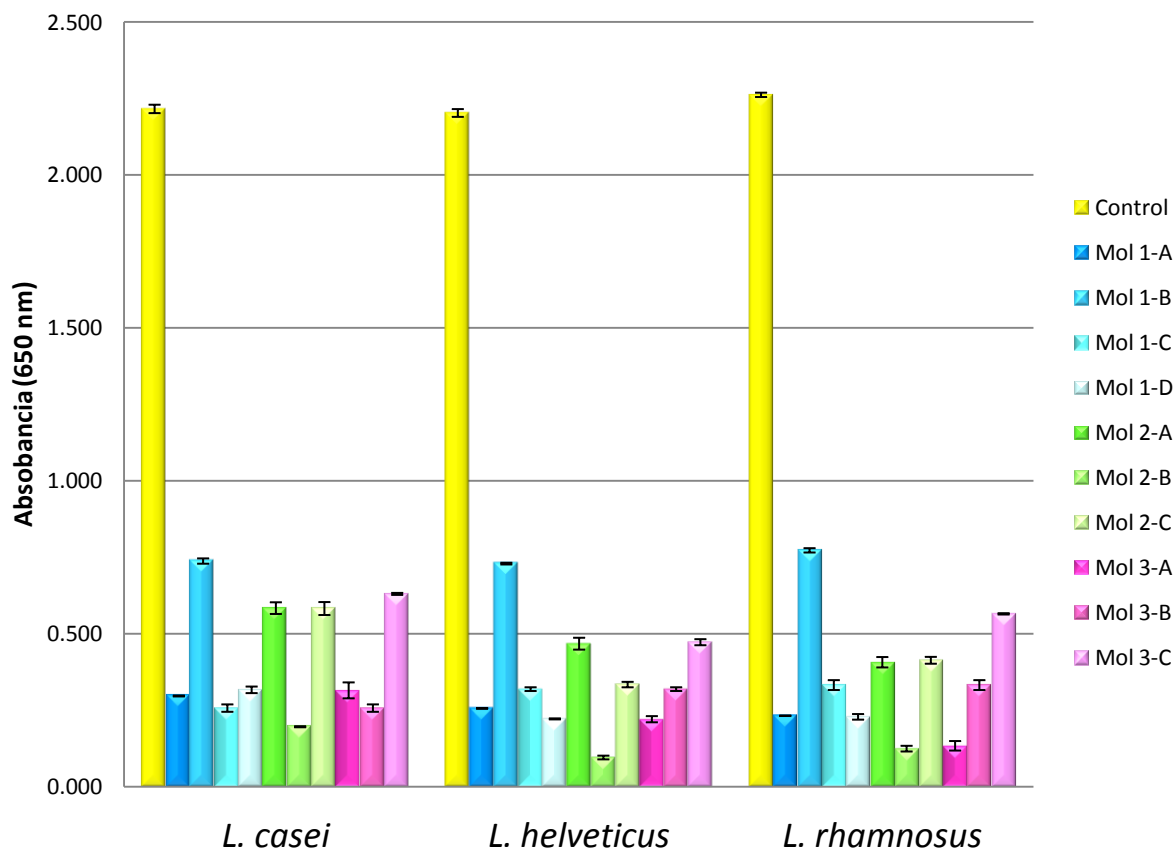
Las fermentaciones se llevaron a cabo utilizando nejayotes acondicionados de los diferentes molinos a una temperatura de 37°C durante 48 horas. En la gráfica 1 se compara el crecimiento obtenido de *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129, en la cual se puede apreciar que independientemente de la muestra de nejayote en cualquiera de los casos se obtuvo crecimiento de las bacteria ácido lácticas. Con los resultados obtenidos podemos decir que los microorganismos están adquiriendo del nejayote las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para crecer.



Gráfica 1. Crecimiento de *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 en muestras de nejayote

7.3.2. Comparación del crecimiento de los lactobacilos obtenido en nejayote con respecto al control.

Para conocer la eficiencia del nejayote como medio de cultivo de las bacterias lácticas, se realizaron fermentaciones de los microorganismos en caldo MRS (al 50%) y se compararon con las fermentaciones realizadas en los nejayotes, los resultados se muestran en la gráfica 2. Se observa que el crecimiento de los lactobacilos en nejayote con respecto al control es menor, sin embargo teniendo en cuenta que el medio de cultivo MRS es específico para bacterias lácticas y siendo el nejayote un desecho, el crecimiento obtenido se puede considerar adecuado.



Gráfica 2. Crecimiento de los *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 en nejayote y en caldo MRS.

7.4. Consumo de carbohidratos y proteína en las fermentaciones

Se cuantificó el consumo de azúcares reductores, carbohidratos totales y proteína después de las 48 horas de fermentación del nejayote con las bacterias lácticas y como se puede observar en la tabla 3. El aprovechamiento de azúcares reductores fue del 60-65%, para carbohidratos totales fue del 5-30% y de proteína fue de 1 al 30%

Tabla 3. Consumo de azúcares reductores, carbohidratos totales y proteína después de la fermentación con *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129

Molino	Azúcares Reductores (%)	Carbohidratos totales (%)	Proteína (%)
1			
1-Lc	62.55	10.75	11.64
1-Lh	63.21	11.62	12.79
1-Lr	60.24	31.84	34.53
2			
2-Lc	61.14	16.69	6.08
2-Lh	63.68	21.18	4.41
2-Lr	60.64	29.28	3.48
3			
3-Lc	62.90	4.81	14.80
3-Lh	63.87	15.80	2.60
3-Lr	65.15	9.54	0.67

Lc: *L. casei*; Lh: *L. helveticus*; Lr: *L. rhamnosus*

Observando el consumo en la fuente de carbono y nitrógeno, se logra apreciar que la fuente de nitrógeno es la que se consume en menor proporción, sin embargo la fuente de carbono no esta siendo aprovechada en mayor medida, con lo que podemos suponer que si se enriquece el medio de cultivo con una fuente alterna de N, hidrolizando los carbohidratos presentes en el nejayote se podría obtener un mejor crecimiento.

7.5. Rendimiento celular de las bacterias probióticas utilizando el nejayote como medio de cultivo (biomasa/sustrato)

Se calculó el rendimiento celular en base a los azúcares totales después de las 48 horas de fermentación del nejayote con las bacterias lácticas (Tabla 4). El rendimiento celular para *L. casei* IMAU60214 fue de 0.07 a 0.22 gX/gS , para el *L. helveticus* IMAU70129 fué de 0.02 a 0.18 gX/gS y para *L. rhamnosus* GG fue 0.01 a 0.21 gX/gS. Estos resultados nos llevan a concluir que a pesar de la gran cantidad de la fuente de carbono presente no está siendo aprovechada .ya que está compuesta en mayor medida por polisacáridos como

hemicelulosa y algunos polisacáridos y los lactobacilos no cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para degradarlos.

Tabla 4. Rendimiento de las bacterias probióticas utilizando el nejayote como medio de cultivo

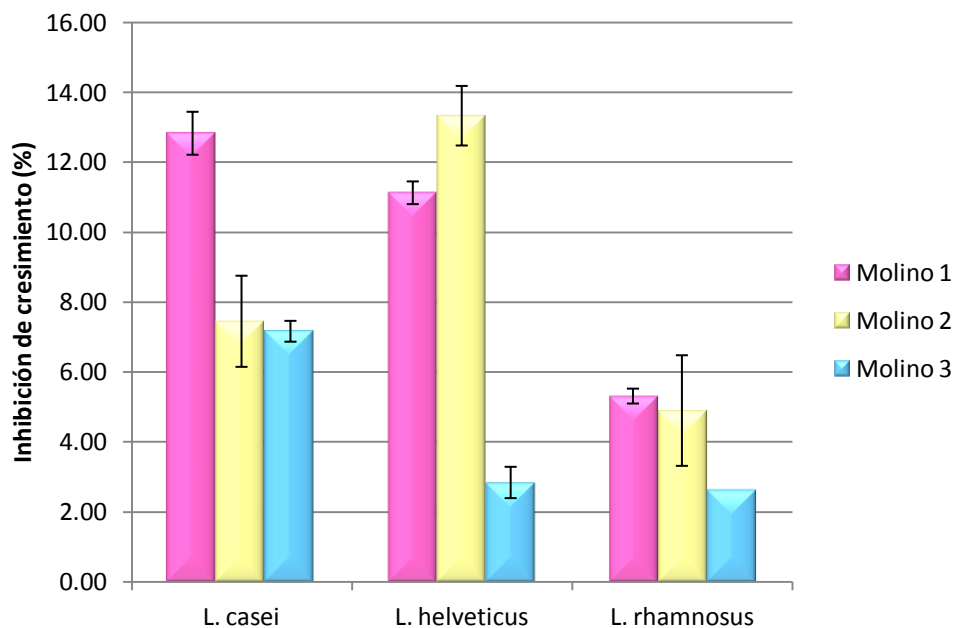
Molino	<i>L. casei</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
	gX/gS	gX/gS	gX/gS
1-A	0.1155	0.0971	0.1112
1-B	0.1116	0.1086	0.1544
1-C	0.0232	0.0283	0.0315
1-D	0.0736	0.0468	0.0638
2-A	0.1195	0.0890	0.0778
2-B	0.0341	0.0064	0.0183
2-C	0.0433	0.0243	0.0352
3-A	0.0428	0.0305	0.0052
3-B	0.0800	0.1203	0.1183
3-C	0.2340	0.1915	0.2191

gX : gramos de biomasa, gS : gramos de sustrato

7.6. Evaluación de bacteriocinas

7.6.1. Inhibición de *Listeria innocua* ATCC 33090

Para saber si durante la fermentación las bacterias lácticas produjeron compuestos antimicrobianos en específico bacteriocinas, los sobrenadantes de la fermentación de los diferentes lactobacilos fueron tratados con catalasa para la eliminación de peróxido de hidrógeno y se ajustó el pH para eliminar el efecto de ácidos orgánicos. En la gráfica 3 podemos apreciar la inhibición del crecimiento de *Listeria innocua* ATCC 33090. Se puede observar que el sobrenadante correspondiente a *L. casei* IMAU60214 tiene un porcentaje de inhibición sobre *Listeria innocua* ATCC 33090 de aproximadamente del 13%, el *L. helveticus* IMAU70129 del 14% y *L. rhamnosus* GG mostró la menor inhibición con 6%.



Gráfica 3. Inhibición del crecimiento de *Listeria innocua* ATCC 33090 por los sobrenadantes de fermentación de las bacterias ácido lácticas.

7.6.2. Inhibición de *Escherichia coli* K12

Al igual que en la prueba con *Listeria innocua* ATCC 33090 se realizó el estudio con *Escherichia coli* K-12. (Gráfica 4).. Se distingue que el *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 presentó la mayor inhibición sobre *E. coli*. K12 (10%), seguido por *L. casei* IMAU60214 con 8% de inhibición.

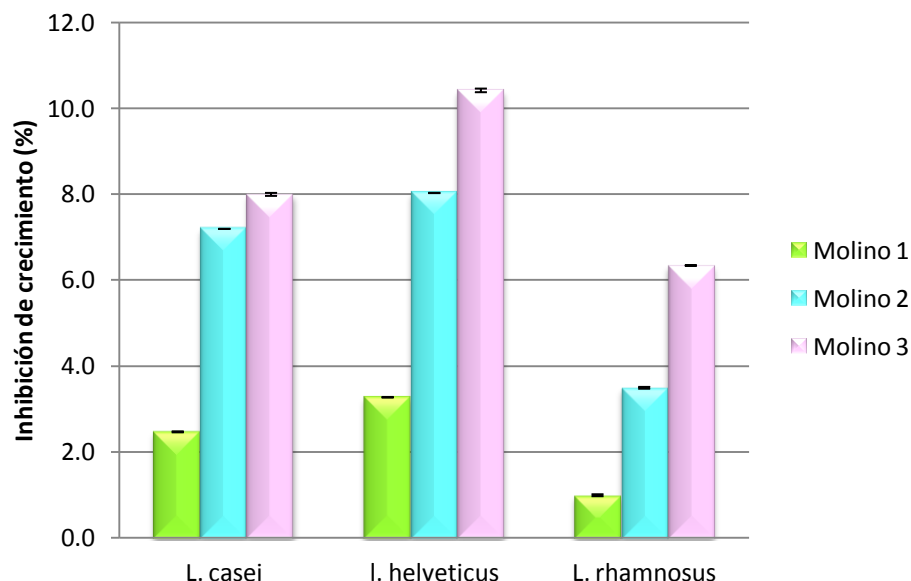


Gráfico 4. . Inhibición del crecimiento de *E. coli* K12 por los sobrenadantes de fermentación de las bacterias ácido lácticas

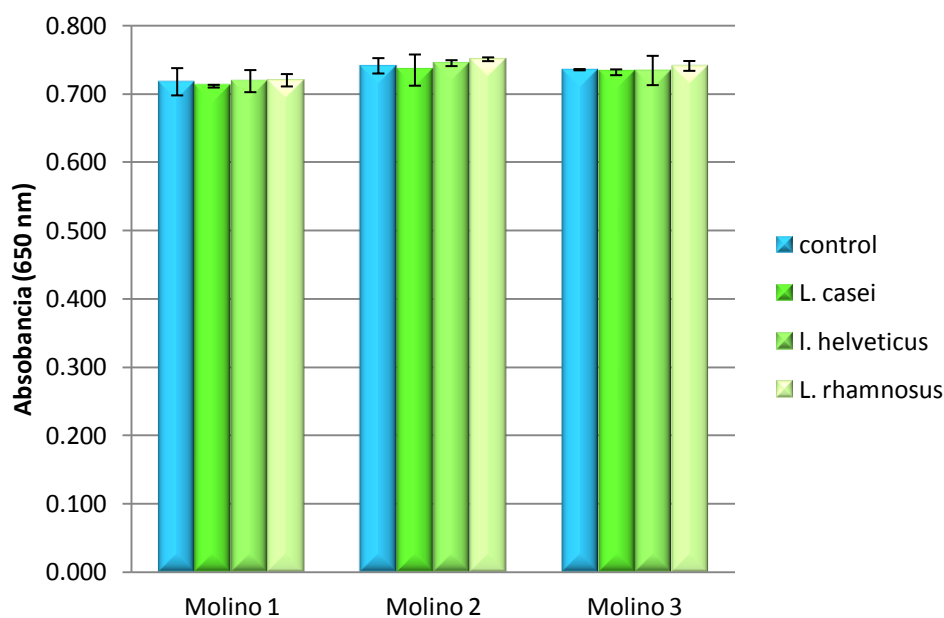
La inhibición máxima obtenida en la cepa de *Listeria innocua* fue del 14% con los sobrenadantes procedentes de *L. casei* IMAU60214 y *L. helveticus* IMAU70129 y en *Escherichia coli* fue del 10% con el sobrenadante de *L. helveticus* IMAU70129.

Papagianni *et al* (2006) describen en su trabajo el porcentaje de inhibición obtenido con la bacteriocina nisina utilizando 9 bacterias gram positivas como microorganismos indicadores de las cuales el *Lactobacillus curvatus* ATCC 51436 y *Pediococcus acidilactici* ATCC 25740 fueron sensibles a concentraciones muy bajas de la bacteriocina 1UI/MI y con una concentración de 75 UI/mL se obtuvo el 100% de inhibición. En el presente trabajo se utilizaron como microorganismos indicadores a *Listeria innocua* ATCC 33090 (bacteria Gram positiva) y *E. coli* K12 (bacteria Gram negativa) y como fuente de bacteriocinas los sobrenadantes de fermentación correspondientes al *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 y como se puede observar (Grafica 3 y 4) se obtuvo inhibición de los dos microorganismos por lo que podemos decir que las bacteriocinas producidas tiene un espectro de inhibición amplio.

7.7.Comprobación de la presencia de bacteriocinas

7.7.1. Crecimiento de *E. coli* K 12.

Para saber si durante la fermentación las bacterias lácticas produjeron bacteriocinas, a los sobrenadantes de fermentación de las diferentes bacterias lácticas *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 se les adicionó proteinasa K para la hidrólisis de proteínas y péptidos. En la gráfica 5 se muestra el crecimiento obtenido de *E. coli* K 12. Observando que no hay una diferencia significativa de la prueba realizada con los sobrenadantes con respecto al control (nejayote sin fermentar). Confirmando que la inhibición obtenida fue a causa de la presencia de bacteriocinas.



Gráfica 5. Crecimiento de *E. coli* K 12 en los sobrenadantes de fermentación tratados con proteinasa K.

7.7.2. Crecimiento de *Listeria innocua* ATCC 33090.

En la gráfica 6 se reporta el crecimiento de *Listeria innocua* ATCC 33090 en los sobrenadantes de fermentación con proteinasa K (para hidrolizar las bacteriocinas). Como se logra apreciar el crecimiento obtenido de *Listeria innocua* ATCC 33090 después de la prueba es el mismo, tanto en el control como en los sobrenadantes de fermentación, con lo cual se confirma que la inhibición de este microorganismo es causada por las bacteriocinas producidas por los lactobacilos crecidos en nejayote

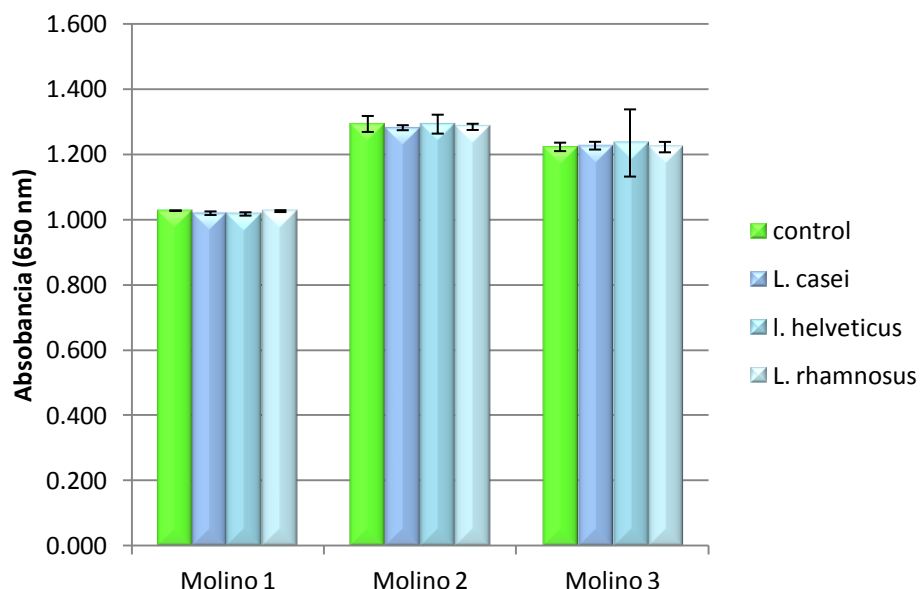


Gráfico 6. Crecimiento obtenido de *Listeria innocua* ATCC 33090 después de evaluar los sobrenadantes de fermentación con los tres tratamientos.

8. CONCLUSIONES

Se lograron crecer las bacterias lácticas en nejayote de diferentes molinos con lo cual se comprueba que el nejayote sirve como medio cultivo.

En el caso de la evaluación de bacteriocinas se logró corroborar que la inhibición obtenida en los microorganismos indicadores (*Listeria* y *E. coli*) se atribuye a presencia de bacteriocinas, en donde las mayores inhibiciones se obtuvieron con los sobrenadantes de las fermentaciones de *Lactobacillus casei* IMAU60214, y *Lactobacillus helveticus* IMAU70129

9. Bibliografía

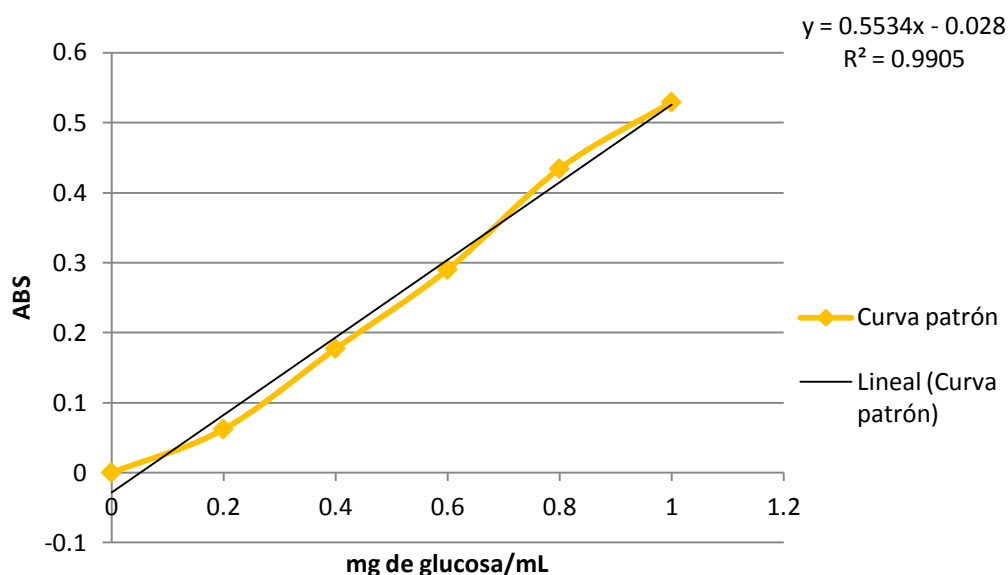
- Asturias, M.A.(2004). *Maíz, de alimento sagrado a negocio del hambre*. .Quito-Ecuador.Acción Ecológica. Red por una América latina libre de transgénicos. P 105
- Cabrera, L. 1972. *Diccionario de aztequismos*. Colofón S.A. Primera edición Mexico. México.
- Caplice, E. y Fitzgerald G.F. (1999). *Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation*. *International Journal of Food Microbiology*. 50: 131-149.
- Castellano P., Raya R. and Vignolo G. (2002). *Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocina from Lactobacillus casei CRL705*. *International Journal of Food Microbiology*. 85:35-43.
- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. y Hernández P.E. (2001). *Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. *Food Science and Technology International*. 7 (4): 281-305.
- Dimitrijevic R., Stojanovic M., Zivkovic I., Petersen A., Jankov R.M., Dimitrijevic L. and Gavrovic-Jankulovic M. (2009). *The identification of a low molecular mass bacteriocin, rhamnosin A, produced by Lactobacillus rhamnosus strain 68*. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 2108–2115
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. *Analytical Chemistry* 28 (3), 350–356.
- Guarner F. (2008). *Organización Mundial de Gastroenterología Guías prácticas: Probióticos y Prebióticos*. P 22
- Gutierrez-Urbe J.A., Rojas-Garcia C., Garcia-Lara S., Serna-Saldivar S.O. (2010). *Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas*. *Journal of cereal science* 52: 410-416
- Keersmaecker S.C.J., Tine L.A. Verhoeven, Jos Desair, Kathleen Marchal, Jos Vanderleyden & Istv ´an Nag.(2006).*StrongantimicrobialactivityofLactobacillus rhamnosus GGagainst Salmonella typhimurium is due to accumulation of lactic acid*. *Federation of European Microbiological Societies*. 259: 89–96
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., And Randall J.R., (1951). *The Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent*. *Journal of biological chemistry* 265-275
- Monroy-Dosta M.C., Castro-Barrera T., Fernández-Perrino F.J. y Mayorga-Reyes L. (2009) *Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas*. *ContactoS* 73: 63–72
- Niño-Medina G., Carvajal-Millán E., Lizardi J., Rascon-Chu A., Marquez-Escalante J.A., Gardea A., Martinez-Lopez A.L., Guerrero V. (2009). *Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking content*. *Food Chemistry* , 1286–1290
- Ochoa A., Vinegra-González G . (2009). *Temas selectos de la cadena maíz-tortilla*. México, D.F. Talleres de la Sección de Impresiones y Diseño de la UAM-I. P-144

- Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, Dasiou, D. e I. Ambrosiadis. (2006). *Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assesing the factor “indicator microorganism”*. *Microbial Cell Factories*. 5 (30): 1-14.
- Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S. and KimH.-Y. (2006) *Probiotics and their fermented food products are beneficial for health*. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.
- Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K. y M.C. Adams. (2010). *Importance of food in probiotic efficacy*. *Food Research International*. 43: 1-7.
- Roberfroid, M. (2007). *Prebiotics: The Concept Revisited*. *The Journal of Nutrition*. 137: 830S-837S.
- Ruiz-Gutiérrez M.G., Quintero-Ramos A., Meléndez-Pizarro C.O., Lardizábal-Gutiérrez D., Barnard J., Márquez-Melendez R.,and Talamás-Abbud R. (2010). *Changes in mass transfer, thermal and physicochemical properties during nixtamalization of corn with and without agitation at different temperatures*. *Journal of Food Engineering*. 98: 76–83
- Sezer, C. and Güven A. (2009). *Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from food*. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*. 15 (1): 45-50.
- Simmering, R. y Blaut M. (2001). *Pro –and prebiotics –the tasty guardian angels?* *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 19-28.
- Simova1 E.D., Beshkova1 D.B. and Dimitrov Zh.P. (2009). *Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products*. *Journal of Applied Microbiology*. 106:692–701
- Todorov, S.D. y L.M.T. Dicks. (2005). *Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives*. *Journal of Basic Microbiology*. 45 (4): 312-322.
- Valderrama-Bravo C., Gutiérrez-Cortez E., Contreras-PadillaM., Rojas-MolinaI., Mosquera J.C., Rojas-Molina A., Beristain F., Rodríguez-García M.E. (2012). *Constant pressure filtration of lime water (nejayote) used to cook kernels*. *Journal of Food Engineering*. 110: 478–486
- Vazquez J.A., Gonzalez M.P.,Murado M.A. (2005). *Stimulation of Bacteriocin Production by Dialyzed Culture Media from Different Lactic Acid Bacteria*. *Current Microbiology*.50: 208–211
- Velasco-Martinez M., Angulo O., Vazquez-Couturier D. L., Arroyo-Lara A., And Monroy-Rivera J. A. (1997). *Effect of Dried Solids of Nejayote on Broiler Growth*. *Poultry Science*. 76:1531–1534
- Vrese M. Schrezenmeir J.(2008) *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. In: Scheper T., *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg P-1-66

10. ANEXO

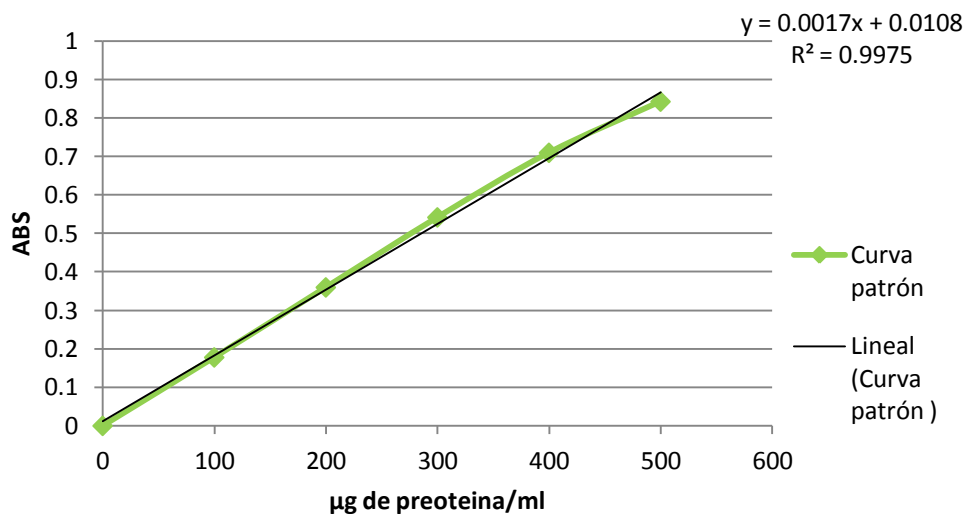
10.1. Curva patrón de azúcares reductores

En esta gráfica se aprecia un coeficiente de correlación de 0.9905 lo cual hace que las concentraciones determinadas de azúcares reductores sean confiables



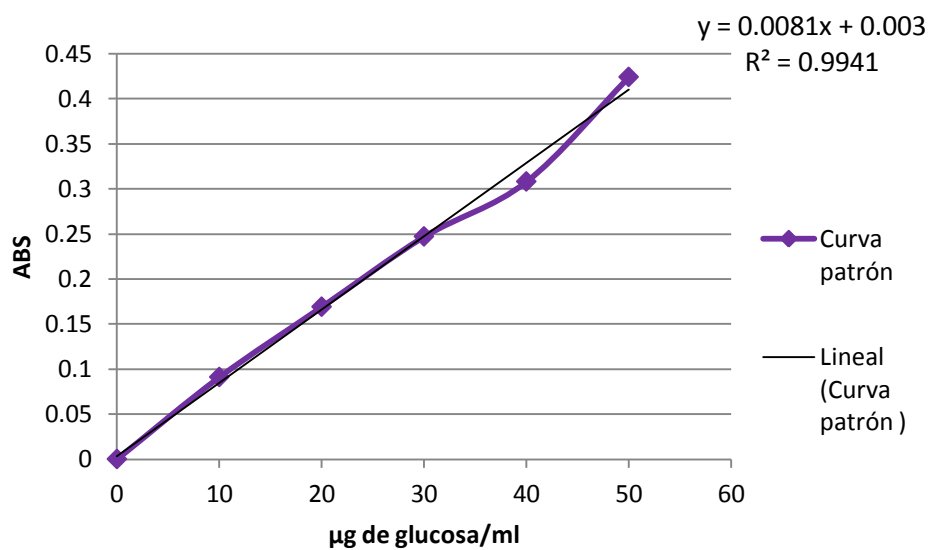
10.2. Curva patrón de proteína (Lowry)

Esta gráfica tiene un coeficiente de correlación de 0.9975 lo cual hace que las concentraciones obtenidas de proteína sean confiables



10.3. Curva patrón de azúcares totales

En esta gráfica se observa un coeficiente de correlación de 0.9941 lo cual hace que las concentraciones obtenidas de azúcares totales sean confiables.



10.4. Curva patrón de para determinar biomasa

En esta gráfica se observa un coeficiente de correlación de 0.9941 lo cual hace que las concentraciones obtenidas de azúcares totales sean confiables.

