

39
205



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

"CRECIMIENTO DE *Pediococcus acidilactici* BAJO
DIFERENTES CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
CARMEN HERRERA RAMIREZ
MARIA SOLEDAD SACRISTAN RUIZ

DIRECTORA: L.N.C.A. ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS
ASESORA: M. en C. SUSANA MENDOZA ELVIRA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Página

RESUMEN	1
CAPITULO 1. MARCO TEORICO REFERENCIAL	2
1.1. Bacterias acidolácticas.....	2
1.1.1. Características morfológicas y bioquímicas	3
1.1.1.1. Género <i>Pediococcus</i>	5
1.1.2. Usos y aplicaciones.....	11
1.1.3. Metabolitos inhibitorios.....	12
1.2. Cinética de Crecimiento de Microorganismos.....	14
1.2.1. Bacterias acidolácticas.....	19
1.3. Medios de cultivo para bacterias acidolácticas.....	20
1.3.1. Fuentes de carbono	23
1.3.2. Fuentes de nitrógeno	29
1.3.3. Requerimientos especiales	30
1.3.4. Características microaerofilicas	33
1.3.5. Temperatura de crecimiento	34
1.3.6. Agentes estabilizantes	36
1.4. Objetivos	37
1.4.1. Objetivo general	37
1.4.2. Objetivos particulares	37
CAPITULO 2. MATERIAL Y METODOS	39
2.1. Cuadro Metodológico	39
2.2. Metodología	40
2.3. Material, equipo y reactivos.....	46
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION	48
CAPITULO 4. CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFIA	85

R E S U M E N .

RESUMEN.

El género *Pediococcus* pertenece a las llamadas bacterias acidolácticas (BAL) y son cocos Gram positivos, inmóviles, con tendencia a formar tétradas, catalasa negativo, anaerobios facultativos, homofermentativos y producen ácido láctico por la fermentación de carbohidratos. Las cepas de *Pediococcus* son las más utilizadas como cultivos iniciadores en productos cárnicos por su resistencia a la liofilización, crecimiento rápido en sustratos cárnicos y el desarrollo de características sensoriales y la evidencia de la producción de compuestos antibacterianos (bacteriocinas) capaces de inhibir bacterias patógenas como *Lysteria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, etc.

Se sabe que el crecimiento de las BAL está condicionado por diversos factores, como fuente de carbono, nitrógeno, requerimientos especiales, temperatura y la adición de buffers y emulsificantes. No se tiene en la literatura información completa de las condiciones de crecimiento para *Pediococcus acidilactici*, por lo que el objetivo de la presente investigación fue establecerlo.

Se realizaron cinéticas de crecimiento de 30 hrs. para cada condición utilizando cultivos de 18 hrs. de *Pediococcus acidilactici* con una concentración inicial de 1×10^9 UFC/ml y se hicieron mediciones de densidad óptica (D.O.). Se realizaron experimentos previos para seleccionar la temperatura de crecimiento y evaluar el efecto de la agitación, así como la adición de un buffer. Se aplicó un diseño factorial utilizando diferentes condiciones y niveles de variación: Temperatura (25, 30, 32 y 37°C); Velocidad de agitación (0, 80 y 200 rpm); Fuente de Carbono (glucosa y sacarosa); Fuente de Nitrógeno (soya tripticaseína, extracto de carne y peptona de caseína); Requerimientos especiales (Ácido ascórbico y manganeso), como emulsificante y buffer Tween 80 y carbonato de calcio respectivamente. Paralelamente se realizó una cinética donde se utilizó jugo de tomate filtrado y estéril como fuente de manganeso y ácido ascórbico.

Los resultados se analizaron mediante el Statistical Analytical System (SAS) y se construyeron las gráficas correspondientes. Se encontró que la combinación de fuentes de nitrógeno incrementan el crecimiento de la cepa y es indistinto el empleo de sacarosa o glucosa en el medio de cultivo. Existe un mejor crecimiento a 30°C, sin agitación y en presencia de manganeso, ácido ascórbico, carbonato de calcio y tween 80.

M A R C O T E O R I C O

R E F E R E N C I A L.

1. MARCO TEORICO REFERENCIAL.

1.1. Bacterias acidolácticas.

Las bacterias aerobias que utilizan carbohidratos como una fuente de energía en varias rutas glicolíticas y que forman lactato como producto principal son llamadas bacterias acidolácticas (BAL).

Las bacterias que tienen estas propiedades son frecuentemente encontradas fermentando materiales orgánicos, en la fabricación de embutidos y productos lácteos, pero están a menudo asociados con la descomposición de muchos alimentos relacionados. El término bacteria acidoláctica comprende estas características y es usado comúnmente en la Industria Alimentaria. (44).

El concepto de agrupamiento de bacterias acidolácticas, originalmente atribuido a Orla-Jensen basado en sus similitudes fisiológicas y ecológicas, ha servido para su clasificación microbiológica. Las semejanzas entre miembros de éste género se han mostrado recientemente por estudios filogenéticos de enzimas funcionales y relacionadas con el RNAR y la fracción 16S. (31,44). Las subdivisiones entre los géneros y especies relacionadas han sido determinadas usando taxonomía numérica, métodos quimiotaxonómicos y estudios de hibridización del DNA.

Las BAL están clasificadas comúnmente en dos familias, la *Streptococcaceae* y la *Lactobacillaceae*. La primera comprende los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Gemella* y

Pediococcus; mientras que la segunda a los *Lactobacillus*. (3,31).

1.1.1. Características morfológicas y bioquímicas.

Las bacterias acidolácticas son Gram positivas, inmóviles, no esporuladas, homo o heterofermentativas, con ausencia de citocromo y catalasa negativa; muchas son microaerófilicas y ácido tolerantes. Se agrupan en tétradas, pares, cocos, cocobacilos ó bacilos. Cuadro 1. (8, 23, 31).

La diferenciación de las bacterias acidolácticas (BAL), puede hacerse usualmente en el laboratorio microbiológico por tinción de Gram, determinando si la utilización de la glucosa es homofermentativa ó heterofermentativa, y por hidrólisis de arginina (44).

Todas las BAL dependen de la fermentación de carbohidratos como fuente de energía y todas forman lactato como un producto principal de la fermentación de la glucosa. Estas están divididas en especies homofermentativas y heterofermentativas dependiendo de los productos finales de la fermentación de glucosa cuando crecen en medios de cultivo selectivos. Las especies homofermentativas son *Streptococcus*, *Pediococcus* y muchos *Lactobacillus*; y las bacterias acidolácticas heterofermentativas comprenden *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus*. (21).

Las homofermentativas fermentan los carbohidratos produciendo

CUADRO 1

Características de las bacterias acidolácticas.

Gram	positivo
Arreglo celular	tétradas, pares, etc.
Morfología	cocos, cocobacilos, bacilos
Presencia de citocromo	negativo
Aerobios estrictos	negativo
Catalasa	negativo
Esporulación	negativo
Reducción de nitratos	negativo
Tolerancia al ácido	positivo
Fermentación de glucosa	homo y heterofermentativo

Fuente: Gilliland, S.E., et al (1975). "Inhibition of psychrotropic bacteria by *Lactobacilli* and *Pediococci* in non fermented refrigerated foods". J. Food Sci.; 40:903-905.

ácido láctico, mientras que las heterofermentativas producen además ácido acético, alcohol etílico y dióxido de carbono. Esto indica que las homofermentativas usan principalmente la vía metabólica Embden-Meyerhoff-Parnas y que las heterofermentativas usan más de una (Entner-Duodoroff, Fermentación Butírica, Fermentación Propiónica, Fermentación butanodiólica). (8, 15, 29).

1.1.1.1. Género *Pediococcus*.

Los *Pediococcus* son microorganismos esféricos, no elongados, la división es alternativamente en dos planos hacia el ángulo derecho para formar tétradas, sin embargo, pueden estar en pares.

Son Gram positivos, inmóviles. No formadores de esporas, anaerobios facultativos, catalasa negativo (algunas cepas de *Pediococcus acidilactici* pueden poseer catalasa débil) (31). El citocromo está ausente; al no poseer el citocromo (sistema que tiene como aceptor final de electrones al oxígeno), la enzima superóxido dismutasa actúa captando al ión superóxido, supliendo la actividad del citocromo; usualmente la leche no es acidificada ni cuajada, no formadores de indol, la mayoría no reducen nitratos, no hidrolizan hipurato de sodio y no son patógenos a plantas y animales (Cuadro 2).

Las colonias varían en tamaño desde 1-2.5 mm de diámetro, son

CUADRO 2

CARACTERISTICAS DEL GENERO *PEDIOCOCCUS*.

Arreglo celular	predominante tétradas, algunos pares.
Aerobios estrictos	negativo
Aerobios facultativos microaerofilicos	positivo
Reacción de catalasa	negativo
Presencia de citocromo	negativo
Producto de fermentación de carbohidratos	lactato
Formación de indol	negativo
Reducción de nitratos	negativo
Peptidoglicán posición 1 posición 2	Alanina Lisina
Acido teicoico en pared celular	no determinado
% Mol G ⁺ + C en DNA	34-42

Fuente: Kitahara, K. (1986). "The Bergey's manual of determinative bacteriology". Ed. Buchanan R. E. & Gibbons. Williams & Wilkins (1, 9, 31, 48). Co., U.S.A., 999-1012 pp.

lisas redondas, de color blanco grisáceo. Todas las especies crecen a 30°C, pero las temperaturas óptimas van de 25-40°C. Son quimioorganótrofos requiriendo un medio rico, factores de crecimiento complejos, así como de aminoácidos, su crecimiento depende de la presencia de carbohidratos, la glucosa es fermentada por la ruta Embden-Meyerhoff a D ó L-(+)-lactato, sin formación de gas.

La especies pueden ser diferenciadas por tolerancia a la temperatura, pH y cloruro de sodio. Se sabe que la electroforesis de LDHs (Lactato deshidrogenasa) es usada para diferenciar especies. (31, 44).

Existen ocho diferentes especies de *Pediococcus* identificadas:

1. *Pediococcus damnosus*
2. *Pediococcus parvulus*
3. *Pediococcus inopinatus*
4. *Pediococcus dextrinicus*
5. *Pediococcus pentosaceus*
6. *Pediococcus acidilactici*
7. *Pediococcus halophilus*
8. *Pediococcus urinaequi*

En 1957 se utilizó el primer cultivo iniciador de *Pediococcus acidilactici* para la conservación de embutidos, el cual se conocía con anterioridad como *Pediococcus cerevisiae* pero por estudios subsecuentes se le identificó como tal (31, 39).

Pediococcus acidilactici crece en forma óptima a 30°C, con un máximo tolerable a los 52°C, destruyéndose por calentamiento a los 70°C por 10 minutos. Se produce ácido láctico a partir de glucosa, galactosa, arabinosa, maltosa, manitol y dextrinas; algunas cepas lo producen también a partir de sacarosa y lactosa.

Las pruebas bioquímicas primarias y secundarias se muestran en el Cuadro 3.

CUADRO 3

Pruebas bioquímicas primarias y secundarias para *P. acidilactici*

Gram	(+)	cloruro férrico	(+)
reducción de nitratos	(+)	proteólisis de suero	(-)
licuefacción de la gelatina	(-)	producción de gas a partir de glucosa	(-)
lipólisis	(+/-)	hemólisis	(-)
oxidasa	(-)	catalasa	(-)
peroxidasa	(-)	esculina 0.5%	(+)
manitol 3%	(-)	salicina 2%	(+)
rafinosa 3%	(-)	celobiosa 1%	(+)
trehalosa 0.5%	(+)	glicerina 1%	(+)
maltosa 2%	(+)	manosa 1%	(+)
sacarosa 0.5%	(+)	galactosa 1%	(+)
lactosa 2%	(+)	fructuosa 1%	(+)
glucosa 1%	(+)	dulcitol 1%	(-)
arabinosa 3%	(-)	sorbitol 1%	(-)
almidón soluble 2%	(+)	adonitol 1%	(-)
dextrina 2%	(+)	xilosa 1%	(-)
ramnosa 1%	(-)	melobiosa 0.5%	(+)

Fuente: Bello, H. H.; Durán, B. I. (1992). "Aplicación de *Pediococcus acidilactici* en la elaboración de un embutido tipo salami." Tesis Ingeniería en Alimentos. F.E.S.C., México, 66-70pp Schiffner. (1978). "Cultivos bacterianos para la Industria Cárnica". Ed. Acribia, España, 4-25, 57-59, 122-127pp.

Riebel en 1990 realizó un estudio de las aldolasas de varias cepas demostrando que *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici* están estrechamente relacionados y que son diferentes de *Pediococcus parvulus*, además hay evidencia de que no todas las cepas de *Pediococcus pentosaceus* poseen alguna aldolasa.

Pediococcus acidilactici y *Pediococcus pentosaceus* están relacionados por el DNA homólogo. Se ha reportado que hay diferenciación fisiológica entre ambos. (31, 44).

El método API (Analytical Profile Index, Alalytab Products, Planview, N. Y.) permite una rápida identificación de las especies y niveles de biotipos de *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*. Las propiedades de éstas especies incluyen reacciones positivas para las pruebas de Voges-Proskawer, β -galactosidasa y leucina arilamidasa. Hay reacciones negativas para fosfatasa alcalina, α -galactosidasa, β -glucuronidasa e hipurato.

Otras pruebas para su diferenciación son fermentación de arabinosa, celobiosa, glicerol, manitol, salicina y sacarosa. Sin embargo, Riebel menciona que hay respuestas variables y no concluye nada al respecto (43, 44).

1.1.2. Usos y aplicaciones.

Algunos géneros de las bacterias acidolácticas se utilizan generalmente como cultivos iniciadores para producir una variedad de alimentos; la carne, pescados, plantas (vegetales, frutas y cereales) y leche son fermentados dando como resultado el aumento en sus cualidades nutricionales, organolépticas y/o de almacenamiento comparados con sus correspondientes productos no fermentados. (36, 46).

El uso en la Industria Cárnica y Láctea de diferentes cultivos iniciadores se ha incrementado debido a que existe mas conocimiento de las aplicaciones de la fermentación y de las fases de maduración asegurando un dominio sobre la flora natural y patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Clostridium botulinum*, *Trichinae spiralis*, *Lysteria spp.*, *Yersinia spp.*, etc; ya que se ha reconocido que las BAL son capaces de producir sustancias inhibitoras como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, ácido cítrico, etc). (2, 25, 35).

Además se ha reportado que los *Pediococcus* presentan gran resistencia a la liofilización y crecimiento rápido en sustratos cárnicos (*Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidophilus*) (33).

1.1.3. Metabolitos inhibitorios.

Las bacterias acidolácticas son sensibles a bacteriófagos, el uso de una sola cepa para la producción de ácido posee una completa pérdida de actividad debido a la lisis del mismo cultivo por bacteriófagos. Los cultivos mixtos son usados para prevenir la acidificación relacionada con el ataque de bacteriófagos. (26).

El uso de cultivos iniciadores puede asegurar un dominio numérico sobre la flora natural incluyendo patógenos, debido a la producción de compuestos antimicrobianos, tales como ácido láctico, bacteriocinas, peróxidos y otros; que en combinación con los propios controles del proceso garantizan la seguridad aumentando la calidad y tiempo de vida del producto final. (6).

Los efectos bactericida y bacteriostático del ácido láctico son bien conocidos y la fermentación de alimentos es uno de los caminos más antiguos para prevenir la putrefacción microbiana. La acción antimicrobiana del ácido láctico depende de tres factores: efecto del pH, extensión de la disociación del ácido y el efecto específico relacionado a la molécula ácida. (48).

El peróxido de hidrógeno generado por bacterias acidolácticas puede reaccionar con tiocianato endógeno, el cual es catalizado por lactoperoxidasa para formar productos inhibitorios a los microorganismos.

Por otra parte las bacteriocinas tienen acción bactericida sobre

bacterias susceptibles y son producidas por una gran variedad de especies bacterianas. La acción letal de muchas bacteriocinas puede ser atribuible a la actividad directa enzimática o a la activación de enzimas endógenas destructoras. (36).

Generalmente la producción de bacteriocinas es mayor a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa productora. El crecimiento a temperaturas elevadas puede suprimir completamente la producción de bacteriocina y conducir a una irreversible pérdida de sus propiedades.

Como ya se mencionó anteriormente, la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* es de bajo peso molecular (6.2 MDa) y está asociado al plásmido pSRQ11. No es inmunogénica, ni tóxica en animales de laboratorio y por su actividad antibacteriana ya indicada puede ser considerada como conservador en alimentos. (52).

1.2. Cinética de crecimiento de microorganismos.

En el desarrollo de un cultivo bacteriano existe un aumento en la cantidad de microorganismos y el método más utilizado para la estimación del material microbiológico total en suspensión es la medición de la absorbancia (Densidad Óptica) de un caldo de cultivo utilizando un espectrofotómetro. (12).

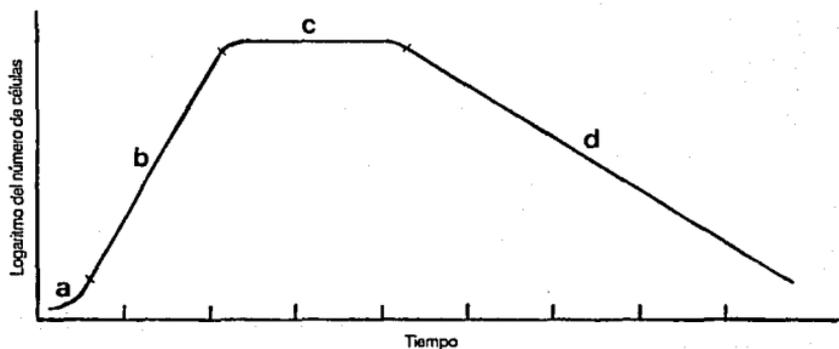
La mayoría de las bacterias se cultivan en el laboratorio en cultivos continuos (con renovación del medio de cultivo) por lo que las condiciones se aproximan a los sistemas cerrados. En los sistemas abiertos o discontinuos (sin renovación del medio de cultivo) los microorganismos degradan a los sustratos que no son renovados, por lo que el cultivo se satura de metabolitos secundarios y se presenta la ausencia de sustratos, dando como consecuencia la inactivación bacteriana.

Al inocular un medio de cultivo adecuado con una bacteria, se toman pequeñas muestras de éste caldo a intervalos regulares de tiempo y en condiciones constantes; la representación gráfica de los datos obtenidos darán como resultado una curva de crecimiento característica como se muestra en la Figura 1.

La curva de crecimiento bacteriano puede dividirse en cuatro fases principales: fase de latencia (fase lag), fase exponencial (fase log), fase estacionaria y fase de declinación. (29).

1. Fase de latencia; después de la inoculación, hay un aumento

FIGURA 1.
Curva de crecimiento bacteriano



a: fase de latencia

b: fase exponencial

c: fase estacionaria

d: fase de declinación

Fuente: Joklik, W. (1991). "Microbiología". 18ava ed.
Ed. Panamericana, Argentina, 55-103 pp.

del tamaño celular en un momento en el cual la división celular es escasa o nula, ésta fase es el período de ajuste necesario para el reabastecimiento del pool de metabolitos celulares hasta un nivel compatible con la síntesis celular de la velocidad máxima. Durante la fase lag, los productos son esenciales para el crecimiento de las células e incorporar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, etc. Estos productos están considerados como productos primarios del metabolismo.

2. **Fase exponencial o logarítmica (aceleración);** las células se encuentran en un balance que condicionó el crecimiento. En este estado, la masa y el volumen de las células aumentan según el mismo factor, de manera tal que la composición promedio de las células y la concentración relativa de metabolitos se mantienen constantes; la velocidad de crecimiento puede expresarse mediante una función exponencial natural. Las células se dividen a una velocidad constante, determinada a la vez por la naturaleza del microorganismo y las condiciones ambientales.

3. **Fase estacionaria (desaceleración);** cuando se emplean condiciones de cultivo de rutina, la acumulación de productos de desecho, el agotamiento de nutrientes, el cambio y otros factores ejercen un efecto deletéreo sobre el cultivo, que trae como resultado una disminución de la velocidad de crecimiento.

Durante esta fase el recuento de células viables se mantiene constante y durante un período que varía según el microorganismo. En la fase estacionaria se producen compuestos que no tienen

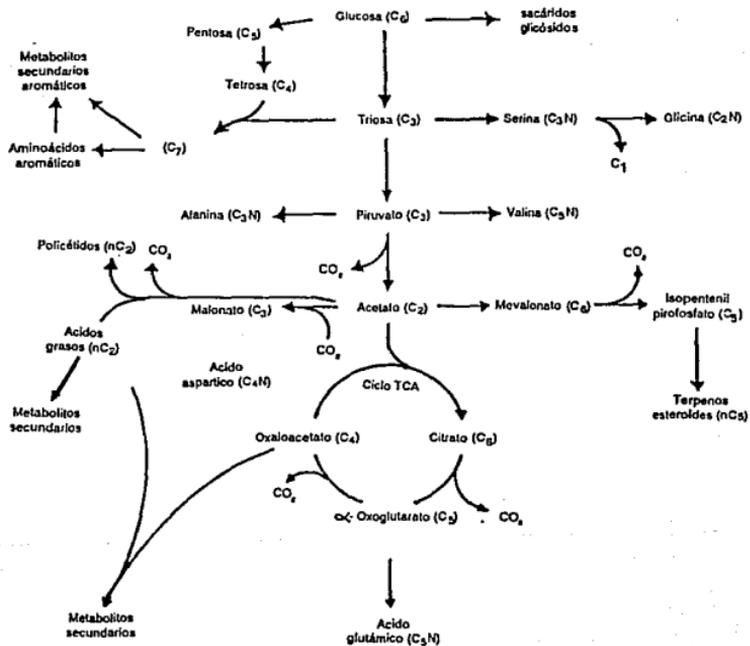
función dentro del metabolismo celular, estos compuestos se conocen como metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son elaborados por intermediarios y productos del metabolismo primario. Algunos de éstos metabolitos secundarios poseen actividad antimicrobiana.

4. **Fase de declinación;** representa la disminución de la población o muerte de la misma.

Los compuestos referidos como productos secundarios del metabolismo son elaborados de intermediarios y productos del metabolismo primario. Aunque el metabolismo primario es común en la mayoría de los microorganismos, cada producto secundario será sintetizado por determinadas especies microbianas.

El papel fisiológico del metabolismo secundario está sujeto a la importancia de estos metabolitos en la fermentación Industrial y a los efectos que tienen sobre otros microorganismos. Muchos metabolitos secundarios tienen actividad antimicrobiana, otros son inhibidores enzimáticos específicos, algunos son promotores del crecimiento y muchos tienen propiedades farmacológicas. (50). La interrelación entre el metabolismo primario y secundario está ilustrada en la Figura 2.

Figura 2
Interrelaciones entre metabolitos primarios y secundarios.



Fuente: Stanbury and Whitaker. (1969). "Principles of fermentation technology", 2nd edition. Ed. Pergamon Press, Great Britain, 1-7, 74-85pp.

1.2.1. Bacterias acidolácticas. Cinética de crecimiento.

En el desarrollo de un cultivo bacteriano, existe un aumento de la masa celular del microorganismo. Dentro de los estudios cuantitativos que se realizan para medir el crecimiento celular, se considera la concentración celular o el número de células por unidad de volumen de cultivo. (29).

Se han establecido diversos procesos para la fermentación dentro de los cuales se deben tomar en cuenta los siguientes puntos: (12, 29, 38, 50).

1. La formulación del medio de cultivo debe ser la misma que se utiliza tanto en el desarrollo del inóculo y en la producción del fermento.
2. Debe estar estéril el medio de cultivo, así como el material y equipo que entre en contacto con el microorganismo.
3. El medio de cultivo empleado debe permitir el crecimiento del microorganismo controlando parámetros tales como: temperatura, pH, agitación y potencial redox.
4. El medio de cultivo que se emplee debe ser fresco.
5. Se debe proveer al microorganismo las fuentes necesarias para su crecimiento, considerando para tal efecto las fuentes de carbono, nitrógeno, minerales y agua.
6. Debe permitir la extracción del producto y su purificación.

1.3. Medios de cultivo para bacterias acidolácticas.

Todos los microorganismos requieren para su crecimiento agua, fuentes de energía, carbono, nitrógeno, elementos minerales y algunos necesitan vitaminas y en el caso de microorganismos aerobios oxígeno.

Los constituyentes del medio de cultivo deben satisfacer los requerimientos especiales para la producción de biomasa y de metabolitos.

Los ingredientes de un medio esencial mínimo incluye cantidades mínimas absolutas de nitrógeno, azufre, fósforo, magnesio y potasio; pueden ser necesitados además; en pequeñas cantidades hierro, zinc, cobre, manganeso, cobalto, molibdeno, boro, etc.

En las bacterias acidolácticas la fuente de carbono es esencial para la formación del producto en el proceso de fermentación, así como fuentes de nitrógeno, minerales, vitaminas, amortiguadores y oxígeno. (50).

Para el cultivo de bacterias acidolácticas, se usan diferentes ingredientes como los que están clasificados dentro de los cinco grupos enlistados en el Cuadro 4.

Para tener el máximo crecimiento de una cepa o mezcla de cepas de bacterias acidolácticas, es necesario formular un medio basal, el cual contenga los nutrientes esenciales utilizables para el metabolismo bacteriano. La mayoría de las cepas de *Lactobacillus*,

CUADRO 4

Ingredientes utilizados en medios de cultivo para bacterias acidolácticas.

<p>Grupo 1. Componentes Proteicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - extracto de levadura - extracto de carne - soya tripticaseína - peptonas 	<p>Grupo 2. Minerales</p> <ul style="list-style-type: none"> - calcio - manganeso - magnesio - molibdeno - hierro - cobalto
<p>Grupo 3. Fuentes de Energía</p> <ul style="list-style-type: none"> - glucosa - maltosa - sacarosa - lactosa 	<p>Grupo 4. Amortiguadores</p> <ul style="list-style-type: none"> - fosfatos - citratos - carbonatos - acetatos
<p>Grupo 5. Emulsificantes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tween 80 	

Fuente: Stamer, J. R.; Albury, M.; et al. (1964). "Substitution of manganese for tomato juice in the cultivation of lactic acid bacteria". Appl. Microbiol.; 12(2):163-168.
 Stanbury and Whitaker (1989). "Principles of fermentation technology". 2nd edition. Ed. Pergamon Press, Great Britain; 1-7, 74-85pp.

Streptococcus del grupo N y *Pediococcus* necesitan, además, requerimientos especiales para su crecimiento. (38).

Pediococcus pentosaceus y *Pediococcus acidilactici* crecen rápidamente en sustituto de caldo, crecen aeróbicamente sobre agar y en atmósfera de hidrógeno y dióxido de carbono. El caldo y agar MRS (DeMan Rogose and Sharpe, 1960) pueden ser usados para el crecimiento de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, aunque se requieren más aminoácidos para éstos últimos. (17).

Otro medio para las bacterias acidolácticas es el agar APT (All Purpose Tween, 1990) designado como un medio selectivo para *Lactobacillus*. Otros autores (Stamer, Albury, 1964) recomiendan un medio Basal. (41, 55).

1.3.1. Fuentes de carbono.

Las bacterias acidolácticas dependen de la fermentación de carbohidratos para formar lactato como producto final en la fermentación de glucosa (1, 8, 43, 53).

Se ha reportado que el período de producción de ácido láctico está relacionado con el peso molecular del carbohidrato utilizado como fuente de carbono; es decir, cuando el peso molecular aumenta se requiere un período mas largo para obtener una adecuada fermentación.

Acton y colaboradores en 1977 establecieron que *Pediococcus acidilactici* produce ácido a partir de glucosa, sacarosa y lactosa pero no de dextrinas. Posteriormente se demostró que este microorganismo realmente fermenta glucosa, sacarosa y maltosa.

Lactosa y dextrina muestran una escasa producción de ácido, además reportan que la sacarosa puede ser sustituida por glucosa; la maltosa puede ser usada en combinación con glucosa y sacarosa cuando se trata del crecimiento de *Pediococcus acidilactici*. (1). La glucosa es un carbohidrato importante en el metabolismo de la mayoría de los microorganismos; la utilización de un azúcar o algún otro compuesto relacionado y de una configuración distinta a la glucosa es el resultado de la capacidad del microorganismo para convertir el sustrato a las vías de la glucosa. (29, 50).

Vía glucolítica.

La fermentación es un mecanismo menos eficiente que la respiración para extraer energía de la molécula de sustrato. Cuando los microorganismos fermentan glucosa, solamente se libera una pequeña cantidad de energía potencialmente disponible en la molécula de glucosa. La mayor parte de la energía está en el producto de la reacción, es decir, el lactato.

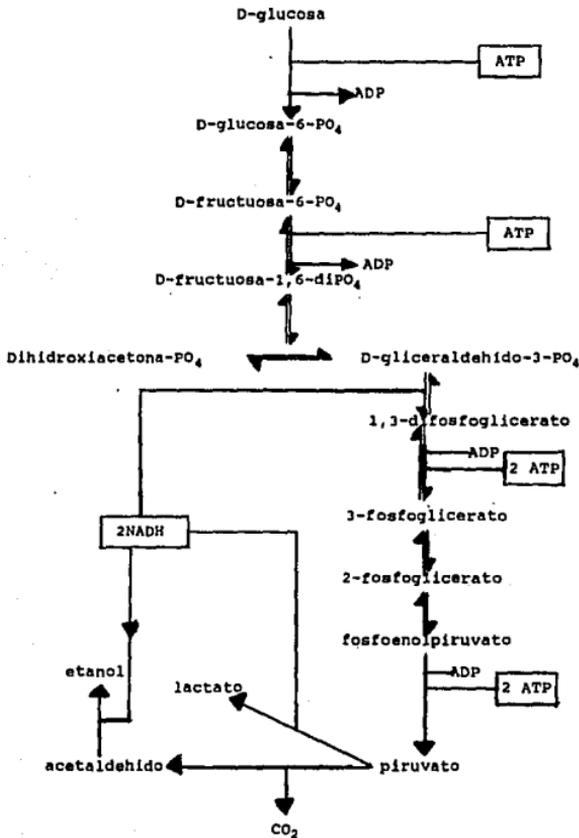
La utilización de un monosacárido depende de la presencia en el microorganismo de sistemas de transporte específico para incorporar el azúcar a las células a través de la membrana. La principal ruta del catabolismo de la glucosa en la mayoría de las células es la de la glucólisis, en la que la molécula de glucosa es degradada a dos moléculas de ácido láctico sin intervención de oxígeno molecular. (29).

Los conceptos básicos de la glucólisis están incluidos en las once reacciones enzimáticas del esquema de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), que se encuentra en la Figura 3.

En la vía glucolítica se forma un total de cuatro moles de ATP por mol de glucosa utilizada. Como se emplean dos moles de ATP en los pasos iniciales, la producción neta de ATP es de dos moles por mol de glucosa fermentada.

La vía EMP no es la única disponible para el metabolismo de carbohidratos, la vía del fosfogluconato que también es conocida como vía pentosafosfato, es una vía multifuncional que puede

FIGURA 3. ESQUEMA GLUCOLITICO DE EMBDEN-MEYERHOFF-PARNAS.



Fuente: Joklik, W. (1991). "Microbiología". 18ava. ed. Ed. Panamericana, Argentina, 55-103pp.

utilizarse para la fermentación de las hexosas, pentosas y otros carbohidratos. (30).

Todos los miembros del género *Streptococcus*, *Pediococcus* y muchas especies de *Lactobacillus* fermentan glucosa predominantemente a ácido láctico. En la asimilación de la glucosa por homofermentadores, el piruvato es reducido a ácido láctico por la enzima deshidrogenasa láctica, actuando el NADH como donador de hidrógeno. El mecanismo homofermentativo debe su producción característicamente alta, de ácido láctico a la acción de la aldolasa, que rompe la hexosa difosfato en dos partes iguales, ambas forman piruvato y por lo tanto, lactato.

La fermentación de la glucosa se inicia siempre por una fosforilación a expensas del "ATP", para producir glucosa-6-fosfato. El ácido pirúvico derivado de la glucosa-6-fosfato es un intermediario clave en el metabolismo fermentable de los carbohidratos. En su formación el NAD es reducido y vuelto a oxidar con el objeto de alcanzar el equilibrio óxido-reducción final. (29). (Figura 4).

González y Kunka (1987) al trabajar con *Pediococcus acidilactici* reportaron la presencia de los plásmidos pSRQ10 de 23 MDa y pSRQ11 de 6.2MDa donde el primero está asociado a la actividad de la sacarosa-hidrolasa, la cual hidrolisa a la sacarosa; mientras que el segundo a la producción de bacteriocina.

Las bacterias homofermentativas tales como *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* utilizan el

fosfoenolpiruvato (PEP): Sistema azúcar fosfotransferasa (PTS) para el transporte de glucosa dentro de la célula.

La fructuosa resultante de la hidrólisis de la sacarosa es fosforilada a nivel de membrana a fructosa-1,6-difosfato y transportada al interior de la célula por el mismo mecanismo, en donde es incorporada a la vía glucolítica Embden-Meyerhoff-Parnas (24).

1.3.2. Fuentes de nitrógeno.

Los microorganismos usados industrialmente pueden utilizar fuentes de nitrógeno inorgánico u orgánico. El nitrógeno inorgánico puede ser suministrado como gas amonio, sales de amonio o nitratos. Las sales de amonio tales como sulfato de amonio producen comúnmente condiciones ácidas como el ión amonio que es utilizado y su protón es liberado.

El nitrógeno orgánico puede ser suministrado como aminoácido, proteína o urea. En muchas instancias el crecimiento será rápido con un suplemento de nitrógeno orgánico y unos pocos microorganismos tienen un requerimiento absoluto de aminoácidos.

Los aminoácidos son comúnmente adicionados como complejos orgánicos de fuentes de nitrógeno los cuales no son homogéneos y fácilmente disponibles. Las fuentes de nitrógeno que son parte de proteína, se obtienen de harina de soya, frijol de soya, algodón y extracto de levadura. Para las bacterias acidolácticas se utilizan como fuentes de nitrógeno extracto de carne, soya tripticaseína, peptona de caseína, polipeptonas, entre las más importantes. (34, 50).

Existen mecanismos de control por los cuales la nitrato reductasa que es una enzima involucrada en la conversión de nitrato a ión amonio, es reprimida en presencia de amonio. Por lo tanto, el amonio (sulfato de amonio) y sus iones son preferidos como fuentes de nitrógeno. La fuente de nitrógeno muestra su influencia en los patrones de fermentación, la producción antibiótica es inhibida por

una fuente de nitrógeno cuando es utilizada rápidamente. (34). Sin embargo, se sabe que la naturaleza de la fuente de nitrógeno en el medio tiene mucha influencia sobre los requerimientos de ATP para la formación del material celular. La cantidad de material celular, que puede ser formado por mol de ATP, es mucho menor durante el crecimiento con nitrógeno molecular, que con amonio. (16).

1.3.3. Requerimientos especiales.

Existen requerimientos especiales que incrementan el crecimiento bacteriano por ser cofactores enzimáticos, así como componentes estructurales (Cuadro 5). La composición elemental de los microorganismos incluyen el contenido de C, H, O, N, S, P, Mn y K; sales minerales (Mg, Ca y Na) y vitaminas (ácido ascórbico, ácido fólico, nicotinamida, etc.) en el medio de cultivo para el crecimiento de éstos. (50).

El ácido ascórbico tiene como función bioquímica ser un cofactor enzimático con la finalidad de catalizar la actividad enzimática. El ascorbato es empleado en la reacción de descarboxilación en el paso de α -cetoglutarato a succinato. El ascorbato reduce también el Fe^{3+} enlazado a la enzima a Fe^{2+} : (19, 28, 37).

CUADRO 5**Composición elemental de las bacterias.**

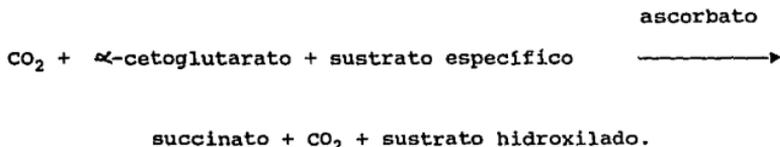
Elemento	% por peso
Carbono	50-53
Hidrógeno	7
Nitrógeno	12-15
Fósforo	2-3
Azufre	0.2-1
Potasio	1-4.5
Sodio	0.5-1
Calcio	0.01-1.1
Magnesio	0.1-0.5
Cloro	0.5
Hierro	0.02-0.2

Fuente: Stanbury and Whitaker. (1989); "Principles of fermentation technology". 2nd edition. Ed. Pergamon Press, Great Britain; 1-7, 74-85pp.

CUADRO 5**Composición elemental de las bacterias.**

Elemento	% por peso
Carbono	50-53
Hidrógeno	7
Nitrógeno	12-15
Fósforo	2-3
Azufre	0.2-1
Potasio	1-4.5
Sodio	0.5-1
Calcio	0.01-1.1
Magnesio	0.1-0.5
Cloro	0.5
Hierro	0.02-0.2

Fuente: Stanbury and Whitaker. (1989); "Principles of fermentation technology". 2nd edition. Ed. Pergamon Press, Great Britain; 1-7, 74-85pp.



Las bacterias acidolácticas requieren manganeso para su crecimiento y producción ácida; se ha reportado que algunas enzimas de la ruta EMP son activadas por Mn^{2+} . El manganeso en cantidades pequeñas ó trazas, es esencial para el crecimiento y actividades metabólicas de las bacterias acidolácticas, especialmente la activación de enzimas que están involucradas en el uso de carbohidratos.

El manganeso estimula la utilización y la actividad de la enzima α -glucosidasa (hidrólisis catalítica del enlace α -glucosídico). (42, 55).

Algunos efectos metabólicos del manganeso están asociados con la estructura, la activación de enzimas, detoxificación de químicos dañinos a la célula bacteriana y estabilización de entidades subcelulares. El manganeso está asociado con el ATP y puede reemplazar al magnesio en muchas reacciones biológicas, tales como el complejo metal-ATP, mecanismos de control, actividad enzimática, etc.

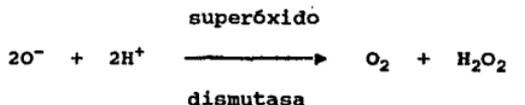
La actividad de la piruvato cinasa en *Streptococcus cremoris* es aumentada cien veces en presencia de manganeso. El manganeso actúa como un importante mecanismo de defensa contra la toxicidad

del oxígeno, ya que este es capturado por el manganeso. (22, 41, 42).

1.3.4. Características microaerofilicas.

El requerimiento de oxígeno para una bacteria en particular refleja el mecanismo empleado para satisfacer sus necesidades energéticas. Los microorganismos microaerofilicos crecen mejor con tensiones bajas de oxígeno y son inhibidos por altas tensiones. El requerimiento de los microorganismos microaerofilicos de una tensión de oxígeno reducida, es probablemente indicativo de la presencia en ellos de enzimas que son inactivadas bajo condiciones fuertemente oxidantes. (29).

En los microorganismos anaerobios y anaerobios aerotolerantes y facultativos, la enzima superóxido dismutasa impide la acumulación del ión superóxido, pero en los anaerobios obligados, esta enzima no se encuentra presente:



El peróxido de hidrógeno formado en la reacción de la dismutasa es rápidamente destruido por la enzima catalasa que se encuentra en los aerobios y en los anaerobios facultativos. Aunque algunos

microorganismos aerotolerantes, tales como las bacterias acidolácticas que carecen de catalasa, poseen una peroxidasa que cataliza la destrucción del peróxido de hidrógeno, permitiendo así que el microorganismo crezca en presencia de oxígeno.

Las superóxido dismutasas son metaloenzimas. El mismo tipo básico de enzimas se encuentran en las bacterias y en las mitocondrias eucarióticas, ambas contienen manganeso y tienen muchas homologías en su secuencia de aminoácidos. (29).

Los *Streptococcus lactis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus sanguis*, así como el *Pediococcus acidilactici* son identificados como poseedores de la superóxido dismutasa-manganeso; sin embargo, a los géneros *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Gemella*, y el *Lactobacillus plantarum* no se les ha estudiado la presencia de ésta enzima. (3).

1.3.5. Temperatura de crecimiento.

Para cada bacteria hay una temperatura óptima en la que crecen con mayor rapidez, y un espectro de temperaturas con el cual puede producirse el crecimiento.

Las bacterias se dividen en tres grupos basándose en los espectros de temperatura con los cuales crecen: psicrófilos, de -5 a 30°C, óptima 10-20°C; mesófilos, de 10 a 45°C, óptima de 20-40°C; y termófilos, de 25 a 80°C, óptima 50-60°C. La temperatura óptima

generalmente es un reflejo del medio ambiente normal del microorganismo y ejerce su efecto en una eficiente utilización del sustrato al incluirlo en la masa celular, donde éste es requerido como fuente de energía. La temperatura induce cambios en los parámetros cinéticos tales como la afinidad del microorganismo por el sustrato. (29, 34).

La división celular es especialmente sensible a los efectos de la temperatura. Además, generalmente se acepta que las actividades metabólicas de la bacteria disminuyen con la disminución de la temperatura. (29, 43).

En los procesos asociados con la membrana celular la temperatura crítica puede llevar a un desorden metabólico, esto es, hay una fase de transición en la porción lipídica de la membrana celular (de un estado cristalino-líquido a un estado sólido-gel). El cambio de fase destruye la actividad enzimática del metabolismo llevando a una mala función de la membrana y de la célula.

La energía de activación (E_a) puede ser usada para la selección eficiente de la temperatura mínima de fermentación para las bacterias acidolácticas, Raccach (1984) ha reportado que la temperatura mínima eficiente de fermentación para *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* es de 32°C y 24°C respectivamente, que son las temperaturas usadas en el comercio. Aunque en el manual Bergey se reporta que *Pediococcus acidilactici* crece en forma óptima a 30°C con un máximo tolerable a los 52°C. (43).

1.3.6. Agentes estabilizantes.

Los agentes estabilizadores son aquellos que permiten que el desarrollo bacteriano se lleve a cabo de una manera constante incrementando el crecimiento del microorganismo. (34).

Un compuesto puede ser adicionado al medio para servir específicamente como un buffer, o puede ser usado como una fuente nutritiva.

Olson y De Man (1959, 1960) sugieren que en los procesos de fermentación se emplean amortiguadores, para ajustar el pH del medio de cultivo ya que la toxicidad del ácido láctico producida por las bacterias acidolácticas puede ser reducido por la adición de un buffer tal como carbonato de calcio (34, 35).

Otro agente estabilizador, se emplea el tween 80 que es un polisorbitol (monooleato de sorbitán y polioxietileno) que se elabora con ésteres del ácido oleico y palmítico.

El tween 80 es un emulsificante que permite la dispersión homogénea de partículas y células, lo cual es deseable dado que se trata de microorganismos inmóviles. (7, 31).

Justificación.

El *Pediococcus acidilactici* utilizado como cultivo iniciador en embutidos cárnicos presenta ventajas de índole sanitario y desarrollo de características de calidad deseables para estos productos; sin embargo, no se tiene información específica acerca de los requerimientos nutricionales ni condiciones de crecimiento en medios de cultivo, por lo que se realizó la presente investigación cuyos objetivos fueron:

1.4. Objetivos.

1.4.1. Objetivo general.

Evaluar las condiciones y factores de crecimiento para el cultivo de *Pediococcus acidilactici*.

1.4.2. Objetivos particulares.

- Seleccionar las curvas de crecimiento de *Pediococcus acidilactici*.
- Elegir la fuente de carbono mas adecuada .
- Determinar la fuente de nitrógeno mas adecuada.
- Demostrar la necesidad de requerimientos especiales (ácido ascórbico y manganeso).

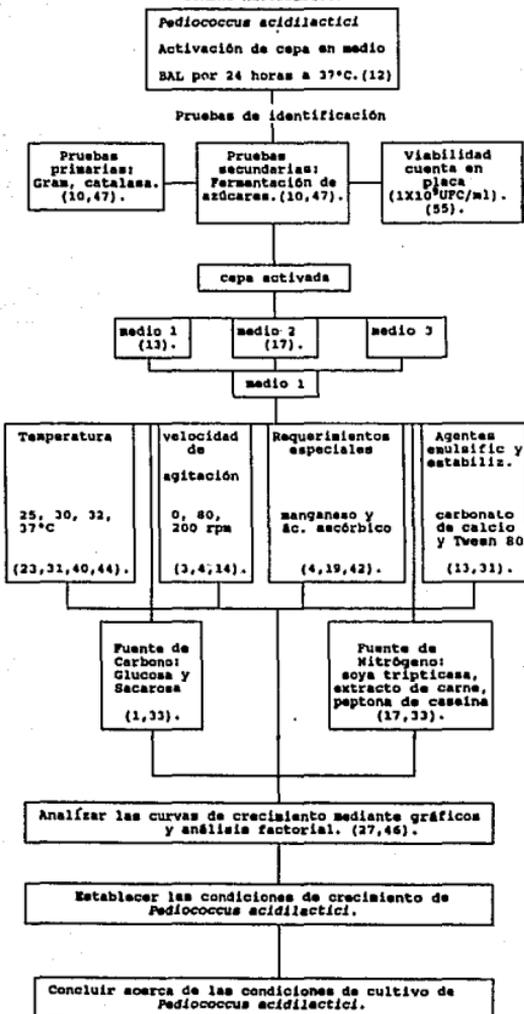
- Valorar la importancia de la adición de otros ingredientes (Tween 80 y carbonato de calcio).
- Verificar la influencia de factores físicos en el crecimiento de *Pediococcus acidilactici*.
- Analizar las curvas de crecimiento mediante gráficos y análisis factorial.
- Establecer las condiciones de crecimiento de *Pediococcus acidilactici*.
- Concluir acerca de las condiciones de cultivo de *Pediococcus acidilactici*.

M A T E R I A L Y

M E T O D O S.

2. MATERIAL Y METODOS.

CUADRO METODOLOGICO



2.2. Metodología.

Material biológico.

La cepa MIT-B-41 P-60 ATCC 8042b-67 de *Pediococcus acidilactici* fue obtenida del cepario del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), la cual se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Manejo y esterilización de material y medios.

El material se esterilizó en autoclave. El tiempo de esterilización varió de acuerdo al tipo de material utilizado. El material de vidrio (pipetas, matraces, cajas petri, etc) se esterilizó a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Con la finalidad de evitar reacciones de oscurecimiento no enzimático y con ello la descomposición del ácido ascórbico, sacarosa y glucosa por los cambios de temperatura e interacción entre estos compuestos y los grupos amino presentes, se procedió a esterilizarlos (ácido ascórbico, glucosa, sacarosa) cada uno por separado a 10 libras de presión durante 10 minutos. En cuanto a los demás ingredientes de los medios de cultivo, estos se esterilizaron a 15 libras por 15 minutos, posteriormente se procedió a mezclar todos los ingredientes en condiciones de esterilidad (11).

Preparación de la cepa.

Para tener un control de la cepa, ésta se mantuvo en caldo basal en refrigeración y cada tres meses se realizó la resiembra de la misma en agar APT (All Purpose Tween), así como las pruebas primarias y secundarias.

La activación de la cepa se realizó inoculándola en medio de cultivo Basal fresco a 37°C por 24 horas. Se centrifugó el caldo con la cepa activada a 2000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células para concentrarlas en un solo tubo. Por diluciones dobles del concentrado se determinaron las UFC/ml mediante el sembrado del mismo en agar APT.

De la cepa activada se tomaron 0.01ml (1×10^9 UFC/ml) por cada ml de medio de cultivo al cual previamente se le variaron la concentración de nutrientes a experimentar en un sistema de cultivo discontinuo.

Medios de cultivo.

Se realizaron cinéticas de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* en tres medios de cultivo para bacterias acidolácticas, los cuales fueron Medio basal, Medio MRS, y Medio sugerido por CINVESTAV cuya composición se muestra a continuación.

Medio 1 (Medio Basal)

Soya tripticaseína	1.0%
Peptona proteasa	1.0%
Glucosa	1.0%
Extracto de levadura	0.5%
Acetato de sodio	0.5%
Citrato de amonio	0.2%
Fosfato disódico	0.02%
Tween 80	0.1%
Sulfato de magnesio	0.01%
sulfato de manganeso	0.005%
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Medio 2 (Medio MRS)

Extracto de carne	0.5%
Extracto de levadura	0.5%
Polipeptona	0.5%
Sacarosa	0.5%
Acetato de sodio	0.3%
Acido ascórbico	0.05%
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Medio 3 (Medio sugerido por CINVESTAV)

Triptona	1.0%
Extracto de levadura	1.0%
Sacarosa	2.0%
Acido ascórbico	0.003%
Agua destilada c.b.p.	100ml

Una vez seleccionado el medio de cultivo en el que hubo mayor crecimiento bacteriano se procedió a buscar la mejor temperatura de crecimiento, así como el efecto de la agitación en el desarrollo del microorganismo.

Cinéticas de crecimiento.

Se realizaron cinéticas de crecimiento utilizando cultivos de *Pediococcus acidilactici* con una concentración inicial de 1×10^9 UFC/ml realizando mediciones de densidad óptica cada 6 horas durante 30 horas mediante el uso de un espectrofotómetro Spectronic 20 (Baush & Lomb) a una longitud de onda de 530nm.

Diseño factorial.

Se aplicó un diseño factorial considerando como factores físicos la temperatura (25, 30, 32, 37°) y la velocidad de agitación (0, 80, 200 rpm); como fuente de carbono glucosa o sacarosa (10, 20 y 30g/l); fuente de nitrógeno, peptona de caseína, extracto de carne o soya tripticaseína (10g/l); como requerimientos especiales ácido

ascórbico (0.0, 0.03, 0.5g/l) y manganeso (0.05, 0.1113g/l; 41, 42); como buffer carbonato de calcio (0.01g/l) y emulsificante polioxoetilensorbitán monoleato (tween 80, 1g/l).

Variaciones del diseño.

Paralelamente se hicieron cinéticas donde se utilizó jugo de tomate filtrado y estéril como fuente de manganeso y ácido ascórbico sugerido por Stamer (1964). La composición del medio de cultivo y jugo de tomate utilizados se muestran a continuación.

Medio 3 con jugo de tomate.

Triptona	1.0%
Extracto de levadura	1.0%
Sacarosa	2.0%
Jugo de tomate	20.0%
* Manganeso	0.002226%
* Acido ascórbico	0.03%
agua destilada c.b.p.	100 ml

*El contenido de manganeso y ácido ascórbico en el jugo de tomate fueron determinados mediante técnicas volumétricas.

Composición del jugo de tomate sin filtrar por cada 100 g.

Carbohidratos	(g)	5.4
Proteínas totales	(g)	0.8
Grasas totales	(g)	0.3
Minerales:		
calcio	(mg)	9.0
hierro	(mg)	0.6
magnesio	(mg)	11.0
sodio	(mg)	361.0
potasio	(mg)	220.0
zinc	(mg)	0.14
manganeso	(mg)	27.55
Vitaminas:		
retinol	(mcg)	56.0
ácido ascórbico	(mg)	35.0
tiamina	(mg)	0.11
riboflavina	(mg)	0.03
niacina	(mg)	0.9
piridoxina	(mg)	0.11
ácido fólico	(mcg)	19.9

Fuente: Chávez, M.; Hernández, M; Roldán, J. A. (1992). "Valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México". 2a. ed. Edit. Comisión Nacional de Alimentación, México, 20App

Métodos de análisis.

Los resultados se analizaron con el paquete estadístico Statistical Analytical System (SAS) y se construyeron las gráficas correspondientes. (46).

2.3. Material, equipo y reactivos.

Para la realización de las curvas de crecimiento se requiere del siguiente material y equipo:

2.3.1. MATERIAL.

- matraz Erlen Meyer de 250 ml
- pipeta graduada de 5 ml
- pipeta graduada de 1 ml
- tubo con tapón de rosca
- vaso de precipitados de 100 ml
- vidrio de reloj
- probeta de 100 ml
- tubos para centrifuga
- celda para espectrofotómetro
- mechero Fisher
- piseta
- caja petri
- pipeta de Ependorff (10-200 μ l)

2.3.2. EQUIPO.

- balanza granataria Sartorius
- balanza analítica Sauter
- autoclave Presto
- centrifuga Sol-Bat C-300

- microscopio óptico Sargent-Welch
- incubadora Blue M
- espectrofotómetro Baush & Lomb Spectronic 20

2.3.3. REACTIVOS.

- Colorantes para tinción de Gram
- Azúcares para control bioquímico
- Medios de cultivo (1, 2, 3).
- Diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono

2.3.4. MATERIAL BIOLÓGICO.

- cultivo de *Pediococcus acidilactici* (MIT-B-41 P60 ATCC 8042b-67)

R E S U L T A D O S Y

D I S C U S I O N .

3. RESULTADOS Y DISCUSION.

Frecuentemente las bacterias acidolácticas utilizadas como cultivos iniciadores se encuentran fermentando materiales orgánicos con la producción de ácido láctico y de otros productos lo cual es benéfico en algunos procesos comerciales, como en la maduración de lácteos y de embutidos. (17, 26, 43).

La utilización de cultivos iniciadores ha permitido estandarizar diferentes procesos de alimentos; sin embargo, su manejo forma parte del Know-How de las grandes compañías, por lo que se tiene poca información al respecto en la literatura.

El paquete para computadora Statistical Analytical System (SAS) aplica un análisis factorial, así como la prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan) entre otras pruebas estadísticas; permitiendo así, un análisis mas confiable y rápido con la finalidad de eliminar cualquier error en el cálculo. Cabe señalar que estas pruebas son utilizadas debido a que se usaron diversos tratamientos con tres niveles de variación cada uno, con un valor de $\alpha = 0.05$ que se ajusta a un análisis factorial.

Para determinar el medio de cultivo en el cual *Pediococcus acidilactici* obtuviera el mayor crecimiento en menor tiempo; se realizaron cinéticas de crecimiento en cada uno de los tres medios de cultivo mencionados en la metodología.

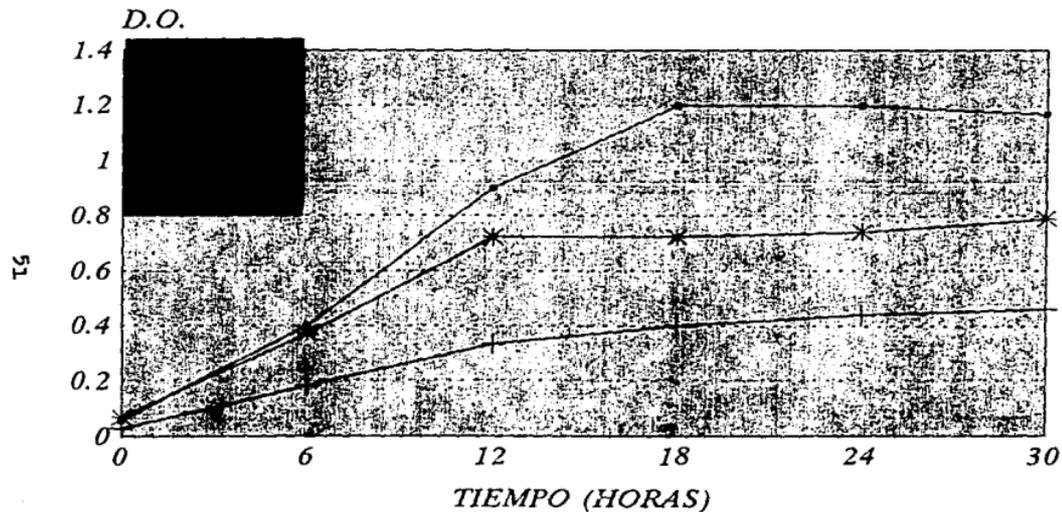
Se encontró que el mas adecuado fue el medio uno como se muestra en la GRAFICA 1, ya que el microorganismo alcanzó la fase logarítmica en menor tiempo en éste medio, a diferencia de los medios dos y tres. Por lo que se empleó el medio uno para realizar las cinéticas y variar las condiciones señaladas en la metodología.

TABLA 1.

CRECIMIENTO DE *Pediococcus acidilactici* EN TRES MEDIOS DE CULTIVO

TIEMPO (HORAS)	MEDIO UNO (D.O.)	MEDIO DOS (D.O.)	MEDIO TRES (D.O.)
0	0.06	0.03	0.07
6	0.40	0.18	0.37
12	0.90	0.33	0.72
18	1.20	0.40	0.72
24	1.20	0.44	0.74
30	1.17	0.46	0.79

GRAFICA 1
CRECIMIENTO DE *P. acidilactici* EN TRES MEDIOS DE CULTIVO



MEDIOS DE CULTIVO

Como se mencionó anteriormente, existe una temperatura óptima de crecimiento para los microorganismos que es importante para metabolizar eficientemente el sustrato e incluirlo en la masa celular donde se requiere como fuente de energía.

En el manual Bergey se sugiere un rango de temperatura eficiente para el crecimiento de todas las especies de *Pediococcus* que van de 25 a 40°C; sin embargo, varios autores difieren en sus estudios dando diferentes temperaturas "óptimas" para el crecimiento de *Pediococcus acidilactici*; por ejemplo, Gilliland (1975), sugiere 37°C; Raccach (1984) sugiere 25 y 32°C; Bergey (1986) da 30°C.

De los resultados reportados en la GRAFICA 2 y analizados estadísticamente se observa que existe una diferencia altamente significativa en la densidad óptica de la cepa a 30°C, obteniéndose un mayor crecimiento en menor tiempo en comparación con las otras temperaturas utilizadas.

Raccach en 1984, encontró que existe una influencia entre la temperatura y el metabolismo de la glucosa vía EMP, esto es, cuando la bacteria carece de una temperatura óptima para su crecimiento se presenta un marcado desorden metabólico, dando como consecuencia una disminución en el transporte del azúcar dentro de la célula y una glucólisis lenta, la cual se refleja por una menor velocidad de fermentación y por consiguiente en el crecimiento de la cepa. (40).

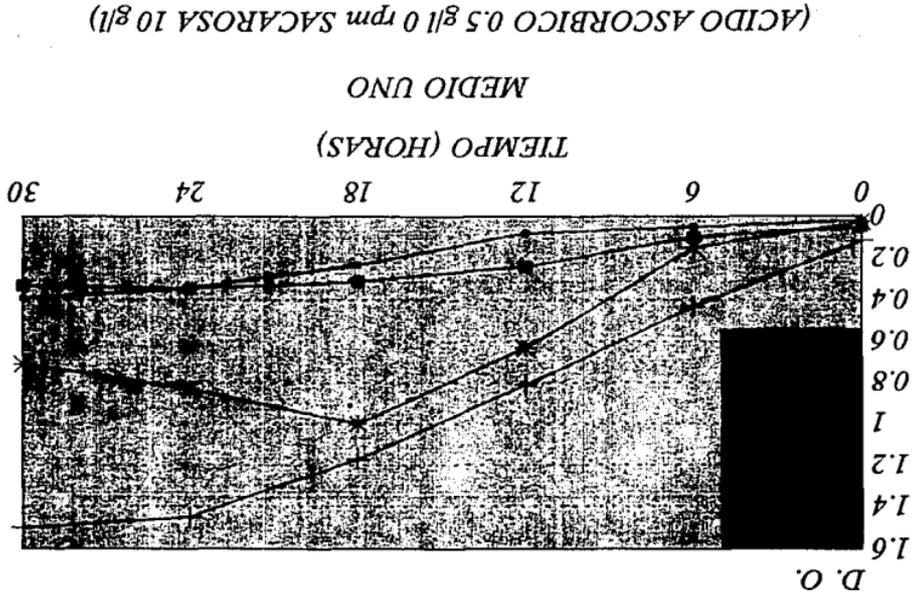
TABLA 2. MEDIO UNO.

**INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DE
Pediococcus acidilactici.**

TIEMPO (HORAS)	25°C (D.O.)	30°C (D.O.)	32°C (D.O.)	37°C (D.O.)
0	0.02	0.12	0.03	0.05
6	0.05	0.43	0.15	0.10
12	0.08	0.81	0.63	0.24
18	0.23	1.17	1.00	0.31
24	0.34	1.45	0.83	0.34
30	0.39	1.50	0.71	0.33

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE P. acidilactici

GRAFICA 2



Se ha reportado que *Pediococcus acidilactici* es un microorganismo microaerofílico, lo que se comprobó al realizar cinéticas con y sin agitación mecánica, los resultados se muestran en la GRÁFICA 3, y de los análisis factoriales se observan resultados altamente significativos ($\alpha = 0.05$) en los que no se utilizó agitación a partir de las 24 horas de crecimiento con respecto de los otros. Como vemos, no hay un cambio significativo en el crecimiento con y sin agitación durante las primeras doce horas. Sin embargo, conforme transcurre el tiempo de la cinética se presenta un mayor crecimiento bacteriano en ausencia de la agitación, mientras que con 80 y 200 rpm la densidad óptica es menor. De este modo, observamos que entre las 24 y 30 horas de crecimiento se obtiene una densidad óptica de 1.5, 1.3 y 1.0 para 0, 80 y 200 rpm respectivamente.

Calam (1969) menciona que en la fase exponencial, el crecimiento puede estar afectado por ciertas limitantes o factores, esto es, puede disminuir su eficiencia con la agitación ya que se incluye oxígeno y como el microorganismo en estudio es de características microaerofílicas, se requiere de bajas concentraciones de este gas debido a la presencia de enzimas, tales como la superóxido dismutasa (SOD) que es inactivada bajo condiciones fuertemente oxidantes. (3, 4).

Zaika y colaboradores (1984) dicen que las bacterias oxígeno tolerantes son estimuladas por el manganeso, acelerando tanto su crecimiento como la producción de ácido láctico por la fermentación

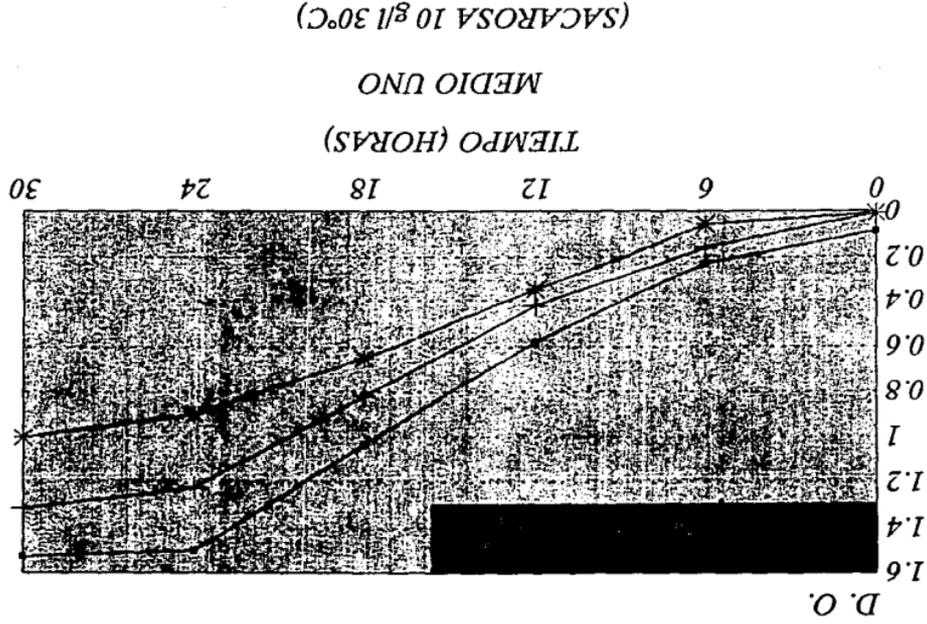
TABLA 3. MEDIO UNO.

**INFLUENCIA DE LA AGITACION MECANICA DURANTE EL CRECIMIENTO DE
Pediococcus acidilactici.**

TIEMPO (HORAS)	0 rpm (D.O.)	80 rpm (D.O.)	200 rpm (D.O.)
0	0.09	0.01	0.01
6	0.23	0.16	0.06
12	0.58	0.42	0.35
18	1.03	0.82	0.65
24	1.50	1.22	0.90
30	1.53	1.31	1.00

EFFECTO DE LA AGITACION SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. acidilactici*

GRAFICA 3



de glucosa sugiriendo que, probablemente el manganeso está asociado con un importante mecanismo de defensa contra la toxicidad del radical superóxido endógeno o sustitución por superóxido dismutasa en *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus mesenteroides* y *Pediococcus pentosaceus*. (3, 55).

Zaika (1984) indica que el manganeso se encuentra en los medios para bacterias acidolácticas en diversas concentraciones, tales como el APT (7.7×10^{-4} M) y MRS (2.2×10^{-4} M) y que éste tiene un efecto estimulante utilizando glucosa como sustrato de fermentación.

Raccach y Marshall (1985) observaron que la fermentación acidoláctica de sacarosa por *Lactobacillus plantarum* en medio APT modificado (sacarosa en lugar de glucosa) fue estimulada en un 140% por manganeso; de nuestros resultados encontramos que el porcentaje de estimulación para el crecimiento de *Pediococcus acidilactici* debido a la presencia de manganeso en los medios de cultivo empleados es de 87.5% en el medio 3 (sin manganeso); de 200% en el medio 1 (0.05mg de Mn/ml) y de 275% en el medio 3 con jugo (0.1155mg de Mn/ml). TABLA A. (41).

TABLA A.
EFFECTO DEL MANGANESO EN LA ESTIMULACION DEL CRECIMIENTO DE
Pediococcus acidilactici.

Medio de cultivo	[manganeso] (mg/ml)	Tiempo (hrs)	Absorbancia (D.O.)	% de estimulación*
2 (control) sin Mn	0.0	18	0.4	---
1	50	18	1.2	200
3	0.0	18	0.75	87.5
3 con jugo de tomate	115.5	18	1.5	275

* D.O. (medio)

$$\left[\frac{\text{-----}}{\text{D.O. (control)}} \times 100 \right] - 100$$

Además Raccach (1985) utilizando *Lactobacillus casei* completó su crecimiento en 12-16 horas con manganeso y en 40 horas en ausencia. Esto coincide con los resultados obtenidos con *Pediococcus acidilactici*, en donde utilizando como control al medio mínimo esencial (constituído por las cantidades mínimas necesarias de nutrientes para el crecimiento) para bacterias acidolácticas (medio 2), encontramos que el tiempo para obtener el máximo crecimiento bacteriano es de 30 hrs; en contraste con el medio 1 y el medio 3 con jugo de tomate que es de 18 hrs; por lo que el tiempo para obtener el máximo crecimiento se reduce en 12 hrs con respecto al control. TABLA B.

Se ha indicado que algunas de las enzimas de la vía EMP son activadas por manganeso como la piruvato cinasa de *Streptococcus cremoris*. Además se ha demostrado que es un requerimiento especial para *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mesenteroides* y otros *Lactobacillus heterofermentativos*. (5, 40, 43).

Algunos efectos biológicos del manganeso están asociados con la estructura/activación de enzimas, detoxificación de metabolitos dañinos a la célula bacteriana; además el manganeso activa fosfotransferasas y descarboxilasas importantes en el ciclo de Krebs. (6).

TABLA B.

EFFECTO DEL MANGANESO EN LA REDUCCION DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO
DE *Pediococcus acidilactici*.

Medio de cultivo	Crecimiento máximo (D.O.)	Tiempo (hrs)	Tiempo de reducción (hrs)
2	0.45	30	control
1	1.20	18	12
3	0.83	36	0
3 con jugo de tomate	1.50	18	12

En cultivos frescos no hay influencia significativa del manganeso en la reducción del tiempo de fermentación (Everson, 1970); sin embargo, cuando se utilizan cultivos congelados-descogelados la reducción es entre 4 y 7 horas al adicionar manganeso; cabe recordar que el *Pediococcus acidilactici* se utiliza como cultivo iniciador y se almacena liofilizado, manteniéndolo concentrado a bajas temperaturas. (20).

Las bacterias acidolácticas homofermentativas transportan carbohidratos usando el Sistema Fosfoenol Piruvato (PEP): sistema fosfotransferasa (PTS) y metaboliza vía EMP. Lehninger (1950) apunta que la hexocinasa cataliza la fosforilación de hexosas.

La inducción enzimática de la sacarosa-6-fosfato hidrolasa y sacarosa-fosfotransferasa permiten la entrada de la sacarosa a la ruta glucolítica; la fructuocinasa es otra enzima que también está involucrada en la catálisis de la sacarosa ya que, al ser desdoblado este disacárido a glucosa y fructuosa, ésta última es fosforilada por la enzima a fructuosa-6-fosfato. (53).

La glucosa entra a la vía glucolítica por acción de la glucocinasa convirtiéndola en glucosa-6-fosfato que posteriormente se convierte en fructuosa-6-fosfato y este producto metabólico es el mismo que el producido a través de la fructuosa, por lo que es común que ambos monosacáridos sean metabolizados por la vía glucolítica. (29).

Gonzalez y Kunka (1987), presentaron evidencia de un plásmido que codifica para la utilización de sacarosa y producción de bacteriocina en *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. La actividad de la enzima sacarosa-hidrolasa fue asociada con la presencia de pSRQ10, un plásmido de 23 MDa, mientras que la producción de la bacteriocina en la misma cepa fue asociada con pSRQ11, otro plásmido de 6.2 MDa. Aplicando técnicas de bioingeniería la eliminación del plásmido de 23 MDa resultó en la pérdida simultánea de la habilidad de fermentar la sacarosa y de la actividad asociada con sacarosa-hidrolasa. Estos mismos autores en 1986, reportaron para la misma cepa que la actividad de sacarosa hidrolasa (inducible), fue obtenida de extractos de células cultivadas, utilizando como fuente de carbono glucosa y sacarosa, lo que nos permite hacer ciertas analogías dado que son las mismas condiciones experimentales utilizadas en esta tesis. Las pérdidas de actividad de las enzimas α -D-glucosidasa y de α -galactosidasa sugieren que la actividad de la sacarosa-hidrolasa puede ser debido a la presencia de la enzima β -fructofuranósido-fructohidrolasa, por lo que su caracterización posterior es necesaria para determinar su especificidad exacta y la posible actividad de permeasa asociada con la presencia del plásmido pSRQ10.

De acuerdo a los resultados obtenidos (GRAFICA 4) se sugiere que *Pediococcus acidilactici* emplea los mecanismos antes citados, sin embargo estadísticamente, es indistinto el uso de glucosa y

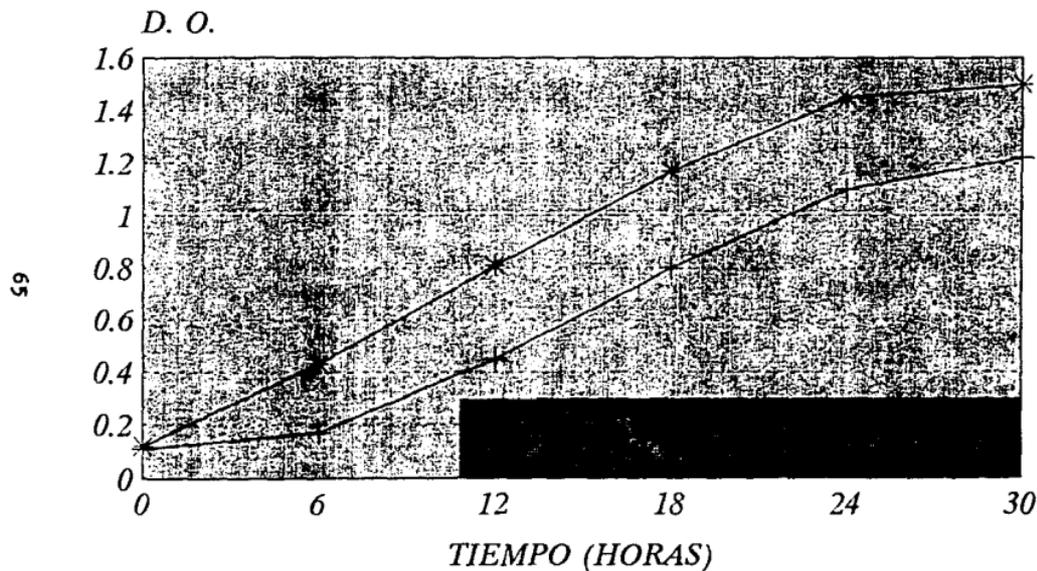
TABLA 4. MEDIO UNO.

INFLUENCIA DE LA FUENTE DE CARBONO EN EL CRECIMIENTO DE
Pediococcus acidilactici.

TIEMPO (HORAS)	GLUCOSA 1% (D.O.)	SACAROSA 1% (D.O.)
0	0.11	0.12
6	0.17	0.43
12	0.45	0.81
18	0.80	1.17
24	1.10	1.45
30	1.22	1.50

GRAFICA 4

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN EL CRECIMIENTO DE *P. acidilactici*



MEDIO UNO

(ACIDO ASCORBICO 0.5 g/l 0 rpm 30°C)

sacarosa como fuente de carbono.

Se sabe que *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* crecen en forma natural en plantas y están involucrados en la fermentación de una variedad de vegetales. La sacarosa es el disacárido mas comunmente encontrado en plantas, por lo que las cepas que contienen información genética para utilizar éste azúcar tienen una ventaja selectiva en su fermentación. (24, 53).

En cuanto a las concentraciones de los azúcares (10, 20 y 30g/l) se tiene como resultado que no hay significancia entre las mismas con respecto al análisis estadístico. Sin embargo en la GRAFICA 5 observamos que con una concentración de 10g/l existe una mayor densidad óptica (1.2), mientras que con las concentraciones de 20 y 30g/l es de 0.8 y 0.9 respectivamente. De este modo vemos que la concentración recomendada a emplear es de 1-2% como lo mencionan Acton (1977) y Thompson (1981). (1, 27, 46, 49, 53).

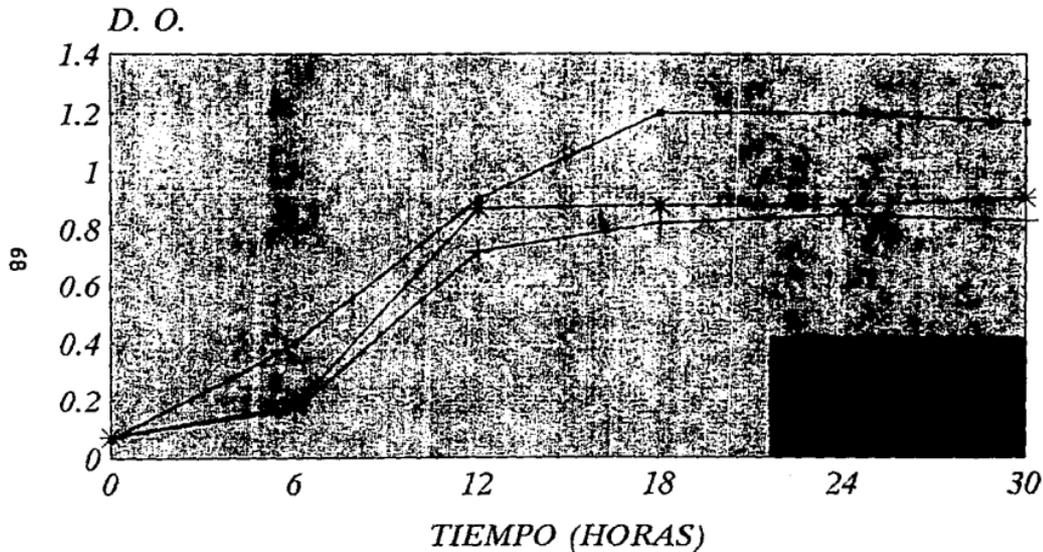
TABLA 5. MEDIO UNO.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA SOBRE
Pediococcus acidilactici.

TIEMPO (HORAS)	10 g/l (D.O.)	20 g/l (D.O.)	30 g/l (D.O.)
0	0.05	0.05	0.05
6	0.40	0.18	0.18
12	0.90	0.72	0.89
18	1.20	0.82	0.89
24	1.20	0.83	0.89
30	1.19	0.83	0.90

GRAFICA 5

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA SOBRE *P. acidilactici*



MEDIO UNO

(ACIDO ASCORBICO 0.5 g/l 0 rpm 30°C CaCO₃ 0.01 g/l)

En los ensayos de ácido ascórbico como requerimiento especial, se establece que el crecimiento de la cepa es mayor en concentraciones altas, es decir, el crecimiento es directamente proporcional a la concentración de ácido ascórbico, en donde la mayor densidad óptica es a una concentración de 0.5g/l. GRAFICA 6. La importancia del ácido ascórbico radica en que es un factor que no es sintetizado por la bacteria, por lo que se requiere su adición en el medio de cultivo. Cuando se ha encontrado que está presente el citrato, el *Streptococcus lactis* tiene una vía alterna para la producción de ácido pirúvico en la producción simultánea del NADH; por lo que éste ácido pirúvico está disponible para la producción de diacetilo que por acción de la diacetil reductasa es posible su reducción a acetoína; que a su vez se reduce en 2,3-butilenglicol. Este aumento en la fermentación conduce a un incremento del metabolismo, por lo tanto, de la masa celular. (39).

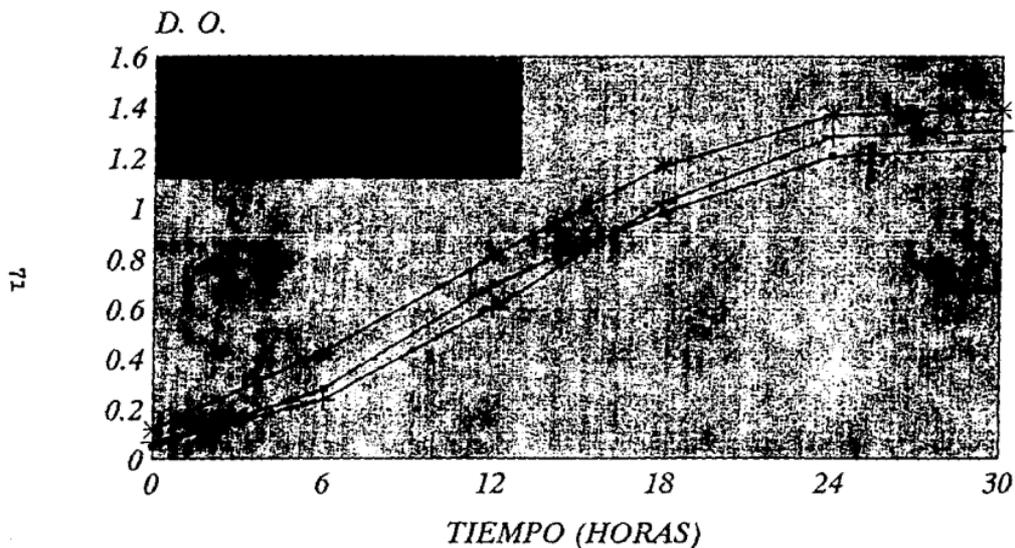
TABLA 6. MEDIO UNO.

**INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ACIDO ASCORBICO EN EL
CRECIMIENTO DE *Pediococcus acidilactici*.**

TIEMPO (HORAS)	0.0 g/l (D.O.)	0.03 g/l (D.O.)	0.5 g/l (D.O.)
0	0.05	0.07	0.12
6	0.28	0.24	0.43
12	0.70	0.61	0.81
18	0.98	1.02	1.17
24	1.21	1.29	1.45
30	1.24	1.31	1.50

GRAFICA 6

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ACIDO ASCORBICO SOBRE *P. acidilactici*



MEDIO UNO

(SACAROSA 10 g/l 0 rpm 30°C)

Briggs (1953) y Efthymiou (1972) al trabajar con *Lactobacillus*, sugieren que el tween 80 al 0.1% es utilizado por las células bacterianas en su crecimiento, aunque el mecanismo de acción es todavía desconocido. En la GRAFICA 7 se observa que la adición de tween 80 al medio de cultivo es necesario para obtener mejor crecimiento de *Pediococcus acidilactici*, ya que tratándose de un microorganismo inmóvil el tween 80 mantiene una suspensión mas homogénea y estable aumentando la superficie de contacto del microorganismo con los nutrientes del medio. Sin embargo, al aplicar la prueba de Duncan se observa que no existe significancia estadística entre la presencia o ausencia del tween 80 en el medio. (13).

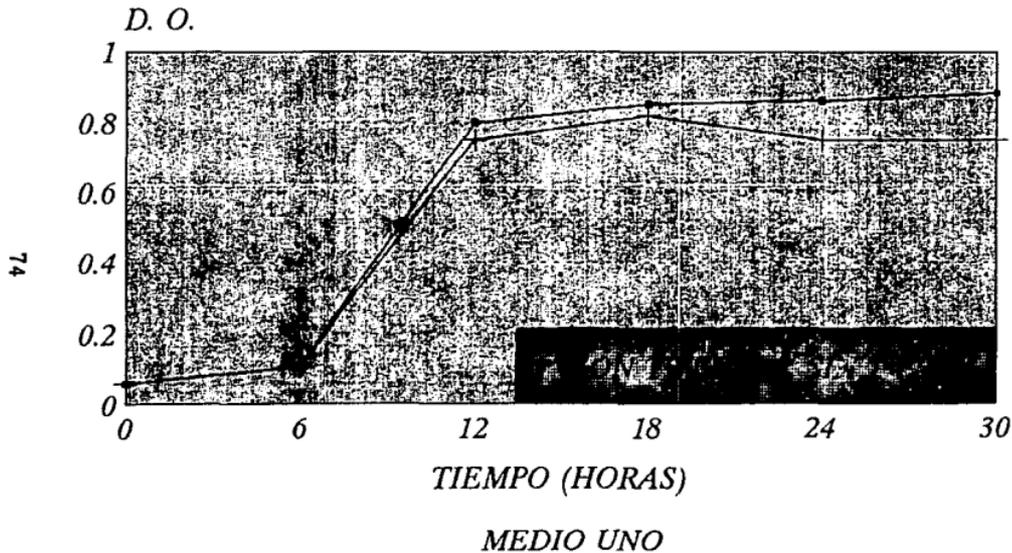
TABLA 7. MEDIO UNO.

EFFECTO DEL TWEEN 80 SOBRE *Pediococcus acidilactici*.

TIEMPO (HORAS)	COM TWEEN (D.O.)	SIN TWEEN (D.O.)
0	0.06	0.06
6	0.11	0.11
12	0.80	0.75
18	0.85	0.82
24	0.86	0.75
30	0.88	0.75

GRAFICA 7

EFFECTO DEL TWEEN 80 SOBRE *P. acidilactici*



(ACIDO ASCORBICO 0.5 g/l 0 rpm 30°C CaCO3 0.01 g/l SACAROSA 10 g/l)

Por otra parte, se sabe que el crecimiento microbiano y su metabolismo conducen a cambios en el pH del medio de cultivo, el cual dependerá de la capacidad amortiguadora de los buffers empleados; ya que estos se utilizan en función de la estabilidad del producto de reacción deseado. Existen diferentes amortiguadores (hidróxido de potasio, ácido clorhídrico, fosfatos) que proporcionan un intervalo de pH específico; por lo que el carbonato de calcio es el mas utilizado en los cultivos de bacterias acidolácticas ya que permite una mayor estabilidad del lactato producido durante la fermentación. Además, el calcio es un constituyente de la pared celular de las bacterias Gram positivas, por lo que es importante considerar su incorporación al medio de cultivo. (34, 35).

La adición de carbonato de calcio no es significativa ($\alpha = 0.05$) con respecto a los medios de cultivo en los que no fué adicionado, pero gráficamente (GRAFICA 8) se observa que sí existe un mayor crecimiento y estabilidad del microorganismo al adicionarlo permitiendo un incremento en el crecimiento bacteriano.

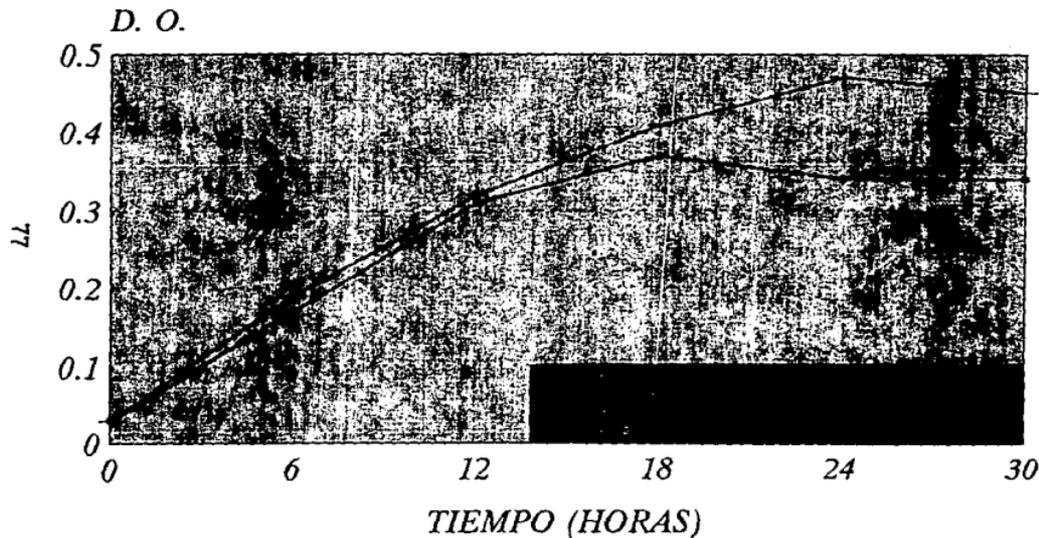
TABLA 8. MEDIO UNO.

EFEECTO DEL CARBONATO DE CALCIO EN EL CRECIMIENTO DE
Pediococcus acidilactici.

TIEMPO (HORAS)	CON CaCO ₃ (D.O.)	SIN CaCO ₃ (D.O.)
0	0.03	0.03
6	0.19	0.17
12	0.32	0.31
18	0.41	0.37
24	0.47	0.34
30	0.45	0.34

GRAFICA 8

EFFECTO DEL CARBONATO DE CALCIO SOBRE *P. acidilactici*



MEDIO UNO

(SACAROSA 10 g/l 30°C ACIDO ASCORBICO 0.5 g/l 0 rpm)

Es evidente que la naturaleza de la fuente de nitrógeno en el medio tiene mucha influencia sobre los requerimientos de ATP para la formación del material celular. La cantidad de material celular que puede ser formado por mol de ATP es mucho menor durante el crecimiento con nitrógeno molecular que con sales de amonio. La dependencia de los sistemas de enzima proteinasa para degradar las proteínas como fuente de nitrógeno puede estar atribuido, en parte, al requerimiento de aminoácidos por el microorganismo (leucina, isoleucina, metionina, valina, ácido glutámico e histidina).

Las peptidasas hidrolizan péptidos con el objeto de facilitar el transporte de aminoácidos esenciales al interior de la célula para poder ser utilizados en la incorporación a la constitución estructural bacteriana y en la producción de metabolitos secundarios. (28, 50).

Sabiendo que la combinación de fuentes de nitrógeno le proporcionan a la bacteria mayor actividad metabólica, se encontró que hay mayor crecimiento en presencia de citrato de amonio, soya tripticaseína 1% y extracto de levadura 1%. (GRAFICA 9). (28, 50).

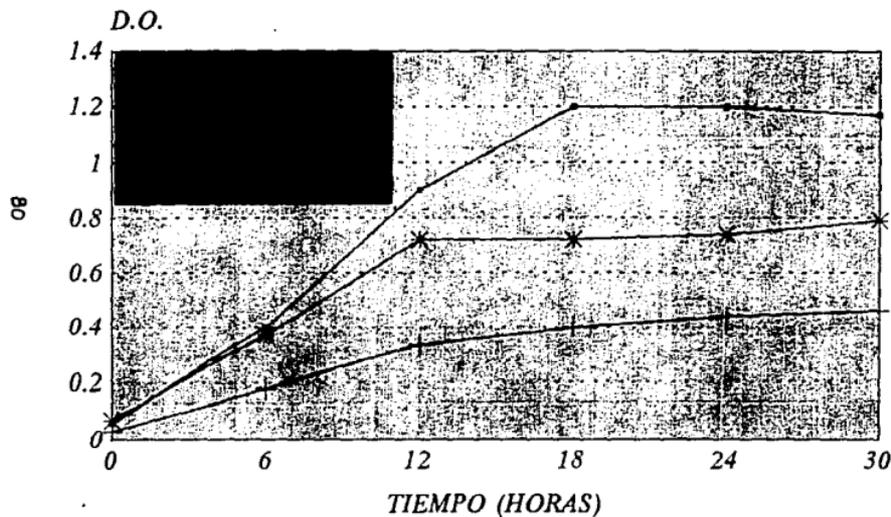
Con respecto a los tres medios de cultivo utilizados, se establece que el máximo crecimiento de *Pediococcus acidilactici* se presenta en el medio 3 con jugo de tomate debido al elevado contenido de manganeso y ácido ascórbico (0.1150mg Mn/ml y 1.5g/l); siguiendo en importancia el medio 1, medio 3 sin jugo de tomate y medio 2. (GRAFICA 10).

TABLA 9. MEDIO UMO.

EFFECTO DE LA INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE
Pediococcus acidilactici.

TIEMPO (HORAS)	SOYA TRIPTICASEINA 1% (D.O.)	EXTRACTO DE CARNE 1% (D.O.)	TRIPTOMA DE CASEINA 1% (D.O.)
0	0.06	0.03	0.07
6	0.40	0.18	0.37
12	0.90	0.33	0.72
18	1.20	0.40	0.72
24	1.20	0.44	0.74
30	1.17	0.46	0.79

GRAFICA 9
EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE *P. acidilactici*



MEDIO UNO

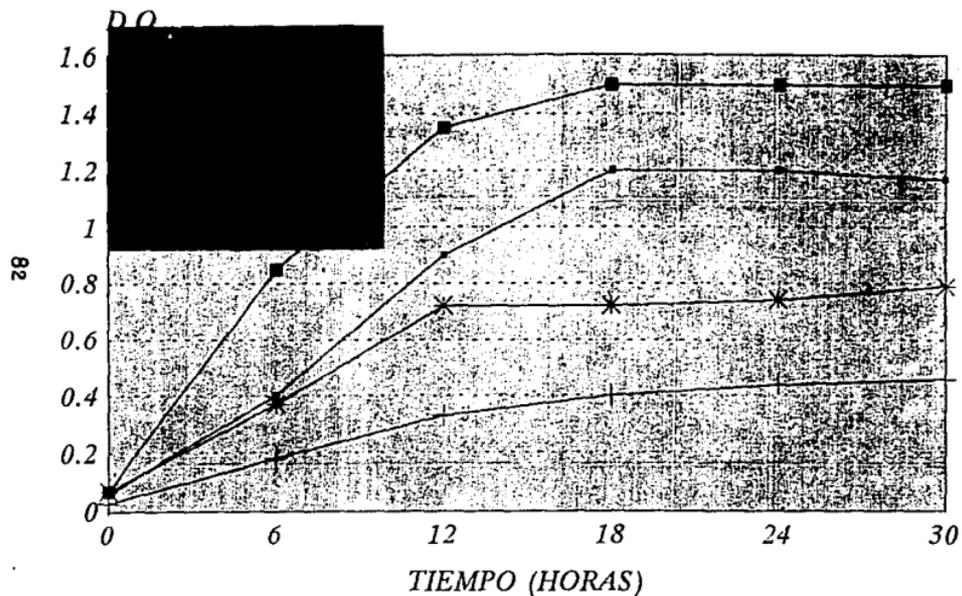
(SACAROSA 10 g/l ACIDO ASCORBICO 0.5 g/l, CaCO₃ 0.1 g/l, 0 rpm, 30°C, EXTRACTO DE LEVADURA 1%)

TABLA 10.

EFEECTO DE LA ADICION DE JUGO DE TOMATE EN EL CRECIMIENTO DE
Pediococcus acidilactici.

TIEMPO (HORAS)	MEDIO UNO (D.O.)	MEDIO DOS (D.O.)	MEDIO TRES (D.O.)	MEDIO TRES CON JUGO DE TOMATE (D.O.)
0	0.06	0.03	0.07	0.07
6	0.40	0.18	0.37	0.85
12	0.90	0.33	0.72	1.35
18	1.20	0.40	0.72	1.50
24	1.20	0.44	0.74	1.50
30	1.17	0.46	0.79	1.50

GRAFICA 10
EFECTO DE LA ADICION DE JUGO DE TOMATE SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. acidilactici*



MEDIOS DE CULTIVO

Por lo anterior, consideramos que el crecimiento de *Pediococcus acidilactici* es favorecido en presencia de sacarosa o glucosa (10g), con la adición de fuentes de nitrógeno, con ácido ascórbico hasta de .1.5g/l, en presencia de tween 80 y carbonato de calcio, sin agitación y a una temperatura de 30°C.

C O N C L U S I O N S .

4. CONCLUSIONES.

1. La mejor temperatura de crecimiento para el *Pediococcus acidilactici* es a 30°C.
2. Dadas las características microaerofílicas de la cepa en estudio, esta crece mejor sin agitación.
3. Es indistinto adicionar sacarosa o glucosa al medio de cultivo como fuente de carbono para esta bacteria.
4. La combinación de fuentes de nitrógeno permite un mayor crecimiento de la cepa.
5. El ácido ascórbico es un requerimiento especial y el crecimiento es proporcional a su concentración hasta 1.5g/l.
6. La adición de jugo de tomate filtrado y estéril permitió un mayor crecimiento bacteriano ya que incrementa la concentración de ácido ascórbico y manganeso.
7. El carbonato de calcio es un buen agente neutralizante para el control del pH del medio de cultivo.
8. La adición del Tween 80 permite un crecimiento más homogéneo de la cepa.
9. La combinación de todos los factores permitió una reducción de más de 24 horas a menos de 12 para alcanzar la fase exponencial del crecimiento.

B I B L I O G R A F I A .

BIBLIOGRAFIA.

1. Acton, J. C.; Dick, R.L.; et al. (1977). "Utilization of various carbohydrates in fermented sausage". J. Food Sci.; 42(1):174-178.
2. Anderson, R. (1988). "Lactic acid bacteria in the production of food". Food Process.; 14:17-21.
3. Archibald, F. S; Fridovich, I. (1981). "Manganese, superoxide dismutase and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria". J. Bacteriol.; 146 (6):928-936.
4. Archibald, F. (1981). "Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*". J. Bacteriol.; 144:42-451.
5. Ayres, G. (1984). "Análisis químico cuantitativo". 2a. ed. Ed. Harla, México, 423pp.
6. Bacus, J. N.; Brown, W. L. (1981). "Use of microbial cultures: meat products". Food Technol.; 35(1):71-78.
7. Badui, D.S. (1988). "Diccionario de tecnología de alimentos". Ed. Alhambra Mexicana, México, 202, 225pp.
8. Banwort, G. J. (1982). "Microbiología básica de los alimentos". Ed. Bellaterra, España, 85-93pp.
9. Barthelemy, R.; Adisson, L. (1977). "Técnicas para el laboratorio de Biología". Ed. Continental, México, 1488pp.

10. Bello, H. H.; Durán, B. I. (1992). "Aplicación de *Pediococcus acidilactici* en la elaboración de un embutido tipo salami". Tesis Ingeniería en Alimentos. F.E.S.C., México, 66-70pp.
11. Braverman, J. B. (1980). "Introducción a la bioquímica de los alimentos". Ed. El Manual Moderno, México, 177-179pp.
12. Breusegem, V. V.; Bastin, G. (1990). "Optimal control of biomass growth in a mixed culture". Biotechnol. Bioeng.; 35:344-355.
13. Briggs, M. (1953). "An improved medium for *Lactobacilli*". J. Dairy Res.; 20:36.
14. Calam, C. T. (1969). "Methods in microbiology". Ed. Academic Press, U.S.A., 270-275pp.
15. Collins, C. H. (1970). "Microbiological methods". 3rd edition. Ed. Butterworth and Co.; England, 297-312pp.
16. Cowman, R. A.; Yoshimura, S.; et al. (1986). "Proteinase enzyme system of *Lactic Streptococci* III substrate specificity of *Streptococcus lactis* intracellular proteinase". J. Bacteriol.; 95(1):181-187.
17. De Man, J.C.; Rogosa, M.; Sharpe, E. M. (1960). "A medium for the cultivation of *Lactobacilli*". J. Appl. Bacteriol.; 23(1):130-135.
18. Effthymiou, C. (1972). "Difference between manganese ion requirements of *Pediococci* and *Enterococci*". J. Bacteriol.; 112(1):627-628.

19. Englard, S.; Seifter, T. (1986). "The biochemical functions of ascorbic acid". *Ann. Rev. Nut.*; 6:365-406.
20. Everson, C. (1970). "Bacterial starter cultures and sausage products". *J. Agric. Food Chem.*; 18(4):570-571.
21. Garvie, E. (1984). "Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of *Leuconostoc* from other lactic acid bacteria". *Met. Microbiol.*; 16:147-178.
22. Ghiorse, W. C. (1984). "Biology of iron manganese-depositing bacteria". *Ann. Rev. Microbiol.*; 38:515-550.
23. Gilliland, S. E.; Speck, M. L. (1975). "Inhibition of psychrotrophic bacteria by *Lactobacilli* and *Pediococci* in non fermented refrigerated foods". *J. Food Sci.*; 40:903-905.
24. Gonzalez, C. F.; Kunka, B. (1987). "Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*": *Appl. Environ. Microbiol.*; 53(10):2534-2538.
25. Guerrero, L. I. (1989). "La biotecnología de los productos cárnicos". UAM. Unidad Iztapalapa, México, 1-6pp.
26. Houle, J. F.; Lafrance, M.; et. al. (1989). "Selection of mixed cultures for meat fermentation". *J. Food Sci.*; 54(4):839-842.
27. Hurley, D.; Aguilar, A.; et.al. (1981). "Técnicas de diseño experimental". Ed. CINVESTAV, México, 344pp.
28. Jawetz, E.; et.al. (1990). "Microbiología médica". 13ava. ed. Ed. El Manual Moderno, México, 46-53pp.

29. Joklik, W. (1991). "Microbiologia". 18ava. ed. Ed. Panamericana, Argentina, 55-103pp.
30. Kirk-Othmer. (1979). "Enciclopedia of chemical technology". Vol. 8, 3rd. edition. Ed. Board, U.S.A., 910pp.
31. Kitahara, K. (1986). "The Bergey's manual of determinative bacteriology". Ed. Buchanan R. E. & Gibbons. Williams & Wilkins Co., U.S.A., 999-1012pp.
32. Lees, R. (1980). "Análisis de alimentos". 3ra. ed. Ed. Acribia, España, 67-68pp.
33. Motlagh, A.; Johnson, M.; et. al. (1991). "Viability loss of food borne pathogens by starter culture metabolites". J. Food Prot.; 54(11):873-884.
34. Mou-Young, M.; Bull, A.; et. al. (1985). "The principles of the biotechnology scientific fundamental". Vol I, Ed. Pergamon, Press Ltd, Great Britain, 189-212pp.
35. Olson, H. C. (1959). "Preservation of lactic starter cultures". J. Dairy Sci.; 42(388):13.
36. Overview outstanding symposia in food science and technology. (1989). "Antimicrobials and their use in food". Food Technol.; 134-164pp.
37. Padh, H. (1990). "Cellular functions of ascorbic acid". Biochem. Cell. Biol.; 68:1166-1173.
38. Peppler, H. J. (1979). "Microbial technology". 2nd. edition. Ed. Academic Press, U.S.A., 59-90pp.

39. Pérez, G. J.; Pérez, G. P. (1984). "Bioquímica y microbiología de la leche". Ed. LIMUSA, México, 93-152pp.
40. Raccach, M. (1984). "A research note method for selection for lactic acid bacteria and determination of minimum temperature for meat fermentations". *J. Food Prot.*; 47(9):670-671.
41. Raccach, M.; Marshall, P. (1985). "Effect of manganese ions on the fermentative activity of frozen, thawed *Lactobacilli*". *J. Food Sci.*; 50(3):665-668.
42. Raccach, M. (1985). "Manganese and lactic acid bacteria". *J. Food Protec.*; 48(10):895-898.
43. Raccach, M.; Henningsen, E. C. (1984). "Role of lactic acid bacteria, curing salts, temperature and spices in controlling the growth of *Yersinia enterocolitica*". *J. Food Prot.*; 47(5):354-358.
44. Riebel, W. J.; Washington, J. A. (1990). "Clinical and microbiologic characteristics of *Pediococci*". *J. Clin. Microbiol.*; 28(6):1348-1355.
45. Romano, H. A.; Brino, G.; et. al. (1987). "Regulation of β -galactoside transport and accumulation in heterofermentative lactic acid bacteria". *J. Bacteriol.*; 169(12):5589-5596.
46. Statistical analytical system. (1985). "SAS Procedure guide for personal computers version". 6th edition. Ed. SAS Institute, Inc, Cary, N. C., U.S.A.
47. Schiffner. (1978). "Cultivos bacterianos para la Industria Cárnica". Ed. Acribia, España, 4-25, 57-59, 122-127pp.

48. Smulders, F. J. M; et.al. (1986). "Review: lactic acid: considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant". J. Food Technol.; 21(4):419-436.
49. Stamer, J. R.; Albury, M.; et. al. (1964). "Substitution of manganese for tomato juice in the cultivation of lactic acid bacteria". Appl. Microbiol.; 12(2):163-168.
50. Stanbury and Whitaker. (1989). "Principles of fermentation technology". 2nd edition. Ed. Pergamon press, Great Britain, 1-7, 74-85pp.
51. Stryer, L. (1988). "Bioquímica". Tomo I, 3ra. ed. Ed. Reverté, España, 362pp.
52. Symposium of the society for general microbiology. (1984). "The microbe". 36th. edition. Ed. Cambridge University Press, U.S.A., 130-136, 232-233pp.
53. Thompson, J.; Chassy, B. (1981). "Uptake and metabolism of sucrose by *Streptococcus lactis*". J. Bacteriol.; 147(2):543-551.
54. Wu, W. H.; Rule, D. C.; et. al. (1991). "Starter culture and time/temperature of storage influences on quality of fermented mutton sausage". J. Food Sci.; 56(4):916-919.
55. Zaika, L. L.; Kissinger, C. J. (1984). "Fermentation enhancement by spices: identification of active component". J. Food Sci.; 49(1):5-9.