



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Caracterización de los sobrenadantes de
cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042
mediante electroforesis SDS-PAGE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS**

**PRESENTA
SELENE LETICIA VILLA GÓMEZ**

**ASESORES:
DRA. ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS
M. EN C. JONATHAN CORIA HERNÁNDEZ**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

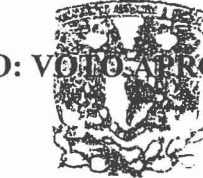
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Caracterización de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 mediante electroforesis SDS-PAGE.

Que presenta la pasante: **Selene Leticia Villa Gómez**

Con número de cuenta: 409017805 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Octubre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.A. Jorge López Pérez	
VOCAL	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
SECRETARIO	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
1er. SUPLENTE	M. en C. Crisoforo Mercado Márquez	
2do. SUPLENTE	M. en C. María Guadalupe Amaya León	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

Al PROYECTO DGAPA-PAPIIT IT 201917 “Estudio *in vitro* de nuevos probióticos para nutrición animal”

Este trabajo de tesis de investigación fue desarrollado en el TMIA: Procesos Tecnológicos de productos cárnicos, en las instalaciones del laboratorio 7 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

A mi madre, por brindarme las herramientas necesarias para llegar a este momento.

A mi asesora, la Dra. Adriana Llorente por su enorme apoyo, dedicación, paciencia y por no permitirme abandonar una parte importante en mi desarrollo profesional.

Al jurado de esta tesis, M. A. Jorge López Pérez, Dr. José Francisco Montiel Sosa, M. en C. Crisóforo Mercado Márquez y M. en C. María Guadalupe Amaya León por su apoyo y observaciones en este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la FES Cuautitlán por ser instituciones tan nobles, acogerme y hacer de mí una mejor mexicana.

A mis compañeros Aura y Patxi por la paciencia, la guía y el apoyo.

A todas las personas que me han enseñado cómo quiero ser en la vida y también a aquellas que me han enseñado cómo no quiero ser.

A la muñeca que vino a hacernos felices...

*“Cuando vayan mal las cosas,
como a veces suelen ir;
cuando ofrezca tu camino
sólo cuestas que subir;
cuando tengas poco haber
pero mucho que pagar,
y precisas sonreír
aún teniendo que llorar;
cuando el dolor te agobie
y no puedas ya sufrir,
descansar acaso debes...
¡pero nunca desistir!”*

“No desistas” de Rudyard Kipling, fragmento.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
1. MARCO TEÓRICO.....	11
1.1 Bioconservación.....	12
1.1.1 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	12
1.1.2 Usos y aplicaciones de cultivos iniciadores	13
1.2 Producción de sustancias con actividad antibacteriana.....	14
1.2.1 Ácidos orgánicos	15
1.2.2 Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	16
1.2.3 Dióxido de carbono.....	16
1.2.4 Reuterina	16
1.2.5 Bacteriocinas.....	17
1.2 <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	18
1.2.6 Actividad antibacteriana.....	20
1.2.7 Cinética de crecimiento	20
1.2.8 Sustancias identificadas.....	21
1.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida	21
1.3.1 Algunas características destacables de la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).....	22
1.3.2 Tipos de electroforesis en gel.....	23
1.3.3 SDS-PAGE	24
1.3.4 Fundamento de la técnica	24
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	26
HIPÓTESIS.....	27
2. DESARROLLO METODOLÓGICO.....	28
2.1 Microorganismo utilizado.....	29
2.2 Medios de cultivo	29
2.3 Reactivación de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	29

2.4	Tinción de Gram.....	29
2.5	Cinética de crecimiento	33
2.5.1	Densidad óptica	33
2.5.2	UFC/mL	33
2.6	Caracterización de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	34
2.6.1	Obtención de los lotes de sobrenadantes	34
2.6.2	Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	34
2.6.3	Preparación de la solución de BSA	35
2.7	SDS-PAGE	36
2.7.1	Separación de proteínas con metanol cloroformo.....	36
2.7.2	Reactivos para SDS-PAGE (Laemmli, 1970)	36
2.8	Análisis de imágenes y determinación de la masa molecular relativa	42
3.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	44
3.1	Verificación de pureza de la cepa	45
3.1.1	Cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en agar MRS.....	45
3.1.2	Tinción de Gram.....	45
3.1.3	Cinética de crecimiento	46
3.2	Caracterización de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	46
3.2.1	Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	47
3.3	Perfil electroforético de sobrenadantes de cultivo	50
3.4	Cálculo de la masa molecular relativa	52
	CONCLUSIONES	55
	BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Requerimientos para el uso de sustancias antimicrobianas presentes naturalmente como conservadores alimentarios	15
Cuadro 2 Espectro de actividad antimicrobiana de bacteriocinas producidas por BAL y <i>Bifidobacterium</i>	19
Cuadro 3 Formulaciones de reactivos para 15 mL de gel concentrador (4%) y gel de resolución al 12 %	38
Cuadro 4 Diluciones en tubos de las muestras de albúmina concentrada y concentración final de cada tubo.....	48
Cuadro 5 Concentración de proteína de los sobrenadantes de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en sus fases de crecimiento	49
Cuadro 6 Valores de masa molecular relativa correspondientes a las bandas presentes en todos los sobrenadantes de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructuras químicas de acrilamida, bis acrilamida y poliacrilamida	23
Figura 2. Efecto desnaturalizante del SDS.....	25
Figura 3. Estructura de pared celular en bacterias Gram negativas	31
Figura 4 Estructura de pared celular en bacterias Gram positivas	31
Figura 5 Procedimiento de la tinción de Gram	32
Figura 6 Montaje del cassette y el vidrio en el soporte	39
Figura 7 Montaje de la celda de electroforesis	40
Figura 8 Colocación de muestra en los pozos correspondientes dentro de la cámara	41
Figura 9 Procedimiento de electroforesis	42
Figura 10. Curva patrón de Marcadores de Peso Molecular para calcular R_f	43
Figura 11. Cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> en agar MRS.....	45
Figura 12 Imagen al microscopio 100x de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en la tinción de Gram	46
Figura 13 Cinética de crecimiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en caldo MRSm	47
Figura 14 Curva patrón obtenida de la determinación de proteína por la técnica de Bradford	48
Figura 15 Concentración de proteína de los sobrenadantes de <i>Pedococcus acidilatici</i> ATCC 8042 a diferentes horas de crecimiento en medio MRSm	49
Figura 16. Perfil electroforético de sobrenadantes de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	50
Figura 17. Perfil electroforético de sobrenadantes de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	51
Figura 18. Perfil electroforético de sobrenadantes de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	52

LISTA DE ABREVIATURAS

±	Más menos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Bacteria Ácido Láctica
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
D.O.	Densidad Óptica
g	gramos
h	horas
kDa	kilodaltones
L	Litros
mA	miliamperes
mg	miligramos
mL	mililitros
mm	milímetros
MPM	Marcador de peso molecular
MRSm	Medio MRS modificado
PAGE	<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
PGH	Peptidoglicano hidrolasa
p/v	peso/volumen
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
v/v	volumen/volumen
μL	microlitros
μg	microgramos

RESUMEN

En el presente trabajo se caracterizaron los sobrenadantes de cultivo de la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 de diferentes fases de crecimiento, determinando la relación existente entre su concentración de proteínas y su perfil electroforético mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), siguiendo los protocolos de Bradford (1976) y Laemmli (1970) para la cuantificación de la concentración de proteínas y la realización de la electroforesis en gel, respectivamente.

Se realizó la verificación de la bacteria con la que se trabajó, *Pediococcus acidilactici*, ATCC 8042, observando sus características morfológicas y de pureza al cultivarla en agar MRS, evidenciando colonias blancas, redondas, de 1-2 mm, a la tinción de Gram se observaron cocos Gram positivos en formación de tétradas y pares, características de *Pediococcus*. Se utilizaron los sobrenadantes de cultivo en MRS modificado, previamente obtenidos de distintas fases de crecimiento (4, 6, 8, 12, 16 y 24 horas de cultivo) ultracongelados y liofilizados, se determinó a cada uno concentración de proteínas con el reactivo de Bradford y se obtuvieron los perfiles electroforéticos, con el que se calcularon las masas moleculares relativas de las bandas de proteínas así obtenidas.

Se observó una clara diferencia en la cantidad, concentración y masas moleculares relativas de las proteínas producidas en cada fase de crecimiento, en el cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, siendo la fase estacionaria la que mostró valores superiores, específicamente de 16 y 24 h de cultivo. Las bandas de 110 y 115 kDa, responsables de la actividad lítica de PGH sobre *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 9648 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, ya reportadas por Llorente (2008) y una banda identificada por Munguía (2015) de 61 kDa responsable de la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en zimogramas de actividad.

INTRODUCCIÓN

Algunos patógenos presentes en alimentos pueden ser inhibidos o incluso eliminados por la acción de competidores o microbiota antagonista, mejorando la vida de anaquel y la seguridad de productos sin la necesidad de usar niveles elevados de aditivos químicos. Una de las alternativas modernas que pueden contribuir significativamente a lograr la inocuidad de los alimentos a través de la reducción de los agentes microbiológicos y minimizar la proliferación de las enfermedades transmitidas por los alimentos contaminados, y por ende, coadyuvar en la preservación de la salud humana, es la Bioconservación.

Las Bacterias Acido Lácticas (BAL) son microorganismos que producen metabolitos con características antibacterianas y sustancias proteicas que pueden inhibir o reducir flora indeseable en productos alimenticios. Su empleo es aceptado debido a que tienen la denominación GRAS, por sus siglas en inglés (*Generally Regarded As Safe*) por los organismos reguladores de Estados Unidos y el *Codex Alimentarius* (Federal Register, 1988) y constituye una medida adicional a otras estrategias dirigidas a asegurar la inocuidad alimentaria.

Dentro de las BAL se le dio estudio específico a la bacteria *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, cuyo efecto inhibidor ante patógenos ha sido estudiado anteriormente por Martínez (2011) y Velasco (2010) realizando estudios sobre su actividad celular; mientras que, Bello y Durán (1992), Llorente *et al.* (2003) y Rivera (2004), utilizaron salamis como modelos experimentales.

En esta investigación se pretendió conocer e identificar las características de las sustancias de origen proteico que poseen el efecto inhibidor en una fase de crecimiento específica en los sobrenadantes de la bacteria por medio de su perfil electroforético, que se realizó por medio de SDS PAGE, que es una técnica común, rápida, sensible y capaz de dar un alto grado de resolución, siendo, probablemente la más utilizada para analizar mezclas de proteínas. Se lleva a cabo en presencia del detergente SDS que se une a las proteínas para

formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente, anulando su carga intrínseca, por lo que éstas son separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (Lomonte, 2002).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Bioconservación

En años recientes, la adición de conservadores químicos ha caído en la desaprobación de los consumidores, quienes, afirman estar buscando alimentos de mayor calidad, menos procesados, libres de aditivos artificiales, más naturales y más seguros. Esto ha resultado en una nueva generación de alimentos mínimamente procesados (Stiles, 1996).

La Bioconservación puede ser definida como la extensión de la vida de anaquel e inocuidad de un alimento a través del uso de microbiota natural o controlada y/o sus compuestos antimicrobianos (Salcido y Barboza, 2010). La bioconservación puede consistir en añadir cepas bacterianas para que crezcan rápidamente y produzcan sustancias antagónicas, añadir sustancias antagónicas purificadas, añadir el licor concentrado ya fermentado proveniente del organismo antagónico, o añadir BAL mesofílicas como protección a prueba de fallos contra el abuso de temperaturas (Stiles, 1996).

1.1.1 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las Bacterias Acido Lácticas (BAL) son un grupo de bacterias con características morfológicas, metabólicas y fisiológicas similares, Gram-positivas, no esporuladas, anaerobias, cocos o bacilos, las cuales producen ácido láctico como principal producto final durante la fermentación de carbohidratos. Muchos de estos microorganismos ejercen su actividad antimicrobiana contra bacterias alterantes, patógenos y levaduras (Axelsson, 1993). Son generalmente mesofílicas, pero pueden crecer en un rango de temperatura de entre 5-45°C y en pH de entre 4-4.5 aunque algunas son activas en pH de 9.6 o de 3.2. Todas las BAL producen ácido láctico a partir de hexosas y los modos en los que las hexosas son metabolizadas dividen a las BAL en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas. Las homofermentativas producen ácido láctico como mayoritario o único producto final de la fermentación de la glucosa (más del 85%). Las

heterofermentativas pueden producir además otros ácidos orgánicos, etanol, acetato y dióxido de carbono (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Las BAL son de especial interés en el área de ciencia de alimentos por que presentan una asociación positiva con ellos, su uso y/o el de otros metabolitos para la conservación de alimentos es generalmente aceptado por los consumidores como algo “natural” y “benéfico para la salud” (Gomes, Lizziane, Reis y De Martinis, 2009). Tienen un gran potencial para su uso en bioconservación, por su larga historia de consumo humano seguro y además dominan, de manera natural, la microbiota de muchos alimentos durante su almacenamiento. Sus propiedades antimicrobianas se derivan de la competencia por los nutrientes y la producción de uno o más metabolitos antimicrobianos como ácidos orgánicos, (principalmente láctico y acético), CO₂, peróxido de hidrógeno y otros componentes como bacteriocinas y péptidos antifúngicos (Reis, Paula, Casarotti y Penna, 2012), y son capaces de controlar microorganismos específicos que dominan la microflora de los alimentos (que es la base del desarrollo de cultivos iniciadores). Además, producen catabolitos que no sólo contribuyen a la conservación, sino también mantienen las cualidades sensoriales del producto, como sabor, olor y textura, valor nutricional y ayudan a determinar sus características propias y únicas (De Vuyst y Vandamme, 1994).

1.1.2 Usos y aplicaciones de cultivos iniciadores

Los cultivos antagónicos añadidos a los alimentos para inhibir patógenos y/o extender la vida de anaquel, evitando cambiar las propiedades sensoriales tanto como sea posible, son llamados cultivos protectores (Luckë, 2000). El uso de cultivos bioprotectores para asegurar la calidad higiénica de alimentos es una herramienta promisoría, que debe ser considerada como una medida adicional a las buenas prácticas de fabricación, procesamiento, almacenamiento y distribución. Las BAL, que predominan en la microbiota de la carne, han mostrado antagonismo hacia bacterias patógenas y alterantes. Es por ello que un enfoque alternativo de la producción de bacteriocinas en alimentos es el uso de

cultivos vivos de BAL que las produzcan *in situ*. Las cepas productoras de bacteriocinas son sustituidas por todo el cultivo iniciador, una parte de él, es, subsecuentemente aplicada al alimento como cultivo bioprotector para así mejorar la seguridad del producto (Vignolo, Fadda, y Castellano, 2008).

1.2 Producción de sustancias con actividad antibacteriana

La inhibición producida por BAL se atribuye a una combinación de uno o más metabolitos activos como ácidos orgánicos (láctico, acético, fórmico, propiónico y butírico), que intensifican su acción reduciendo el pH del medio; así como otras sustancias como etanol, ácidos grasos, acetoína, peróxido de hidrógeno, diacetilo; componentes antifúngicos (propionato, fenil-lactato, dipéptidos cíclicos y 3-hidroxi ácidos grasos), bacteriocinas (nisina, reuterina, reuticiclina, pediocina, lactacina, enterocina y otras) (Reis *et al*, 2012). Como sucede en la teoría de barreras, cada sustancia antimicrobiana producida durante la fermentación constituye un obstáculo adicional para las bacterias patógenas y responsables del deterioro, de modo que más adelante no puedan sobrevivir o proliferar en alimentos. Su potencial antimicrobiano es definido por la acción colectiva de sus productos metabólicos sobre bacterias indeseables (Rivera, 2005).

Cuadro 1 Requerimientos para el uso de sustancias antimicrobianas presentes naturalmente como conservadores alimentarios

-
- En cuanto a aspectos toxicológicos debe ser aceptable por las autoridades reconocidas.
 - No debe tener ningún efecto perjudicial sobre cualquiera de las propiedades sensoriales de los alimentos en que se use.
 - El costo de uso debe ser económicamente aceptable para la industria.
 - Debe ser estable durante su almacenamiento antes de su uso y si su acción depende de un residual, debe ser suficientemente estable durante la vida de anaquel del alimento.
 - Debe ser efectivo a concentraciones relativamente bajas.
 - No debe tener uso médico.
-

Fuente: Daeschel, 1989

1.2.1 Ácidos orgánicos

El ácido láctico es el metabolito mayoritario de las BAL, causando reducción del pH que inhibe muchos microorganismos. La forma no disociada, más hidrofóbica del ácido es la forma tóxica de la molécula, ya que ésta se difunde sobre la membrana celular y se disocia dentro de la célula liberando iones H^+ que acidifican el citoplasma. Además del efecto del pH, la forma no disociada de la molécula contribuye al efecto antibacteriano mediante el colapso del gradiente electroquímico de protones en la membrana, causando con ello la muerte de las bacterias susceptibles (Schnürer y Magnusson, 2005).

Las BAL heterofermentativas también son capaces de producir ácido acético y propiónico. De la misma manera que el ácido láctico, ambos interaccionan con la membrana celular al neutralizar el potencial electroquímico, pero el efecto de estos ácidos frecuentemente dependen de la disminución de pH causada por el ácido láctico. El ácido propiónico reduce el crecimiento de hongos, especialmente en bajo pH y el ácido láctico producido durante el crecimiento de BAL junto con el acetato de sodio encontrado en el sustrato MRS, un

medio estándar de crecimiento de BAL, pueden tener efectos antifúngicos sinérgicos (Schnürer, 2005).

1.2.2 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Las BAL que producen H₂O₂ han demostrado que inhiben el crecimiento de microorganismos psicrótrofos y patógenos a temperaturas de refrigeración. Debido a que las BAL carecen de catalasa para degradar el H₂O₂ generado en presencia de oxígeno, se argumenta que éste puede acumularse y ser inhibitorio para algunos microorganismos por el fuerte efecto oxidativo que tiene sobre los lípidos de la membrana y proteínas celulares, lo cual genera daños irreversibles en la célula (Caplice, 1999). Se sabe que el H₂O₂ es bactericida por sí mismo dependiendo de las concentraciones aplicadas y de factores ambientales como el pH y la temperatura, que es un parámetro extremadamente importante, ya que se ha encontrado que el H₂O₂ es un débil esporicida a temperatura ambiente pero muy potente a altas temperaturas (Reis *et al.*, 2012).

1.2.3 Dióxido de carbono

El dióxido de carbono, formado por fermentación heteroláctica, puede crear un ambiente anaerobio que es tóxico para algunos microorganismos aerobios por medio de su acción en las membranas de las células y su habilidad de reducir el pH interno y externo. En bajas concentraciones, puede estimular el crecimiento de algunas bacterias (Caplice *et al.*, 1999).

1.2.4 Reuterina

La reuterina es producida durante la fase estacionaria del crecimiento anaerobio de *Lactobacillus reuteri* en una mezcla de glucosa y glicerol o gliceraldehído (Caplice, 1999). Es una mezcla equilibrada de formas monoméricas hidratadas y diméricas cíclicas de 3-

hidropropionaldehído (3-HPA). Generalmente tiene un espectro anti microbiano que afecta tanto virus, hongos y protozoarios como bacterias incluyendo Gram positivos y negativos (Magnusson, 2003).

1.2.5 Bacteriocinas

El término bacteriocina fue originalmente acuñado para describir la colicina de *E. coli* de tipo de proteína antimicrobiana, ya que las bacteriocinas reciben su nombre de acuerdo con la bacteria que las sintetiza. Sin embargo, actualmente este término es utilizado para definir un grupo mucho mayor de compuestos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente (Reis *et al.*, 2012). Las colicinas constituyen un grupo diverso de proteínas antibacterianas que matan bacterias estrechamente relacionadas por medio de varios mecanismos como la inhibición de la síntesis de pared celular, permeabilización de la membrana celular o por medio de la inhibición de la actividad realizada por ARN y ADN (Cleveland, Montville, Ness y Chikindas, 2001). Muchas bacteriocinas producidas por BAL son un grupo heterogéneo de péptidos y proteínas grado alimenticio, lo que puede ser particularmente útil en aplicaciones de conservación e inocuidad alimentaria y también tiene implicaciones en el desarrollo de flora deseable en alimentos fermentados que ayudan a los procesadores a extender su control sobre la microbiota de los alimentos después de su manufactura (Cotter, Hill y Ross, 2005).

Las bacteriocinas tienen diversas propiedades que hacen de ellas adecuadas para la conservación de alimentos. Son generalmente reconocidas como sustancias seguras (GRAS); no activas y no tóxicas en células eucariotas; se inactivan con las proteasas digestivas, así que tienen mínima influencia en la microbiota de digestión. Son generalmente termorresistentes (pueden mantener actividad antimicrobiana después de la pasteurización y la esterilización) y tienen un espectro antimicrobiano relativamente amplio contra bacterias de origen patógenas y alterantes.

El último esquema de clasificación realizado divide a las bacteriocinas en dos categorías: Clase I: Lantibióticos y Clase II: Bacteriocinas no-lantibióticos. Mientras que, en forma independiente, están las proteínas grandes, murein hidrolasas termosensibles formando la Clase III designadas como bacteriolisinas (Cotter *et al.*, 2005).

Las bacteriocinas pueden ser introducidas en los alimentos al menos de 3 maneras:

- 1) por cultivos bacterianos producidos *in situ*
- 2) por adición directa de bacteriocinas purificadas o semipurificadas
- 3) como ingrediente basado en el fermentado de una cepa productora de la bacteriocina (Vignolo *et al.*, 2008).

La aplicación de bacteriocinas en conservación de alimentos puede ofrecer muchos beneficios: provee protección extra durante el abuso de condiciones de temperatura; disminuye el riesgo de transmisión de patógenos de origen a través de la cadena alimentaria, reduce las pérdidas por descomposición; reduce el uso de conservadores químicos; permite la aplicación de tratamientos térmicos menos severos, lo que implica una mejor preservación de los nutrientes y vitaminas, así como de las propiedades sensoriales y, permite la comercialización de nuevos productos que satisfagan la demandas tanto de la industria como de los consumidores (menos ácidos, con menos contenido de sal, y mayor contenido de agua) (Reis *et al.*, 2012). Las bacteriocinas tienen aplicaciones en la tecnología de barreras, en la que se utilizan sinergias con tratamientos combinados para una conservación de alimentos más efectiva (cuadro 2).

1.2 *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

El género *Pediococcus* pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas asociadas con la fermentación de carnes, donde juega un papel importante en la producción de ácido y desarrollo del sabor. Este género consiste en siete especies (*P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. inopinatus*, *P. claussenii* y *P. cerevisiae*) (Holzapfel, 2006).

Cuadro 2 Espectro de actividad antimicrobiana de bacteriocinas producidas por BAL y *Bifidobacterium*

Género	Especie	Compuestos	Espectro de inhibición	Referencias
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. Lactis</i>	Bifilact Bb-12	<i>Staphylococcus aureus</i> AS 1.72,	Abd El.Salam <i>et al.</i> ,
	<i>B. infantis</i> BCRC 14602	Bifidin I	<i>Salmonella</i> sp., <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium butyricum</i>	Cheikhyoussief <i>et al.</i> ,
	<i>B. bifidum</i> NCFB	Bifidocina B	Bacterias Gram-negativas	Yildirim <i>et al.</i>
	<i>Bifidobacterium</i> spp. RBL 68 y RBL 85	Componentes proteínicos	<i>L. monocytogenes</i>	Zouhir <i>et al.</i> ,
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> WHE 81	Enterocinas A y B	<i>L. monocytogenes</i>	Izquierdo, <i>et al.</i> ,
	<i>E. faecalis</i> A-48-32	Enterocina AS-48	<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Muñoz, <i>et al.</i> ,
	<i>E. mundi</i> ST15	3944 Da bacteriocina	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Clostridium tyrobutyricum</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aureginosa</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kwaadsteniet <i>et al.</i> ,
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> AA11	Acidocina D20079	<i>Salmonella shigella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Abo-Amer
	<i>L. acidophilus</i> DSM20079	Acidocina D20079		Deraz, <i>et al.</i> ,
	<i>L. casei</i>	Lactocina 705	<i>L. monocytogenes</i>	Parada, <i>et al.</i> ,
	<i>L. sake</i>	Sakacina	<i>L. monocytogenes</i>	Schillinger y Lücke, Sobrino, <i>et al.</i> , Samelis <i>et al.</i> , De Martinis y Franco, De Martinis, <i>et al.</i> ,
	<i>L. reuteri</i>	Reuteriicina	<i>Listeria innocua</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecium</i>	Gänzle <i>et al.</i> ,
	<i>L. plantarum</i> KLDS1.0391	Plantaricin MG	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella Typhimorium</i>	Gong <i>et al.</i> ,
	<i>L. paracasei</i> subesp. cepa M3	Compuestos proteínicos	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, <i>Helicobacter pylori</i> NCIPD 230 y algunas especies de levaduras	Atanassova <i>et al.</i> ,
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subesp. <i>Lactis</i> ATCC 11454	Nisina	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>Lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>Cremoris</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Clostridium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., bacterias psicrótrofas	Savadogo, <i>et al.</i> ,
	<i>L. lactis</i>	Lactacina 481	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Dufour <i>et al.</i> ,
	<i>L. lactis</i> MG1614	Enterocina A	<i>L. monocytogenes</i>	Liu <i>et al.</i> ,
	<i>L. lactis</i> subesp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylatis</i> UL719	Nisina Z	<i>Listeria innocua</i>	Meghrouss <i>et al.</i> ,
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. gelidum</i>	Leucocina A	<i>L. monocytogenes</i>	Parada <i>et al.</i> ,
	<i>L. mesenteriodes</i>	Mesentericina Y105	<i>L. monocytogenes</i>	Parada <i>et al.</i> ,
<i>Pediococcus</i>	<i>P. pentosaceus</i> <i>P. acidilacti</i>	Pediocina A	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Listeria</i> so., <i>Clostridium</i> sp.	Parada <i>et al.</i> , Devi y Halami

Fuente: (Reis, 2012)

Son Gram positivos de la familia *Lactobacillaceae*, homofermentativos. Requieren de medios muy ricos en nutrientes y carbohidratos fermentables, no reducen nitratos y no son patógenas para plantas o animales. Normalmente se presentan en pares o tétradas, siendo las únicas bacterias ácido lácticas con forma de coco (1.0 – 2.0 μm de diámetro), no móviles, anaerobias facultativos.

Todas las especies crecen a 30 °C, la temperatura óptima de crecimiento es de entre 25°C y 40°C, con un máximo de 52°C y se destruyen por calentamiento a 72°C por 10 min. El pH óptimo del medio de crecimiento es de 6 a 6.5 (Martínez, 2011). El primer cultivo iniciador de *Pediococcus acidilactici* para la conservación de embutidos se utilizó en 1957 (Giraffa, 2004).

1.2.6 Actividad antibacteriana

En *P. acidilactici* ATCC 8042 se ha reportado actividad de peptidoglicano hidrolasa (PGH) intracelular, que fue relacionada con la autólisis del microorganismo, que se presentó (entre 40% y 90%) después de 48 h de incubación a 37°C (Mora, *et al.*, 2003, Llorente, 2008). Esta cepa no codifica para la producción de pediocinas (Mora, *et al.*, 2000), por lo que el efecto bactericida que presenta se debe a otro tipo de sustancias. También se ha reportado actividad lítica adherida a membrana donde la mayor actividad fue detectada a las 8 h de crecimiento del microorganismo y con amplio espectro antimicrobiano contra diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas (Velasco, 2010).

1.2.7 Cinética de crecimiento

La curva de crecimiento normalmente se representa como el número de células en una escala logarítmica frente al tiempo de cultivo. Esta representación muestra el estado de las poblaciones bacterianas y no de microorganismos individuales (Brock, 2003).

Las cinéticas de crecimiento se realizaron con el fin de determinar el tiempo de incubación necesario para que los microorganismos alcanzaran su fase logarítmica o exponencial, ya que si éstos se encontraran en fase estacionaria, no se sabría si las sustancias inhibitorias son las que detienen el crecimiento, o ese efecto fue debido a que muchas de las bacterias estaban en fase de muerte (Parish y Davidson, 1993).

Por otro lado, en la fase logarítmica, la actividad metabólica de los microorganismos de prueba es máxima, su tamaño bacteriano se reduce, sus estructuras (pared y membrana) presentan un espesor mínimo y la sensibilidad a los agentes físicos, químicos y antibacterianos son evidentes. Por lo anterior, también es durante esta fase cuando las bacterias sintetizan compuestos de defensa (Martínez, 2011).

1.2.8 Sustancias identificadas

Las bacteriocinas identificadas en *Pediococcus acidilactici* son: Pediocina PA.1 de *Pediococcus acidilactici* 1.0 (NRRL B-5627), Pediocina PO₂ y Pediocina AcH. Se ha demostrado frecuentemente que la biosíntesis de bacteriocinas de *Pediococcus* está asociada con plásmidos (Llorente, 1998). Tras diversos intentos de identificación se encontraron dos proteínas con actividad lítica en un peso molecular aproximado de 99 y 110 kDa, con un total de aminoácidos de 927 y 1065 respectivamente (García, *et al.*, 2011).

1.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis es una técnica por la cual se separan biomoléculas en disolución al ser sometidas a un campo eléctrico. La muestra debe situarse en o sobre un medio de soporte principalmente para evitar perturbaciones mecánicas y corrientes de convección durante la separación. Los medios de gel están formados por polímeros que forman una malla, matriz o red tridimensional a través de la cual deben avanzar las moléculas de la muestra,

que queda embebida en el medio de soporte electroforético. Empleando geles y aplicando las proteínas en una zona estrecha en torno a los electrodos se pueden determinar diferencias de carga neta entre proteínas. Este método se denominada electroforesis zonal. La matriz de poliacrilamida resulta ser un buen soporte para este método pues la migración de las proteínas no sólo es proporcional a la carga neta sino también al tamaño y forma de las proteínas. Una ventaja de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un rango amplio de pH, temperatura y fuerza iónica.

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada PAGE (polyacrilamide gel electrophoresis por sus siglas en inglés) es sin duda una de las técnicas más ampliamente usadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas. Es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra, pues se requiere sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

1.3.1 Algunas características destacables de la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente responsable del entrecruzamiento, bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina) y como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^{2-}$) que se añade en forma de persulfato amónico.

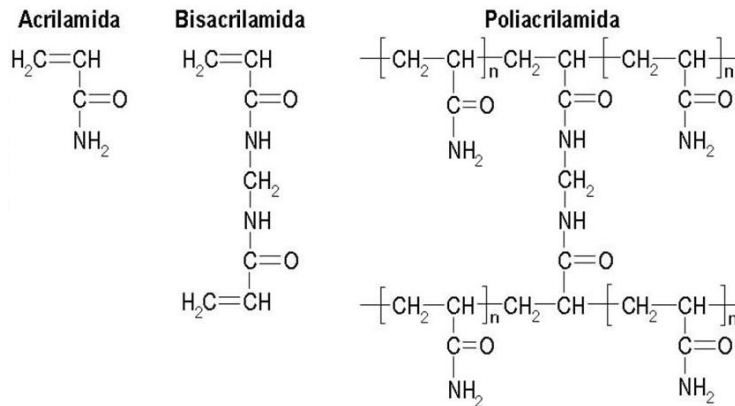


Figura 1 Estructuras químicas de acrilamida, bis acrilamida y poliacrilamida
Fuente: Félix, A. (2017) Electroforesis de proteínas

La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración del iniciador y el catalizador.

La porosidad del gel la determinan las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo el poro más pequeño cuanto más bis-acrilamida vs acrilamida se use.

Habitualmente los geles se denominan en función del porcentaje de acrilamida/bis acrilamida que contienen. El porcentaje total de acrilamida/bis acrilamida determina el rango de separación del gel.

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa, más rápida será la migración.

1.3.2 Tipos de electroforesis en gel

La electroforesis se clasifica en función del estado de las proteínas, en nativa o desnaturizante. Una electroforesis desnaturizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturización. En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. Una

electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos.

1.3.3 SDS-PAGE

Es la SDS-PAGE más ampliamente usada. Su nombre se deriva de que se lleva a cabo en presencia de Dodecil sulfato de sodio (SDS Sodium Dodecyl Sulphate por sus siglas en inglés). Fue descrito por Laemmli (1970). Se trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (β -mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

Es necesario analizar en la misma electroforesis unas proteínas patrón, de tamaño conocido con las que se construye una curva de calibrado. Para controlar el avance del frente de electroforesis (posición de máxima movilidad) se añade a la muestra un colorante marcador, molécula cargada y de pequeño tamaño que avanza más que cualquier componente de la muestra, el más habitual es el azul de bromofenol. Para detección de proteínas en el gel con azul de Coomassie (colorante estándar para proteína total) se requiere por lo menos 1 mg de proteína por cada banda (Ausubel 1989).

1.3.4 Fundamento de la técnica

En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a sus complejos proteína/SDS; poseen una estructura

elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), éstas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína y viceversa (Lomonte, 2002).

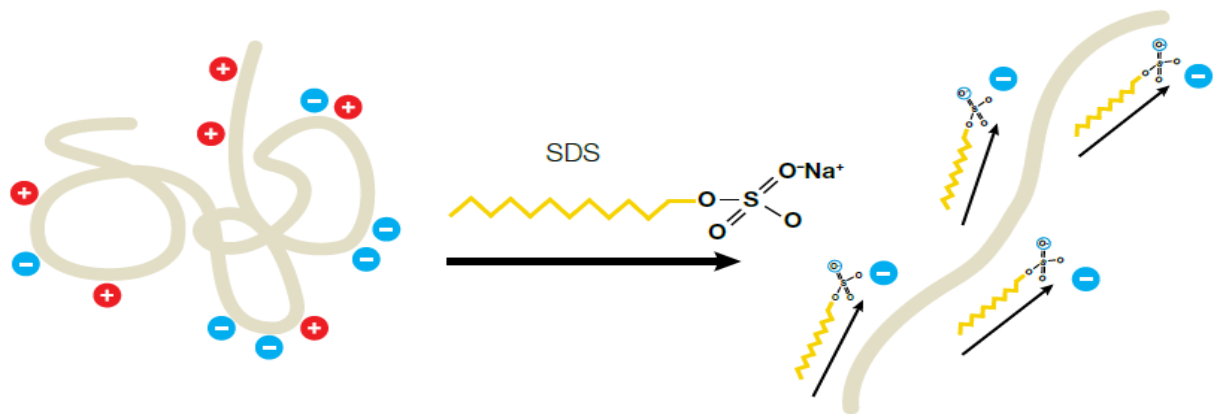


Figura 2. Efecto desnaturalizante del SDS

Fuente: Bio Rad. A guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection

JUSTIFICACIÓN

Este trabajo constituye una herramienta de soporte en la identificación de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 por medio de su perfil electroforético para cualquier investigación que pudiera realizarse en el futuro, dada la viabilidad que promete esta bacteria para ser utilizada como bioconservador, ya sea *in situ* o por medio de las sustancias inhibitorias que ha presentado en trabajos realizados anteriormente las cuales son las que se pretende identificar y corroborar. La relación de la concentración de proteínas y el perfil electroforético de estas proteínas definidas en electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras, permitirán elementos importantes en la caracterización de los sobrenadantes de cultivo de esta cepa con aptitud como cultivo iniciador, con efecto bioprotector.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 obtenidos de la cinética de crecimiento por medio de su perfil electroforético.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Valorar la concentración de proteínas de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 durante las diferentes fases de crecimiento por medio de la técnica de Bradford (1976).
2. Identificar el perfil electroforético de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, en las distintas fases de crecimiento por medio del protocolo de Laemmli (1970).
3. Correlacionar la concentración de proteínas, con los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

HIPÓTESIS

Si *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 produce metabolitos de naturaleza proteica, entonces la electroforesis en geles de poliacrilamida permitirá la definición de los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de cultivo en las distintas fases de crecimiento y se podrá establecer su relación con la concentración de proteínas producidas.

2. DESARROLLO METODOLÓGICO

2.1 Microorganismo utilizado

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa liofilizada de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, que fue proporcionada por el laboratorio de Bioconservación (Lab.7 de la UIM-FESC) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

2.2 Medios de cultivo

Se prepararon botellas y tubos de ensaye con agua peptonada al 0.1% para realizar las series de diluciones decimales y cajas Petri estériles con agar MRS (*Lactobacilli* MRS Broth, Difco™, USA) adicionado de sulfato de manganeso (J.T. Baker, USA) y ácido ascórbico.

2.3 Reactivación de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Para su reactivación, se prepararon 200 mL de caldo MRS estéril, en el cual se colocó un *pellet* de la cepa, la cual se incubó (incubadora marca Quincy Lab modelo 12-140 incubator) durante 12 h a 30 ± 2 °C, tras las cuales se realizó un pase a MRS estéril nuevo y se cultivó durante 24 h a las mismas condiciones para obtener los inóculos con los cuales se desarrollaron las cinéticas de crecimiento.

2.4 Tinción de Gram

Cuando las bacterias son teñidas con ciertos colorantes básicos y tratadas con yodo, algunas especies se pueden decolorar fácilmente con disolventes orgánicos como etanol o acetona, mientras que otras especies se resisten a la decoloración. Las bacterias que retienen el teñido son llamadas Gram-positivas y aquéllas que son decoloradas son llamadas Gram-negativas. Las bacterias Gram positivas son un tipo de célula procariota

cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa, mientras que las bacterias Gram negativas son también procariotas cuya pared celular contiene relativamente poco peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacárido, lipoproteína y otras macromoléculas complejas (Brock, 2003).

La tinción de Gram es un procedimiento muy útil para identificar bacterias desconocidas o para verificar que las muestras de la bacteria con la que se está trabajando no se encuentran contaminadas por alguna otra cepa (Claus, 1992). El resultado de esta técnica permite obtener al final imágenes al microscopio de bacterias teñidas de color violeta cuando son Gram positivas, y color rojo cuando son Gram negativas.

La pared celular de las bacterias Gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglicano, además de dos clases de ácidos teicóicos. Por el contrario, la capa de peptidoglicano de las Gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior por medio de lipoproteínas. La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglicano que posee, es delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta/yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea.

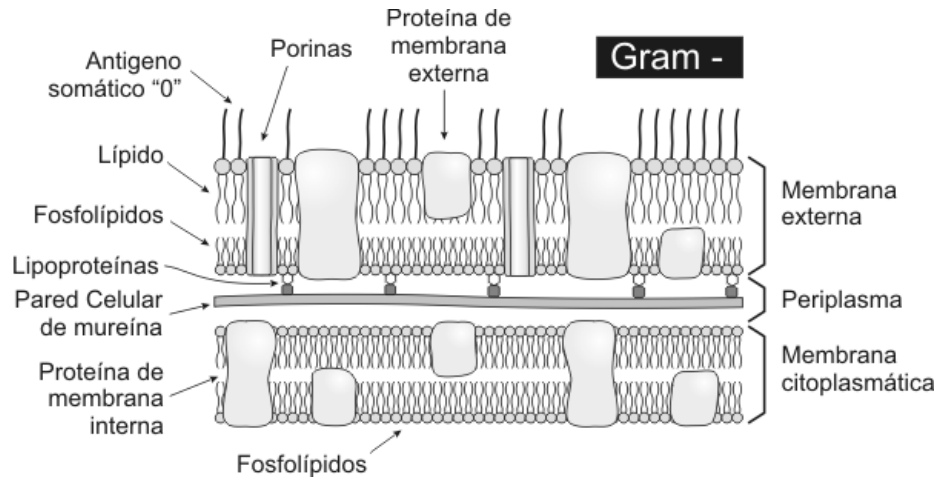


Figura 3. Estructura de pared celular en bacterias Gram negativas

Fuente: Salminem, (1993) Lactic Acid Bacteria

Por el contrario, las Gram positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicano, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violácea.

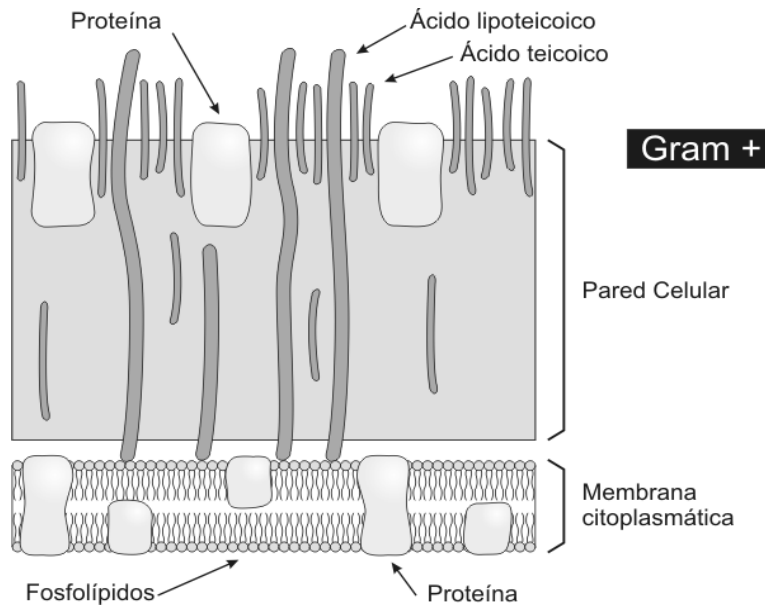


Figura 4 Estructura de pared celular en bacterias Gram positivas

Fuente: Salminem, (1993) Lactic Acid Bacteria

La prueba se realizó tomando una impronta de células del cultivo fresco que se colocó en un portaobjetos limpio en el cual se depositó una pequeña gota de agua estéril y se dejó secar al aire 1 min, se cubrió la muestra seca con solución cristal violeta (Cristal violeta, etanol 95%, agua destilada) y se eliminó el exceso con agua destilada, se agregó una gota de solución de lugol (Yodo, KI, polivinilpirrolidona, agua destilada) dejando actuar durante 1 min y se eliminó el exceso, se decoloró con una solución alcohol-acetona durante 10 s y se eliminó el exceso. Se tiñó con una gota de solución de safranina (Safranina, etanol 95%, agua destilada) dejando actuar 1 min. Los reactivos utilizados fueron B-D™ Gram Stain Kit. Se dejó secar a temperatura ambiente y se observó al microscopio óptico (Olympus CX31 Tokio, Japón) con el objetivo de 100X para identificar Gram positivos o Gram negativos (Claus, 1992).

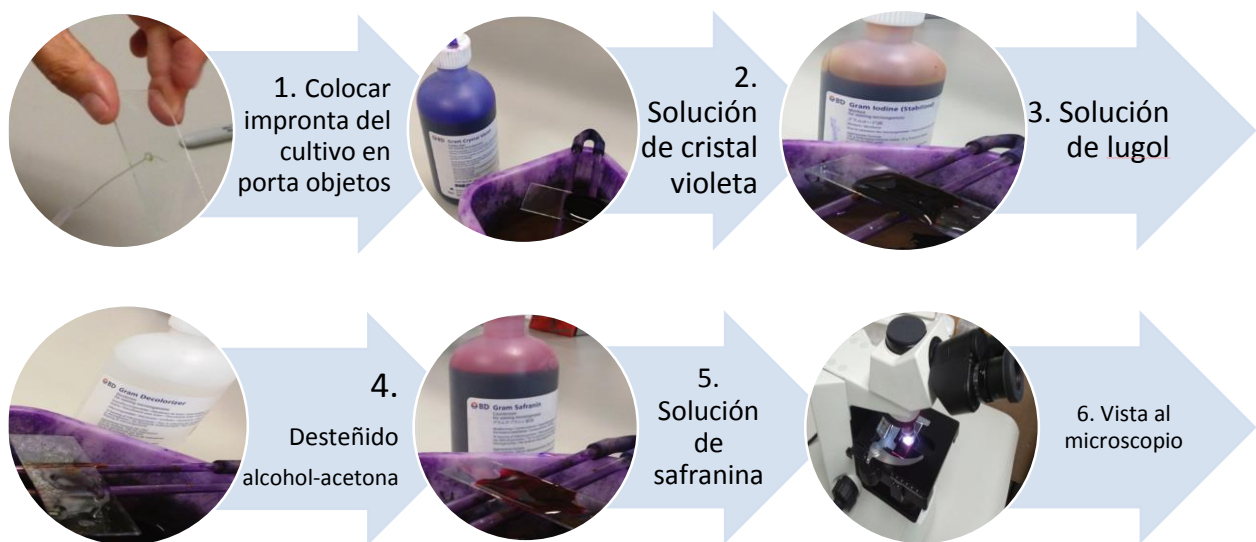


Figura 5 Procedimiento de la tinción de Gram

2.5 Cinética de crecimiento

De acuerdo con la metodología de Llorente (2008), la cepa reconstituida de *P. acidilactici* ATCC 8042, se cultivó dos veces durante 12 h a 30 ± 2 °C en 40 mL de caldo MRSm, para obtener el inóculo, mismo que se utilizó al 1% (v/v) para el desarrollo de las cinéticas.

Se utilizaron 3 matraces Erlenmeyer de 50 mL con 40 mL de MRSm de volumen de trabajo, uno para cada réplica, tomando tres matraces de cada tiempo de cultivo de las 0 a las 24 h cada 30 min con objeto de construir la cinética de crecimiento de 24 h e identificar la fase media logarítmica.

2.5.1 Densidad óptica

Todos los matraces se incubaron bajo las mismas condiciones a 30 ± 2 °C en incubadora bacteriológica Quinci Lab, Inc. Mod. 12-140 Incubator (USA). Para la construcción de las cinéticas se les determinó la densidad óptica con el espectofotómetro (BioPhotometer Eppendorf™), a una longitud de onda de $\lambda_{600 \text{ nm}}$, utilizándose como blanco caldo MRSm sin inocular.

2.5.2 UFC/mL

En paralelo, se determinaron las UFC/mL, para lo cual se realizaron series de diluciones decimales (10^{-1} a 10^{-6}) en agua peptonada estéril al 0.1%.

Se colocaron 20 μ L de cada dilución por triplicado con una micropipeta Eppendorf en cajas con agar MRS divididas en tres y se incubaron durante 24 h a 30 ± 2 °C. Se consideraron representativas las cajas que presentaron las diluciones que contenían entre 2 y 30 colonias; usando el factor de dilución se hizo la determinación del número de células

viabiles en 1 mL. Los resultados de las cuentas obtenidas expresadas como UFC/mL se transformaron al logaritmo base 10 y se obtuvieron las gráficas correspondientes.

2.6 Caracterización de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

2.6.1 Obtención de los lotes de sobrenadantes

De acuerdo con protocolo estandarizado por Llorente (2008), del cultivo del pre inóculo se tomó el 1% para cultivarlo en un matraz Fernbach para llevar a cabo la fermentación en un volumen de 1 L. Al término del tiempo de fermentación, tardía se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue vaciado y se neutralizó a pH 7 ± 0.02 con solución de NaOH 1M para asegurarse que el efecto inhibitorio que presenten los sobrenadantes no sea por causa de la presencia de ácido láctico producido por la cepa. Se filtraron con el sistema de filtración (Millipore) con membrana (0.22 μ m); 30 mL de los sobrenadantes fueron dispensados en tubos cónicos de 50 mL, se congelaron a $-70 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h, luego se liofilizaron a $-50\pm 2^\circ\text{C}$ y 0.055 mBars durante 24 h, y por último, se conservaron a -20°C , hasta su utilización. Los sobrenadantes se resuspendieron en la décima parte del volumen original (10x) en agua bidestilada estéril (Llorente, 1998).

2.6.2 Determinación de proteínas por el método de Bradford

La determinación de proteínas con el reactivo de Bradford™, promueve la formación de un compuesto de adsorción de coloración azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante azul brillante de Coomassie G-250 (BioRad™). La absorbancia se lee a $\lambda_{595\text{nm}}$ y la intensidad de la absorción depende del contenido de aminoácidos básicos y aromáticos. El complejo proteína-colorante permanece disperso en la solución durante un tiempo relativamente largo (1h) (Bradford, 1976).

Previo a la determinación de la concentración de proteína total del sobrenadante de cultivo, se construyó una curva de calibración a partir de una solución de seroalbúmina bovina (BSA) en diluciones, de modo que, permitieran estimar la concentración de proteína contenida en la muestra. Cada muestra se realizó por triplicado. El tubo No. 1 fue utilizado como blanco.

2.6.3 Preparación de la solución de BSA

A partir de una solución de BSA (Bio Rad) (-20°C) en viales Eppendorf con concentración inicial de 2 mg/mL en una presentación comercial de microtubos de 1 mL se realizó una dilución tomando el contenido de un microtubo y agregándole 0.4285 mL de agua destilada para cambiar su concentración a 1.4 mg/mL, se diluyó la solución 1:1 con agua destilada quedando una concentración de 0.7 mg/mL, se tomó una alícuota de 178 μ L y se aforó a 10 mL con agua destilada.

La preparación de la muestra de sobrenadantes consistió en tomar 30 mL de sobrenadante de cultivo de cada tiempo de incubación y sometido a liofilización, posteriormente fue rehidratada con agua destilada estéril y concentrada 10x al ser reconstituida en sólo 3 mL y mezclado a homogeneidad.

Se hicieron diluciones del sobrenadante rehidratado de 1/10, 1/100 y 1/1000. Se añadieron 800 μ L y de la última dilución y 200 μ L del reactivo (Etanol 95%, ácido fosfórico 88%, azul de Coomassie G-250) (Bollag, 1996) a cada tubo y se mezclaron. Se tomó un tubo como blanco, en el cual se sustituyó el volumen de la solución proteica con agua destilada. Se tomaron alícuotas de 80 μ L y se midió la absorbancia de cada muestra entre los 5 y 60 min después de adicionar el reactivo (Kruger ,2009).

2.7 SDS-PAGE

Todos los reactivos utilizados en la determinación de proteínas y en la electroforesis, así mismo los marcadores de peso molecular empleados en este trabajo son de la marca BioRad™

2.7.1 Separación de proteínas con metanol cloroformo

Se utilizaron 450 μ L de los sobrenadantes liofilizados de cada fase de crecimiento, resuspendidos en agua desionizada, en la décima parte de su volumen original (10x) adicionados de 400 μ L de metanol (J.T. Baker) y agitados vigorosamente en un vórtex por 5 minutos. Se añadieron 100 μ L de cloroformo (J.T. Baker) y se agitaron nuevamente por 5 min, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 min a 4°C (Centrífuga Centurion Scientific mod. 2015R). Se aspiró la fase superior sin tocar la interfase, ya que ahí se encontraban las proteínas. Se añadieron 700 μ L de metanol y se mezclaron por 5 min. Se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar.

2.7.2 Reactivos para SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Se hizo una solución de Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C) con agua desionizada usando una formulación de 87.6 g de Acrilamida (29.2g/100mL) y 2.4 g de N'N'-BIS-metilenoacrilamida (0.8g/100mL) que se aforó a 100 mL. Se filtró y almacenó a 4°C dentro de un frasco ámbar en un lugar oscuro por máximo 30 días.

La solución de SDS al 10% (p/v) se preparó mezclando 10 g de SDS en 90 mL de agua hasta disolución completa y se aforó a 100 mL con agua desionizada.

Para obtener buffer de gel concentrador 0.5 M se disolvieron 18.5 g Tris en 60 mL de agua, se ajustó el pH a 6.8 con HCl, se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a 4°C.

Para obtener buffer de gel separador 1.5 M se disolvieron 18.5 g Tris en 60 mL de agua, se ajustó el pH a 8.8 con HCl y se aforó a 100 mL.

Para obtener el buffer de muestra se mezclaron 1.25 mL de buffer de gel apilador, 2.5 mL de glicerol, 2 mL de solución de SDS, 0.2 mL de 0.5% (P/V) azul de bromofenol y 3.55 mL de agua desionizada para obtener un volumen total de 9.5 mL de solución final y se almacenó a temperatura ambiente

La solución de persulfato de amonio (APS) 10% (p/v) se obtuvo disolviendo 100 mg de este compuesto en 1 mL de agua desionizada.

La solución de poliacrilamida se obtuvo disolviendo 27.23 g de Tris base y 80 mL de agua desionizada se ajustó a pH 8.8 con HCl 6 N, se aforó a un volumen total de 150 mL con agua desionizada y se almacenó a 4°C.

Para usarlo se añadieron 50 µl de β-Mercaptoetanol a 950 µl de buffer de muestra antes de su uso, se diluyó la muestra 1:2 con el buffer de muestra y se calentó a 95 °C por 4 minutos.

Para el buffer de corrimiento en la cámara se utilizaron 30.3 g de Base Tris, 144 de glicina y 10g de SDS que se disolvieron y aforaron a un volumen total arriba de 1000 mL con agua desionizada obteniendo una solución con un pH de 8.3 – 8.4 y fue almacenado a 4°C. Para usarlo se diluyeron 50 mL de 10x stock con 450 mL de agua desionizada por cada corrida de electroforesis. Las cantidades de 30% Acrilamida/Bis y de agua que se agregan varían de acuerdo al porcentaje de gel que se desee. El cuadro 3 muestra la formulación necesaria para obtener geles de 4%, de 12% y de cualquier otro porcentaje de gel que se desee, cuyo valor está representado por X.

Cuadro 3 Formulaciones de reactivos para 15 mL de gel concentrador (4%) y gel de resolución al 12 %

	Gel concentrador		Gel de resolución	
	4 %	12%	X%	
30 %Acrilamida/Bis	1.98 mL	6 mL	0.33 (X mL)	
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	3.78 mL	-	-	
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	-	3.75 mL	3.75 mL	
10% SDS	150 µL	150 µL	150 µL	
diH₂O	9 mL	7.28 mL	11.03-(0.33 x X) mL	
TEMED	15 µL	15 µL	15 µL	
10% APS	75 µL	75 µL	75 µL	

Fuente: Bio Rad. Manual de Instrucción Mini Protean 3

Se preparó la solución del monómero mezclando todos los reactivos, el TEMED y el APS al 10% en el orden siguiente: Agua, Buffer de Laemmli (1970), solución de Acrilamida y solución de SDS. Inmediatamente antes de vaciar el gel, se añadió la solución de persulfato de amonio (APS) al 10% y TEMED, tanto para el gel separador como para el gel concentrador. Se sirvió la mezcla de soluciones para el gel de corrimiento dentro de los vidrios con una pipeta cuidando que no se formaran burbujas y se esperó a que polimerizara (figura 6).

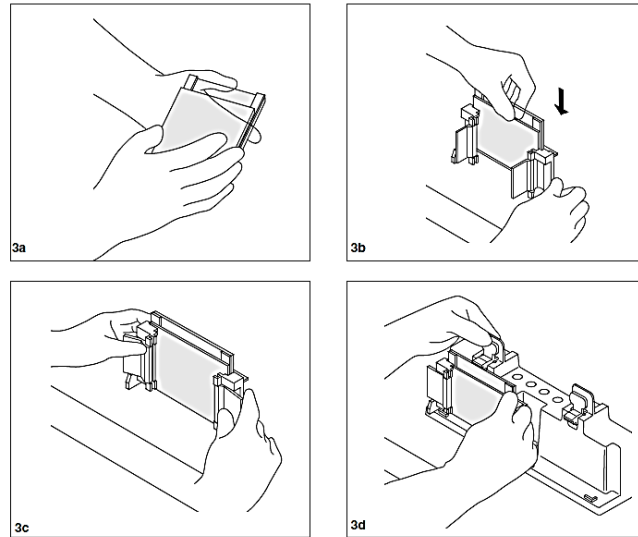


Figura 6 Montaje del cassette y el vidrio en el soporte

Fuente: Mini Protean Tetra cell manual. Bio-Rad

Una vez polimerizado el gel de corrimiento, se sirvió la mezcla de soluciones para el gel concentrador (que siempre será realizado al 4%) cuidando que no se formen burbujas, colocar el peine y se retiró una vez polimerizado en gel.

Los geles polimerizados se colocaron en la celda Mini Protean Tetra cell (figura 7).

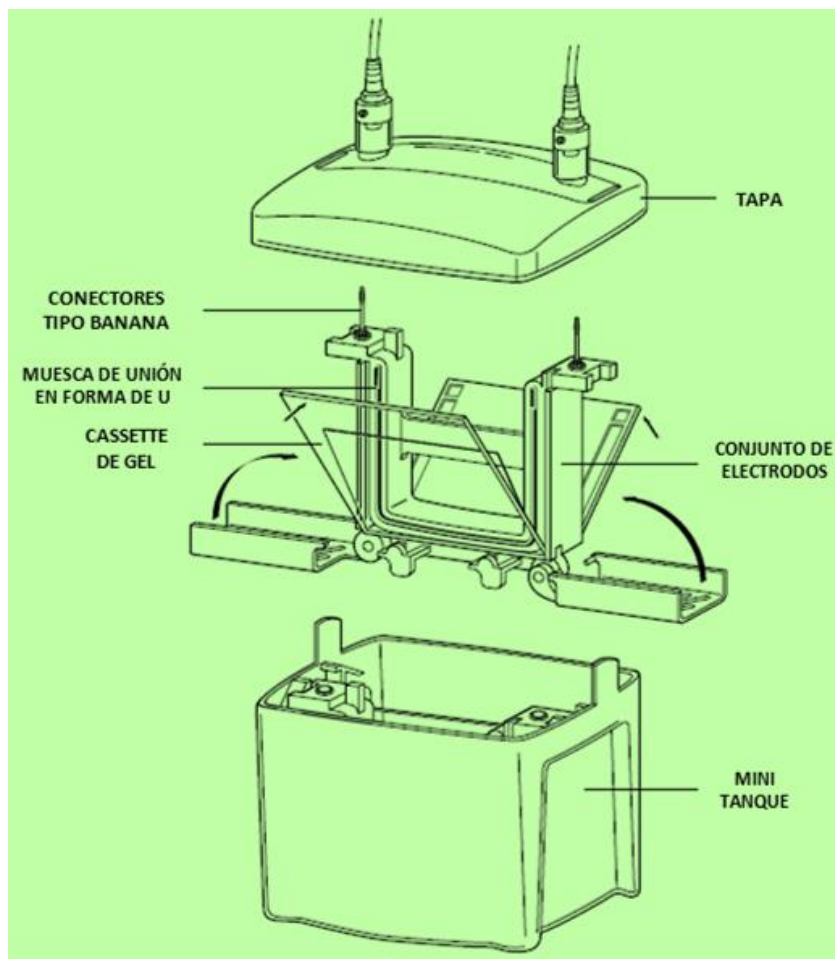


Figura 7 Montaje de la celda de electroforesis

Fuente: Mini Protean Tetra cell manual. Bio-Rad

El procedimiento para electroforesis se realizó preparando el buffer de corrida (10x) diluido en 100mL de stock 10x con 900mL de agua y usando en buffer de Laemmli (1970) para las muestras.

El *pellet* de proteínas precipitadas se resuspendió en 30 mL del buffer de muestra Bio-Rad (30 mL de SDS) 2 mercaptoetanol, azul de bromofenol Tris-HCl y glicerol) y se desnaturalizaron a 95°C por 5 min, posteriormente se colocaron en los pozos correspondientes con una pipeta y puntas especiales como se observa en la figura 8.

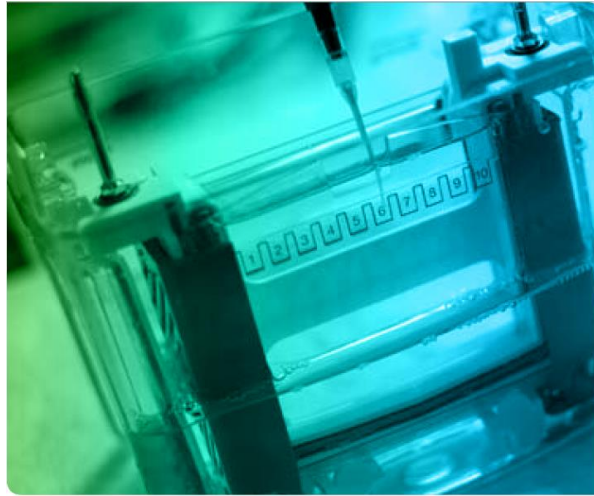


Figura 8 Colocación de muestra en los pozos correspondientes dentro de la cámara
Fuente: BioRad Electrophoresis Guide to PAGE and detection

Se conectó la cámara de electroforesis a una fuente de poder BioRad y se realizaron las corridas a 200 V y 4 mA durante 60 min (figura 9).

Una vez terminada la electroforesis los geles se desmontaron y se tiñieron con una solución de azul Coomassie (Sigma-Aldrich) al 0.25% en 450 mL de metanol y 10 mL de ácido acético aforado a 1000 mL con agua bidestilada, en agitación orbital por 1 h, posteriormente se decoloraron por 12 h con metanol-ácido acético- agua bidestilada (200mL, 150 mL, 650 mL respectivamente). Los geles teñidos fueron guardados en solución de almacenamiento (BioRad™) para su posterior análisis.

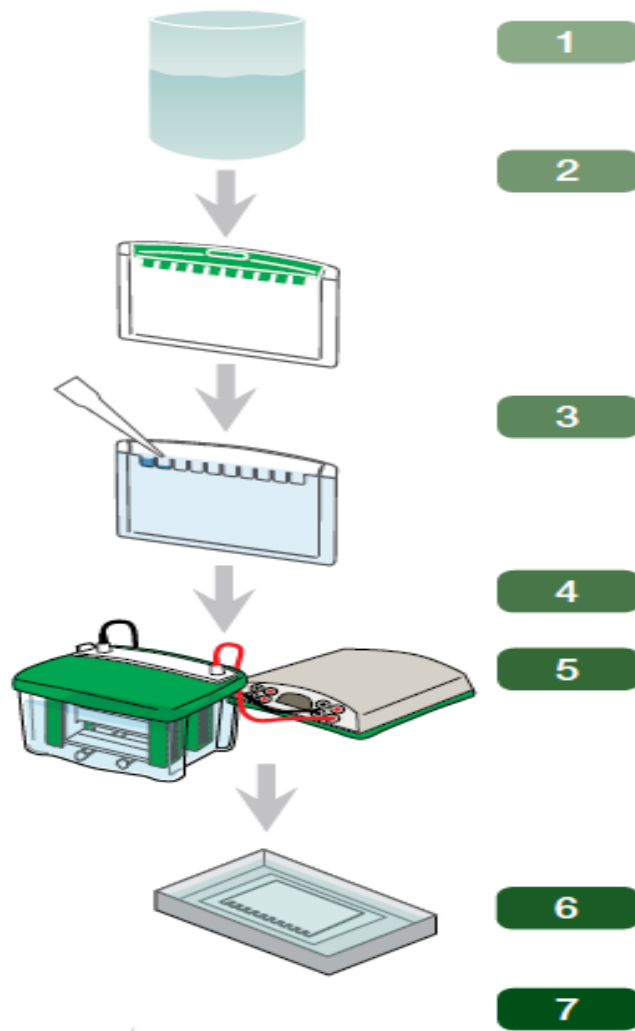


Figura 9 Procedimiento de electroforesis

Fuente: BioRad Electrophoresis Guide to PAGE and detection

2.8 Análisis de imágenes y determinación de la masa molecular relativa

El primer paso en la determinación de la masa molecular relativa fue la separación de la proteína de muestra en el mismo gel con un marcador de peso molecular estándar. Después, se trazó una gráfica de $\log PM$ contra la distancia relativa de migración (R_f) basada en los valores obtenidos de las bandas de PM estándar. El PM de las bandas de proteína desconocida es calculado por la interpolación.

$$y = mx + b$$

Dónde:

$$y = \log PM$$

$$X = R_f$$

Por lo que: $PM = 10^y = 10^{mR_f + b}$

Los valores de m y b se conocen a través de la obtención de la curva. Para asegurar una determinación más exacta deben seleccionarse condiciones de separación que produzcan una relación lineal en la gráfica obtenida, además, es importante también generar múltiples datos (por lo menos 3) para poder un ajuste lineal y coeficiente de determinación. (Bio Rad, Molecular Weight Determination by SDS PAGE).

El cálculo de la masa molecular relativa fue obtenido con la información de Bio-Rad, mediante el uso de los estándares de peso molecular (figura 18).

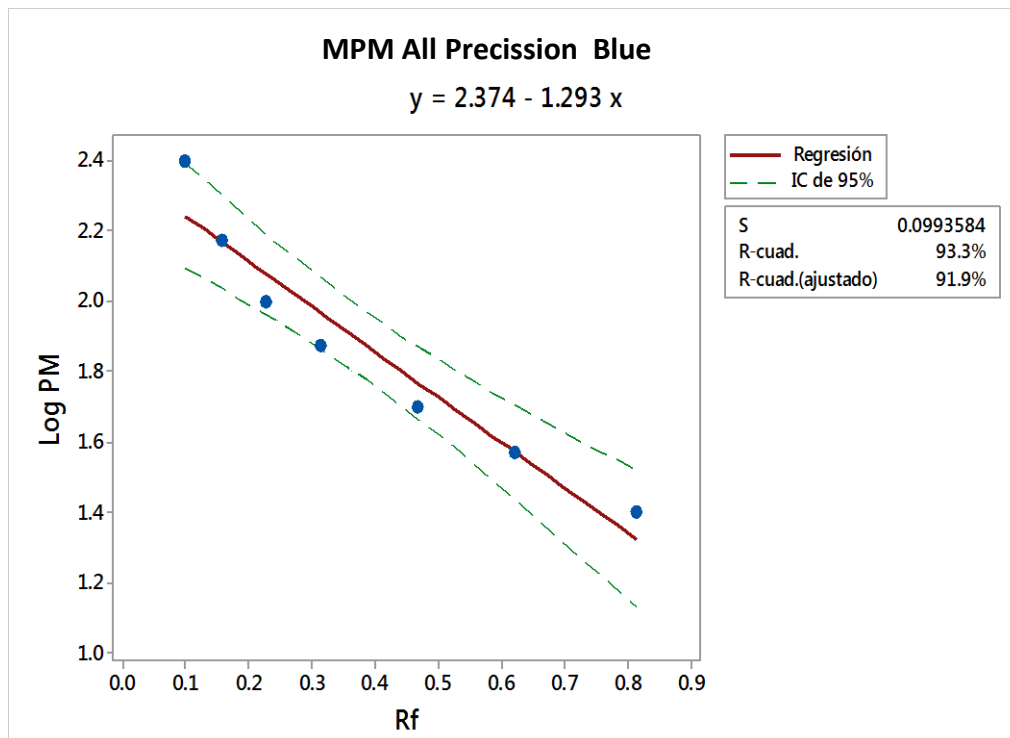


Figura 10. Curva patrón de Marcadores de Peso Molecular para calcular R_f

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Verificación de pureza de la cepa

3.1.1 Cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en agar MRS

La pureza del cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 fue verificada mediante cultivo de 24 h, en agar MRS. En la figura 10 se presenta la imagen de la caja en donde se observan colonias redondas, lisas, apariencia cremosa de color blanca, de diámetro aproximado de 1 a 2 mm.



Figura 11. Cultivo de *Pediococcus acidilactici* en agar MRS

3.1.2 Tinción de Gram

En la imagen al microscopio del frotis correspondiente, en la tinción de Gram se pueden observar tétradas o pares de cocos Gram positivos (azules) (Figura 11) agrupados en pares y tétradas, que es la agrupación característica de *Pediococcus acidilactici*.

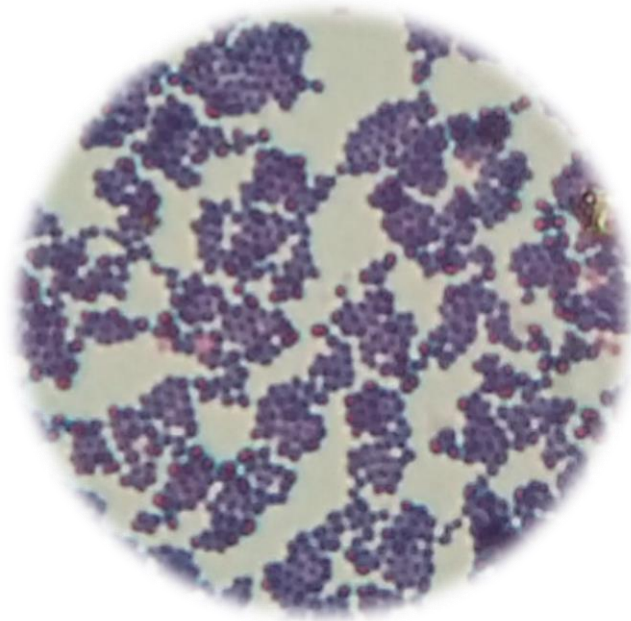


Figura 12 Imagen al microscopio 100x de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en la tinción de Gram

3.1.3 Cinética de crecimiento

En la figura 11 se muestra la cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (Munguía, 2015) donde se evaluó el comportamiento de la Densidad Óptica (D.O.) A_{600nm} y las Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL), pudiéndose establecer que la fase de latencia va de las 0 a las 2 h, la fase logarítmica de las 4 a las 10 h y la fase estacionaria de las 10 h en adelante. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Llorente (1998).

3.2 Caracterización de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Los sobrenadantes de cultivo liofilizados de cada una de las fases de crecimiento, fueron evaluados en su concentración de proteínas y perfil electroforético mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE). Los resultados se presentan a continuación

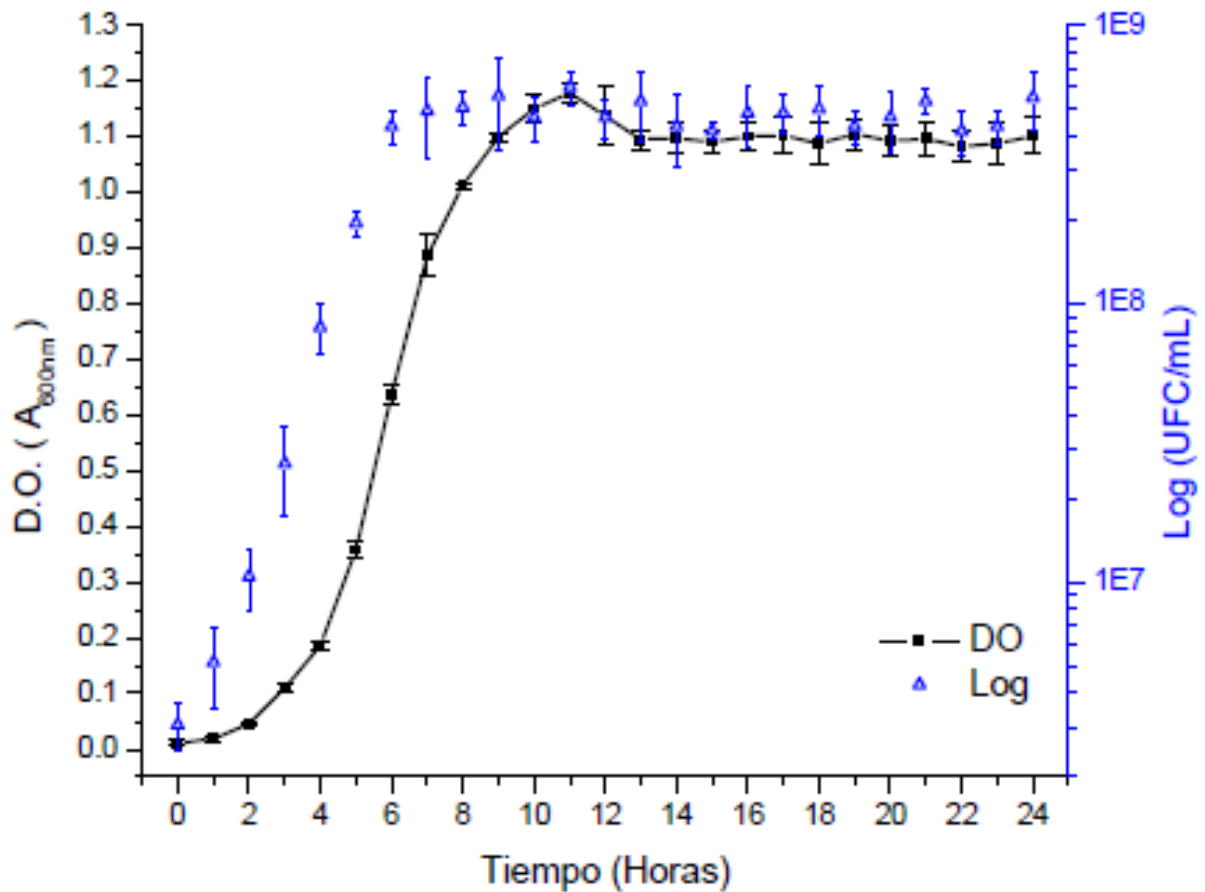


Figura 13 Cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en caldo MRSm

Fuente: Munguía, 2015

3.2.1 Determinación de proteínas por el método de Bradford

La determinación de proteínas de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se llevó a cabo por la técnica de Micro Bradford (Bradford 1976). Se construyó una curva patrón utilizando diluciones conocidas de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (BioRad™) y los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4 y figura 13.

Cuadro 4 Diluciones en tubos de las muestras de albúmina concentrada y concentración final de cada tubo

No. De tubo	Reactivo de Bradford (μL)	Agua destilada (μL)	Solución de BSA (μL)	Concentración (μg/mL)
0	200	800	0	0
1	200	650	150	1.875
2	200	600	200	2.5
3	200	500	300	3.750
4	200	400	400	5
5	200	300	500	6.25
6	200	200	600	7.5
7	200	100	700	8.750
8	200	0	800	10

Con esta curva se obtuvieron los datos de la pendiente y la ordenada al origen. Utilizando la ecuación de la recta sustituyendo los valores de la ecuación se obtuvo la gráfica correspondiente (figura 13).

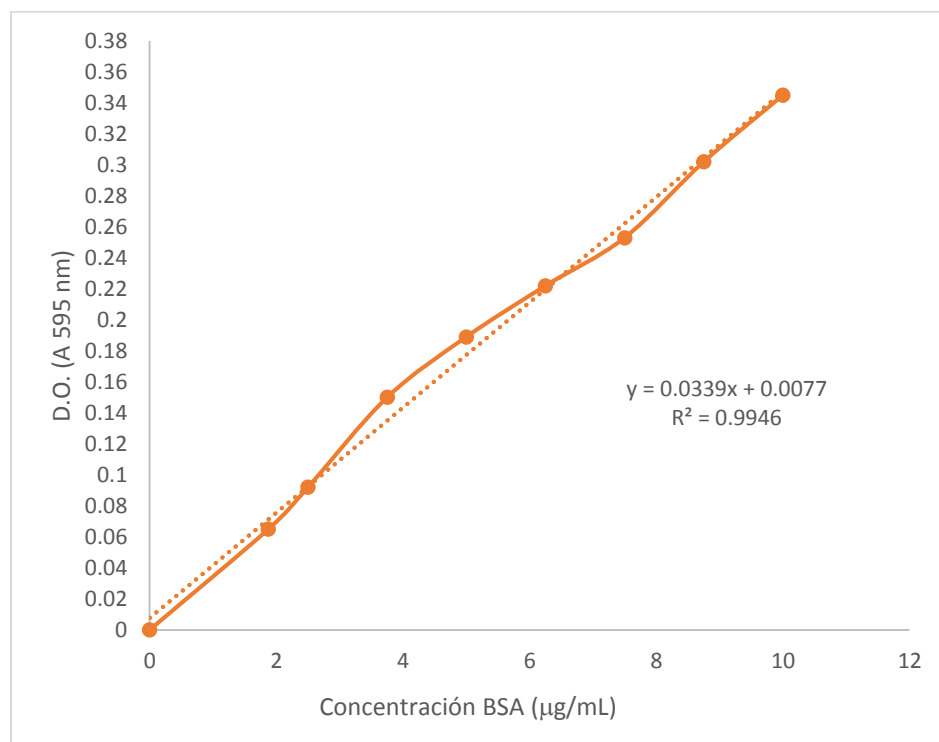


Figura 14 Curva patrón obtenida de la determinación de proteína por la técnica de Bradford

Conociendo los valores necesarios, se obtuvo la concentración de proteínas de las muestras de los sobrenadantes en las diferentes fases de crecimiento. Los resultados se muestran en el cuadro 5 y en la figura 14.

Cuadro 5 Concentración de proteína de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en sus fases de crecimiento

Hora de cultivo	Fase	Concentración de proteína (mg/mL)
4	Logarítmica	2.51
6		4.09
8		4.37
12	Estacionaria	5.76
16		3.80
24		3.42

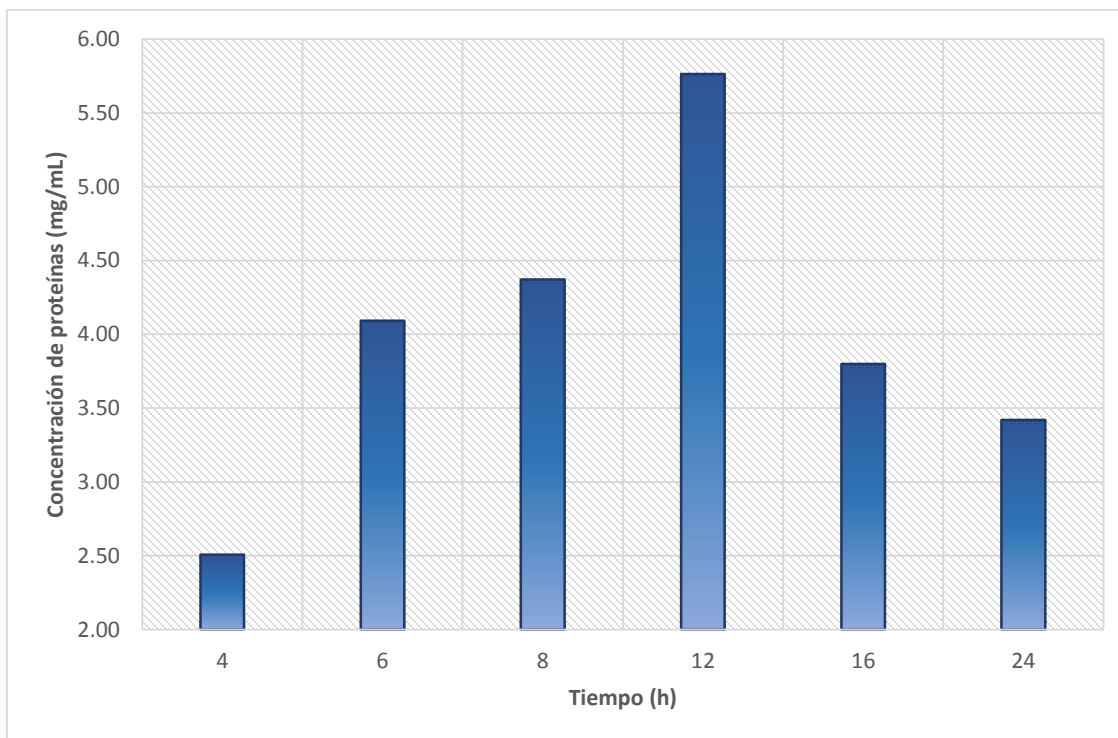


Figura 15 Concentración de proteína de los sobrenadantes de *Pedococcus acidilactici* ATCC 8042 a diferentes horas de crecimiento en medio MRSm

Lo que se observa, es una coincidencia en el comienzo de la fase estacionaria, que corresponde a las 12 horas de cultivo, cuando la bacteria ha mostrado su mayor valor de crecimiento, con la mayor concentración de proteínas.

3.3 Perfil electroforético de sobrenadantes de cultivo

Se partió de una concentración de proteína de 0.84 μg de proteína/mg de sobrenadante liofilizado de MRS. En las figuras 15-17 se muestran las imágenes obtenidas de los geles. En los 3 casos se apreció una presencia mayor de proteínas en los sobrenadantes de 12, 16 y 24 h de cultivo que en los otros, y en todos coincidieron las mismas bandas observadas y los sobrenadantes de MRS, 4, 6 y 8 h de cultivo, fueron los que correspondieron a pesos moleculares de alrededor de 50, 60 y 75 kDa, mientras que de 12 h, 16 h y 24 h de cultivo se observaron muchas más bandas de las cuales las más notables fueron las que correspondientes a los pesos moleculares de alrededor de 100, 70, 50, 40 y 32 kDa.

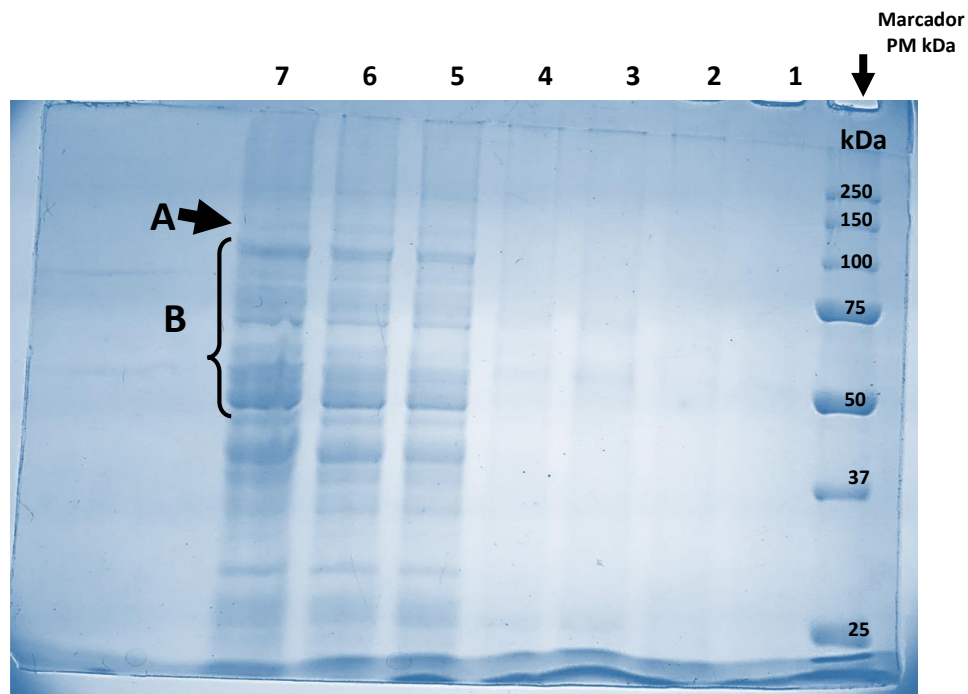


Figura 16. Perfil electroforético de sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Gel de poliacrilmida al 10%, 1 mm, tinción de azul de Coomassie. Réplica 1

Carriles: 1. Medio MRSm, 2. Sobrenadante de 4h de cultivo, 3. Sobrenadante de 6h de cultivo, 4. Sobrenadante de 8h de cultivo, 5. Sobrenadante de 12h de cultivo, 6. Sobrenadante de 16h de cultivo, 7. Sobrenadante de 24h de cultivo. El MPM utilizado fue All Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad™.

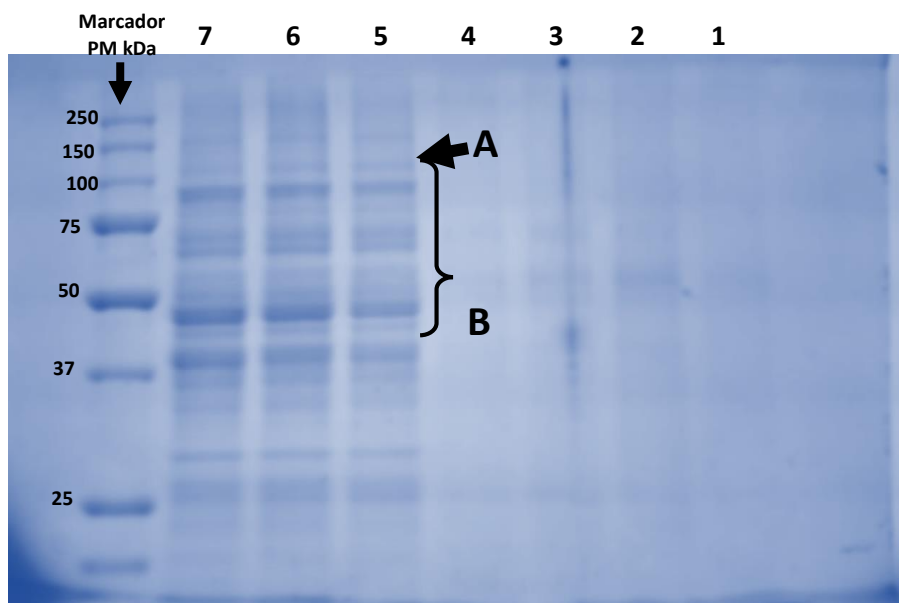


Figura 17. Perfil electroforético de sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Gel de poliacrilimida al 10%, 1 mm, tinción de azul de Coomassie. Réplica 2

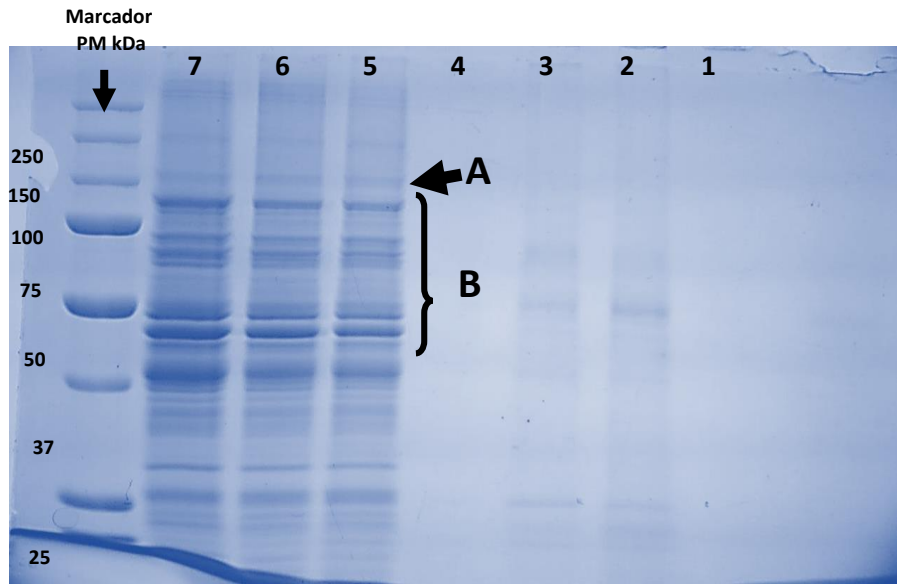


Figura 18. Perfil electroforético de sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Gel de poliacrilmida al 10%, 1 mm, tinción de azul de Coomassie. Réplica 3

Carriles: 1. Medio MRSm, 2. Sobrenadante de 4h de cultivo, 3. Sobrenadante de 6h de cultivo, 4. Sobrenadante de 8h de cultivo, 5. Sobrenadante de 12h de cultivo, 6. Sobrenadante de 16h de cultivo, 7. Sobrenadante de 24h de cultivo. El MPM utilizado fue All Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad™.

3.4 Cálculo de la masa molecular relativa

Es importante señalar que al observar los perfiles electroforéticos de cada sobrenadante de cultivo, existe clara una diferencia entre ellos, donde los sobrenadantes de la fase estacionaria presentan notablemente un mayor número de bandas, que los de la fase logarítmica, sin embargo se encontró que hay bandas que se presentan en todas las fases y se señalan en las figuras 15-17.

Una vez identificadas las bandas en común de todos los sobrenadantes de cultivo, se describen las de mayor interés que corresponden a los valores de movilidad electroforética relativa que se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6 Valores de masa molecular relativa correspondientes a las bandas presentes en todos los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

(kDa)
127.53
115.97
110.59
84.5
74.44
70.99
54.24
50.12
44.85
22.7

Como microorganismo perteneciente al grupo de las BAL, el perfil electroforético de sus sobrenadantes, respalda los resultados obtenidos por Mora, *et al.* (2003), y Lortal *et al.* (1997), en los cuales, la presencia de PGH se hace notar en los perfiles obtenidos de los sobrenadantes de otras BAL como son *Lactobacillus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici*, tratándose ésta última, de una cepa distinta. Respecto a la cepa 8042, el perfil electroforético obtenido en este trabajo coincide con lo reportado por Llorente *et al.* (2008), donde el valor de 110 kDa corresponde a la PGH extracelular de la cepa 8042.

El patrón de movilidad proteica de cada sobrenadante de cultivo es bastante similar al descrito por Munguía (2015), donde se presentan hasta 35 bandas en los carriles con los sobrenadantes de cultivo de 12, 16 y 24h de cultivo y no más de 15 en los carriles con los sobrenadantes de 4, 6 y 8 h, y cuyas masas moleculares coinciden.

Los resultados confirman lo que Llorente, 2008 y Munguía (2015) describen como la presencia de actividad PGH de los sobrenadantes de *P. acidilacici* en evidencia de la generación de lisis en células de *Micrococcus lysodeikticus* con bandas de 116 kDa, así como en un intervalo de bandas entre los 110 y 61 kDa. De la misma forma, se observa la ausencia de dichas bandas en el carril del medio MRSm y en el de 4h de cultivo, lo que confirma que las bandas no se deben a componentes del medio de cultivo, por el contrario al identificarse en los sobrenadantes de distintas fases de crecimiento de *P. acidilacici*, como productos metabólicos de la fermentación.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizó la caracterización del perfil electroforético de las proteínas de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en las diferentes fases de crecimiento y se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. Existe un patrón electroforético relacionado con las sustancias de naturaleza proteica generadas en los sobrenadantes de cultivo de la cepa ATCC 8042 según cada fase de crecimiento, mismas que fueron identificadas mediante UFC/mL y densidad óptica.
2. Es importante resaltar que en los perfiles electroforéticos se lograron identificar las bandas de proteínas que corresponden a masas moleculares relativas en un intervalo de valores entre los 61 y 115 kDa donde los más destacados son de 110 y 115 kDa, que corresponden a las de actividad de PGH.
3. Se observó una tendencia positiva en la concentración de proteínas hasta las doce horas de cultivo, en el inicio de la fase estacionaria, con la mayor concentración de proteínas del sobrenadante de la bacteria en cuestión. Asimismo se obtuvieron mayor número de bandas de proteínas en el perfil electroforético.
4. Los resultados de imagen corroboran los obtenidos anteriormente en trabajos previos con la cepa de estudio, por lo que puede establecerse que los procedimientos se realizaron de manera apropiada.
5. Los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 obtenidos y analizados en este trabajo, representan una referencia sobre la caracterización de la bacteria en cuestión, que puede ser utilizada en investigaciones futuras con el objetivo de profundizar en el estudio de cada proteína específica identificada, así como su efecto en la inhibición de otros microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

Axelsson, L. T. (Salminen S. y Von Wright A.) (1993). *Lactic Acid Bacteria Lactic Acid Bacteria: classification and physiology*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Bello, H. y Durán, B. (1992) Aplicación de *Pediococcus acidilactici* en la elaboración de un embutido tipo salami. (Tesis de Ingeniería en Alimentos). FESC-UNAM, Cuautitlán Izcalli, México.

Bio Rad. A guide to Poliacrylamide Gel Electrophoresis and Detection.

Bio Rad. Instruction manual for Mini Protean 3 cell.

Bio Rad, Molecular Weight Determination by SDS-PAGE. Tech note 3133.

Bollag D. (1996) *Protein methods*. New York: Wiley-Liss.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method of quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:428-254.

Caplice, E., Fitzgerald, F. (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* 50, 141-149

Claus, D. (1992) A standardized Gram staining procedure. *World Journal of microbiology and biotechnology*, 8, 451-452.

Cleveland, J., Montville, T. J., Ness, I. F. y Chikindas, M. F. (2001) Bacteriocins: Safe, natural antimicrobial for food preservation. *Int Journal Food Microbiology.* (50) 131-149.

Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Review Microbiology.* (3) 777

Daeschel, M. A., and Klaenhammer, T. T. (1995) Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appli. Environ. Microbiol.*, (50) 153-8.

De Vuyst, L. y Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Microbiology, genetics and applications*. London: Editorial Blackie Academic and professional.

Faoro, V. y Stanta, G. (2011) Guidelines for molecular analysis in archive tissues. Recuperado de http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-17890-0_40 el 2 de octubre de 2013.

- Federal Register (1988) Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Regist.* 53:11247–11251.
- Félix, A. Electroforesis de proteínas. Recuperado el 12 de septiembre de 2017 de <http://slideplayer.es/slide/9441975/>
- García, I., Velasco, L., Rodríguez, S., Mendoza G., y Farrés, A. (2011). Detection and localization of two lytic enzymes in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *J. Appl. Microbiol.* (111) 607-615.
- Giraffa, G. (2004) Studying the dynamics of microbial populations during for fermentation. *FEMS microbiol. Rev.* (28) 251-259.
- Gomes, B., Lizziane, K., Reis, F. y De Martinis E. Biopreservation. (2009) En Toldrá, F. *Safety of Meat and Processed Meat* (pp. 297-312) Recuperado de http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-89026-5_11/fulltext.html
- Kruger, N. (Walker, J.) (2009) The protein protocols Handbook. Recuperado de: http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-198-7_4 el 2 de octubre de 2013.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lortal, S., Valence, F., Bizet, C., & Maubois, J. L. (1997). Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lmtubacillus* species. *Research in Microbiology*, 148, 461-474.
- Llorente, A. (2008) Caracterización de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici*. (Tesis de doctorado en ciencias biológicas). FC-UNAM. México, D.F.
- Lomonte, B. (2002) Inmunología general: Manual de laboratorio. San José: Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología. Instituto Clodomiro Picado.
- Lücke, F. K. (2000) Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science.* (56) 105-115.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (2003) Brock. Microbiología de los microorganismos. Madrid: Prentice Hall.
- Magnusson, J. (2003) Antifungal activity of lactic acid bacteria. (Doctor's dissertation) Swedish University of Agricultural Science. Uppsala Sweden.

- Martínez, M. (2011) Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana del sobrenadante de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. (Tesis de maestría en MVZ). FC-UNAM. México, D.F.
- Munguía, P. (2015) Evaluación de la actividad antagónica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la expresión de algunos factores de virulencia de *Pseudomonas aureginosa* ATCC 9027. (Tesis de maestría M. en C.) FESC-UNAM. Cuautitlán Izcalli, Méx.
- Parish , M. y Davidson, P. (Davidson, P. and Larry, B.) (1993) Methods for evaluation en: Antimicrobials in foods. Chap. 17 New York: Marcel Dekker Inc.
- Reis, J.A., Paula, A. T., Casarotti, S. N. y Penna, A. L. B., (2012) Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*. (4) 124-140.
- Schnürer, J. y Mangusson, J. (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in food science & technology*. 16. 70-78
- Salcido, N. M. D. L. & Barboza Corona, J. E. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*, 20(1) 43-52.
- Salminen, S., Von, W., (1993) Lactic Acid Bacteria. New York: Marcel Dekker.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 331–345.
- Velasco, M. Caracterización y espectro antibacteriano de la peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. (Tesis de licenciatura en Química de alimentos) FQ-UNAM. México, D. F.
- Vignolo, G., Fadda, S. y Castellano, P. Bioprotective cultures. (2008) En: Toldrá, F. *Meat biotechnology*. (pp. 299-424)