



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CAMPUS IV

UNACH
BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSITARIA

PURIFICACIÓN DE LA BACTERIOCINA
WB1 PRODUCIDA POR *Lactococcus*
lactis* subsp. *lactis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA
VERÓNICA SANTIAGO CRUZ

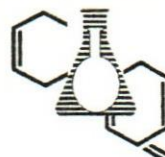
DIRECTORA DE TESIS
Dra. Ana Olivia Cañas Urbina

Tapachula de Córdova y Ordóñez, Chiapas, México
Junio del 2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA



DIRECCIÓN
UN. A. CH. / CAMPUS IV

OFICIO N° DFCQ/CIP 11/2002

TAPACHULA, CHIAPAS
30 DE MAYO DE 2002

C. VERONICA SANTIAGO CRUZ
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE

De acuerdo a la respuesta que emitieron los sinodales que revisaron su Tesis, titulada:

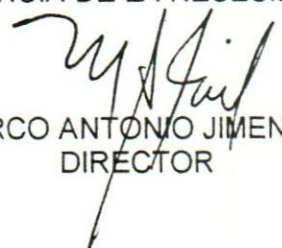
"PURIFICACIÓN DE LA BACTERIOCINA WB1 PRODUCIDA POR *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS*", me es grato informarle que se le autoriza la impresión de la misma.

Así también el Jurado para su Examen de Grado, queda integrado de la siguiente manera:

DRA. ANA OLIVIA CAÑAS URBINA
DR. MIGUEL SALVADOR FIGUEROA
DR. SERGIO HUERTA OCHOA
DR. MIGUEL ANGEL MAZARIEGO ARANA
M. en C. DORY GLEDIS RAMOS PEREZ

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
SUPLENTE
SUPLENTE

ATENTAMENTE
"POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR"


MTRO. MARCO ANTONIO JIMENO ZAVALA
DIRECTOR



c. c. p. Servicios Escolares
c. c. p. Archivo
c. c. p. Minutario
MAJZ/ajrv

El presente trabajo se realizó con el apoyo del
CONACYT, a través del proyecto J28010-B

SITIOS EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

- ♦ Laboratorio 101- Oriente. Departamento de bioquímica.
Instituto de Fisiología Celular. UNAM
- ♦ Laboratorio de Control de Calidad. Noris, S. A. de C. V.
México, D. F.
- ♦ Laboratorio del Departamento de Ciencia de los Alimentos.
Universidad de Rutgers. New Brunswick, NJ, E.U.

AGRADEZCO

- ❖ A la Dra. Ana Olivia Cañas el apoyo incondicional brindado en todo momento, sus consejos, su paciencia, cariño y la oportunidad de crecer profesionalmente.
- ❖ Al Dr. Edgardo Escamilla Marván su asesoría y las facilidades sin límite durante la estancia de investigación en el laboratorio a su cargo para la realización de este trabajo.
- ❖ A la Sra. Ma. Antonieta Rion, de Noris S. A. de C. V., por las facilidades técnicas y administrativas que me brindó en su empresa y a todo su personal, especialmente, al Dr. Antonio José Pérez Alonso y a los técnicos Imelda Saucedo y Héctor Morales.
- ❖ Al IBT Juan Luis Chávez Pacheco de la UNACH por su invaluable ayuda en la parte experimental de este trabajo.
- ❖ Al M. en C. Luis Jesús García Aguirre por las facilidades brindadas para la realización del análisis de HPLC en el laboratorio de Farmacocinética (Facultad de Medicina, UNAM) a su cargo.
- ❖ Al Dr. Thomas Montville de la Universidad de Rutgers por permitirme realizar la estancia de investigación en el laboratorio a su cargo.

- ❖ En la UNAM: Al Q.F.B. Jorge Abraham Ayala Bautista del laboratorio de farmacocinética de la Facultad de Medicina por haber realizado los análisis de HPLC; al Dr. Raúl Aguilar de la Facultad de Química y al Dr. Guillermo Mendoza del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por sus cruciales sugerencias para los estudios de caracterización; a la Dra. Evangelina Villavicencio del Instituto de Química por su asesoría para la obtención de muestras durante el análisis de HPLC. En el Instituto de Fisiología Celular : a la Dra. Martha Contreras y a Juan Méndez por su apoyo técnico; a la Dra. Luz María García por compartir su experiencia práctica para la elaboración de geles de acrilamida; al Dr. Marcos Flores Encarnación por su asesoría para realizar el escalamiento de las fermentaciones.
- ❖ Al Dr. Pert Saris de la Universidad de Helsinki (Finlandia) por la realización del bioensayo de bioluminiscencia.
- ❖ Al Dr. Miguel Salvador Figueroa de la UNACH por su disposición y flexibilidad para el enriquecimiento de este trabajo.
- ❖ A la Q. A. Rosa María Castillo, Q. A. Alma Patricia Maqueda Gálvez , al IBT Juan Luis Chavéz Pacheco y al Q.F.B. Abraham Ayala por su ayuda, amistad, cariño y el tiempo que compartieron conmigo.

GRACIAS

*A Dios por permitirme alcanzar una más de mis metas
porque sin él nada hubiera sido posible*

*A mis padres por su ejemplo, confianza y cariño que me han
guiado para seguir adelante*

*A mis hermanas Alejandra y Erika por todos los momentos
que hemos compartido y su cariño*

*A mis amigos por su amistad, apoyo incondicional y porque a
pesar del tiempo y la distancia su cariño es más sólido.*

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Bacteriocinas	3
2.2 Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas	3
2.2.1 Clasificación	4
2.2.2 Bacteriocinas producidas por <i>Lactococcus lactis</i>	4
2.3 Bacteriocinas patentadas	7
2.3.1 Nisina	7
2.3.2 Pediocina PA-1	8
2.3.3 Termofilinas	9
2.4 Secuencia a seguir para el estudio de bacteriocinas	9
2.5 Purificación de bacteriocinas	10
2.5.1 Precipitación	10
2.5.2 Separación o purificación	13
2.5.2.1 Purificación por el método de adsorción y liberación específica	13
2.5.3 Determinación del peso molecular e identificación de actividad	14
2.6 Factores que influyen en la purificación de bacteriocinas	18
2.6.1 Producción de bacteriocinas	18
2.6.2 Determinación de la concentración de proteínas y la actividad específica	20
2.6.3 Pureza y estabilidad de las bacteriocinas	21
2.7 Caracterización de bacteriocinas	21
2.7.1 Bioensayos para la caracterización de nisina	21
2.7.2 Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)	22
2.7 Bacteriocina WB1	24
II. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos específicos	25

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Medios de cultivo y soluciones	26
4.1.1 Medios de cultivo	26
4.1.2 Soluciones	26
4.2 Microorganismos	26
4.2.1 Conservación de cepas	27
4.2.2 Estandarización del inóculo de <i>L. lactis</i>	27
4.2.3 Inóculo de <i>M. luteus</i>	27
4.3 Producción de las bacteriocinas WB1	29
4.3.1 Cultivo estático	29
4.3.2 Efecto de la aireación	29
4.3.3 Cultivo de <i>L. lactis</i> en fermentador	29
4.4 Determinación de actividad	31
4.4.1 Preparación de muestras	31
4.4.2 Método de fosas	31
4.4.3 Cuantificación de actividad	32
4.5 Determinación de proteínas	32
4.6 Purificación de las bacteriocinas WB1a y WB1m	33
4.6.1 Purificación de la bacteriocina WB1a adherida a células	33
4.6.1.1 Liberación de la bacteriocina WB1	33
4.6.1.2 Ultrafiltración	33
4.6.1.3 Técnicas cromatográficas	34
4.6.2 Purificación de la bacteriocina WB1m libre en el medio de cultivo	35
4.6.2.1 Adsorción de la bacteriocina a la resina XAD-7	35
4.6.2.2 Técnicas cromatográficas	35
4.7 Determinación de los pesos moleculares de las bacteriocinas WB1a y WB1m	36
4.8 Derminación de bandas con actividad	37
4.9 Caracterización de las bacteriocinas WB1a y WB1m	37
4.9.1 Ensayo de GUS (β -glucorinidasa)	37
4.9.2 Ensayo de bioluminiscencia	39
4.9.3 Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)	39
V. RESULTADOS	40
5.1 Estandarización del inóculo de <i>L. lactis</i>	40
5.2 Producción de las bacteriocinas WB1	40
5.2.1 Cultivo estático	40
5.2.2 Efecto de la aireación	43
5.2.3 Crecimiento de <i>L. lactis</i> en fermentador	43
5.3 Purificación de las bacteriocinas WB1	43
5.3.1 Purificación de la bacteriocina WB1a	43
5.3.2 Purificación de la bacteriocina WB1m	46
5.4 Determinación de los pesos moleculares de las bacteriocinas WB1	46
5.5 Identificación de bandas con actividad	49

5.6 Caracterización de las bacteriocinas WB1	49
5.6.1 Ensayo de GUS y ensayo de bioluminiscencia	49
5.6.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	51
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
VII. CONCLUSIONES	58
APÉNDICE 1	59
APÉNDICE 2	60
VIII. BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de bacteriocinas (Klaenhammer, 1993; Nes <i>et al.</i> 1996)	5
Cuadro 2. Bacteriocinas producidas por el género <i>Lactococcus</i>	6
Cuadro 3. Métodos empleados en la secuencia de purificación de bacteriocinas	11
Cuadro 4. Purificación de la bacteriocina WB1a (adherida a células)	45
Cuadro 5. Purificación de la bacteriocina WB1m (libre en el medio de cultivo)	47
Cuadro 6. Pesos moleculares de las bacteriocinas WB1a y WB1m comparados contra nisina	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquematzación del proceso de adsorción-liberación de bacteriocinas a las células productoras	15
Figura 2.	Determinación de los pesos moleculares en SDS-PAGE de algunas bacteriocinas e identificación de las zonas de actividad (zimogramas)	17
Figura 3.	Cinética de producción de las bacteriocinas J1132, Cereína 7	19
Figura 4.	Esquema de la autorregulación de la biosíntesis de la nisina en <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> N8 por señal de transducción	23
Figura 5.	Preparación del inóculo A de <i>L. lactis</i> para tener un cultivo en fase logarítmica de crecimiento	28
Figura 6.	Preparación del inóculo B de <i>L. lactis</i> para iniciar las fermentaciones	28
Figura 7.	Efecto de la aireación en la producción de la bacteriocina WB1m	30
Figura 8.	Estandarización del inóculo de <i>L. lactis</i>	41
Figura 9.	Producción de la bacteriocina WB1m en un cultivo estático	42
Figura 10.	Producción de la bacteriocina en un cultivo aireado a 18 h de incubación a 30°C	44
Figura 11.	Gel y zimogramas de las bacteriocinas WB1a y WB1m	48
Figura 12.	Curva patrón de nisina contra actividad de β -glucorinidasa	50
Figura 13.	Cromatogramas de HPLC	52

RESUMEN

Las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas son compuestos proteicos antimicrobianos de interés para la industria alimentaria porque pueden ser utilizadas como conservadores naturales. *L. lactis* subsp. *lactis*, aislado de pozol de la zona Altos de Chiapas, se ha identificado como cepa productora de aparentemente dos bacteriocinas, denominadas WB1a (adherida a células de *L. lactis* subsp. *lactis*) y WB1m (libre en el medio de cultivo al finalizar la fermentación). El objetivo principal del presente trabajo fue purificar y caracterizar ambas bacteriocinas.

Se realizaron estudios de producción de la bacteriocina WB1m. El proceso de purificación consistió en una primera etapa de concentración seguida de una etapa de separación mediante cromatografías. La determinación del peso molecular se hizo por electroforesis (SDS-PAGE) y la caracterización se hizo mediante los ensayos de GUS, bioluminiscencia y HPLC.

Se encontró que la bacteriocina WB1m es producida en una concentración de 100 a 200 UA/mL, no tiene un pico máximo y la aireación no aumenta su producción. Por lo tanto, para proceder con la purificación se escaló la fermentación de matraz de 250 mL a fermentador de 5 L.

Se obtuvo un rendimiento del 13.1 y del 1.1% con un factor de purificación de 5 y 58 veces para las bacteriocinas WB1a y WB1m, respectivamente.

Los estudios de caracterización demostraron que tanto la bacteriocina WB1a como la bacteriocina WB1m son nisina, reportándose una concentración (UA/mL) de 445.2 y 127.18 por el ensayo de GUS y 250 y 10 por el ensayo de bioluminiscencia, respectivamente.

De lo anterior, se concluye que la purificación a partir de células es más eficiente.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza proteica producidas por algunos microorganismos como mecanismo de defensa. Las bacteriocinas tienen un efecto antimicrobiano contra bacterias taxonomicamente relacionadas con el microorganismo productor (Klaenhammer, 1993). En la industria alimentaria existe interés por bacteriocinas producidas por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) porque pueden ser usadas como conservadores naturales.

Actualmente existen tres bacteriocinas patentadas: nisina, pediocina PA-I y termofilina, únicamente las dos primeras son comercializadas para su uso en alimentos. Debido a lo anterior, existe un gran interés científico por encontrar nuevas bacteriocinas. La secuencia de investigación en el estudio de bacteriocinas es la siguiente: identificación y aislamiento de la cepa productora, determinación del espectro de inhibición, purificación de la bacteriocina, caracterización y/o secuenciación de aminoácidos y determinación del mecanismo de acción.

La bacteriocina WB1 es producida por *L. lactis* subsp. *lactis* aislado de pozol de la zona Altos de Chiapas. De acuerdo a Santiago (2000), aproximadamente el 40% de la bacteriocina WB1 esta adherido a las células productoras y el resto se encuentra libre en el medio de cultivo. Se denominó WB1a a la bacteriocina adherida a células y WB1m a la bacteriocina libre en el medio de cultivo. De lo anterior, surge la hipótesis de que *L. lactis* es productor de dos bacteriocinas.

El presente trabajo se enfocó a estudios de purificación y caracterización de dichas bacteriocinas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de tipo proteico producidas por microorganismos como *E. coli* (colicinas), *Pseudomonas pyocyaneus* (piocinas), *Bacillus megaterium* (megacinas) y bacterias ácido lácticas (pediocinas, lactococinas, lantioninas, etc.) (Klaenhammer, 1993; Dikes, 1995).

2.2 Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son Gram positivas, no esporuladas y anaerobias facultativas e incluyen los géneros de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Jay, 1992). Las BAL juegan un papel muy importante en alimentos fermentados. Desde hace muchos siglos se han utilizado debido a que resultan efectivas para preservar alimentos. Además de proporcionarles sabor y textura.

El potencial de las BAL radica en la capacidad que tienen de producir sustancias antimicrobianas tales como son ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido, reuterina y bacteriocinas (Stiles, 1996; Enan *et al.* 1996; Larsen *et al.* 1993).

Las bacteriocinas producidas por BAL constituyen una nueva perspectiva como conservadores naturales ya que debido a su naturaleza proteica son degradadas por enzimas del tracto digestivo (tripsina, α -quimotripsina) y por lo tanto no se acumulan en el organismo del consumidor (Delves-Broughton, 1990); otra de sus ventajas es que presentan un amplio espectro de inhibición contra microorganismos alterantes de los alimentos (Stiles, 1996; Van Reenen *et al.*

1998; Franz *et al.* 1998). El interés por el uso de bacteriocinas también se ha acentuado por la gran preocupación en la industria alimentaria con respecto a *Listeria monocytogenes*. Dicho microorganismo es un patógeno emergente que crece a temperaturas de refrigeración y resulta fatal en el 30% de los casos registrados. Por lo que se ha generado una intensa búsqueda de bacteriocinas para ser usadas como agentes antilistéricos (Pucci *et al.* 1998).

2.2.1 Clasificación

Las bacteriocinas de BAL presentan diferencias en cuanto a peso molecular, espectro de inhibición, modo de acción, y propiedades bioquímicas (Montville y Winkowski, 1997). Con base en dichas diferencias Klaenhammer en 1993, clasificó a las bacteriocinas de BAL en cuatro grupos: I. Lantibióticas, II. No lantibióticas, III. Termolábiles y IV. Bacteriocinas de estructura compleja.

En estudios posteriores se propuso la eliminación del grupo IV y se modificaron los grupos I, II y III (Nes *et al.* 1996). La clasificación actualizada se presenta en el cuadro 1.

2.2.2 Bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis es una BAL Gram positiva, tiene forma de coco, anaerobia facultativa. Las subespecies de *L. lactis* son *lactis*, *lactis* var *diacetylactis* y *cremonis*. Hurst (1981) realizó un estudio en 40 tipos de bacterias de *L. lactis* encontrando que 35 de éstas eran productoras de nisina. En el cuadro 2 se describen algunas bacteriocinas, además de nisina, producidas por el género *Lactococcus*.

Cuadro 1. Clasificación de bacteriocinas (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.* 1996).

CLASE*	GRUPO	ESTRUCTURA	CARACTERISTICAS	EJEMPLOS
I	Lantibióticas	Péptidos pequeños (menos de 5 KDa)	Contienen aminoácidos raros o atípicos como lantionina, β -metil lantionina Existen 2 tipos:	
			Tipo A. Péptidos alargados y catiónicos. Forman poros. Algunos están formados por dos componentes.	Nisina A NisinaZ Lactosina S
			Tipo B. Péptidos con estructura globular, actúan contra enzimas y tienen actividad inmunológica	Lacticina 481 Carnocina UI49
II	No lantibióticas	Péptidos de cadena corta, termoestables (menos de 10KDa)	No contienen lantionina Se dividen en 4 subgrupos :	
			Ila. Péptidos antilistéricos con una secuencia N-terminal (Try-Gly-Ans-Gly-Val-Xaa-Cys)	Pediocina PA-1 Sakacina A Sakacina B Leucocina A Curvacina A
			Ilb. Bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos	Lactococina G Lactococina M Lactacina F
			Ilc. Bacteriocinas que requieren residuos de cisteína para su actividad.	Enterococina P Divergisina A Lactococina B
III	Proteínas termolábiles	Peso molecular superior a 30 KDa	Son afectadas por la temperatura	Carnobacteriocina A Enterococina B Plantaricina A
				Helveticina V-1829 Helveticina J Acidofilucina A Lactacinas A y B

* Las bacteriocinas más estudiadas son las pertenecientes a las clases I y II debido a su abundancia en la naturaleza y su potencial de aplicación industrial.

Cuadro 2. Bacteriocinas producidas por el género *Lactococcus*

MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	REPORTADA POR
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454 NIZO 22186 10 300 71 6F3 CNRZ 481 DRC1 ADRIA 85LO30	Nisina A Nisina Z Lactostrepcina 1 Lactostrepcina 2 y 3 Lactostrepcina 4 Bac V, VI y VII Lacticina 481 Dricina Lactococina DR	Rogers (1928); Mattick & Hirsch (1944, 1947) Mulders <i>et al.</i> (1991) Kozak <i>et al.</i> (1977) Kozak <i>et al.</i> (1978) Kozak <i>et al.</i> (1978) Geis <i>et al.</i> (1983) Piard <i>et al.</i> (1990) Powell <i>et al.</i> (1990) Thualt <i>et al.</i> (1991); Dufour <i>et al.</i> (1991)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var <i>diacetylactis</i> 6F7 WM4 S50 DPC938	Bac VIII Bac WM4 Bacteriocina S50 Lactocina D	Geis <i>et al.</i> (1983) Scherwitz <i>et al.</i> (1983) Kojic <i>et al.</i> (1991) Morgan & Hill (1993)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 346 202 9B4, 4G6 LMG2081 9B4 LMG2081 R	Diplococina Lactostrepcina 5 Bac I, II, III y IV Lactococina A Lactococina A, B y M Lactococina G Lactococina R	Rogers (1928); Oxford (1944) Kozak <i>et al.</i> (1978) Geis <i>et al.</i> (1983) Holo <i>et al.</i> (1991) Geis <i>et al.</i> (1983); Van Belkum <i>et al.</i> (1989) Nissen-Meyer <i>et al.</i> (1992) Yildirim & Johnson (1998)

Adaptada de De Vuyst y Vandamme, 1994.

2.3 Bacteriocinas patentadas

Las bacteriocinas disponibles en el mercado son escasas por varias razones. Una de ellas es que investigaciones largas y complicadas pueden conducir a secuencias idénticas para bacteriocinas diferentes. También es común que pierdan actividad durante los procesos de fermentación y/o purificación o que la bacteriocina en estudio tenga un espectro de actividad similar al de otras bacteriocinas ya conocidas. Las bacteriocinas patentadas, por ende las más conocidas, son nisina, pediocina PA-1 y termofilinas 1 y 2 que se describen a continuación.

2.3.1 Nisina

La nisina producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* fue la primera bacteriocina en descubrirse (Rogers, 1928) y es la más estudiada hasta el momento. En 1969 fue autorizada para su uso en alimentos por la FAO/WHO (WHO, 1969) y fue reconocida en 1988 con el estatus GRAS por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos.

La nisina esta formada por 34 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 3,510 Da (Delves-Brought, 1990), inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y particularmente las que producen esporas como *Bacillus* y *Clostridium*. Existen dos tipos de nisina, la nisina A y la nisina Z, cuya diferencia radica en un aminoácido en la posición 27 de la cadena peptídica. La nisina A y Z tienen un espectro de actividad similar, sin embargo, la nisina Z difunde mejor en agar (Jenson *et al.* 1994). Se han reportado evidencias de que la nisina puede formar

dímeros o tetrámeros con pesos moleculares de aproximadamente 7000 y 14 000 Da respectivamente cuando se encuentra en solución acuosa (Kelly *et al.* 2000).

La molécula de nisina presenta una gran estabilidad y solubilidad bajo condiciones ácidas. Recientemente se ha reportado que la nisina en solución a un valor de pH de 3 presenta mayor estabilidad cuando se calienta a una temperatura de 115°C por 20 minutos (Davies, 1998).

La nisina se comercializa principalmente como Nisaplin por Applin & Barret (Inglaterra), como Ambicin por AMBI Inc. (Estados Unidos) y como Chrisin por Chr. Hansen (Dinamarca) a un costo promedio de 460 USD/Kg.

2.3.2 Pediocina PA-1

La Pediocina PA-1 producida por *Pediococcus acidilactici* NRRL-B-18050 (González y Kunka, 1987); esta conformada por 44 aminoácidos y tiene un peso molecular de 4 629 Da (Vanderburg, 1991); inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Listeria*.

La Pediocina PA-1 se comercializa por Quest International como ingrediente en una mezcla denominada ALTA^{MR} 2341 y es recomendada para su uso en productos como queso cottage, crema, ensaladas y carnes (Szabo y Cahill, 1998).

2.3.3 Termofilinas

Las Termofilinas 1 y 2 son producidas por *Streptococcus thermophilus*. El peso molecular de la Termofilina 1 es de 5 800 Da y el de la Termofilina 2 es de 3900 Da. Inhiben el crecimiento de bacterias de los géneros *Clostridium*, *Listeria* y *Bacillus*. Las termofilinas 1 y 2 fueron patentadas en 1997 por Germond. No se comercializan pero son usadas por Nestlé en una gama de productos que incluyen leches, yogurt y pastas de dientes.

2.4 Secuencia a seguir para el estudio de bacteriocinas

El procedimiento general para el estudio de bacteriocinas se ha descrito por varios autores en la literatura (Coventry et al. 1997; Yildirim y Johnson, 1998; Zheng y Slavik, 1999; Zhu et al. 2000). Los pasos principales se mencionan a continuación.

- Identificación y aislamiento de la bacteria productora de la bacteriocina
- Producción de la bacteriocina
- Determinación del espectro de inhibición
- Purificación de la bacteriocina
- Secuenciación o caracterización de la bacteriocina pura para establecer si es una bacteriocina nueva
- Mecanismo de acción

2.5 Purificación de bacteriocinas

Generalmente las bacteriocinas no se comercializan ni se utilizan en forma pura en los alimentos sino que son mezcladas con otros ingredientes. La razón principal para purificar bacteriocinas es realizar estudios de caracterización.

No existe un método universal para llevar a cabo la purificación de las bacteriocinas debido a que se trata de un grupo heterogéneo de sustancias (López-Lara *et al.* 1991). Usualmente se toma como base la secuencia general de purificación de proteínas y se adapta de acuerdo a las necesidades y posibilidades de cada grupo de investigación como se describe en el cuadro 3. Convencionalmente, la purificación de bacteriocinas se lleva a cabo por medio de una etapa inicial de precipitación, seguida de una etapa de separación por cromatografía en gel, de intercambio iónico o en fase reversa purificación por adsorción-liberación específica (Yang *et al.* 1992; Yildirim y Johnson, 1998) o por cromatografía de inmunoafinidad (Suárez *et al.* 1997). A continuación se hace una breve descripción de las etapas de purificación.

2.5.1 Precipitación

Normalmente las bacteriocinas se purifican a partir del medio de cultivo, teniendo como paso inicial de purificación la precipitación. Los métodos de precipitación se. Existen también métodos que involucran una etapa inicial de separación o fundamentan en la diferencia de solubilidades que presentan las proteínas al ser expuestas a sales, solventes orgánicos, polímeros orgánicos, variaciones de pH y temperatura (Prado *et al.* 1999). Los compuestos más empleados en la

Cuadro 3. Métodos empleados en la secuencia de purificación de las bacteriocinas

AUTOR	BACTERIOCINA	SECUENCIA DE PURIFICACION							ACTIVIDAD RECUPERADA (%)
		Precipitación con sulfato de amonio	Extracción con Cloroformo y/o metanol	Filtración en gel	Cromatografía			Adsorción - liberación	
					Intercambio iónico	Interacción hidrofóbica	Fase reversa		
Kanatini Kazuo (1995)	Acidocina A	400 mg/ L	-	-	-	-	-	-	10
Joerger M. C. (1986)	Helveticina J	Buffer pH 5.3 con 6% de SDS	-	Sephadex G-22012	-	-	-	-	4
Jimenes Díaz Rufino (1995)	Pantaricina S	516g/L	-	-	Sepharosa Catiónica	Fenil-sepharosa	Líquida C2/C18	-	91.6
Kaiser Alan L (1996)	Bavaricina MN	60% saturación	-	-	Sepharosa Q (aniónico) Sepharosa SQ (catiónica)	-	-	-	10.7
Aymerich Teresa (1996)	Enterocina A	400g/l	-	-	S sefarosa cationica	-	Ne	-	51.3
Contreras B. G. L. (1997)	Lactobina A	35% Saturación	Cloroformo/ metanol (1:2)	-	-	-	Fenil-sepharosa HR 5/5	-	0.069

- El método no se utilizó; Ne- condiciones no especificadas

Cuadro 3. Métodos empleados en la secuencia de purificación de las bacteriocinas (continuación)

SECUENCIA DE PURIFICACION									
AUTOR	BACTERIOCINA	Precipitación con sulfato de amonio	Extracción con cloroformo y/o metanol	CROMATOGRAFIA				Adsorción- liberación	ACTIVIDAD RECUPERADA (%)
				Filtración en gel	Intercambio iónico	Interacción hidrofóbica	Fase reversa		
Van Reenen C. A. (1998)	Plantaricina 423	-	13% de cloroformo	-	-	-	Fenilsepharosa H/R 5/5	-	-
Meghrouss J. (1997)	Nisina Z	60% saturación	-	-	-	-	Ultrasfere ODS	-	3.6
Hubert E. (1998)	Bacteriocina PsVP-10	-	-	Fosfocelulosa	-	-	-	-	64
Miteva V. (1998)	Bacteriocina producida por Lactobacillus delbrückii 1043	Ne	-	-	-	-	Ne	-	17
Aktypis A. (1998)	Termofilina T	55%	-	Sephadex G-150	Aniónica	-	-	-	3
Elegado (1997)	Pediocin AcM	-	-	-	-	-	-	Adsorción pH6/lib. NaCl pH 2	90
Yildirim Z. (1998)	Lactococina R	-	-	-	-	-	-	Ajustando el pH del medio de cultivo a rangos de 3-9 centrifugando y resuspendiendo en NaCl pH 2	50

- El método no se utilizó; Ne- condiciones no especificadas

Precipitación de bacteriocinas son el sulfato de amonio y mezclas cloroformo-metanol (Cuadro 3).

2.5.2 Separación o purificación

Como se indica en el cuadro 3, la etapa de separación o purificación de las bacteriocinas se lleva a cabo mediante métodos cromatográficos tales como cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). También se han empleado métodos poco convencionales como la cromatografía de inmunoadfinidad y el método de adsorción- liberación. El final del proceso de purificación esta marcado por la concentración de las muestras de bacteriocina para cuyo fin se realizan procesos de diálisis, ultrafiltración y liofilización.

Por ser de interés en el presente trabajo, a continuación se detalla el método de purificación por adsorción-liberación específica.

2.5.2.1 Purificación por el método de adsorción-liberación específica

De acuerdo a Bhunia, (1991) dependiendo del pH del medio de cultivo la Pediocina AcH se adhiere a la célula productora. Se observó también que la máxima adsorción ocurría a valores de pH de 6.0-6.5 y que a un valor de pH menor o igual a 2 no se observaba adsorción alguna. Hasta el momento, no se conoce el principio fisicoquímico de este fenómeno, pero dicha propiedad ha sido utilizada para la purificación de bacteriocinas por Yang (1992), Elegado *et al.* (1997) y Yildirim y Johnson (1998). El método consiste en modificar el pH del medio de cultivo a un valor que promueva la adsorción de la bacteriocina a la

célula productora y posteriormente resuspender las células en una solución salina a un valor de pH que propicie su liberación (Figura 1).

En algunos casos el método de adsorción-liberación se puede utilizar como paso inicial de purificación, es decir, usarlo para recuperar la bacteriocina del medio de cultivo y continuar con una serie de cromatografías. También existen reportes de que aprovechando la propiedad de adherencia de las bacteriocinas se ha sustituido a las células por una resina (amberlita XAD-7 (Germond *et al.* 1997), XAD-10 (Hastings *et al.* 1991), XAD-1180 (Jennes, 2000) para la recuperación de bacteriocinas del medio de cultivo. El uso de la resina ha resultado efectivo aunque la adsorción no es tan específica como en el caso de las células ya que también se adhieren otros componentes del medio de cultivo. Aún así, de acuerdo a Guyonnet *et al.* (2000) es mejor usar la resina como paso inicial de purificación que la precipitación porque se recupera un porcentaje mayor de la bacteriocina con una menor cantidad de proteínas del medio de cultivo.

2.5.3 Determinación del peso molecular e identificación de actividad

Una vez separadas o purificadas, la determinación del peso molecular de las bacteriocinas se hace tradicionalmente por electroforesis (González *et al.* 1994; Garver y Muriana, 1994). Se puede usar también espectroscopia de masas para dicho fin aunque el proceso resulta muy caro (Elegado *et al.* 1997).

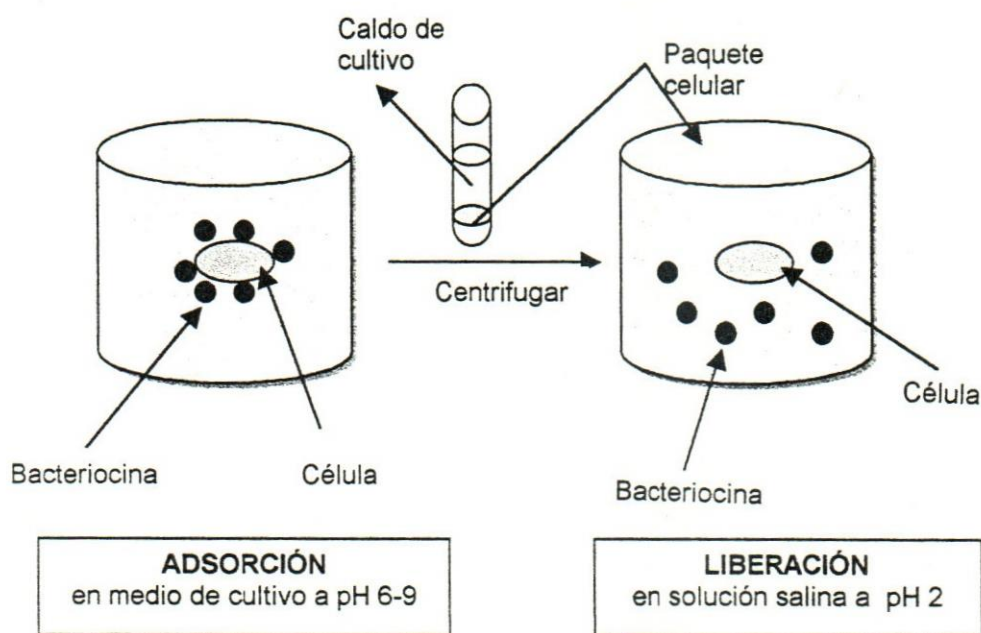


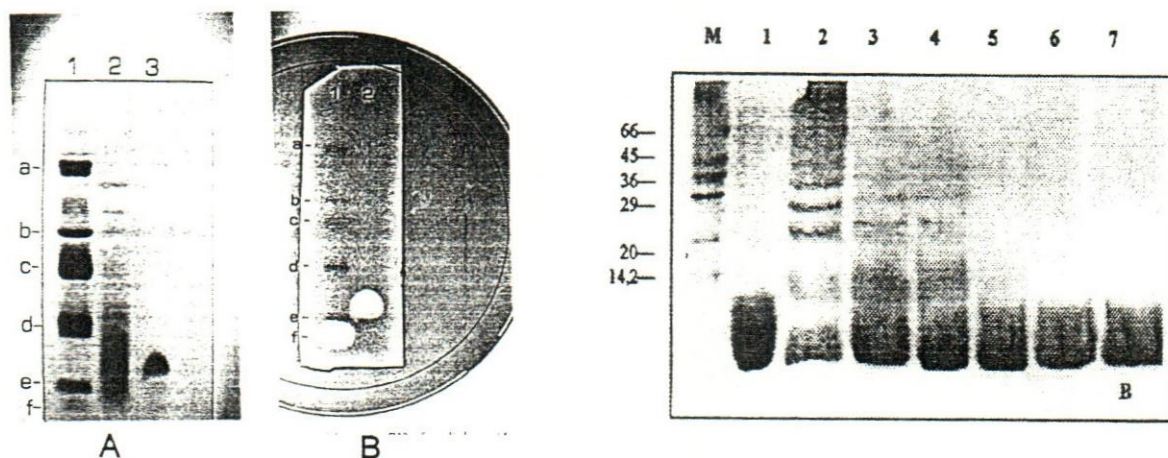
Figura 1. Esquematización del proceso de adsorción-liberación de bacteriocinas a las células productoras

La determinación del peso molecular de las bacteriocinas puras se realiza utilizando gel de acrilamida (PAGE) y dodecil sulfato de sodio (SDS), de acuerdo a Shägger y Von Jagow (1987). La técnica de electroforesis fue usada inicialmente para separar proteínas de bajo peso molecular de un rango de 1 a 100 Kda y ha sido empleada con éxito por varios grupos de investigación para separación de péptidos (Kaiser y Montville, 1996; Aymerich *et al.* 1996; Larsen *et al.* 1993).

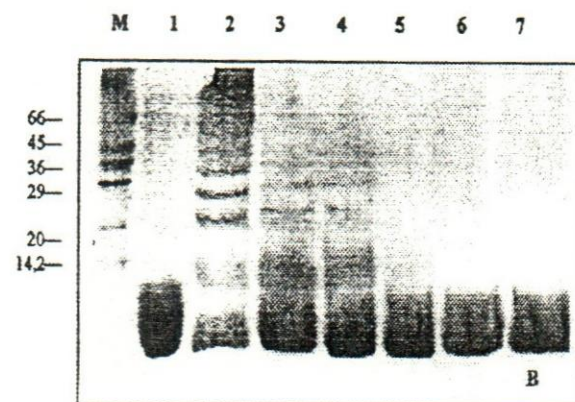
En el caso de las proteínas la electroforesis, además de dar a conocer su peso molecular también es empleada como un indicador de pureza, ya que la presencia de una sola banda en el gel indica que la proteína en estudio esta pura. En el caso de las bacteriocinas, sin embargo, el gel de electroforesis presenta generalmente más de una banda o una banda no definida (Figura 2) (Aktypis *et al.*, 1998; Oscáriz *et al.*, 1999; Abriouel *et al.*, 2001; Janes *et al.*, 1999). Esto es debido a que las bacteriocinas tienen la propiedad de formar productos de agregación y a que se degradan durante el proceso de purificación por efecto de los procesos de diálisis, liofilización, factores de pH, temperatura y tiempo de purificación (Elegado *et al.* 1993; Parente y Ricardi, 1999; Jiménez-Díaz *et al.* 1995).

La identificación de la banda correspondiente a una bacteriocina en un gel de poliacrilamida, se hace colocando el gel sin teñir en una caja Petri estéril y agregando una capa de agar que contiene un microorganismo indicador (Yildirim y Jonson, 1998; Humbert *et al.* 1998; Kaiser y Montville, 1996; Janes *et al.* 1999).

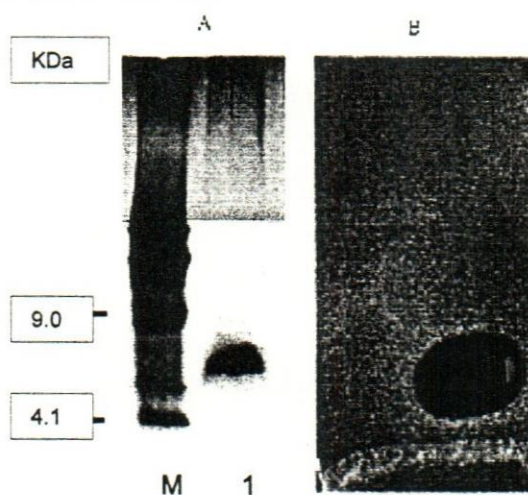
Después de un periodo de incubación, se observan halos de inhibición (figura 2 (i) y (ii)) alrededor de la banda correspondiente a la bacteriocina.



i) Gel y zimograma de las bacteriocinas leucocina BC2 y G13 (Janes *et al.* 1999). A) Gel de acrilamida. Carril 1- Marcadores de peso molecular 2-Leucocina BC2 y 3-Leucocina G13. B) Zimograma donde se observan las zonas de inhibición de las dos bacteriocinas



ii) Gel de la bacteriocina AS- 48 (Abriouel *et al.* 2001). M-Marcadores de peso molecular y en los carriles del 1 al 7 se observan bandas de las muestras de bacteriocina AS-48 con diferentes concentraciones de SDS



iii) Gel y zimograma de la bacteriocina Cereína 7 (Oscáriz *et al.* 1999). A) Gel de acrilamida donde M- marcadores de peso molecular y 1) Banda correspondiente a Cereína 7. B) Zimograma de Cereína 7 donde se observa la zona de inhibición.

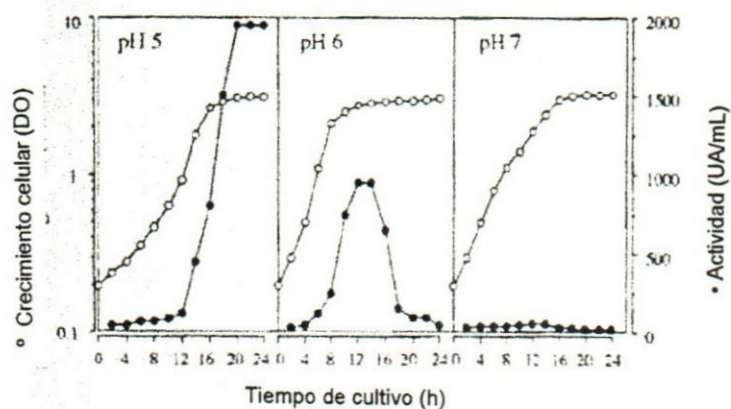
Figura 2. Determinación de los pesos moleculares en SDS-PAGE de algunas bacteriocinas e identificación de las zonas de actividad (zimogramas).

2.6 Factores que influyen en la purificación de bacteriocinas

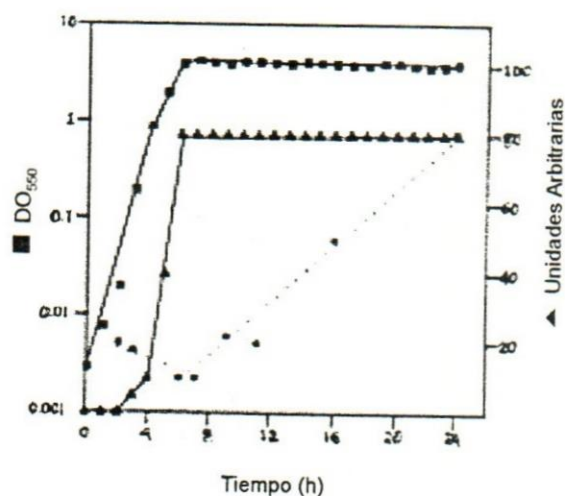
Debido a la naturaleza extremadamente heterogénea de las bacteriocinas se han destacado algunos factores importantes a considerar durante el proceso de purificación. Dichos factores se detallan a continuación

2.6.1 Producción de bacteriocinas

Existen reportes de bacteriocinas que pierden o disminuyen su actividad en medio líquido (Contreras *et al.* 1997) . Por lo tanto es necesario asegurar la producción máxima de la bacteriocina antes de iniciar el proceso de purificación. La producción de las bacteriocinas se presenta de dos maneras. Existen bacteriocinas que tienen un pico máximo de producción y un ejemplo de ellas es la acidocina J1132 (Tahara *et al.* 1996) (Figura 3A). Debido a esto se hacen ensayos de cinética de crecimiento para encontrar el pico máximo de producción de una bacteriocina en estudio. También hay bacteriocinas que no tienen un pico máximo de producción sino que alcanzan su concentración máxima al final de la fase logarítmica de crecimiento del microorganismo productor y dicha concentración permanece constante durante toda la fermentación como es el caso de la cereína 7 (Oscáriz *et al.* 1999) (Figura 3B). Cuando la producción de bacteriocina no tiene un pico máximo y se desea aumentarla varían las condiciones (Eraso *et al.* 1992), como por ejemplo, la aireación.



A) Producción de la acidocina J1132 a diferentes condiciones de pH (Tahara *et al.* 1996). Se observa un pico máximo de producción a pH 6.



B) Producción de la bacteriocina Cereína 7 que no tienen un pico máximo durante la fermentación 7 (Oscáriz *et al.* 1999).

Figura 3. Cinética de producción de las bacteriocinas J1132 y Cereína 7.

2.6.2 Determinación de la concentración de proteínas y la actividad específica

La sensibilidad de los ensayos de cuantificación de proteínas y de actividad de bacteriocinas resultan de importancia para asegurar el grado de pureza y actividad específica de la bacteriocina en estudio (Carolissen-Mackay *et al.* 1997).

Los métodos más empleados para la determinación de proteínas son el de Folin Lowry, Biuret, Bradford, Acido bicinónico (BCA) así como la determinación directa por espectroscopia a 280 o 214 nm (Piard *et al.* 1992; Rammlsberg *et al.* 1990) y han sido adaptados para determinar las concentraciones de bacteriocinas durante el proceso de purificación.

Tagg y colaboradores (1976) indican que los ensayos de actividad de bacteriocinas dependen de las condiciones de prueba y de la susceptibilidad del microorganismo indicador utilizado. La difusión de la bacteriocina durante los ensayos es un importante factor a considerar. Por ejemplo la nisina tiene una difusión baja en el agar y por lo tanto se subestima su valor de actividad (Hurst, 1981). En 1971, Bailey y Hurst encontraron que la actividad biológica de la nisina es afectada por los métodos de extracción y purificación teniendo como consecuencia diferencias en la actividad específica. Así también, se ha reportado que las actividades específicas de las carnobacteriocinas BM1 y B2 varían cuando son probadas contra diferentes cepas indicadoras (Quadri *et al.* 1994).

2.6.3 Pureza y estabilidad de las bacteriocinas

Las bacteriocinas puras son más inestables que las bacteriocinas que se encuentran en el medio de cultivo (Carolissen-Mackay *et al.* 1997). A lo largo de la purificación las bacteriocinas se van degradando observándose la disminución de actividad durante cada paso de purificación. Este proceso de degradación se refleja también mediante bandas que no están muy bien definidas aunque la muestra este pura (Aktypis *et al.* 1998).

2.7 Caracterización de bacteriocinas

Los estudios de caracterización de bacteriocinas se realizan para confirmar si la bacteriocina en estudio es nueva o es una de las ya existentes. Tradicionalmente, la caracterización de bacteriocinas se ha venido haciendo mediante la secuenciación de aminoácidos. Esto tiene la desventaja de que el proceso es largo y a veces se complica debido a que el grupo N- terminal de los aminoácidos se encuentra bloqueado haciendo imposible la secuenciación por degradación de Edman. Tal es el caso de la nisina (Jiménez-Díaz *et al.* 1995; Mota-Méira *et al.* 1997).

2.7.1 Bioensayos para la caracterización de nisina

En el caso específico de la nisina se han desarrollado pruebas rápidas para caracterizar a la nisina como el ensayo de bioluminiscencia (Wahlström y Saris, 1999) y el ensayo de GUS (β -glucorinidasa) (De Ruyter *et al.* 1996).

Ambos ensayos se fundamentan en la autorregulación de la biosíntesis de la nisina. Los genes que participan en la biosíntesis de la nisina, autorregulación e inmunidad, están clasificados en dos operones inducibles, *nisA/ZBTCIPRK* y *nisFEG*. Los genes *nisR* y *nisK* son los responsables del sistema de autorregulación, formado por dos componentes: el regulador de respuesta NisR que se encuentra en el citoplasma y la histidin cinasa (NisK) que se encuentra en la membrana. La nisina externa actúa como señal sobre NisK que transmite la información a NisR y este activa la transcripción de los promotores de los operones *nisA/ZBTCIPRK* y *nisFFEG* (Figura 4). Los promotores de nisina se han utilizado para hacer plasmidos, en donde dichos promotores son unidos a un gen reportero. En el caso del bioensayo de GUS el promotor *nisA* es unido al gen *gus* A (De Ruyter *et al.* 1996) y en el de bioluminiscencia el promotor *nisF* es unido al gen de luciferasa (Wahlström y Saris, 1999). Ambos genes se van a expresar en presencia de nisina. Estos ensayos se han utilizado para detectar nisina en leche, agua y sobrenadantes de cepas productoras de nisina.

Hasta el momento, no se han reportado bioensayos para detectar otras bacteriocinas que no sean nisina.

2.6.1 Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)

Generalmente el HPLC ha sido usada como paso final de purificación de algunas bacteriocinas como curvacina FS47 (Garver y Muriana, 1999), bavaricina A (Larsen *et al.* 1993) y Mesentericina Y-105 (Héchar *et al.* 1992). También se ha utilizado para determinar el peso molecular de las bacteriocinas como es el caso de acidocina A (Kanatany , 1995). Hasta el momento, no existen reportes de la

utilización de HPLC para caracterizar bacteriocinas. Sin embargo, se conoce el perfil de elusión de nisina. Por lo tanto se puede usar ésta como referencia y comparar su perfil de elusión con el de otras bacteriocinas en estudio.

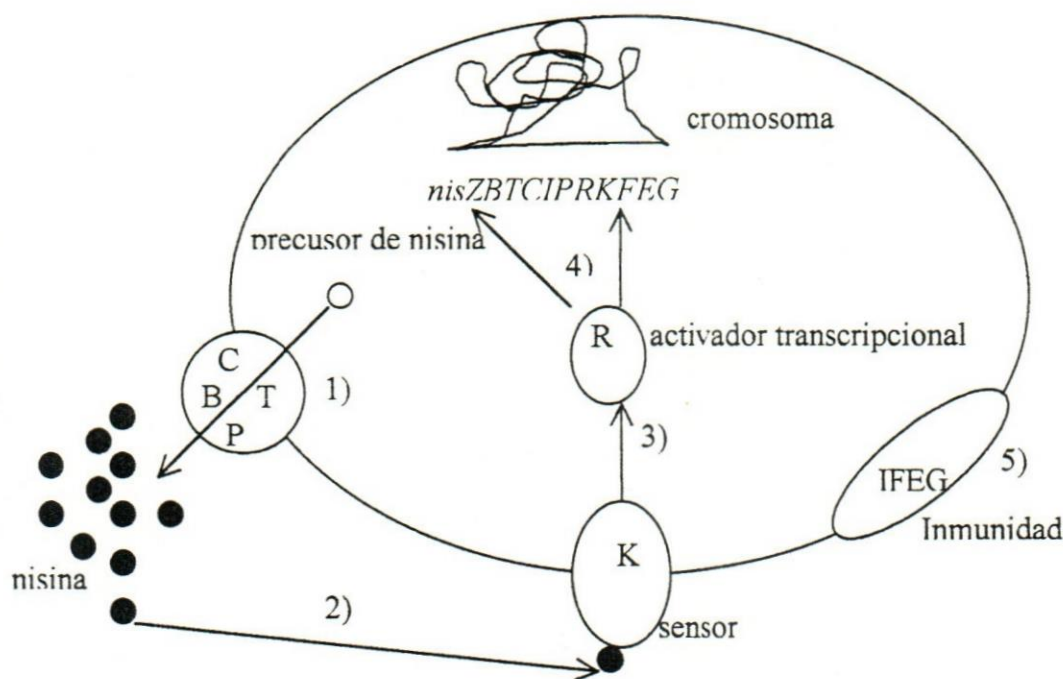


Figura 4. Esquema de la autorregulación de la biosíntesis de la nisina en *L. lactis* subsp. *Lactis* N8 por señal de transducción. 1) La nisina es modificada y secretada por la maquinaria de biosíntesis (BCTP). 2) La nisina extracelular activa la histidina cinasa NisK que es autofosforilada. 3) NisK después fosforila al regulador de respuesta NisR. 4) NisR activa la transcripción de los promotores de los operones que están antes de *nisZ* y *nisF*. 5) El sistema (IFEG) está presente para proteger a la cepa productora de nisina, por un mecanismo desconocido pero previene la muerte por nisina (Wahlström y Saris, 1999).

2.7 Bacteriocina WB1

La bacteriocina WB1 es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislado de pozol de la zona Altos de Chiapas por Cañas (1991). El pozol es una masa preparada a base de maíz nixtamalizado que se consume disuelta en agua como bebida refrescante en Honduras, Nicaragua y en el sureste de México (Oaxaca, Campeche, Tabasco, Veracruz, Yucatán y Chiapas) (Herrera y Ulloa, 1975; Silva, 1984).

De acuerdo a Pereyra y Trejo (1998) la bacteriocina WB1 se reporta como perteneciente al grupo IIa y que inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Es sensible a pronasa y no es inactivada por tripsina ni por α -quimotripsina. Así mismo se ha reportado que un porcentaje del 40% de bacteriocina se encuentra adherido a células y un 60% se encuentra libre en el medio de cultivo al finalizar la fermentación (Santiago, 2000). La bacteriocina adherida a células se denominó WB1a mientras que la bacteriocina libre en el medio de cultivo se denominó WB1m. En ese mismo trabajo se liberó a la bacteriocina WB1a en solución salina a pH 1 y posteriormente se observaron 6 bandas con actividad antimicrobiana en el gel de electroforesis (Santiago, 2000). Lo anterior conllevó a la presunción de que *L. lactis* aislado de pozol es productor de un sistema de bacteriocinas. Por lo tanto sería de interés purificar dicho sistema para caracterizarlo.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Purificar y caracterizar las bacteriocinas WB1a y WB1m producidas por *L. lactis* subsp. *lactis*.

3.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar la preparación del inóculo de *L. lactis*
2. Determinar el pico máximo de producción de la bacteriocina WB1m en un cultivo estático.
3. Determinar la influencia de la aireación en la producción de la bacteriocina WB1m.
4. Realizar el escalamiento de la producción de las bacteriocinas WB1a y WB1m de matraz a fermentador.
5. Realizar la separación de las bacteriocinas WB1a y WB1m para determinar sus pesos moleculares.
6. Caracterizar las bacteriocinas WB1a y WB1m .

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Medios de cultivo y soluciones

4.1.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron los siguientes: **Agar assay 1%** (g/L: peptona bacteriológica (Oxoid L37) 10; extracto de carne (Bioxon 160) 3; NaCl 3; extracto de levadura (Difco 0127-179) 1.5; azúcar mascabado (Dilis) 1 y agar bacteriológico (Bioxon C150-1) 10, pH 7.5); **Agar assay 0.8%** (g/L: la formulación anterior con 8 g de agar) pH 7.5; **Caldo soya tripticasa preparado por ingredientes (CST-C)**: (g/L: Triptona (Oxoid L42) 17; peptona bacteriológica (Oxoid L37) 3; cloruro de sodio 5; fosfato dipotásico 2.5; 0.25% glucosa más 0.5% de extracto de levadura (Difco 0127-17)); **Caldo M17** (Difco).

4.1.2 Soluciones

Las soluciones empleadas fueron las siguientes: Solución Ringer (g/L: NaCl 9; KCl 0.42; CaCl₂ anhidro 0.24 y NaHCO₃ 0.20); Solución Ringer 1:4 : A una parte de solución Ringer se le adiciona 3 partes de agua destilada; Agua peptonada 0.1%.

4.2 Microorganismos

Las cepas que se utilizaron fueron:

I. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislada de pozol indígena de la zona Altos de Chiapas y caracterizada por MIDI LABS (Newark, USA) con base en la similitud de su secuencia genética 16SrRNA.

II. *Micrococcus luteus* ATCC (American Type Culture Collection) 10240.

4.2.1 Conservación de cepas

I. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* fue mantenida a -20°C en chaquiras preparadas en caldo nutritivo con glicerol como crioprotector.

II. *Micrococcus luteus* fue mantenida a -70°C en viales con 200 μL de una mezcla de caldo nutritivo con glicerol al 10% como crioprotector.

4.2.2 Estandarización del inóculo de *L. lactis*

El inóculo de *L. lactis* se preparó a partir de las cepas conservadas. Se hicieron dos resiembras de *L. lactis* y en cada una se realizó un registro de la $\text{DO}_{550\text{nm}}$ (Densidad óptica) para establecer el tiempo de incubación necesario para tener un cultivo en la fase logarítmica de crecimiento ($\text{DO}_{550\text{nm}} = 0.45-0.85$) (Figura 5). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Después de establecidas las condiciones se transfirieron 0.2% de la segunda resiembra de *L. lactis* (Inóculo A) y se realizaron dos diluciones seriadas en 50 mL de agua peptonada para inocular el cultivo de fermentación y alargar el tiempo a 18 h (Figura 6).

4.2.3 Inóculo de *M. luteus*

El inóculo de *M. luteus* se preparó a partir del cultivo de trabajo de acuerdo a lo descrito por Maqueda (2001) (Apéndice 1).

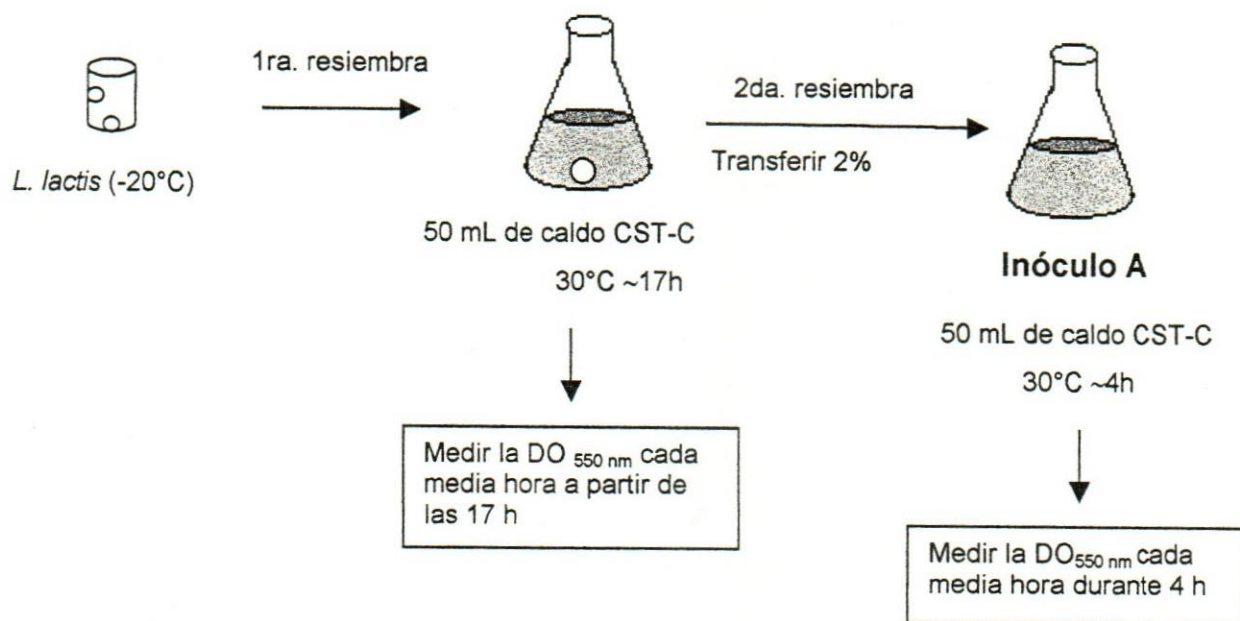


Figura 5. Preparación del inóculo A de *L. lactis* para tener un cultivo en fase logarítmica de crecimiento

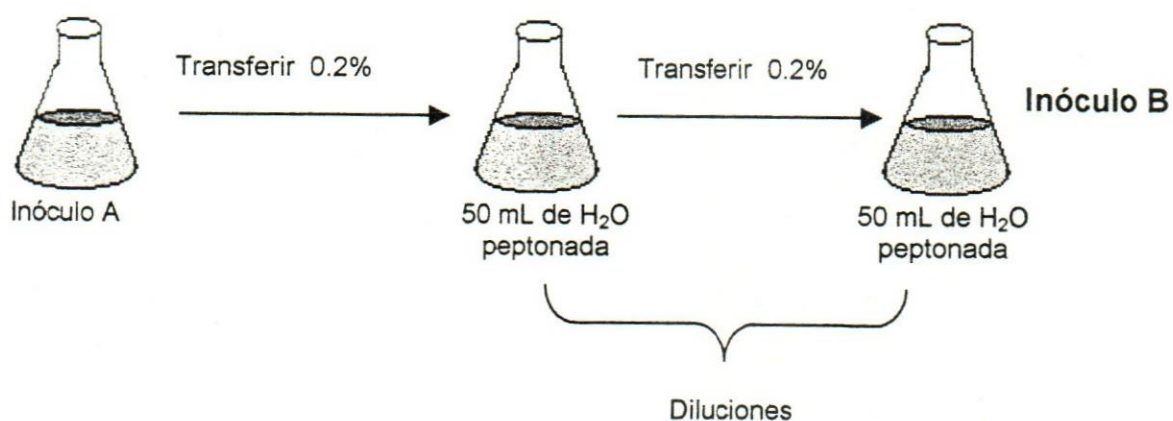


Figura 6. Preparación del inóculo B de *L. lactis* para iniciar las fermentaciones

4.3 Producción de las bacteriocinas WB1

4.3.1 Cultivo estático

Se inocularon 250 mL de caldo CST-C con 0.2% del inóculo B (Figura 6) en matraces Erlenmeyer de 500 mL se incubaron a 30°C bajo condiciones estáticas. Después de 17 horas de crecimiento de *L. lactis* se tomaron muestras cada 30 minutos hasta las 23 y 31h. Se midió la DO_{550nm} , el pH y la actividad de la bacteriocina WB1m en cada una de las muestras. Los experimentos se hicieron por triplicado.

4.3.2 Efecto de la aireación

Para conocer el efecto que tiene la aireación en la producción de la bacteriocina WB1m se incubó a *L. lactis* durante 18 h a 30 °C como se describe en la Figura 7.

4.3.3 Cultivo de *L. lactis* en fermentador

Una vez establecidas las condiciones de cultivo en matraz se escaló la producción de las bacteriocinas WB1 a cultivos de 5 L de CST-C en un fermentador BIOFLOW II. Con base en estudios previos (Santiago, 2000) esta era la cantidad mínima de medio para tener una concentración de bacteriocina WB1a y WB1m suficiente al final de la fermentación y poder seguir con la purificación. Se transfirió 0.2% del inóculo B a los 5 L de medio de cultivo CST-C. La fermentación se incubó a 30°C durante 18 h con una agitación de 50 r.p.m.

Al finalizar la fermentación, el medio de cultivo se centrifugó a 6000 r.p.m durante 10 minutos y se separó el medio de cultivo del paquete celular.

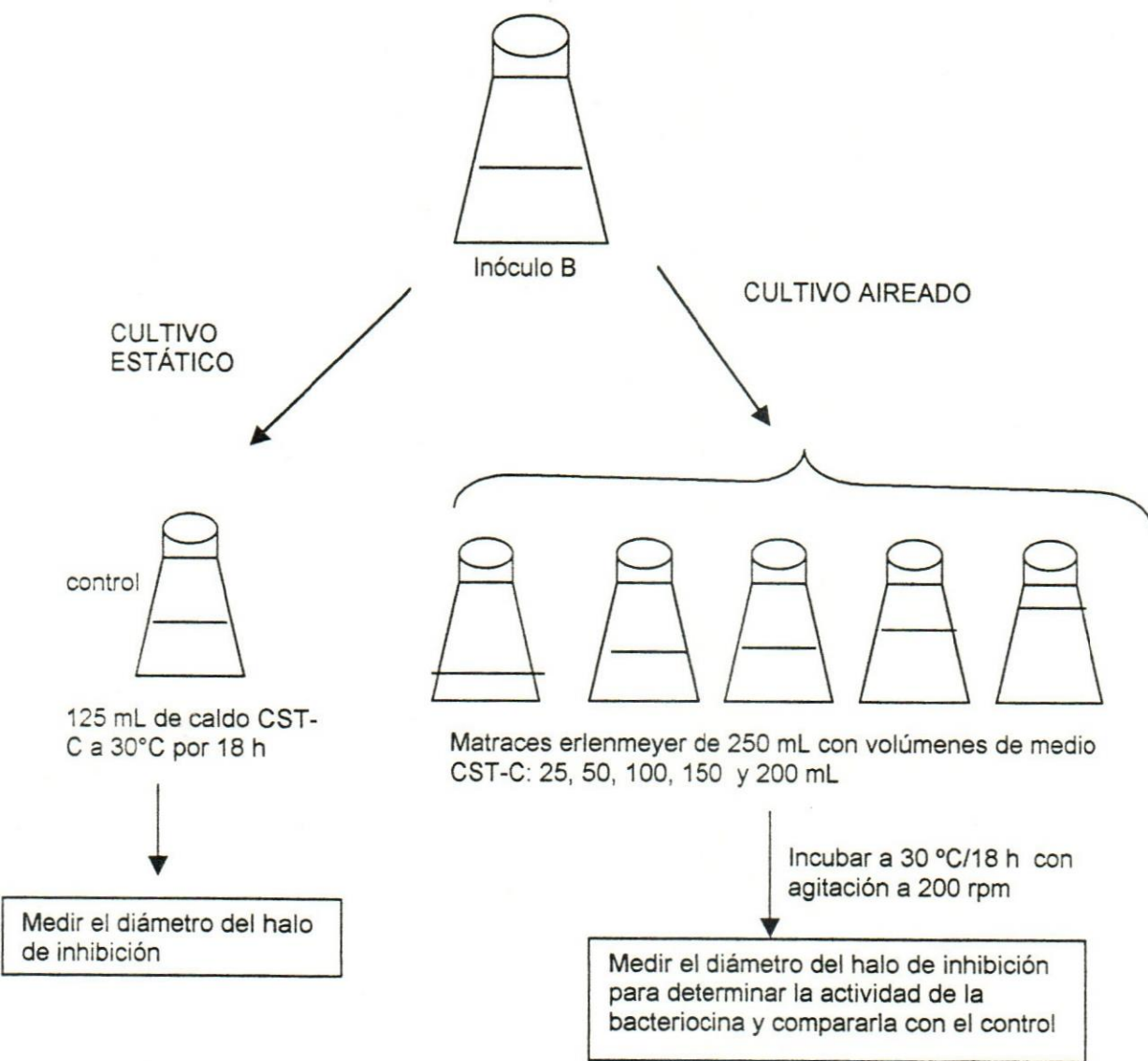


Figura 7. Efecto de la aireación en la producción de la bacteriocina WB1m

4.4 Determinación de la actividad

4.4.1 Preparación de muestras

Las muestras con bacteriocina WB1 fueron calentadas en baño María a 70 °C durante 30 minutos para evitar una posible inactivación de la bacteriocina WB1 por la acción de enzimas proteolíticas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10 000 r.p.m por 10 minutos a 4 °C o temperatura ambiente para tener sobrenadantes libres de células. El pH de los sobrenadantes se ajustó a un valor de 6.5 adicionando NaOH 1M o HCl 1M. Las muestras obtenidas fueron esterilizadas por filtración utilizando membranas de punto de corte de 0.45 µm. A partir de estas muestras se realizaron diluciones seriadas de dos en dos (1:2, 1:4, 1:8, etc.) en condiciones asépticas.

4.4.2 Método de fosas

La determinación de actividad se llevó a cabo por el método de fosas utilizando como microorganismo indicador a *M. luteus* (Pereyra y Trejo, 1999; Santiago, 2000; Maqueda 2001). Se prepararon placas con el microorganismo indicador y se refrigeraron durante 1 hora a 4 °C. Después de este tiempo, en cada placa se hicieron tres series de 3 fosas de 5 mm de diámetro. En cada fosa se colocaron por triplicado 20 µL de muestra de bacteriocina y de sus respectivas diluciones. Se dejaron secar las muestras en las fosas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron las placas en posición invertida durante 24 h a 30 °C. La presencia de halos de inhibición indicó la actividad de la bacteriocina.

4.4.3 Cuantificación de la actividad

La cuantificación de la actividad se hizo midiendo el diámetro de los halos de inhibición de muestras concentradas. La relación entre el diámetro de inhibición y la actividad de la bacteriocina fue proporcional. También se cuantificó la actividad de un modo fino utilizando unidades. Las unidades de actividad fueron definidas como el recíproco de la máxima dilución que presentó una zona de inhibición perceptible y fueron expresadas como unidades arbitrarias (UA) por mililitro.

4.5 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas en las muestras de bacteriocina se determinó colocando 1 mL de solución en un celda de volumen reducido y midiendo la DO a 214 nm. El método se basa en que a la longitud de onda de 214 nm se manifiesta el enlace peptídico de las proteínas.

La concentración de proteínas se cuantificó interpolando la DO obtenida de las muestras en una curva patrón mediante una ecuación de regresión lineal.

La curva patrón se hizo midiendo la DO a 214 nm de concentraciones conocidas de nisina pura. Se preparó una solución de nisina con una concentración de 20 µg/mL a partir de la cual se hicieron diluciones para tener concentraciones de 2 a 10 µg/mL. La curva patrón obtenida (Apéndice 2) se utilizó para calcular la cantidad de proteína en las muestras de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína (}\mu\text{g/mL)} = [\text{DO}_{214\text{nm}} - (-0.00157)] / 0.02149$$

4.6 Purificación de las bacteriocinas WB1a y WB1m

El proceso de purificación de las bacteriocinas WB1a y WB1m se realizó como se describe a continuación.

4.6.1 Purificación de la bacteriocina WB1a adherida a células

4.6.1.1 Liberación de la bacteriocina WB1

Las células de *L. lactis* con bacteriocina WB1 fueron resuspendidas en 250 mL de una solución salina de NaCl 100 mM ajustada con HCl 1M a pH 1.0. La solución fue mezclada con un agitador magnético durante 6 h. Transcurrido el tiempo la muestra se centrifugó a 10,000 r.p.m por 15 min para separar la solución del paquete celular. El volumen de la muestra se redujo cinco veces por liofilización. Se realizó la determinación de actividad y proteína.

4.6.1.2 Ultrafiltración

La eliminación de sales y reducción del volumen cinco veces más que en el paso anterior (4.6.1.1) de la muestra de bacteriocina se hizo por ultrafiltración. Se usó un equipo de ultrafiltración Amicon con una membrana YCO5 (punto de corte de 500 Da). El proceso tuvo una duración de 2 a 3 h. A la muestra se le determinó actividad y proteína.

4.6.1.3 Técnicas cromatográficas

i) Cromatografía de filtración en gel

La muestra de bacteriocina WB1 obtenida en el inciso 4.6.1.2 se aplicó a una columna de 76x2.3 cm con resina Sephadex G-50 (rango de separación entre 1.5 y 30 kDa). La columna fue equilibrada y eluída en una solución amortiguadora de TRIS 10 mM pH 7.0 a un flujo de 0.5 mL/min y a 4 °C. Las fracciones se colectaron cada 5 minutos. A las fracciones que contenían proteína se les hizo ensayo de actividad. Se mezclaron las fracciones con actividad de bacteriocina.

ii) Cromatografía de intercambio catiónico

La muestra con actividad obtenida de filtración en gel fue aplicada a una columna que contenía resina CM-celulosa. La columna fue equilibrada y eluída en una solución amortiguadora de TRIS 10 mM pH 7.0 a un flujo de 0.5 mL/min y a 4 °C. La muestra de proteína adherida a la resina fue removida aplicando un gradiente desde 0 a 2 M de una solución de NaCl. Se colectaron las fracciones cada 5 minutos. Se determinó actividad en cada una de las fracciones y se mezclaron las fracciones con actividad. Se redujo el volumen final de la muestra obtenida por liofilización.

iii) Cromatografía de filtración en gel

La muestra obtenida por intercambio catiónico se aplicó a una columna con resina sephadex G-50 para desalar la muestra y eliminar otras proteínas. Las condiciones fueron las mismas que se describieron en i) excepto que se uso como

eluyente agua destilada. Finalmente las muestras puras de bacteriocina WB1 obtenidas se concentraron por liofilización.

4.6.2 Purificación de la bacteriocina WB1m libre en el medio de cultivo

4.6.2.1 Adsorción de la bacteriocina a la resina XAD-7

Los 5 L de medio de cultivo con bacteriocina fueron adicionados con 160 g de resina XAD-7 (Sigma). La mezcla se mantuvo con agitación por un período de 12 a 14 h para que la bacteriocina WB1m se adsorbiera a la resina XAD-7. Transcurrido el tiempo la resina se separó del medio de cultivo por decantación. La resina fue lavada de 5 a 8 veces con agua destilada para eliminar compuestos con color procedentes del medio de cultivo. Se colocó la resina XAD-7 en un matraz Erlenmeyer de 1L y se le adicionó 500 mL de una solución amortiguadora de acetonitrilo al 70% con TFA (Ácido trifluoroacético) 0.1% para extraer la bacteriocina. La solución amortiguadora fue adicionada en fracciones de 100 mL por cada hora durante 5 h aproximadamente. El extracto obtenido fue concentrado 5 veces del volumen original por evaporación del acetonitrilo con nitrógeno. A la muestra obtenida se le determinó actividad y proteína.

4.6.2.2 Técnicas cromatográficas

a) Cromatografía de intercambio aniónico

La muestra de bacteriocina obtenida en el inciso 4.6.2.1 se aplicó a una columna que contenía resina QAE-550C Toyopearl. La columna fue equilibrada y eluída con solución amortiguadora de TRIS 10 mM pH 7 a un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones con bacteriocina WB1 no fueron retenidas en la columna. Estas

fracciones se colectaron cada 5 minutos y se les determinó actividad. Las fracciones con actividad se mezclaron.

b) Cromatografía de intercambio catiónico

La muestra obtenida de intercambio aniónico se aplicó a una columna con resina CM-celulosa. El procedimiento fue el mismo que se describió en el inciso ii).

c) Cromatografía de filtración en gel

La muestra obtenida de intercambio catiónico se aplicó a una columna con resina sephadex G-50. El procedimiento seguido fue el mismo que se describió en el inciso iii).

Todos los análisis cromatográficos fueron realizados con columnas en las que el eluyente fluía por gravedad. La detección de las bacteriocinas WB1a y WB1m se llevó a cabo en línea con un detector (Uvicord SII Pharmacia) mediante celda UV a 206 nm. La colección de fracciones se hizo con un colector Bio-Rad, modelo 2128.

4.7 Determinación de los pesos moleculares de las bacteriocinas WB1a y WB1m

Los pesos moleculares de las muestras de bacteriocinas WB1a y WB1m puras obtenidas de las células y del medio de cultivo se determinaron por electroforesis usando un gel de poliacrilamida al 16.5% de acuerdo a lo descrito por Schägger y

von Jagow (1987). Las condiciones de electroforesis que se emplearon fueron las descritas por Kaiser y Montville (1996).

4.8 Determinación de bandas con actividad

La determinación de bandas con actividad en el gel de electroforesis se hizo utilizando zimogramas.

El zimograma consiste en colocar una parte del gel sin teñir (después de la electroforesis) en una caja Petri que contiene una base de agar assay 0.8% inoculado con *M. luteus* y se cubren con una sobrecapa de agar assay 0.8% igualmente inoculada con *M. luteus*. Las cajas se incubaron a 30 °C por 24 h. Transcurrido este tiempo se determinó la presencia o ausencia de halo de inhibición alrededor de las bandas que correspondan a las bacteriocinas.

4.9 Caracterización de las bacteriocinas WB1a y WB1m

Una vez que se confirmó la pureza de las bacteriocinas, el siguiente paso fue determinar si las bacteriocinas WB1 eran diferente a las que ya existen para lo cual se hicieron los siguientes estudios de caracterización.

4.9.1 Ensayo de GUS (B-glucorinidasa)

Las muestras puras de bacteriocina WB1 obtenidas a partir de células y del medio de cultivo fueron analizadas por el ensayo de GUS, usando como referencia nisina. Se inóculo la cepa de *L. lactis* 8008, que tiene un gen específico que es activado en presencia de nisina. En 20 mL de medio M17 y se incubó a 30 °C por

12 h. Transcurrido el tiempo, se transfirieron 10 mL del cultivo a 100 mL de medio fresco y se incubó a 30 °C por 1.5 h. Se revisó que la DO₆₆₀ fuera mayor o igual a 0.5.

A partir de una solución de nisina pura de 50 UI/mL se hicieron diluciones hasta 0.26 UI/mL para hacer una curva patrón; también se tuvieron preparadas las muestras de bacteriocinas WB1. Después de la 1.5 h de incubación se transfirió 0.1 mL de las diluciones de nisina y de las bacteriocinas WB1 a tubos de microcentrifuga y se les adicionó 0.9 mL del cultivo de *L. lactis*, se homogenizaron las muestras y se incubaron nuevamente a 30 °C por 1.5 h. Después los tubos se centrifugaron por 5 min. a la máxima velocidad (12 000 r.p.m) de la microcentrífuga para separar al paquete celular del medio de cultivo. A los paquetes celulares contenidos en cada tubo se les adicionaron 0.2 mL de buffer de fosfatos pH 7 y 25 µL de tolueno-acetona 9:1. Se homogenizó la mezcla y fue incubada a 30 °C por 20 minutos. Por otro lado, se preparó una serie de viales de vidrio con 2.85 mL de buffer de GUS y 0.189 mL de sustrato. Transcurridos los 20 minutos se adicionaron 100 µL de la suspensión de células a cada tubo de vidrio. Se homogenizaron las muestras y se dejaron reposar por 5 minutos. Después se transfirieron 200 µL de cada muestra a una placa con pozos. La fluorescencia de las muestras se midió en el espectrofluorómetro a una excitación de 325 nm y emisión de 345 nm. Para determinar las unidades internacionales (UI) por mL de las bacteriocinas WB1 los valores de actividad de β -glucorinidasa se interpolaron en la curva patrón.

4.9.2 Ensayo de bioluminiscencia

Las muestras de bacteriocinas WB1 fueron analizadas de acuerdo a lo descrito por Wahlström y Saris (1999).

4.9.3 Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)

Las muestras de bacteriocina WB1a se inyectaron a una columna x-Terra RP18 (250 mm x 4.6 mm). El sistema cromatográfico de HPLC Waters constaba de una bomba cuaternaria Waters 600, un automuestreador Waters 717, un detector UV visible Waters 2487 y un sistema de integración Millenium versión 2032. La separación de la muestra se hizo a un flujo de 1 mL/min usando como eluyente A acetonitrilo y como eluyente B TFA (Ácido Trifluoroacético) 0.1%. Muestras de nisina pura y de nisaplin, sometido al mismo proceso de purificación que la bacteriocina WB1a, fueron usadas como estándares. Al final se hizo una comparación de los cromatogramas obtenidos.

V. RESULTADOS

5.1 Estandarización del inóculo de *L. lactis*

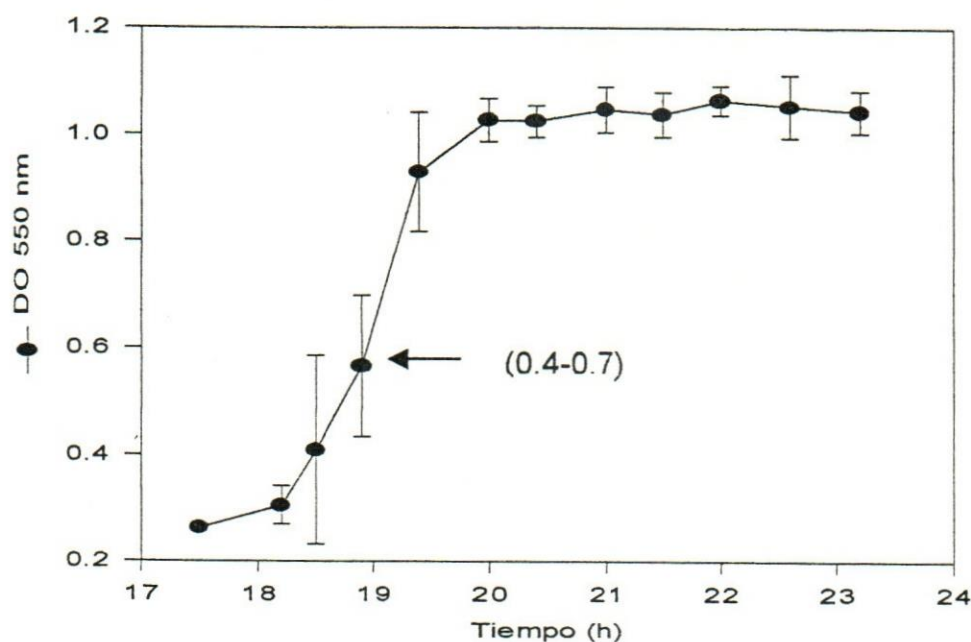
Para obtener un inóculo de *L. lactis* en fase logarítmica de crecimiento se encontró que se necesitan dos resiembras consecutivas a partir del cultivo de trabajo. Los tiempos de incubación se establecieron con base en el monitoreo realizado durante el crecimiento de *L. lactis* como se muestra en la Figura 8. La primera resiembra requiere un tiempo de incubación de 19 h ($DO_{550}=0.4-0.7$) y la segunda resiembra requiere un tiempo de 2.5 h ($DO_{550} = 0.5-0.6$).

5.2 Producción de las bacteriocinas WB1

5.2.1 Cultivo estático

Se monitoreó el pH del medio de cultivo y la producción de la bacteriocina WB1m durante el crecimiento de *L. lactis* en un cultivo estático. Se encontró que durante la fase media logarítmica de crecimiento de *L. lactis* ($DO_{550}= 0.6$) la producción de la bacteriocina WB1 m fue de 200 UA/mL y que a lo largo de la fermentación varía entre 100 y 200 UA/mL (Figura 9). El pH del medio de cultivo disminuyó de 6.5 a 5 durante la fase logarítmica de crecimiento y se mantuvo a 5.5 al final de la fermentación (Figura 9). La bacteriocina WB1m no presentó un pico máximo de actividad.

I)



II)

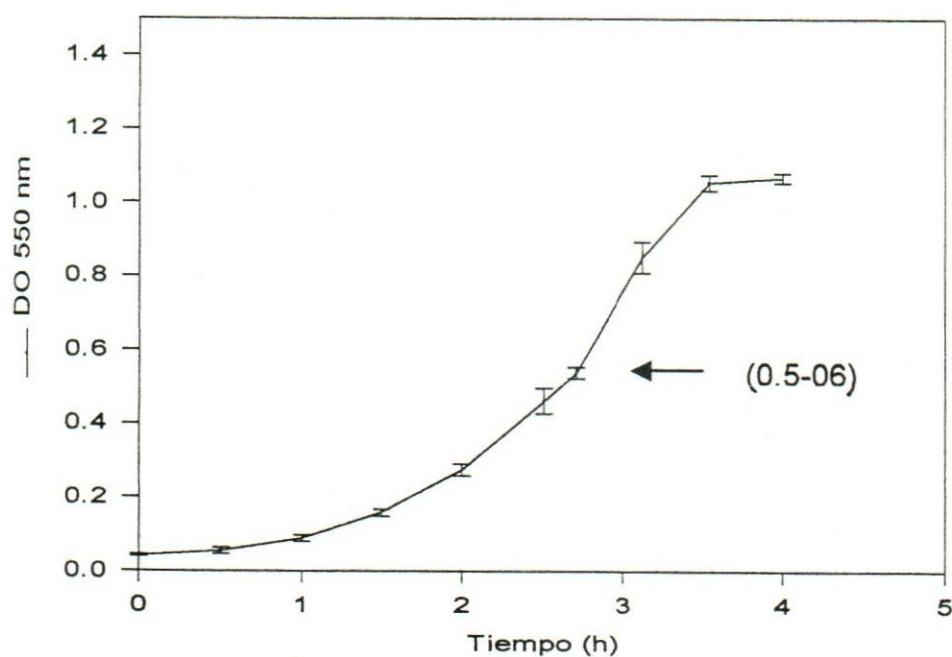


Figura 8. Estandarización del inóculo de *L. lactis*. I) Crecimiento de *L. lactis* durante la primera resiembra proviene del cultivo de trabajo mantenido a -20°C . II) Crecimiento de *L. lactis* durante la segunda resiembra inoculada con 2% de la primera resiembra a las 19h de crecimiento (DO 0.4-0.7). Los resultados son el promedio de tres determinaciones donde las barras y los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

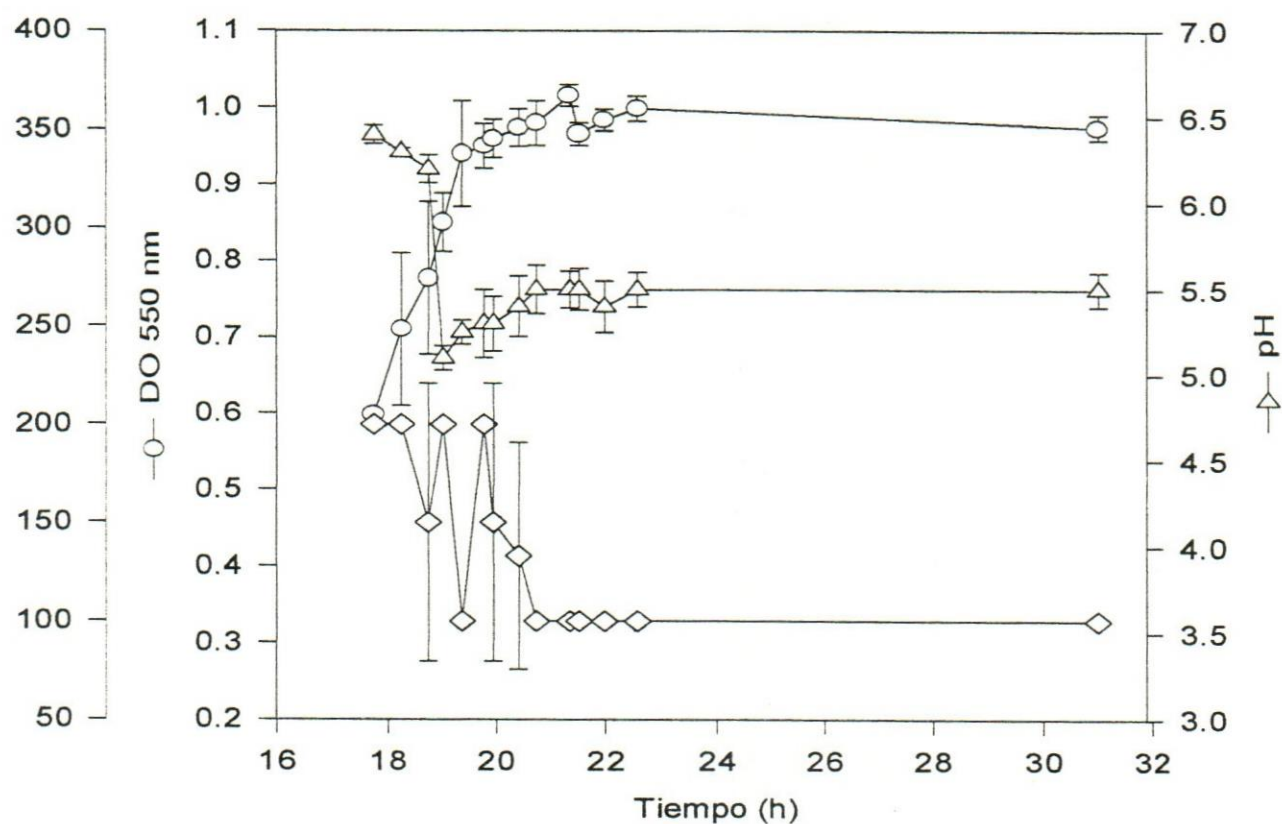


Figura 9. Producción de la bacteriocina WB1m en un cultivo estático, donde se muestra la relación de crecimiento (○), pH (Δ) y actividad de la bacteriocina (◇). Los resultados son el promedio de tres fermentaciones diferentes, donde las barras indican la desviación estándar.

5.2.2. Efecto de la aireación

Para conocer el efecto de la aireación en la producción de la bacteriocina WB1m se creció a *L. lactis* en cultivos aireados variando los volúmenes de medio de cultivo y usando como control un cultivo estático.

Los resultados obtenidos muestran que la aireación no aumentó la producción de la bacteriocina WB1m con respecto al control (Figura10).

5.2.3 Crecimiento de *L. lactis* en fermentador

Al escalar la producción de las bacteriocinas WB1a y WB1m en fermentador de 5L se encontró que, al igual que en matraz, el tiempo de incubación fue de 18 h y la actividad de la bacteriocina WB1m también variaba entre 100 y 200 UA/mL.

5.3 Purificación de las bacteriocinas WB1

5.3.1 Purificación de la bacteriocina WB1a

El valor promedio de recuperación de células del medio de cultivo fue de 2.5g de células en peso húmedo por litro. La actividad específica del extracto de liberación fue de 2327 UA/mg de proteína (Cuadro 4). El proceso de purificación de la bacteriocina WB1a se realizó mediante un paso inicial de liberación seguido de ultrafiltración (% de recuperación de 162), cromatografía de filtración en gel el porcentaje de recuperación disminuyó aproximadamente cinco veces (33.9%), cromatografía de intercambio iónico el porcentaje de recuperación disminuyó 0.25 veces (25%) y finalmente nuevamente cromatografía de filtración en gel en donde la actividad disminuyó una vez (13.1%) y el factor de purificación fue de

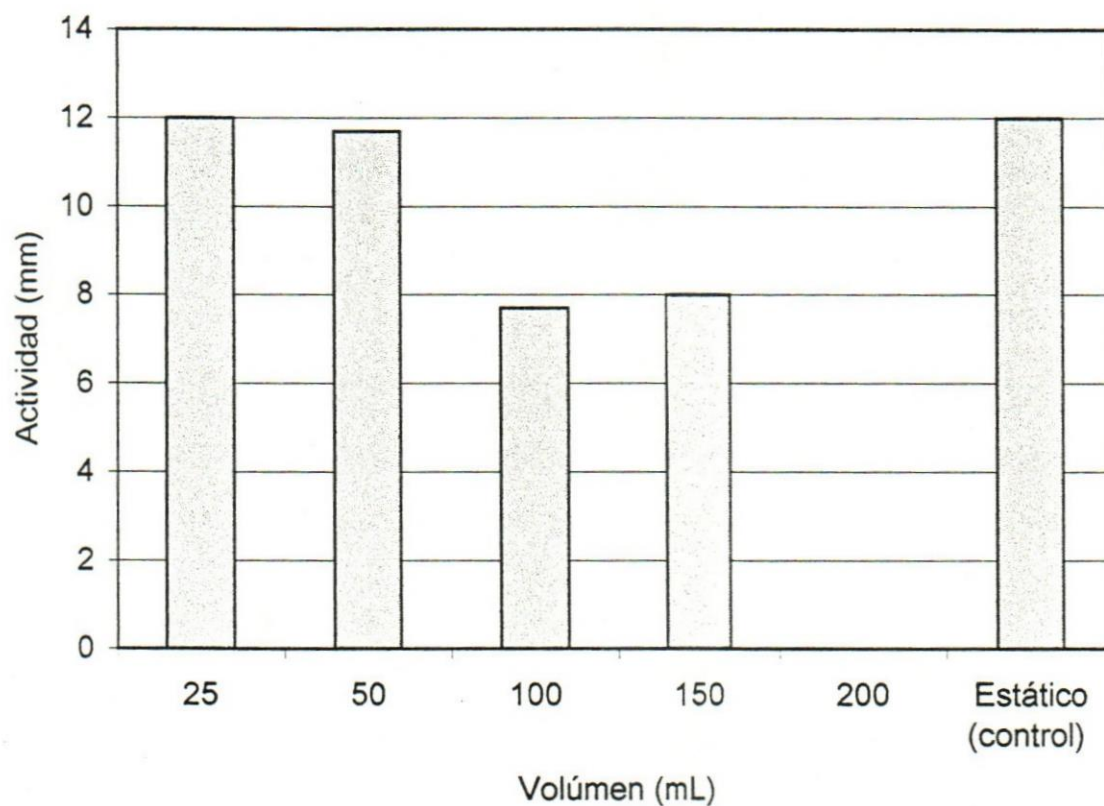


Figura 10. Producción de la bacteriocina WB1m en un cultivo aireado a 18h de incubación a 30°C. Se observa que la aireación no aumentó la producción de bacteriocina WB1 a ninguno de los volúmenes probados con respecto al control. Los resultados son el promedio de tres fermentaciones diferentes.

Cuadro 4. Purificación de la bacteriocina WB1a (adherida a células)

Etapas	Actividad total ¹ (10 ³ UA)	Proteína total ² (mg)	Actividad específica ³ (UA/mg)	Factor de purificación ⁴	% recuperación ⁵
Liberación	755.2	324	2 327	1.0	100
Ultrafiltración (membrana 500 pc)	1 228.8	132	9 327	4.0	162.7
Sephadex G-50 (filtración en gel)	256	70	3 673	1.6	33.9
CM –celulosa (intercambio catiónico)	195.2	16	1 2030	5.2	25.8
Sephadex G-50 (filtración en gel)	99.2	8	11 679	5.0	13.1

¹Es el resultado de multiplicar el volumen de muestra (mL) por la actividad (UA/mL)

²Es el resultado de multiplicar el volumen de muestra (mL) por la concentración de proteína (mg/mL)

³Se obtiene dividiendo la actividad total (UA) entre la proteína total (mg)

⁴Se refiere al número de veces que se purifica una proteína y se obtiene multiplicando la actividad específica de cada paso de purificación por 1 y dividiendo el valor entre la actividad específica inicial

⁵ Se refiere al % de actividad recuperada y se obtiene multiplicando la actividad total de cada paso de purificación por 100 y dividiendo el valor entre la actividad total inicial

cinco en promedio para todos los pasos excepto para la segunda filtración en gel (1.6). Los resultados antes descritos se muestran resumidos en el cuadro 4.

5.3.2 Purificación de la bacteriocina WB1m

La actividad específica recuperada del extracto del medio de cultivo fue de 123 UA/mg de proteína. Los resultados obtenidos durante el proceso de purificación de la bacteriocina WB1m se muestran en el cuadro 5. Se observa que durante la adsorción se tiene una recuperación de actividad (RA) del 62.9% con un factor de recuperación (FR) de 6.6 seguido de cromatografía de intercambio aniónico con RA de 48.4% y FR de 7.2, cromatografía de intercambio catiónico con RA de 26.9% y un FR de 285.7 y finalmente con la cromatografía de filtración en gel la RA fue de 1.1% con un FR de 58.4.

5.4 Determinación de los pesos moleculares de las bacteriocinas WB1

En el gel de acrilamida (Figura 11) se colocaron muestras de bacteriocina WB1a, WB1m y de nisina pura (patrón de referencia). Se observó que en el carril de la bacteriocina WB1a se tienen 4 bandas con un rango de peso molecular entre 3500 a 13 000 Da (Cuadro 6) siendo más ancha la banda identificada como 4. En el carril de la bacteriocina WB1m se observó una sola banda ancha con un peso molecular promedio de 3387 Da (Cuadro 6, Figura 11). En el carril con nisina pura (N) se observaron dos bandas con peso molecular de 6115.5 y 3842.1 Da siendo la última una banda ancha.

Cuadro 5. Purificación de la bacteriocina WB1m (libre en el medio de cultivo)

Etapa	Actividad total ¹ (10 ³ UA)	Proteína total ² (mg)	Actividad específica ³ (UA/mg)	Factor de purificación ⁴	% recuperación ⁵
Medio de cultivo	7 568.0	61 570	123	1.0	100
Adsorción (XAD-7)	4 761.6	5 855	813	6.6	62.9
QAE Toyopearl (intercambio aniónico)	3 660.8	4 118	889	7.2	48.4
CM-celulosa (intercambio catiónico)	2 035.2	58	35 108	285.7	26.9
Sephadex G-50 (filtración en gel)	86.4	12	7 183	58.4	1.1

¹Es el resultado de multiplicar el volumen de muestra (mL) por la actividad (UA/mL)

²Es el resultado de multiplicar el volumen de muestra (mL) por la concentración de proteína (mg/mL)

³Se obtiene dividiendo la actividad total (UA) entre la proteína total (mg)

⁴Se refiere al número de veces que se purifica una proteína y se obtiene multiplicando la actividad específica de cada paso de purificación por 1 y dividiendo el valor entre la actividad específica inicial

⁵Se refiere al % de actividad recuperada y se obtiene multiplicando la actividad total de cada paso de purificación por 100 y dividiendo el valor entre la actividad total inicial

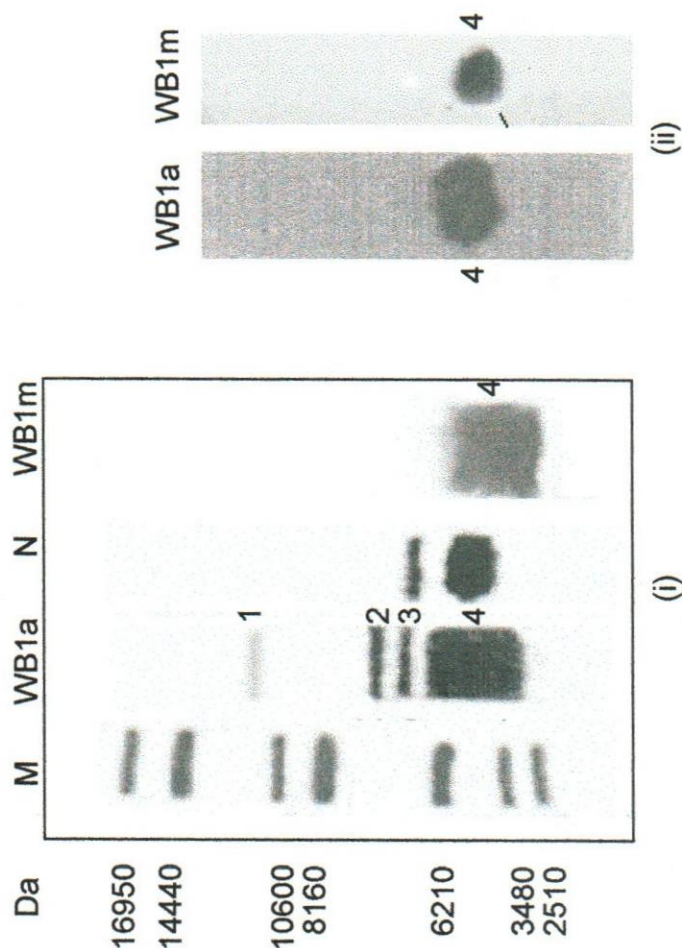


Figura 11. Gel y zimogramas de las bacteriocinas WB1a y WB1m. **(i) SDS_PAGE:** M (marcadores de peso molecular): Mioglobina (Polipéptido 1-153) 16950 Da; Mioglobina (I+II, 1-131) 14440 Da; Mioglobina (I+III, 56-153) 10600 Da; Mioglobina (I, 56-131) 8160 Da; Mioglobina (II, 1-55) 6210Da; Glucagon 3480 Da y Mioglobina (III, 132-153) 2510Da. **WB1a** (bacteriocina WB1a adherida a células): Se observa que esta conformada por 4 bandas, que tienen los siguientes pesos moleculares: 1, 13084.2 Da; 2, 7880.2 Da; 3, 6115.5 Da; 4, 3530.8 Da. **N** (Nisina pura): La nisina fue usada como control y presentó dos bandas de 6115.5 y 3842.1 Da cada una. **WB1m** (bacteriocina WB1m adherida a células) presentó solo una banda que corresponde a la banda 4 con un peso molecular de 3387.5 Da. **(ii) Zimogramas.** Se observan zonas de inhibición alrededor de la banda 4 siendo mayor la zona en la bacteriocina WB1a que en la bacteriocina WB1m.

Cuadro 6. Pesos moleculares de las bacteriocinas WB1a y WB1m comparados contra nisina

Bandas	PESOS MOLECULARES (Da)		
	Bacteriocina WB1a	Bacteriocina WBm	Nisina
1	13084.2	-	-
2	7880.2	-	-
3	6115.5	-	6115.5
4	3530.8	3387.5	3842.1

- No existe banda

5.5 Identificación de bandas con actividad

Para identificar las bandas con actividad, se hicieron zimogramas utilizando como microorganismo indicador a *M. luteus*. De las 4 bandas obtenidas de la muestra de bacteriocina WB1a solo se observó actividad en una de ellas y que coincide con la zona de actividad de la muestra de bacteriocina WB1m (Figura 11 (ii)).

5.6 Caracterización de las bacteriocinas WB1

5.6.1 Ensayo de GUS y ensayo de bioluminiscencia

Los resultados obtenidos por el ensayo de GUS y el ensayo de bioluminiscencia demostraron que tanto la bacteriocina WB1a como la bacteriocina WB1m son nisina. La cantidad de bacteriocina WB1a y WB1m detectada al interpolar los valores de actividad de β -glucorinidasa en la curva patrón de nisina (Figura 12) fue de 0.065 UI/mL y de 0.248 UI/mL respectivamente. Con los valores antes

mencionados se determinó que la cantidad total de la bacteriocina WB1a y WB1m en las muestras purificadas fue de 445.2 UI/mL y 127.18 UI/mL.

Las concentraciones totales de bacteriocina WB1a y WB1m obtenidas mediante el ensayo de bioluminiscencia fueron de 250 UI/mL y 10 UI/mL respectivamente.

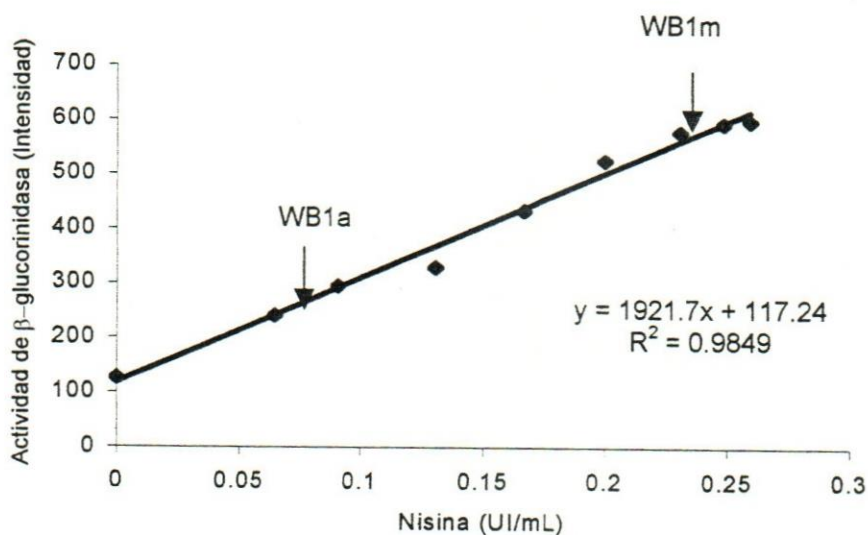


Figura 12. Curva patrón de nisina contra actividad de β -glucoronidasa

5.6.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Los resultados obtenidos muestran que el perfil de elución de la bacteriocina W1a es igual que el de nisina pura y el de nisaplin (figura 13). El tiempo de retención en la columna para el pico más concentrado en todas las muestras probadas fue de 33.5 a 34 minutos. La concentración de la bacteriocina WB1a después de pasarla por la columna de CM-celulosa disminuyó aproximadamente a la mitad (0.019 AU) comparada con la concentración de la bacteriocina WB1a de liberación (0.037 AU).

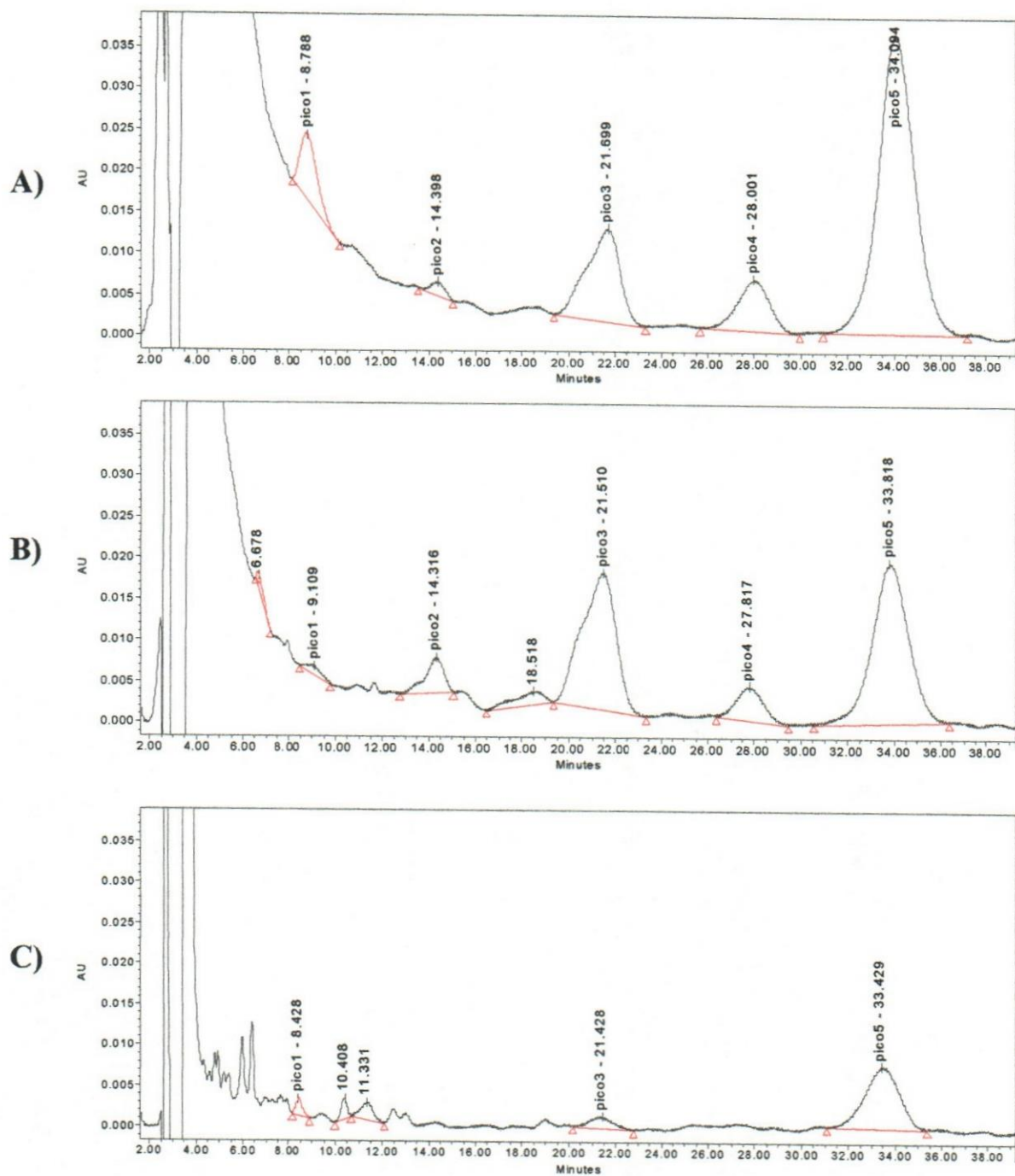
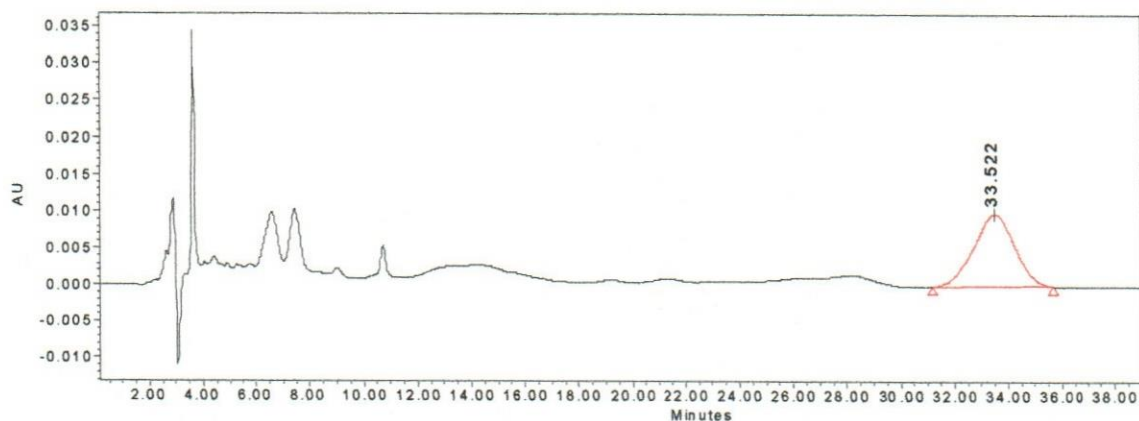


Figura 13. Cromatogramas de HPLC. A) Bacteriocina WB1a después de la liberación de células. Se observan 5 picos; B) Bacteriocina WB1a después de pasar por la columna de CM-celulosa. Se observan 7 picos; C) Nisaplin sometido al mismo proceso de purificación que la bacteriocina WB1a. Se observan 5 picos.

D)



E)

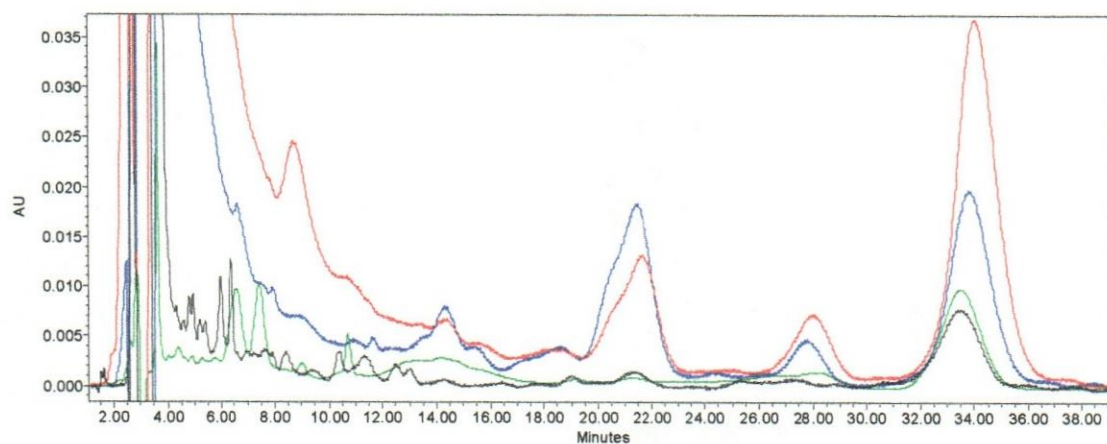


Figura 13. Cromatogramas de HPLC (continuación). D) Nisina pura. Solo se observa 1 pico; E) Comparación de cromatogramas de HPLC. (—) WB1a después de liberación de células. (—) WB1a después de pasar por la columna de CM-celulosa. (—) Nisina pura. (—) Nisaplin sometido al mismo proceso de purificación que la bacteriocina WB1a.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Antes de proceder con los estudios de purificación de las bacteriocinas WB1a y WB1m fue necesario asegurar una alta producción de las mismas. Para ello se experimentó con tres variables: calidad del inóculo, tiempo de fermentación y efecto de la aireación. En primer lugar se estandarizó el inóculo de *L. lactis* porque se ha reportado que este factor pueden repercutir en la producción de bacteriocinas durante la fermentación. Generalmente, la estandarización se realiza utilizando dos resiembras consecutivas para tener un cultivo en fase logarítmica de crecimiento (Krier *et al.* 1998; Miteva *et al.* 1998; Scanell *et al.* 2000). También se ha reportado que durante la producción de algunas bacteriocinas del grupo IIa como Acidocina J1132 (Tahara *et al.* 1996), Enterococina O12 (Jennes *et al.* 2000), Termofilina T (Aktypis *et al.* 1998), Acidocina A (Kanatani *et al.* 1995) y Amilovorina L471 (Lejeune *et al.* 1998), se observa un pico máximo. La tercera variable estudiada fue el efecto de la aireación debido a que se ha reportado el incremento de producción de bacteriocinas en cultivos aireados (Eraso *et al.* 1992).

Una vez estudiadas las 3 variables, los resultados condujeron a la estandarización del inóculo de *L. lactis* mediante dos resiembras consecutivas de 19 y 2.5 h de incubación, respectivamente (Figura 8).

Utilizando dicho inóculo estandarizado, se siguió la cinética de producción de la bacteriocina WB1m. La producción máxima de ésta se presentó al final de la fase logarítmica de crecimiento (18 h). La concentración de bacteriocina no disminuyó durante la fase estacionaria, esto es, no se observó un pico máximo de producción

(Figura 9). En lo referente a la aireación, ésta no aumentó la producción de la bacteriocina WB1m con respecto a un cultivo estático como control (Figura 10). Dado que ninguna de las variables estudiadas implicó un aumento la producción de la bacteriocina WB1m, se decidió aumentar el volumen de medio de cultivo fermentado para tener una concentración suficiente y poder continuar con la purificación. Aunque existen varios reportes en los que se muestra que el escalamiento afecta la producción de las bacteriocinas (De Vuyst y Vandamme, 1992), en el caso de la bacteriocina WB1 se observó que de matraz de 250 mL a un fermentador de 5 L la producción no cambió (100 IU/mL).

Una vez establecidas las condiciones de producción se procedió a la purificación de las bacteriocinas WB1a y WB1m.

Generalmente, la purificación de bacteriocinas se realiza a partir del medio de cultivo y hasta el momento, solamente Mota-Meira *et al.* (1997) han reportado la purificación de Mutacina B-Ny266 a partir de células. Por lo anterior fue interesante comparar los procesos de purificación de la bacteriocina WB1a (adsorbida a células) y WB1m (libre en el medio de cultivo). Se observó que el rendimiento de purificación fue de 13.1% para la bacteriocina WB1a y de 1.1 % para la WB1m, mientras que los factores de recuperación fueron de 5 y 58 respectivamente (Cuadro 4 y 5). Para ambas bacteriocinas, el paso crítico fue la separación por filtración en gel usando como eluyente agua destilada ya que se observa una disminución del rendimiento del 25 al 13.1% de la bacteriocina WB1a y del 26.9 al 1.1 % de la bacteriocina WB1m (Cuadro 4 y 5). La finalidad de este paso, principalmente, fue eliminar el NaCl que provenía de las muestras obtenidas de CM-celulosa para así evitar el barrido de bandas durante la electroforesis. De

cualquier forma, en el gel se observaron 4 bandas para la bacteriocina WB1a y una banda ancha para la bacteriocina WB1m (Figura 11). Esto es debido a que las bacteriocinas tienden a agruparse y formar dímeros, trímeros y tetrameros (Kelly *et al.* 2000; Jiménez-Díaz *et al.* 1996) y a que durante los procesos de purificación las bacteriocinas tienden a degradarse (Abriouel *et al.* 2001; Oscáriz *et al.* 1999).

Al comparar los pesos moleculares obtenidos para las bacteriocinas WB1a (3 500 a 13 000 Da) y WB1m (3530.8 Da) con los de nisina (6 115.5 y 3 387.5 Da) se encontró que son muy similares (Figura 11); dado que la bacteriocina WB1 fue inicialmente caracterizada como perteneciente al grupo IIa (Pereyra y Trejo, 1999), para descartar o confirmar los resultados obtenidos mediante la electroforesis se caracterizó a ambas bacteriocinas mediante ensayos de GUS, bioluminiscencia y HPLC. Dichos estudios demostraron que tanto la bacteriocina WB1a como la bacteriocina WB1m son nisina y que por lo tanto, pertenecen al grupo Ia. Éste resultado se obtuvo después de purificar por separado a ambas bacteriocinas. Pereyra y Trejo (1999) realizaron los estudios preliminares de caracterización de dichas bacteriocinas en muestras sin purificar. De aquí se destaca la importancia que tiene la purificación para realizar estudios de caracterización.

Los estudios de caracterización también demostraron que el sistema de purificación seguido para separar a la bacteriocina WB1a proporciona muestras más estables, esto es, la concentración detectada por el ensayo de GUS y de bioluminiscencia fue mayor en las muestras de bacteriocina WB1a (445.2 y 250 UI/mL) que en las muestras de bacteriocina WB1m (127.1 y 10 UI/mL) respectivamente. Además el estudio de HPLC demostró que la bacteriocina

procedente de células WB1a desde el primer paso de liberación en solución salina a pH 2 ya tiene una pureza similar a la de nisina y que al llevar a cabo subsecuentes pasos de separación por columnas disminuye el rendimiento sin aumento en la pureza (de 100 a 13%)(Figura 13 (E); Cuadro 4).

De lo anterior se desprende que la bacteriocina WB1a puede ser purificada mediante un proceso de liberación en solución salina con un rendimiento del 100%.

La nisina se comercializa en más de 48 países, sin embargo el proceso de producción no es del dominio público. La presentación comercial (Nisaplin^{MR}, Ambicin^{MR}, Chrisin^{MR}) contiene un 99% de sales, de lo que podría presumirse que la producción comercial se realiza mediante liberación en solución salina como se describió en este trabajo.

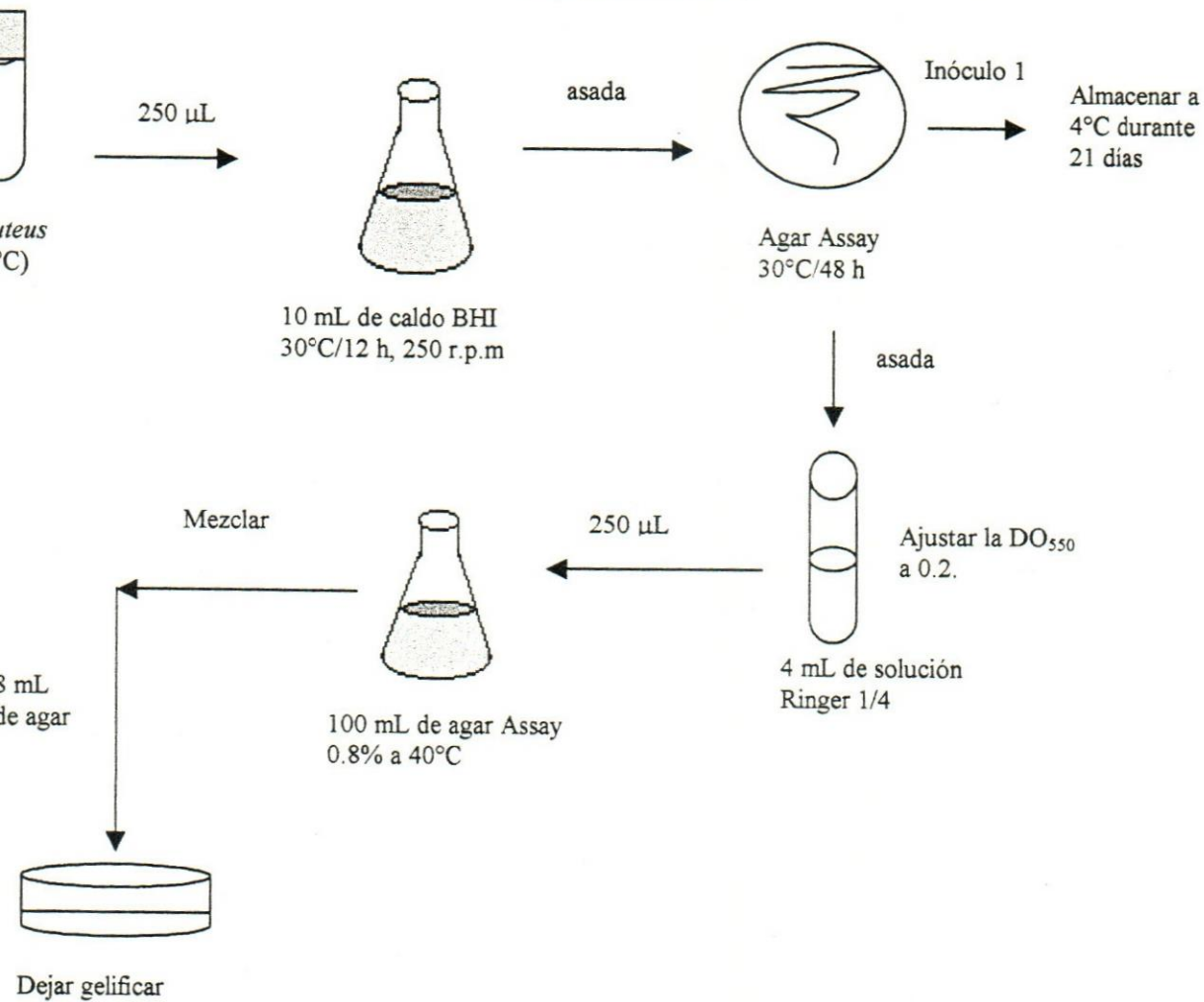
A lo largo de este estudio fue de interés darse cuenta que cada bacteriocina tiene su propio proceso de producción y purificación único e individual y que la información referente a las diversas bacteriocinas reportadas es de utilidad únicamente como marco de referencia, es decir, no puede estandarizarse el proceso de purificación como en el caso de proteínas.

VII. CONCLUSIONES

- Los estudios de caracterización demostraron que las bacteriocinas WB1a y WB1m son nisina.
- El proceso de purificación a partir de células proporciona muestras más estables de bacteriocina WB1a que el proceso de purificación a partir del medio de cultivo.
- Es importante purificar las bacteriocinas para tener estudios de caracterización confiables.
- La bacteriocina WB1a puede purificarse únicamente mediante un proceso de liberación en solución salina con un rendimiento del 100%.

APÉNDICE 1

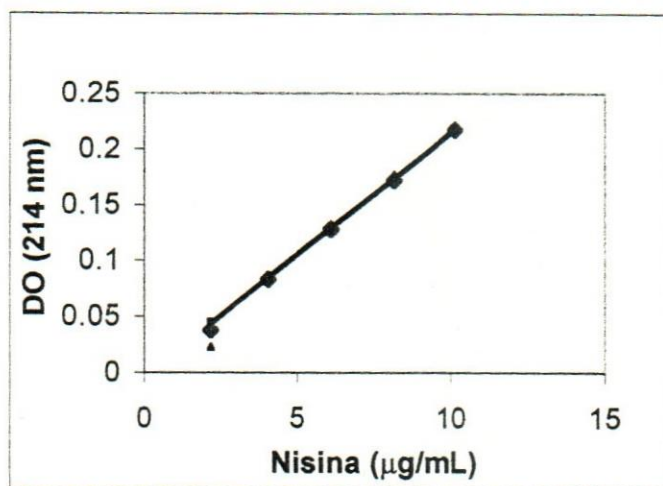
PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE *M. luteus* (Maqueda, 2001)



APÉNDICE 2

CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN LAS MUESTRAS DE BACTERIOCINA WB1a y WB1m

Nisina (μg/mL)	DO1	DO2	DO3
2.17	0.0379	0.0455	0.023
4.062	0.0832	0.0832	0.0857
6.093	0.1283	0.1266	0.1299
8.124	0.1722	0.1734	0.1769
10.155	0.2171	0.2185	0.2164



$$DO_{214nm} = 0.02149 (\text{Proteína } \mu\text{g/mL}) - 0.00157$$

$$R = 0.998$$

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A. and Maqueda, M. (2001). Influence of physico-chemical factors on the oligomerization and biological activity of Bacteriocin AS-48. *Current. Microbiol.*, 42: 89-95
2. Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis in't Veld, J. H. J. and Brink, B. (1998). Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *J. Appl. Microbiol.* 84: 568-76
3. Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L. S., Hugas, M., Carriga, M. and Nes, I. F. (1996). Biochemical and genetic characterization of Enterocin A from *Enterococcus faecium*, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5):1676-82
4. Barefoot, S. F., and Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:1808-15
5. Bayley, F. J. and Hurst, A. (1971). Preparation of a highly active form of nisin from *Streptococcus lactis*. *Cant. J. Microbiol.*, 17:61-67
6. Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. and Kalchayand, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilacti* H on sensitive bacterial strain. *J. Appl. Bacteriol.*, 70:25-33
7. Cañas Urbina, A. O. (1991). Variaciones microbiológicas asociadas al método de elaboración de pozol en la zona Altos de Chiapas. Tesis. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Campus Guaymas.
8. Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., Hastings, J. W. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Internat. J. Food Microbiol.*, 34: 1-16
9. Choi, H. J., Cheigh, C. H., Kim, S. B. and Pyun, Y. R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.*, 88:563-571
10. Contreras, B.G.L., De Vuyst, L., Devreese, B., Busanyova, K., Raymaeckers, J., Bosman, F., Sablon, E. and Vandamme, E. J. (1997). Isolation, purification, and amino acid sequence of Lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1): 13-20
11. Coventry, M. J., Gordon, J. B., Alexander, M., Hickey, M. W. and Wan, J. (1996). A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 :1764-1769
12. Davies, E. A., Milne, C. F., Bevis, H. E., Potter, R. W., Harris, J. M., Williams, G. C, Thomas, L. V. and Delves-Broughton, J. (1998). Effective use of Nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *J. Food Protec.*, 62 (814): 40-46

13. De Ruyter, P. G. G. A., Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Van Alen-Boerrigter, I. and De Vos, W. M. (1996). **Functional Analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis***. J. Bacteriol., 178 (12): 3434-3439
14. De Vuyst, L. and Vandamme, E. J (1994). **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Blackie Academic and Professional, New York : 527
15. Delves-Broughton, J. (1990). **Nisin and its uses as a food preservative**. Food Technol., 44: 100-112.
16. Du Toit, M., Franz, C. M. Dicks, L. M. and Holzapfel, W. H. (2000). **Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces**. J. Appl. Microbiol., 88 (3): 482-494
17. Dufour, A., Thuault, D., Boulliou, A., Bourgeois, C. M. and Le Pennec, J. P. (1991). **Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide**. J. Gen. Microbiol., 137: 2423-9
18. Dykes, G. A. (1995) en Humbert, E., Lobos, O., Brevis, P. and Padilla, C. (1998). **Note: Purification and characterization of the bacteriocin PsVP-10 produced by *Pseudomonas* sp.** J. Appl. Microbiol., 84: 910-13.
19. Elegado, F. B., Kim, W. J., Kwon, D. Y.(1997). **Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M.** Int. J. Food Microbiol., 37 (1): 1-11
20. Enan, G., El-Essawy, A. A., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (1996). **Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: Characterization, production and bactericidal mode of action**. Int. J. Food Microbiol., 30: 189-215.
21. Eraso, J. M. and Weinstock, G. M. (1992). **Anaerobic control of colicin E1 production**. J. Bacteriol., 174 (15): 5101-9
22. Federal Register.1988. **Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient**. Fed. Regist. 54:11247-11251
23. Franz, C. M. A. Pl, Du Toit, M., von Holy, A., Shillinger, U. and Holzapfel, W. H. (1997). **Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables**. J. Basic Microbiol., 3: 187-196
24. Garver, K. I. and Muriana, P. I. (1994).**Purification and partial amino acid sequence of curvacin FS47, a head-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47**. Appl. Environ. Microbiol., 60:2191-2195
25. Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. (1983). **Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin**. Appl. Environ. Microbiol., 45: 205-11
26. Germond, J. E., Marciset, O., Mollet, B. (1997). **Bacteriocins from *Sreptococcus thermophilus***. United States Patent No. 5,683,890

27. González, B., Arca, P., Mayo, B. and Suárez. (1994). Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. Appl. Environ. Microbiol., 60: 2158-2163
28. González, C. F. and Kunka. B. S. (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and su-crose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. Appl. Environ. Microbiol., 53: 2534-8.
29. Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y. and Berjeaud, J. M. (2000). Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. Appl. Environ. Microbiol., 66 (4):1744-1748
30. Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. J. Bacteriol., 173: 7491-500.
31. Héchard, Y., Derijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y. (1992). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. J. Gen. Microbiol., 138: 2725-31.
32. Herrera, T. and Ulloa, M. (1975). Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre. Rev. Latinoamer. Microbiol., 17: 143-47
33. Holo, H., Nilssen, O. and Nes, I. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*: isolation and characterization of the protein and gene. J. Bacteriol., 1973: 3879-87
34. Humbert, E., Lobos, O., Brevis, P., Padilla, C. (1998). Note: Purification and characterization of the bacteriocin PsVP-10 produced by *Pseudomonas* sp. J. Appl. Microbiol. 84: 910-13.
35. Janes, M. E., Nannapaneni, R. and Johnson, M. G. (1999). Identification and characterization of two bacteriocin-producing bacteria isolated from garlic and ginger root. J. Food Prot., 62 (8): 899-904
36. Jay, J. M. (1992). Microbiología Moderna de los Alimentos. 3ra. Edición. Editorial Acribia, S.A, Zaragoza, España : 443-449
37. Jennes, W., Dicks, L. M. and Verwoerd, D. J. (2000). Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. J. Appl. Microbiol., 88 (2): 349-57
38. Jensen, N.B., Melchiorson, C. R., Jokunsen, K. V. and Villadsen, J. (2001). Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in microaerobic continuous cultivation at a low dilution rate. Appl. Environ Microbiol., 67(6): 2677-82
39. Jenson, I., Baid, L. and Delves- Broughton, J. (1994). The use of Nissin as a Preservative in Crumpets. J. Food Protect., 57 (10): 874-77

40. Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Holo, H., Nes, I. F., Sletten, K. H. and Warner, P. J. (1995). Purification and partial amino acid sequence of Plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depended on the complementary action of two peptides. Appl. Environ. Microbiol. 61(12): 4459-63
41. Joerger, M. C. and Klaenhammer, T. R. (1986). Characterization and Purification of Helveticin J and Evidence for a Chromosomally Determined Bacteriocin Produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 167(2):439-46
42. Kaiser, A.L. and Monville, T.J. (1996). Purification of the bacteriocin Bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. Appl. Environ. Microbiol., 62 (12): 4529-35.
43. Kanatani, K., Oshimura, M. and Sano, K. (1995). Isolation and characterization of Acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 61(3): 1061-67
44. Kelly, N. A., Reuben, B. G., Rhoades, J. and Roller, S. (2000). Solvent extraction of bacteriocins from model solutions and fermentation broths. J. Chem. Technol. Biotechnol., 75: 777-784
45. Kelly, U. J., Asmundson, R. V., and Huang, C. M. (1996). Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Bacteriol., 81: 657-62
46. Klaenhammer T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12: 39-86
47. Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. and Topisirovic, L. (1991). Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *Diacetylactis* S50. Appl. Environ. Microbiol., 57: 1835-37
48. Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrzanski, T. W. (1978). Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by *lactis streptococci*. J. Dairy Res., 45: 247-57
49. Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrzanski, T. W. (1977). Lactostrepcin-A bacteriocin produced by *Streptococcus lactis*. Bulletin de la Academie Polonaise des Sciences (Série des Sciences Biologiques Cl. Vi), 25: 217-21
50. Krier, F., Revol-Junelles, A. M. and Germain, P. (1998). Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconstoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* FR52 during batch fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 50: 359-363
51. Larsen, A. G., Vogensen, F. K. and Josephsen, J. (1993). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour dough: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. J. Appl. Bacteriol., 75:113-22.
52. Leujene, R., Callewaert, R., Crabbé, K. and De Vuyst, L. (1998). Modelling the grow and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. J. Appl. Microbiol., 84: 159-168

53. López-Lara, I., Galvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. and Valdivia, E. (1991). Purification, characterization, and biological effects of a second bacteriocin from *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens* S-48 and its mutant strain B-48-28. *Can. J. Microbiol.*, 37: 769-74.
54. Maqueda Gálvez, A. P. (2001). Factores que influyen en la cuantificación de bacteriocinas utilizando a *Micrococcus luteus* como microorganismo indicador. Tesis. Facultad de Química. UNAM
55. Mattick, A. T. R. and Hirsch, A. (1944). A powerful inhibitory substance produced by group N *streptococci*. *Nature*, 154: 551.
56. Mattick, A. T. R. and Hirsch, A. (1947). Further observations on an inhibitory substance (nisin) from *lactic streptococci*. *Lancet*, 2:5-7.
57. Meghrou, J., Lacroix, C., Bouksaïm, M., La Pointe, G. and Simard, R. E. (1997). Note: Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719. *J. Appl. Microbiol.* 83: 133-38.
58. Miteva, V., Ivanova, I., Budakov, I., Pantev, A., Stefanova, T., Danova, S., Moncheva, P., Mitev, V., Dousset, X. and Boyaval, P. (1998). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbruekii* strain 1043. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 603-14.
59. Montville, T. J. and Winkowski, K. (1997). **Biologically Based Preservation Systems and Probiotic Bacteria**. *Food Microbiol. Fundamentals and frontiers*. Cap. 30: 557-74.
60. Morgan, S. and Hill, C. (1992). Lactocin D, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *Diacetylactis* DPC938. *J. Ge. Microbiol.* Submitted for publication.
61. Mota-Meira, M., Lacroix, C., LaPointe, G. and Lavoie, M. C. (1997). Purification and structure of mutacin B-Ny266: a new lantibiotic produced by *Streptococcus mutans*. *FEBS Letters*, 410:275-279
62. Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. and De Vos, W. M. (1991). Identification and characterization of the lactibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201: 518-84
63. Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., and Holo, H. (1996). **Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria**. Kluwer Academic Publishers. Antonie van Leeuwenhoek 70: 113-28
64. Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, S., Sketten, K. and Nes, I. F. (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.*, 174: 5686-92
65. Ocaña, V. S., De Ruiz-Holgado, A. A. and Nader-Macías, M. E. (1999). Characterization of a Bacteriocin-Like Substance Produced by a Vaginal *Lactobacillus salivarius* Strain. *Appl. Environment. Microbiol.*, 65 (12): 5631-5635
66. Oscáriz, J. C., Lasa, I. and Pisabarro, A. G. (1999). Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 178: 337-341

67. Oxford, A. E.(1944). **Diplococcin, an anti-bacterial protein elaborated by certain milk *streptococci***. J. Biochem., 38: 178-82
68. Parente, E. and Ricciardi, A. (1999). **Producción, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52: 628-638
69. Pereyra, C. E. M., Trejo, H. E. (1998). **Detección de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas aisladas de pozol**. Tesis. Facultad de Química, UNAM.
70. Piard, J. C. and Desmazeaud, M.(1992). **Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins an other antibacterial substances**. Lait. 72: 113-42.
71. Piard, J. C., Delorme, F., Giraffa, G., Commissaire, J. and Desmazeaud, M.(1990). **Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481**. J. Biol. Chem., 268:16361-68
72. Powell, I. B., Ward, A. C., Hiller, A. J. and Davison, B. E. (1990). **Simultaneous conugal transfer in *Lactococcus* to genes involved in bacteriocin production and reduced susceptibility to bacteriophages**. FEMS Microbiol. Lett. 72: 209-14
73. Pucci, M. J., Vedamuthu, E. R., Kunka, B. S. and Vandemburgh, P. A. (1988). **Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0**. Appl. Environ. Microbiol., 54: 2349-53
74. Quadri, L. E. N., Sailers, M., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. (1994). **Chemical and gentic characterization of bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B**. J. Biol. Chem., 269: 12204-12211
75. Rammelsberg, M., Müller, E. and Radler, F. (1990). **Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei***. Arch. Microbiol., 154: 249-52
76. Rammelsherg, M. and Radler, F. (1990). **Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species**. J. Appl. Bacteriol., 69: 177-84.
77. Rogers, L. A. (1928). **The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus***. J. Bacteriol., 16: 321-25
78. Santiago Cruz, V. (2000). **Purificación de una bacteriocina mediante el método de adsorción y liberación específica**. Tesis. Facultad de Química. UNAM
79. Scanell, A. G., Hill, C., Ross, R. P., Marx, S., Hartmeier, W. and Arendt, E. K. (2000). **Continuous production of lacticin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate**. J. Appl. Microbiol., 89 (4): 573-579
80. Shagger, H. and Von Jagow, J.(1987). **Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 Kda**. Anal. Biochem. 166: 368-69

81. Sherwitz, K. M., Baldwin, K. A. and McKay, L. L. (1983). Plasmid linkage of a bacteriocin-like substance in *Streptococcus lactis* subsp. *Diacetylactis* strain WM4: transferability to *Streptococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 45:1506-12
82. Silva Villarreal, E. (1984). Estudios preliminares sobre la fermentación de pozol en Tapachula, Chiapas. Tesis. Facultad de ciencias Químicas Campus IV. UNACH
83. Stiles, M. A. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70: 331-45
84. Suárez, A. M., Azcona, J. I., Rodríguez, J. M., Sanz, B. and Hernández, P. E. (1997). One-Step Purification of Nisin A by Immunoaffinity Chromatography. Appl. Environ. Microbiol., 63 (12): 4990-92
85. Szabo, E. A. and Cahill, M. E. (1998). The combined effects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 43: 21-31
86. Tagg, H. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev., 40:722-756
87. Tahara, T., Oshimura, M., Umezawa, C. and Kanatani, K. (1996). Isolation, Partial characterization, and mode of action of Acidocin J1132, a two-component bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. Appl. Environment. Microbiol. 62 (3): 892-897
88. Thuault, D., Beliard, E., Le Guern, J. and Bourgeois, C.-M. (1991). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. J. Dairy Sci., 74: 1145-50
89. Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Geis, A., Kok, J. and Benema, G. (1989). Cloning of two bacteriocin genes from lactococcal bacteriocin plasmid. Appl. Environ. Microbiol., 55: 1187-91
90. Van Reenen, C. A., Dicks, L. M. T. and Chikindas, M. L. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol., 84:1131-37.
91. Vandenberg, P. A. (1991). Pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici*. Annual Meeting, Society for Industrial Microbiol., Philadelphia, PA. Aug. 4-9 Abstract #S101
92. Wahlström, G. and Saris, P. E. J. (1999). A nisin bioassay based on bioluminescence. Appl. Environment. Microbiol., 65 (8): 3742-3745
93. Yang, R., Johnson, M. C. and Ray, B. (1992). Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 58 (10): 3355-59
94. Yildirim, Z. and Johnson, M. G. (1998). Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* R isolated from radish. Lett. Appl. Microbiol., 26: 297-304

95. Zheng, G. and Slavik, M. F.(1998). **Detection and demonstration of inhibitory activities bacteriocins by isoelectric focusing.** J. Rap. Methods and Automation in Microbiol., 6: 219-24
96. Zhu, W. M., Liu, W. and Wu, D. Q. (2000). **Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7.** J. Appl. Microbiol., 88 (5): 877-86