

11661

3
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**EVALUACION DE LA PRODUCCION DE
BACTERIOCINAS DE *Pediococcus acidilactici* BAJO
DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(AREA MICROBIOLOGIA)
P R E S E N T A:
ADRIANA DE NUESTRA SEÑORA DEL
SAGRADO CORAZON LLORENTE BOUSQUETS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. AMELIA FARRES GONZALEZ - SARAVIA.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1998.

264807

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

Este trabajo forma parte de la Cátedra de Tecnología de Productos Cárnicos y fue realizado en los Laboratorios de Tecnología de Productos Cárnicos y de Virología (Posgrado) de la FES-Cuautitlán y en el Laboratorio de Biotecnología Conjunto E de la Facultad de Química.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Amelia Farrés González-Saravia por su calidad profesional y humana, por la confianza en este trabajo.

De verdad gracias Amelia por tu dirección y apoyo.

A la Dra. Susana Mendoza y al M. en C. Edgar Aguilera por su apoyo técnico en la parte experimental.

A la M. en C. Idalia Flores y a la M. en C. Rebeca Ramírez por su guía en el análisis estadístico.

A la Dra. Carmen Wachter y a la M. en C. Clara Inés Álvarez por sus atinados comentarios en la revisión de este trabajo.

Al Técnico Académico Ignacio García Salgado por su apoyo en la búsqueda documental.

Al Técnico Académico Rodolfo Robles por su apoyo fotográfico.

DEDICATORIAS

A ti Miguel por una vida compartida juntos, por el amor, la libertad y el respeto a mi y a mi trabajo.

A Adriana, Ana Gabriela y Miguel por inspirar todos mis logros, con todo mi cariño este trabajo es para ustedes.

A ti Chayo por la fortaleza que siempre encuentro cuando te recuerdo.

A Cocó por las palabras de aliento que fueron claves para alcanzar la meta.

A Carlos, Ricardo, Dolores, Antonio, Jorge y Aurora por todo lo que nos une.

A René Miranda por allanar el camino.

A Bertha por las mejores muestras de amistad.

A Carmen, Sol, Verito, Vero, Andrés y Sandra por compartir conmigo el camino.

A Mari Carmen, Mikis y Chucho por los momentos de ánimo y desánimo que compartimos juntos.

A Rodolfo, José Luis, Ismael, Adelfo, Alicia, Carolina, por facilitarme el camino.

—Tienes que ser un hombre fuerte, y tu vida tiene que ser verdadera.

—¿Que es una vida verdadera?

—Una vida que se vive con la certeza nítida de estar viviéndola; una vida buena, fuerte.

—Mira cada camino de cerca y con intención, luego hazte a ti mismo, y a ti solo, una pregunta.....¿tiene corazón este camino?

—Debes tener siempre presente que un camino es sólo un camino; si sientes que no deberías seguirlo, no debes seguir en el bajo ninguna condición.....tu decisión de seguir en el camino o de dejarlo debe estar libre de miedo y ambición.

—¿Tiene corazón este camino?

—Si tiene, el camino es bueno; si no, de nada sirve. Ningún camino lleva a ninguna parte, pero uno tiene corazón y el otro no. Uno hace gozoso el viaje, mientras lo sigas, eres uno con él. El otro te hará maldecir tu vida. Uno te hace fuerte, el otro te debilita.

—Antes de embarcarte en cualquier camino tienes que hacer la pregunta: ¿tiene corazón este camino? Si la respuesta es no, tu mismo lo sabrás, y deberás entonces escoger otro camino.

—Un camino sin corazón nunca es disfrutable. Hay que trabajar duro tan sólo para tomarlo. En cambio, un camino con corazón es fácil: no te hace trabajar por tomarle gusto.

—Para mí sólo recorrer los caminos que tienen corazón, cualquier camino que tenga corazón... nada más puede intentarse que establecer el principio y la dirección de un camino infinitamente largo....

Carlos Castaneda

3.0. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Caracterización de la cepa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	33
3.1.1. Determinación del perfil de fermentación de carbohidratos	33
3.1.2. Extracción del DNA para la detección de la presencia de plásmidos	33
3.1.3. Electroforesis de proteínas intra y extracelulares de <i>P. acidilactici</i> en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	34
3.2. Determinación de la presencia de actividad de bacteriocina de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 usando como microorganismo de prueba <i>S. aureus</i> ATCC 65385p	36
3.2.1. Obtención del sobrenadante de <i>Pediococcus acidilactici</i> para las pruebas de actividad de bacteriocina	36
3.2.2. Estandarización de la cepa de prueba (<i>S. aureus</i> ATCC 6538p)	36
3.2.3. Prueba de inhibición <i>S. aureus</i> por difusión en agar de sobrenadantes de <i>P. acidilactici</i>	37
3.2.3.1. Variaciones a las técnicas para demostrar actividad de bacteriocina	38
3.2.4. Prueba turbidimétrica de dilución en caldo	40
3.2.5. Curva de inhibición o muerte	41
3.2.5.1. Concentración mínima inhibitoria	41
3.3. Fermentaciones de <i>P. acidilactici</i>	43
3.3.1. Diseño ortogonal para la formulación de los medios de fermentación	43
3.3.2. Determinación de densidad óptica (Absorbancia)	44
3.3.3. Determinación de la velocidad de crecimiento (μ)	44
3.4. Liofilización de <i>P. acidilactici</i> con y sin crioprotectores	46
3.4.1. Reconstitución de las cepas	47
3.4.2. Determinación de la viabilidad y funcionalidad de las cepas	47
3.5. Análisis Estadísticos	48
4.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. Caracterización de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 en términos de perfil de fermentación de carbohidratos, presencia de plásmidos y perfil de proteínas	50
4.1.1. Perfil de fermentación de carbohidratos de <i>P. acidilactici</i>	50
4.1.2. Electroforesis de DNA de <i>P. acidilactici</i> en geles de agarosa para detectar la presencia de plásmidos	51
4.1.3. Electroforesis de proteínas intra y extracelulares de <i>P. acidilactici</i> en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	52
4.2. Evaluación cualitativa y cuantitativa de la presencia de bacteriocina de <i>P. acidilactici</i>	54
4.2.1. Cinética de crecimiento de la cepa productora (<i>P. acidilactici</i> ATCC 8042)	54

4.2.2.	Cinética de crecimiento de la cepa indicadora <i>S. aureus</i> ATCC 6538p	55
4.2.3.	Prueba de actividad de bacteriocina por difusión en agar de sobrenadantes de <i>P. acidilactici</i> vs <i>S. aureus</i>	57
4.2.4.	Consideraciones en la determinación de actividad de bacteriocina en la prueba de difusión en agar	59
4.2.4.1.	Sobrenadante de <i>P. acidilactici</i> hipsinizado y efecto en actividad de bacteriocina	59
4.2.5.	Inhibición de <i>S. aureus</i> al utilizar sobrenadante de <i>P. acidilactici</i> en la prueba de dilución en caldo	60
4.2.6.	Curva de Inhibición o muerte	62
4.2.6.1.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria	64
4.3.	Efecto de la formulación del medio de cultivo en la velocidad de crecimiento (μ) de <i>P. acidilactici</i> y en la actividad de bacteriocina vs <i>S. aureus</i>	64
4.4.	Condiciones de Liofilización de <i>Pediococcus acidilactici</i>	73
4.4.1.	Efecto del uso de crioprotectores y neutralizante sobre la viabilidad de <i>P. acidilactici</i>	74
4.4.2.	Efecto del uso de crioprotectores y neutralizante sobre la actividad de bacteriocina de <i>P. acidilactici</i>	76
4.4.3.	Efecto del uso de crioprotectores y neutralizante sobre el perfil de fermentación de carbohidratos de <i>P. acidilactici</i>	77
5.0	CONCLUSIONES	78
6.0	LITERATURA CITADA	79
7.0	Anexos	86

INDICE DE TABLAS

Tabla No 1	Características diferenciales de bacterias ácido-lácticas	2
Tabla No 2	Condiciones diferenciales de crecimiento de las especies del Género <i>Pediococcus</i>	5
Tabla No 3	Características primarias y secundarias de <i>P. acidilactici</i>	6
Tabla No 4	Sistema numérico propuesto para la nomenclatura de bacteriocinas	12
Tabla No 5	Requerimientos para el uso de sustancias antimicrobianas presentes naturalmente como conservadores alimentarios	14
Tabla No 6	Prueba turbidimétrica de dilución en caldo con diferentes volúmenes del sobrenadante de <i>P. acidilactici</i>	40
Tabla No 7	Resultados del perfil de fermentación de carbohidratos de <i>P. acidilactici</i>	49
Tabla No 8	Carbohidratos empleados como control de actividad fermentativa de <i>P. acidilactici</i>	50
Tabla No 9	Resultados de la prueba de Duncan ($p < 0.01$) de las formulaciones del diseño ortogonal	66
Tabla No 10	Efecto de la formulación del medio de crecimiento (diseño ortogonal) en la velocidad de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> y en la producción de bacteriocina	73
Tabla No 11	Resultados de la viabilidad de <i>P. acidilactici</i> adicionados o no de crioprotectores y neutralizante (almacenamiento a -20°C)	74
Tabla No 12	Resultados de la actividad de bacteriocina de <i>P. acidilactici</i> tras conservar la cepa por liofilización con medios de suspensión adicionados o no de crioprotectores y neutralizante (almacenamiento a -20°C)	76
Tabla No 13	Resultados de la actividad fermentativa de <i>P. acidilactici</i> liofilizados con o sin crioprotector y neutralizante	77
Tabla No 14	Fermentaciones de <i>P. acidilactici</i> (diseño ortogonal)	89
Tabla No 15	Fermentaciones de <i>P. acidilactici</i> concentraciones de cada variable	90
Tabla No 16	Resultados de D.O. (Absorbancia) de la cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> en CSTES modificado	91
Tabla No 17	Resultados de D.O. (Absorbancia) de la cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> en BHI	91
Tabla No 18	Resultados de las cuentas viables de la cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> en Agar BHI	91
Tabla No 19	Inhibición de <i>S. aureus</i> al adicionar diferentes volúmenes de sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i> en la prueba turbidimétrica	92
Tabla No 20	Curva de inhibición o muerte de <i>S. aureus</i> al adicionar diferentes volúmenes de sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i>	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No 1	Estructura química de la nisina	10
Figura No 2	Cuadro Metodológico General	31
Figura No 3	Objetivo Particular No 1	32
Figura No 4	Objetivo Particular No 2	35
Figura No 5	Determinación de células viables (UFC/ml) en placas de agar	37
Figura No 6	Prueba cualitativa de actividad de bacteriocina mediante el método de estriado de Kekessy y Piguét (1970)	38
Figura No 7	Prueba cualitativa de actividad de bacteriocina aplicando una sobrecapa de agar con la cepa indicadora	39
Figura No 8	Prueba de difusión en agar incluyendo la cepa indicadora en una sobrecapa de agar y colocando los sobrenadantes de la cepa con actividad de bacteriocina en penicilindros	40
Figura No 9	Objetivo Particular No 3	42
Figura No 10	Objetivo Particular No 4	45
Figura No 11	Reconstitución de <i>P. acidilactici</i>	47
Figura No 12	Detección de la presencia de plásmidos de <i>P. acidilactici</i> mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.6%	51
Figura No 13	Proteínas intra y extracelulares de <i>P. acidilactici</i> mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	52
Figura No 14	Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> en CTES modificado	55
Figura No 15	Cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> en BHI (D.O. vs tiempo)	56
Figura No 16	Cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> en BHI (UFC/ml. vs tiempo)	57
Figura No 17	Inhibición de <i>S. aureus</i> al aplicar sobrenadantes de <i>P. acidilactici</i> en la prueba de difusión en agar	58
Figura No 18	Inhibición de <i>S. aureus</i> al aplicar sobrenadante de <i>P. acidilactici</i> en la prueba de difusión en agar realizando las consideraciones de Lewus y Montville	60
Figura No 19	Inhibición de <i>S. aureus</i> por diferentes volúmenes de sobrenadante de <i>P. acidilactici</i> en la prueba turbidimétrica de dilución en caldo	61
Figura No 20	Curva de inhibición o muerte de <i>S. aureus</i> al utilizar diferentes volúmenes de sobrenadante de <i>P. acidilactici</i>	62
Figuras No 21	Cinéticas de crecimiento Subgrupo 1 (Duncan $p < 0.01$) 1122, 2121, 2222, 1221, 1212	67
Figuras No 22	Cinéticas de crecimiento Subgrupo 2 (Duncan $p < 0.01$) 2121, 2222, 1221, 1212, 1111	69
Figuras No 23	Cinéticas de crecimiento Subgrupo 3 (Duncan $p < 0.01$) 1221, 1212, 1111, 2211	70
Figuras No 24	Cinéticas de crecimiento Subgrupo 4 (Duncan $p < 0.01$) 1212, 1111, 2211, 2112	71

Resumen

La cepa de *Pediococcus acidilactici* 8042 se utilizó en estudios previos como cultivo iniciador en la elaboración de embutidos madurados, en los que se obtuvo una mejor calidad sanitaria al compararla con los no inoculados. En virtud de que otras cepas de *Pediococcus acidilactici* producen bacteriocinas, moléculas responsables del control de la flora normal y de algunos microorganismos patógenos, se planteó la posibilidad de que esta cepa produjera este tipo de moléculas.

Se estudió la actividad de bacteriocina de la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en la inhibición de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, para evaluar el efecto se aplicaron tanto pruebas cualitativas de difusión en agar como cuantitativas (turbidimétricas, curvas de inhibición o muerte y concentración mínima inhibitoria).

La prueba de difusión en agar evidenció una zona de inhibición de crecimiento del microorganismo de prueba en un medio libre de carbohidratos y en anaerobiosis, lo que permitió establecer que se encontraba actividad de bacteriocina. La naturaleza proteica del compuesto se detectó al inhibir su actividad por tratamiento con tripsina.

Las pruebas cuantitativas permitieron establecer una curva de muerte, y se cuantificó un menor número de células viables (UFC/ml) cuando se adicionó mayor cantidad de sobrenadante. Se logró la inhibición de 68% de las células de *S. aureus* en 10 horas. La Concentración Mínima Inhibitoria se encontró al adicionar 0.5 ml de sobrenadante:2.5 ml de BHI y 0.1 ml de cepa indicadora.

Entre las pruebas realizadas para caracterizar a la cepa se detectó la presencia de un plásmido con peso molecular de 2,700 kDa, que no coincide con los reportados en la literatura para otras cepas de *Pediococcus acidilactici*.

Se estudió también el efecto de la formulación del medio de crecimiento en la producción de bacteriocinas mediante un diseño ortogonal L_8 en donde se modificaron los niveles de la fuente de carbono (sacarosa), de los requerimientos especiales (ácido ascórbico y sulfato de manganeso) y del agente neutralizante (carbonato de calcio). Como variables de respuesta se analizaron la velocidad de crecimiento y la producción de bacteriocina.

El análisis estadístico con el Programa SPSS aplicando un ANOVA de dos vías demostró una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre los resultados de crecimiento medido (μ) por Absorbancia de los diferentes tratamientos. La prueba de Duncan ($p < 0.01$) estableció la formación de 4 subgrupos donde resalta que el mayor efecto se debió al $MnSO_4$. El mejor medio para producir la mayor μ fue el MRS modificado con 2% de sacarosa, 0.1% de ácido ascórbico, 0.025% de $MnSO_4$, 0.002% de $CaCO_3$. La producción de bacteriocina mostró independencia entre los resultados de Absorbancia, μ de las cinéticas y los halos de inhibición de cada sobrenadante no existiendo correlación. Existe una relación inversa entre μ y producción de bacteriocina. La formulación que produjo los halos de inhibición más grandes fue el MRS modificado con 1% de sacarosa, 0.15% de ácido ascórbico, 0.02% de $MnSO_4$, 0.002% de $CaCO_3$.

Finalmente se estudió el comportamiento de la cepa ante diferentes condiciones de liofilización y se empleó MRS modificado como control. Las variantes probadas fueron la adición o no de crioprotector y neutralizante y se determinó el efecto de los mismos en la viabilidad, en el perfil de fermentación de carbohidratos y en la actividad de bacteriocina.

Los resultados obtenidos señalan que la cepa liofilizada en MRS modificado adicionado de crioprotector y neutralizante conservó una mayor viabilidad (94.34%) cuando se adicionó crioprotector y neutralizante. Se observó que la liofilización no modificó el perfil de fermentación de los carbohidratos al utilizar el MRS modificado solo o con adición de crioprotector y neutralizante. El medio de suspensión si tuvo una influencia altamente significativa ($p < 0.01$) en la producción de bacteriocina evaluada por halos de inhibición mediante la prueba de difusión en agar, ya que fueron mayores los obtenidos de los lotes con adición de crioprotector y neutralizante.

JUSTIFICACIÓN

Las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) han demostrado producir sustancias inhibitoras tales como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y ácido láctico, los cuales tienen actividad bactericida y/o bacteriostático sobre bacterias susceptibles. Esto asegura su dominio sobre la flora natural y/o patógena cuando se les utiliza como cultivo iniciador. La aplicación de iniciadores en alimentos fermentados en combinación con los propios controles del proceso, garantizan mejores características sensoriales y sanitarias comparados con sus correspondientes productos no fermentados, por lo que son de considerable interés sanitario, tecnológico y económico.

Las BAL tienen una condición GRAS (generally regarded as safe), situación que agiliza el proceso regulatorio y facilita la aprobación de su uso en alimentos. La producción de bacteriocinas de cultivos lácticos y el interés en el desarrollo de las bacteriocinas como conservador en alimentos se ha incrementado debido a la autorización por parte de la FDA-USDA, para usar la nisina (bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*), como conservador, abriendo la puerta a la aplicación potencial de bacteriocinas en alimentos. La producción de bacteriocinas (pediocinas) por *Pediococcus acidilactici* ha sido reconocida por diversos grupos de investigación, quienes han demostrado que las pediocinas estudiadas inhiben bacterias patógenas de interés sanitario en la industria alimentaria, tales como *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *C. botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, etc. Este trabajo busca demostrar que la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 es productora de pediocinas al utilizar como cepa indicadora *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, adecuando para ello la metodología propuesta en la literatura.

Muchos de los estudios realizados en el área se centran en el aislamiento de microorganismo productores y en la purificación y caracterización de los compuestos antibacterianos, sin embargo, existe poca información sobre las condiciones de producción, por lo que en este trabajo se pretende contribuir al respecto y se investigan factores del medio de cultivo que inciden en la producción de estos metabolitos. Por otro lado cabe resaltar que debido a la poca información que existe en cuanto a la conservación de BAL hay muchos problemas de inestabilidad, recordando que de una adecuada conservación depende el éxito de los procesos tecnológicos en que se empleen. Ante ello se exploran diversas estrategias de conservación de la cepa con el objetivo de asegurar la producción de bacteriocinas.

1.0 MARCO TEÓRICO

1.1. Bacterias Ácido-Lácticas

La descripción general de las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) en la edición del Manual Bergey's (1986) indica que son cocos o bacilos Gram-positivos, agrupados en tétradas y/o pares, no formadoras de esporas, no poseen actividad de catalasa, ni poseen citocromos, producen ácido láctico como producto mayoritario durante la fermentación de carbohidratos. Incluye los géneros que poseen la descripción general de las BAL típicas: *Aerococcus* (A.), *Lactobacillus* (Lb.), *Leuconostoc* (Ln.), *Pediococcus* (P.), *Streptococcus* (S.). La mayoría de los géneros son filogenéticamente grupos distintos, en particular *Lactobacillus* y *Leuconostoc* son muy heterogéneos y la cercanía filogenética no correlaciona con la clasificación basada en las características fenotípicas.

Se emplean actualmente nuevas herramientas para la clasificación e identificación de BAL. Las subdivisiones entre los géneros y especies relacionadas han sido determinadas usando taxonomía numérica y métodos quimiotaxonómicos; la técnica más prometedora consiste en la hibridación del DNA y la secuenciación de los genes del RNAr, en particular la fracción 16S. La comparación de estas secuencias es la técnica más poderosa y más segura para determinar las relaciones filogenéticas de microorganismos, como se ejemplifica por las descripciones de nuevos géneros, de este modo, Schleifer *et al.* (1985) y Schleifer *et al.* (1987) dividen a los integrantes del género *Streptococcus* primero en tres: *Enterococcus* (E.), *Lactococcus* (Lc.), y *Streptococcus sensu stricto*. Más tarde, Collins *et al.* (1989) sugirieron que algunas BAL móviles diferentes a los lactococos, formarían un género separado, *Vagococcus* (V.). Los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* han permanecido mucho tiempo sin cambio, aunque algunas BAL en forma de bacilos, previamente incluidas en el género *Lactobacillus*, ahora forman un nuevo género, *Carnobacterium* (C.) (Collins *et al.* 1987; Wallbanks *et al.* 1990). Collins *et al.* (1990) elevaron de nivel la especie de *Pediococcus halophilus* y formaron el género *Tetragenococcus* (T.).

Las BAL comprenden dos familias, la *Streptococcaceae* y la *Lactobacillaceae*. La primera comprende los géneros *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*,

Streptococcus, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*; mientras que la segunda, a los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. La clasificación actual de las BAL en diferentes géneros está basada en sus características diferenciales (Tabla No 1):

- Morfología celular: cocos o bacilos
- Modo de fermentar la glucosa: se distinguen 2 vías de fermentación entre las BAL, la fermentación homoláctica, que por la vía glucolítica Embden-Meyerhoff genera casi exclusivamente ácido láctico como producto final, y la fermentación heteroláctica, la que por la Vía de las pentosas-fosfato (fosfogluconato-fosfocetolasa) genera otros productos además del ácido láctico, tales como etanol, acetato y CO₂
- Configuración del ácido láctico producido: D, L, o ambos
- Crecimiento a diferentes temperaturas
- Capacidad para crecer en altas concentraciones de sal
- Tolerancia a ácido o álcali

Tabla No 1
Características diferenciales de las BAL^a

	Bacilos		Cocos						
	Cam.	Lb.	Aer.	Ent.	Lactoc.	Leuc.	Ped.	Strep.	Tetr.
Formación de tétradas	-	-	+	-	-	-	+	-	+
CO ₂ de glucosa ^b	-	±	-	-	-	+	-	-	-
Crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+
Crecimiento a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-
Crecimiento a 6.5% NaCl	ND ^d	±	+	+	-	±	±	-	+
Crecimiento a 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Crecimiento a pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-
Crecimiento a pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Acido Láctico ^c	L	D,L,DL ^e	L	L	L	D	L,DL ^e	L	L

^a+, positiva; -, negativa; ±, la respuesta varía entre especies; ND, no determinada.

^bPrueba de glucosa para homo o heterofermentación; negativa y positiva denota homofermentativa y heterofermentativa, respectivamente.

^cConfiguración del ácido láctico producido de la glucosa.

^dNo se ha reportado crecimiento en 8% de NaCl.

^eProducción de D-, L-, o DL-ácido láctico varía entre especies.

Fuente: Axelsson, 1993; Manual Bergey's, 1986.

1.1.1. Usos y aplicaciones

Existe gran interés por parte de la Asociación Nacional de Procesadores de Alimentos de los Estados Unidos en incrementar la seguridad de los alimentos mínimamente procesados y conservados en refrigeración, ya que aplicar sólo refrigeración puede implicar 2 problemas:

- a) El 20% de los refrigeradores, tanto comerciales como residenciales, se mantienen a temperaturas superiores a los 10°C y
- b) *Listeria monocytogenes* y otros patógenos pueden crecer a temperaturas cercanas a la temperatura de congelación.

De ahí que esta asociación recomienda considerar barreras adicionales para controlar el crecimiento de microorganismos en alimentos refrigerados. Tales barreras pueden ser a través del uso de BAL, ya que esta forma de conservación de alimentos es aceptado por los consumidores como "natural" y "promotor de la salud".

La fermentación de alimentos es la forma mas antigua de conservar alimentos, situación que ha generado un enorme interés en los métodos biológicos de conservación, procedimiento identificado ya como "bioconservación", y que se define como el uso de BAL, sus productos metabólicos o ambos para mejorar o asegurar la calidad de los alimentos que son generalmente considerados fermentados, debido a la producción de ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico, cítrico, etc.) a temperaturas controladas de acidificación. La producción controlada de ácido *in situ* es una forma importante de bioconservación en la que están involucrados muchos factores, entre los que resaltan el pH inicial, su capacidad amortiguadora, el tipo de organismo, la naturaleza y concentración del carbohidrato fermentable, ingredientes que pueden influir en la viabilidad y velocidad de crecimiento de las BAL, y las velocidades de crecimiento de BAL y patógenos a temperaturas extremas (Montville y Winkowski, 1997).

Algunos géneros de BAL se utilizan como cultivos iniciadores para producir una variedad de alimentos fermentados derivados de carne, leche, pescado, verduras, frutas y cereales. La aplicación de BAL como cultivos iniciadores garantizan mejores características sensoriales y sanitarias del producto final, comparados con sus correspondientes productos no fermentados, contribuyendo en el dominio sobre la flora natural, que incluye a otras BAL y/o patógenas, como

Staphylococcus aureus, *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, *Listeria* spp., *Yersinia* spp., *E. coli*, etc. Las bacteriocinas, diacetilo y peróxido de hidrógeno producidos por algunas cepas de BAL son antibacterianos con actividad bactericida y/o bacteriostática que contribuyen a la inhibición de bacterias responsables del deterioro de alimentos y/o patógenas sin cambiar la naturaleza físico-química de los alimentos (Anderson, 1988; Bacus y Brown, 1981; Bello y Durán 1992, Gilliland y Speck, 1975; Harris *et al.* 1989; Schiffner, 1978; Daeschel 1989; Guerrero, 1989; Klaenhammer, 1988; Lewus y Montville, 1991; Mottagh, *et al.* 1991; Smulders, 1986 y Montville y Winkowski, 1997).

La naturaleza fermentativa de las BAL es también de considerable interés académico ya que son excelentes sistemas modelo para el estudio de la transducción de energía, transporte de soluto y biología de la membrana (Kashket, 1987; Konings *et al.* 1989; Maloney, 1990; Axelsson, 1993).

1.2.. Género *Pediococcus*

El Manual Bergey's (1986) y Riebel y Washington, (1990) describen a los *Pediococcus* como un grupo de bacterias Gram-positivas, inmóviles, no encapsuladas, homofermentativas, anaerobios facultativos, cuyas células esféricas forman principalmente tétradas, aunque también se les encuentra formando pares. Son catalasa negativos, no forman indol, la mayoría no reducen nitratos, no hidrolizan hipurato de sodio y no son patógenos a plantas ni animales. Las colonias varían en tamaño de 1-2.5 mm de diámetro, son lisas redondas, de color blanco grisáceo. Todas las especies crecen a 30°C, pero las temperaturas óptimas se encuentran entre 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 y la glucosa es fermentada por la ruta Embden-Meyerhoff a D(+) ó L(-)-lactato, sin formación de gas.

Existen siete diferentes especies de *Pediococcus* identificadas:

- | | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1. <i>Pediococcus acidilactici</i> | 4. <i>Pediococcus inopinatus</i> | 7. <i>Pediococcus urinaequi</i> |
| 2. <i>Pediococcus damnosus</i> | 5. <i>Pediococcus parvulus</i> | |
| 3. <i>Pediococcus dextranicus</i> | 6. <i>Pediococcus pentosaceus</i> | |

Las cuales pueden ser agrupadas de acuerdo con su sensibilidad a la temperatura, pH y NaCl, como se observa en la Tabla No 2.

Tabla No 2
Condiciones diferenciales de crecimiento de las especies del Género *Pediococcus*

características	<i>acidil.</i>	<i>damnosus</i>	<i>dextranicus</i>	<i>inopinatus</i>	<i>parvulus</i>	<i>pentosaceus</i>	<i>urinaequi</i>
Crecimiento a							
35°C	+	-	+	+	+	+	+
40°C	+	-	+	-	-	+	+
50°C	+	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a							
pH 4.2	+	+	-	-	-	+	-
pH 7.5	+	-	+	d	+	+	+
pH 8.5	d	-	-	-	-	d	+
Crecimiento en							
4% NaCl	+	-	+	+	+	+	+
6.5% NaCl	+	-	-	d	+	+	+
18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Manual Bergey's, 1986.

1.2.1. *Pediococcus acidilactici*

Pediococcus acidilactici crece en forma óptima a 30°C, con un máximo tolerable a los 52°C, se destruye por calentamiento a los 70°C por 10 minutos. Produce ácido láctico a partir de glucosa, galactosa, arabinosa, maltosa, manitol y dextrinas; algunas cepas lo producen también a partir de sacarosa y lactosa. Sus características primarias y secundarias se muestran en la Tabla No 3.

Tabla No 3
Características primarias y secundarias de *P. acidilactici*

Gram	(+)	cloruro férrico	(+)
reducción de nitratos	(-)	proteólisis de suero	(-)
licuefacción de la gelatina	(-)	producción de gas a partir de la 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%	(+)	fructosa 1%	(+)
glucosa 1%	(+)	dulcitol 1%	(-)
arabinosa 3%	(-)	sorbitol 1%	(-)
almidón soluble 2%	(+)	adonitol 1%	(-)
dextrina 2%	(+)	xilosa 1%	(-)
ramnosa 1%	(-)	melobiosa 0.5%	(+)

Fuente: Axelsson, 1993; Manual Bergey's, 1986; Schiffner, 1978.

Riebel (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 (Manual Bergey's, 1986).

El método API (Analytical Profile Index, Alalylab Products, Planview, N. Y.) permite una rápida identificación de las especies y niveles de biotipos de *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus*

pentosaceus. Las propiedades de estas especies incluyen reacciones positivas para las pruebas de Voges-Proskauer, 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 (1990) menciona que hay respuestas variables y no concluye nada al respecto.

1.2.2. Usos y Aplicaciones

El primer cultivo iniciador de *Pediococcus acidilactici* para la conservación de embutidos se utilizó en 1957. Este se conocía con anterioridad como *Pediococcus cerevisiae* pero estudios subsiguientes lo reclasificaron como tal (Manual Bergey's 1986).

Bello y Durán (1992), utilizaron *Pediococcus acidilactici* en la elaboración de salami, y demostraron que los productos elaborados con *P. acidilactici* tenían mejores características sensoriales (textura, color, aroma) y sanitarias durante la maduración-fermentación, que aquellos lotes a los que no se adicionó el iniciador. Por otro lado se ha reportado que *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* y *P. acidophilus* presentan gran resistencia a la liofilización y un crecimiento rápido en sustratos cárnicos, aspectos que favorecen su uso como cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos (Bacus, 1981; Bello y Durán, 1992 y Mottagh, 1991).

1.3. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias antibacterianas producidas por gran diversidad de especies bacterianas. El significado original del término bacteriocina contempla características comunes a las colicinas. Las bacteriocinas forman un grupo heterogéneo de moléculas de origen proteico que ejercen acción bactericida sobre bacterias susceptibles. Su clasificación inicial se hizo por su espectro y modo de acción antibacteriana, propiedades químicas y adsorción a receptores específicos de la membrana. Últimamente se incluyen, además, como criterios secundarios para

clasificarlas, los receptores específicos de células sensibles y los plásmidos ligados a su producción e inmunidad (Tagg *et al.* 1976; Daeschel, 1989).

Tagg *et al.* (1976) reconocieron las diferencias entre las colicinas y las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas. En la actualidad la mayoría de los péptidos o proteínas bactericidas producidas por bacterias son llamadas bacteriocinas. La producción de muchas de las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas presenta títulos de actividad muy bajos y es necesario purificarlas a partir de grandes volúmenes de cultivo. Algunas bacteriocinas requieren de medios sólidos para su producción y su recuperación se hace del agar.

Estos mismos autores sugieren siete elementos para caracterizar las proteínas antibacterianas producidas por microorganismos Gram-positivos:

1. - Son proteínas y esto es demostrado por su pérdida de actividad al adicionar proteasas en el medio que las contienen (Montville y Kaiser, 1993).
2. - Son bactericidas. Se sabe que muchas bacteriocinas caracterizadas como bactericidas en sistemas modelo han demostrado ser bacteriostáticos al aplicarse en alimentos (Nielsen, *et al.* 1990; Pucci *et al.* 1988).
3. - Las bacteriocinas tienen sitios específicos de unión, por lo que muestran especificidad contra ciertos patógenos, característica que puede ser usada para diferenciarlas de otro espectro de antibacterianos, tales como ácidos orgánicos y la mayoría de antibióticos en general (Montville y Kaiser, 1993).
4. - Muchas bacteriocinas son codificadas por plásmidos. Esto ha sido demostrado para *Pediococcus pentosaceus*. (Daeschel y Klaenhammer, 1985); *Lactobacillus acidophilus* (Muriana y Klaenhammer, 1987) y *Pediococcus acidilactici* (Ray y Hoover, 1993).
5. - Décadas de investigación en antibióticos indican que las bacteriocinas son producidas durante la fase de crecimiento sin la lisis del organismo productor (Lewus y Montville, 1991; Lewus y Kaiser, 1991)
6. - El último elemento sugiere que las bacteriocinas son activas contra un amplio espectro de bacterias cercanamente relacionadas, así muchas bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas, son efectivas contra muchos géneros de bacterias Gram-positivas (Montville y Kaiser, 1993).

7. - Aunque algunos estudios sobre proteínas antibacterianas producidas por BAL, frecuentemente citan estos elementos, no deben ser inflexibles para microorganismos Gram-positivos, ya que pocas proteínas antimicrobianas podrían caracterizarse bajo los siete elementos (Montville y Kaiser, 1993).

Hoover (1993) encontró que generalmente la producción de bacteriocinas es mayor a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa productora.

Es claro que pocas bacteriocinas de BAL poseían todos estos criterios, por lo que se propuso que sólo aquellas que tenían todas las características serían designadas como bacteriocinas y que se utilizara la denominación de "Sustancias inhibitorias similares a las bacteriocinas" (BLIS por sus siglas en inglés) para designar otras proteínas antimicrobianas. Ésto obedeció a otro propósito, ya que al menos cinco ejemplos de bacteriocinas aisladas independientemente y nombradas por diferentes investigadores, fueron idénticas en su secuencia de aminoácidos. Para prevenir esta confusión Jack *et al.* (1995) propusieron designar provisionalmente "proteína BLIS" a las producidas por nuevas cepas y asignar nombre a nuevas bacteriocinas sólo cuando la secuencia de aminoácidos indicara que la bacteriocina fuese única.

Klaenhammer (1988 y 1993) y Nettles y Barefoot (1993) señalan que las bacteriocinas difieren en su espectro de actividad, características bioquímicas y determinantes genéticos. La mayoría de las bacteriocinas son pequeñas (3 a 10 kDa), tienen un punto isoeléctrico básico y contienen ambos dominios, hidrofílico e hidrofóbico.

Klaenhammer (1993) clasificó a las bacteriocinas en cuatro grandes grupos (I, II, III y IV). Esta agrupación proporciona conceptos de trabajo útiles para los investigadores de bacteriocinas.

Grupo I. Las Bacteriocinas de este grupo contienen los aminoácidos poco comunes dehidroalanina (DHA), dehidrobutirina (DHB), lantionina y β -metilantionina (Figura No 1) en donde se muestran las posiciones de dehidroalanina (DHA), dehidrobutirina (DHB), lantionina (Ala-S-Ala), y metil lantionina (ABA-S-Ala), ácido amino butírico (ABA*) y configuración D-estereo para el carbono α .

Estos aminoácidos son producidos por modificación post-traduccional de la serina y treonina a sus formas dehidro. Los dehidroaminoácidos reaccionan con cisteína para formar (sulfhidrilo solo) anillos lantionina tioeter. Las bacteriocinas que contienen estos anillos son referidos comúnmente como *lantibióticos*. Existen muchos lantibióticos estructuralmente similares. La nisina, la primera y mejor bacteriocina de BAL caracterizada, es producida en dos formas relacionadas. La nisina A contiene una histidina en la posición 27, donde la Nisina Z tiene una asparagina. Mientras la subtilina, producida por *Bacillus subtilis*, también contiene cinco anillos de lantionina y una conformación similar a la Nisina, además de que tiene otra sustitución de aminoácidos, incluyendo un carboxi terminal en dos aminoácidos cortos mas que la nisina como se aprecia en la Figura No 1.

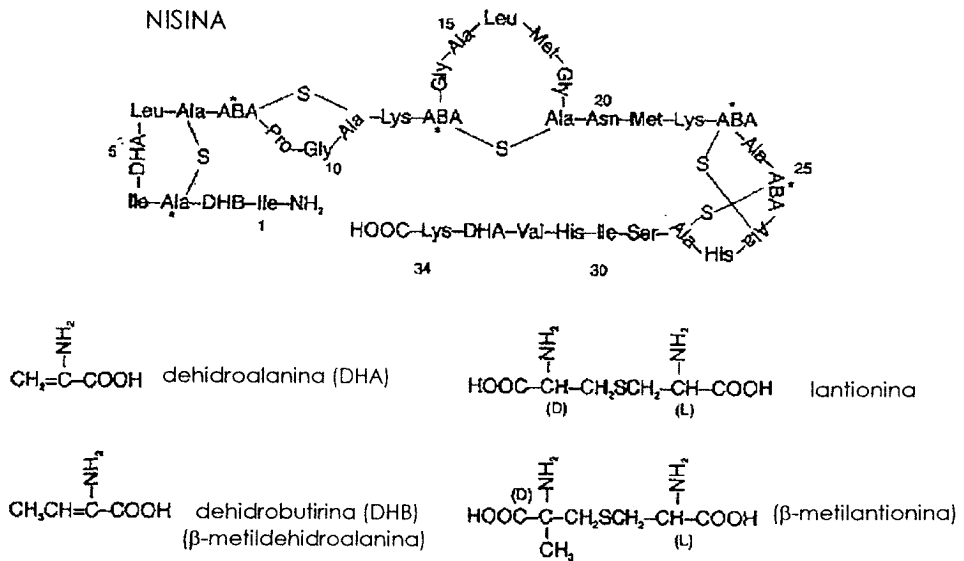


Figura No 1. Estructura de la nisina
Fuente: Montville y Winkowsk, 1997.

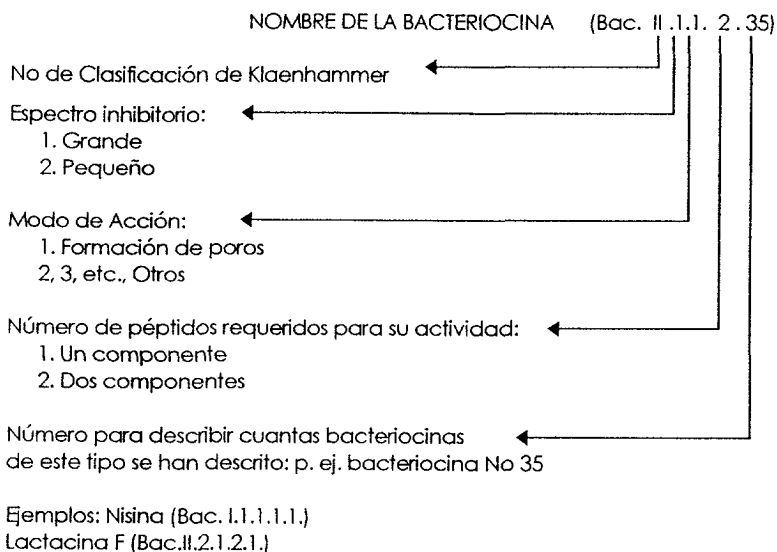
La lactacina 481, lactococcina, lactocina S y carnocina son otros lantibióticos producidos por BAL.

Grupo II. Muchas bacteriocinas están en esta categoría y son un gran grupo de pequeñas proteínas termoestables que contienen Gly-Gly¹-Xaa⁺¹, sitio de corte importante para procesar la bacteriocina durante su exportación. El Grupo II se divide en tres grupos: bacteriocinas activas contra *L. monocytogenes*, que tienen una secuencia terminal de aminoácidos clasificados en el subgrupo IIa -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. La pediocina PA-1 (cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a la pediocina AcH), sakacinas A y P, leucocina A, bavaricina MN y curvacina A son miembros de este subgrupo. El subgrupo IIb contiene bacteriocinas como lactococcina G, lactococcina M y lactacina F, que requiere dos diferentes péptidos para su actividad. Las bacteriocinas del subgrupo IIc, como lactacina B, requiere cisteínas reducidas para su actividad.

Grupo III y IV. Estas bacteriocinas difieren marcadamente de otras bacteriocinas. Las mayores proteínas antimicrobianas termolábiles (>30 kDa) como las helveticinas J y V y lactacinas A y B, que están clasificadas en el Grupo III de bacteriocinas. Las Bacteriocinas del Grupo IV como leuconocina S, lactocina 27 y pediocina SJ-1 tienen una fracción de lípido o carbohidrato. La composición y función de estas porciones no proteicas son desconocidas (Jack *et al.* 1995; Montville y Winkowski, 1997).

Los sistemas de clasificación de bacteriocinas todavía están evolucionando. Klaenhammer (1995) agrupó e incorporó a las bacteriocinas en un sistema numérico análogo al sistema de numeración de las enzimas (Tabla No 4).

Tabla No 4
Sistema numérico propuesto para la nomenclatura de bacteriocinas



Fuente: Klaenhammer T.R. *Taller de Bacteriocinas de BAL- Aplicaciones y Fundamentos*, 1995

Jack *et al.* (1995) presentaron un sistema de nomenclatura alternativa, que está basada en la química de los sulfhidrilo. Así como las bacteriocinas que contienen anillos de lantionina se llaman lantibióticos, los que contienen enlaces disulfuro se llamarían cistibióticos y los que contienen sulfhidrilos reducidos, tiobióticos. La investigación en bacteriocinas es muy dinámica y pasará tiempo antes de que se tenga un sistema de nomenclatura definitivo.

1.3.1. Bacteriocinas de BAL

Las bacteriocinas producidas por BAL son un grupo relativamente heterogéneo de pequeñas proteínas sintetizadas ribosomalmente. Las bacteriocinas actúan contra bacterias "cercanamente

relacionadas" (amplio rango de Bacterias Gram-positivas), pero no contra los organismos productores. En los últimos años, el interés en el desarrollo de las bacteriocinas como conservador en alimentos se ha incrementado debido a dos aspectos:

1. La autorización en 1988 por parte de la Administración de Drogas y Medicamentos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (FDA-USDA), para usar la nisina (bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*) como conservador en quesos pasteurizados untables, abriendo la puerta a la aplicación potencial de bacteriocinas en alimentos en los Estados Unidos.
2. Otro factor que contribuyó a este interés en las bacteriocinas es el aumento en la incidencia de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria.

Algunas bacteriocinas como la nisina y aquellas producidas por especies del género *Pediococcus* y *Lactobacillus* parecen antagonistas contra *L. monocytogenes*, que es más difícil de destruir por otros métodos, ya que es resistente a la acidez, temperatura elevada y otros antimicrobianos (Montville y Winkowski, 1997).

La producción de bacteriocinas de cultivos lácticos agiliza el proceso regulatorio y facilita la aprobación de su uso en alimentos debido a que las BAL tienen una categoría GRAS (generally regarded as safe) y a que son inhibidores naturales que parecen altamente atractivos contra problemas de origen bacteriano. Debido a la importancia del uso potencial que tienen las bacteriocinas en alimentos se ha desarrollado gran cantidad de investigación con los diversos géneros de BAL, con el fin de establecer la producción de estos compuestos, analizar su actividad antibacteriana, su modo de acción, espectro de actividad, caracterización, etc., para que mediante técnicas de aislamiento y purificación se pueda considerar su aplicación en alimentos, siempre y cuando se cumplan los requerimientos para su uso establecidos en la Tabla No 5 (Daeschel, 1989; Foegeding, 1992; Harris, 1989; Hoover, 1989; Hoover, 1993; Montville y Kaiser, 1993; Mottagh, 1992; Nielsen, 1990; Pucci, 1988).

Tabla No 5
Requerimientos para el uso de sustancias antimicrobianas
presentes naturalmente como conservadores alimentarios.

- En cuanto a aspectos toxicológicos debe ser aceptable por 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.

A continuación se enlistan algunas de las bacteriocinas identificadas en los diferentes géneros de BAL y las especies que las producen:

- **Lactococcus:** *Lactococcus lactis* (nisina, diplococcina, lactostrepcina 1,2, 3, 4 , 5 y bacteriocina S50 de lactococos).
 - **Pediococcus:** *P. pentosaceus*. FBB61 y L7230 (pediocinas), *P. cereviceae* FBB63 (pediocina), *P. acidilactici* (pediocina PA-1), *P. acidilactici* PO2 B5627 (pediocina PO2), *P. pentosaceus* MC-03 (pediocina), *P. acidilactici* (pediocina PAC 1.0), *P. acidilactici* (pediocina Ach), *P. acidilactici* (pediocinas E,F y H)
 - **Lactobacillus:** *L. acidophilus* (lactocidina, acidolina y acidophilina); *L. acidophilus* (lactacina B y F), *L. helveticus* (lactocina 27 y helveticina J), *L. fermenti* 466 (bacteriocina), *L. plantarum* (lactolina), plantaricina SIK-83), *L. plantarum* C-11 (plantaricina A), *L. sake* Lb 706 (sakacina A), *L. sake* L 45 (lactocina S), *Lactobacillus fermentum* (fermenticina B).
 - **Leuconostoc:** *L. paramesenteroides* (leuconocina S)
 - **Camobacterium:** *C. piscicola* LV17UI 49 (carnocina)
 - **Propionibacterium:** *P. thoenii* P 127 (propionicina PLG-1), *P. jensenii* P 126 (jensenina)
- (Bhunia et al. 1987; 1988; Daeschel, 1989; Foegeding, 1992; Hoover, 1993; Klaenhammer, 1988; Motlagh, 1992; Pucci, 1988; Ray, 1993).

Actualmente sólo la nisina está aprobada para su uso como conservador en los Estados Unidos., ya que sólo en ella se ha encontrado el criterio de efectividad de compuesto antimicrobiano solicitado por la FDA para uso en alimentos. No se tiene conocimiento de investigación toxicológica de cualquier otra bacteriocina para uso en alimentos, aunque obviamente se requiere hacer mas investigación al respecto de otras bacteriocinas de BAL. Los cultivos de BAL productores de bacteriocinas pueden ser adicionados a los alimentos y la literatura contiene numerosos ejemplos de diferentes productos alimenticios en los que se ha evaluado la aplicación de bacteriocinas y resulta en el efecto antimicrobiano deseado. Por ejemplo:

- El uso de fermentaciones lácticas, naturales aceleradas, en el que se busca un control sanitario con la inhibición de *Salmonella spp*, *Shigella*, *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, etc. (Bacus y Brown, 1981; Bello y Durán, 1992; Daeschel, 1989; Foegeding *et al.* 1992; Lewus y Kaiser, 1991; Nielsen *et al.* 1990).
- Se han utilizado cultivos de cepas solas o mezcladas de *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, para inhibir coliformes en leche (Harris *et al.* 1989).
- Se ha examinado el potencial de controlar bacterias heterofermentativas con cultivos iniciadores de bacterias homofermentativas (Hoover *et al.* 1993).
- Se ha investigado la actividad antibacteriana de BAL aisladas de carnes empacadas a vacío contra bacterias que son causantes de la descomposición de estos productos (Ahn y Stiles 1990).

Se registra gran cantidad de investigación de actividad de bacteriocina contra *L. monocytogenes* y *S. aureus* comparando las habilidades conservadoras de las bacteriocinas ACh, nisina y sakacina A para cuatro aditivos comerciales, Nisaplin (conservador basado en nisina), lactato de sodio, diacetilo, etc., encontrando efectiva la preparación de bacteriocina, contra *Listeria* pero no contra bacterias Gram-negativas; el lactato de sodio y el diacetilo demostraron alguna inhibición contra otras bacterias Gram-negativas examinadas, pero no contra la *Listeria*. En estos ejemplos se resalta la gran variedad de aplicaciones y productos que están siendo investigadas para analizar el efecto antimicrobiano y conservador de las bacteriocinas. La aplicación de las bacteriocinas puras puede ser otra forma de aplicación en alimentos, que por

ahora es privativa de la nisina (Bhunia *et al.* 1987; 1988; Daeschel, 1989; Foegeding, 1992; Hoover, 1993; Klaenhammer, 1988; Motlagh, 1992; Pucci, 1988; Ray, 1993).

1.3.1.1. Modo de acción

Con la posible excepción de la lactocina 27, las bacteriocinas de BAL son bactericidas, no bacteriostáticas, y es importante reconocer los receptores específicos de la membrana de las células sensibles a los cuales se adsorben. De este modo la nisina actúa como un detergente o tensoactivo catiónico que se adsorbe a la membrana de la célula, seguido de la inactivación de los grupos sulfhidrilo, disipando la fuerza protón motriz basal demostrado en *L. monocytogenes*, posiblemente otras bacteriocinas de BAL actúen de manera similar a la nisina, aunque no se tiene conocimiento de ello para confirmarlo (Hoover, 1993).

Una de las hipótesis sobre el modo de acción de las colicinas es que interrumpen los cambios conformacionales en las unidades repetitivas secuencialmente propagadas de protómero de la membrana, provocando lesiones bioquímicas o ruptura de estructuras. En muchos casos, las células sensibles expuestas a la acción de bacteriocinas, pueden ser rescatadas por tratamiento con enzimas proteolíticas. Para bacterias Gram-positivas las lesiones pueden envolver producción de energía, síntesis de macromoléculas o transporte y permeabilidad en membrana (Tagg *et al.* 1976). Estos pueden disparar entonces problemas metabólicos secundarios. Pucci *et al.* (1988) demostraron lisis de *L. monocytogenes* después de estar expuesta a bacteriocina en polvo derivada de *P. acidilactici*.

El tratamiento de células sensibles con diplococcina resultó en un cese inmediato de la síntesis de DNA y RNA y muerte sin lisis (Davey, 1981). La lactostrepcina LAS 5 inmediatamente bloquea la síntesis de DNA, RNA y proteínas, aunque esto se deba probablemente a una reacción secundaria a severa ruptura de la membrana y pérdida de constituyentes intracelulares (Zajdel *et al.* 1985).

Tagg *et al.* (1976) indican que deben realizarse pruebas cualitativas y cuantitativas de actividad de bacteriocina sobre cepas indicadoras antes de definir una bacteriocina como bactericida o bacteriostático.

1.3.2. Bacteriocinas de *Pediococcus*

Anteriormente se indicó que se han identificado algunas pediocinas del género *Pediococcus*:

- pediocina de *P. cerevisiae* FBB63 (Graham y McKay, 1983)
- pediocina de *P. pentosaceus*, FBB61 y L-7230 (Daeschel y Klaenhammer, 1985)
- pediocina PA-1 de *P. acidilactici* PAC 1.0 (NRRL B-5627) (Marugg *et al.*, 1992; González y Kunka, 1986; 1987; Pucci, 1988)
- pediocina de *P. acidilactici* PO₂ (Hoover *et al.* 1989)
- pediocina Ach de *P. acidilactici* (Bhunia *et al.* 1987, 1988, 1990, Yang *et al.* 1992)

de las cuales se mencionan a continuación aspectos importantes de su espectro de actividad y caracterización (Ray y Hoover 1993).

Se ha demostrado frecuentemente que la biosíntesis de bacteriocinas de *Pediococcus* está asociada con plásmidos. Las cepas FBB-61 y L-7230 de *P. pentosaceus* producen pediocina A, la cual es activa contra otras BAL y también contra *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus aureus*, micrococos y bacilos, en pruebas de inhibición en agar. No tuvo efecto contra bacterias Gram-negativas o levaduras. Su inmunidad y producción fueron asociadas con la presencia de un plásmido de 13.6 MDa demostrado por electroforesis en geles de agarosa.

Los plásmidos de *Pediococcus* fueron primero estudiados por González y Kunka en 1983. La utilización de rafinosa y la actividad de α -galactosidasa y sacarosa-hidrolasa fueron ligadas a plásmidos en *P. pentosaceus* (González y Kunka, 1986). La caracterización de *P. acidilactici* PAC 1.0 (NRRL B-5627) reveló la presencia de una bacteriocina designada pediocina PA-1, asociada con un plásmido de 6.2 MDa. Parcialmente purificada la PA-1 no fue activa contra *Micrococcus*

varians, *M. sodonensis*, *Staphylococcus xylosus*, *S. epidermidis*, *S. carnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. lactis* y *Lb. bulgaricus*. La PA-1 de aproximadamente 16,500 Da, fue termoestable (100°C/10 min) sensible a proteasas (papaina, pepsina y α -quimotripsina) y a la actividad de lipasa, lisozima, DNAsa y RNAsa. La mayor estabilidad fue a pH 4-7. Para ser utilizado en alimentos la PA-1, se preparó un liofilizado de sobrenadante de cultivo de PAC 1.0 suplementado con 10% de leche descremada en polvo, y se demostró la inhibición de *Listeria monocytogenes* LMO1 en lácteos a pH 5.5-7.0 tanto a 4° como a 32°C (González y Kunka, 1987).

La pediocina Ach producida por *Pediococcus acidilactici* Ach es de bajo peso molecular (6.2 MDa) y está asociada al plásmido pSRQ11. No es inmunogénica, ni tóxica en animales de laboratorio y por su actividad antibacteriana ya indicada puede ser considerada como conservador para alimentos. (González y Kunka, 1987).

Daeschel y Klaenhammer (1985) señalaron la importancia de las BAL utilizadas como cultivos iniciadores, que además son productores de bacteriocinas contra microorganismos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos (embutidos fermentados), especialmente *S. aureus*. La pediocina A de *P. pentosaceus* ayuda en fermentaciones en las cuales hay competencia con otras BAL que son flora nativa inhibiéndolas.

1.4. Métodos de investigación de bacteriocinas

Cuando se está investigando la síntesis de bacteriocinas de BAL se debe siempre estar consciente de la presencia de cantidades relativamente altas de ácidos orgánicos. Existen diferentes métodos de laboratorio para detectar antagonismo ligado a bacteriocinas, contestando preguntas tales como:

- ¿Se trata de una prueba directa o indirecta?
- ¿Cuál es el efecto del pH del medio, capacidad amortiguadora, contenido de nutrientes, potencial redox o capacidad de unir proteínas? .
- ¿Cómo se manejó el cultivo productor y la cepa indicadora?

- ¿Cuánto tiempo se incubó la prueba?.
- ¿La bacteriocina es inducible?.
- ¿Es importante la densidad celular?.
- ¿La bacteriocina difunde libremente?.
- ¿La bacteriocina es termoestable o es sensible a la degradación de enzimas proteolíticas comunes?.
- ¿Cómo se expresó cuantitativamente la actividad de bacteriocina, por unidades, por zonas o por densidad óptica? (Hoover, 1993).

Los métodos utilizados para evaluar la eficacia antimicrobiana están afectados por factores que pueden influir en su actividad aparente. Entre los más importantes están el microorganismo de prueba, el agente antimicrobiano a identificar, así como el medio y el procedimiento de prueba, que, en sí mismos, pueden alterar los resultados de tal modo que un compuesto ineficaz es juzgado como efectivo o viceversa. Además un compuesto puede ser efectivo bajo las condiciones usadas para la prueba y no demostrar actividad importante en alimentos de interés, bajo condiciones prácticas. Es deseable, aunque poco práctico, controlar todas las variables que podrían influir en los resultados de la prueba, por lo que es necesario identificar y cuantificar los factores capaces de afectar los resultados. Uno de los más importantes es la naturaleza del microorganismo de prueba, ya que las cepas individuales de una especie demuestran con frecuencia genotipo y fenotipo diferentes de los de la cepa tipo. Los microorganismos seleccionados para usar en una prueba de antimicrobiano reflejarían el comportamiento de la microflora de los alimentos susceptibles a ellos (Parish y Davidson, 1993).

Piddock (1990), estableció que el tamaño y estado fisiológico del inóculo son críticos y deben estar bien controlados y enfatizó la importancia que tiene el tamaño del inóculo en las pruebas de susceptibilidad a antibióticos en las pruebas de dilución en caldo y en agar. Los inóculos tanto concentrados como diluidos pueden resultar en falsa resistencia o falsa sensibilidad, respectivamente. Se requiere más investigación para determinar la concentración celular adecuada para usar en compuestos antimicrobianos relacionados con alimentos. La fisiología de la célula puede afectar también las pruebas de antimicrobianos. Se asume que las células vegetativas en fase logarítmica son más sensibles al estrés ambiental, causado por factores

antimicrobianos (químicos, calor, actividad de agua, congelación y otros), que cuando están en fase estacionaria o esporas. La fisiología puede jugar de hecho un papel determinante en la sensibilidad o resistencia de la célula, aunque el efecto de la fase de crecimiento microbiano sobre la susceptibilidad al antimicrobiano en alimentos no está bien definido.

Los factores inherentes al medio y método de prueba, tienen efectos definidos sobre la respuesta de sensibilidad o resistencia (Davidson y Parish, 1989).

Los métodos usados para evaluar la actividad de antimicrobianos en alimentos se pueden dividir en in vitro llamadas también pruebas discriminativas, incluyen cualquier prueba en que el compuesto no es aplicado directamente al producto bajo condiciones de uso, y pruebas de aplicación, son aquellas en que el antimicrobiano es aplicado directamente a un alimento, para determinar su efecto sobre la microflora natural o sobre un microorganismo inoculado (Davidson y Parish, 1989; Parish y Davidson, 1993).

Las pruebas discriminativas pueden ser subdivididas en pruebas de punto final y descriptivas. Las pruebas de punto final son aquéllas en que un microorganismo es probado por un período arbitrario y los resultados reflejan el poder inhibitorio de un compuesto solo por un tiempo especificado a través de: pruebas de difusión en agar, dilución en agar y caldo, placas con gradientes y pruebas de desinfectantes y sanitizantes. Estos métodos pueden proporcionar solo información preliminar para determinar el uso potencial del compuesto de prueba. En las pruebas descriptivas, se realiza un muestreo periódico para determinar los cambios en el número de células viables con respecto a un tiempo determinado por pruebas turbidimétricas y curvas de inhibición o muerte (Davidson y Parish, 1989; Parish y Davidson, 1993).

El método de difusión en agar ha sido probablemente el mas usado para la determinación de actividad antimicrobiana a través del tiempo, ha sido aceptado por la FDA-USDA y es un método estándar aceptado por la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). En esta prueba, el compuesto antimicrobiano se adiciona a una placa de agar sobre un disco de papel o en un pozo en el agar. El compuesto difunde a través del agar y resulta un gradiente de concentración que es inversamente proporcional a la distancia del disco o pozo. El grado de

inhibición es indicado por una zona de no crecimiento alrededor del disco o pozo, la susceptibilidad de los microorganismo de prueba es relacionada con las zonas de inhibición (en mm), lo que depende de la velocidad de difusión del compuesto y del crecimiento celular. Los resultados que se obtienen son cualitativos. El antimicrobiano evaluado no deberá ser altamente hidrofóbico, ya que no difundirá o lo hará muy poco y no se podrá detectar la inhibición (Barry, 1986; NCCLS, 1991; Piddock, 1990)

Como microorganismo de prueba en las pruebas de susceptibilidad de antimicrobianos se sugieren aquéllos de crecimiento rápido, como los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, especies de *Staphylococcus* y *Enterococcus*. Se han adaptado otras bacterias como *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Haemophilus* y *Neisseria* (Thornsberry, 1991). En las pruebas de actividad de bacteriocina, se prefieren bacterias Gram-positivas cercanamente relacionadas, reconociendo que las cepas que crecen lento producen largas zonas de inhibición y viceversa (Piddock, 1990). Bhunia *et al.* (1987 y 1988) utilizaron *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium perfringens* como cepas indicadoras de actividad de pediocina AcH de *Pediococcus acidilactici*.

Se tiene información sobre la efectividad de antimicrobianos derivados biológicamente, en primera instancia de bacteriocinas producidas por BAL. Varios métodos relacionados al de difusión en agar están disponibles para determinar la actividad de estos compuestos, incluyendo el de Kekessy and Piguet (1970), (flip-streak y/o flip-spot, minimizan los efectos de ácidos y bacteriófagos, ya que las cepas productora e indicadora están separadas por una capa de agar).

En estudios (spot on-lawn) de Harris *et al.* (1989) y Lewus y Montville (1991), se demostraron gran número de resultados falsos negativos en los ensayos de difusión en agar usando pozos. Los métodos mas comunes para demostrar actividad antibacteriana son los de difusión en disco o en penicilindros en cajas de Petri con agar, la mayoría de las variaciones deriva del de Harris *et al.* (1989) para bacteriocinas, la cual incluye el uso de una sobrecapa de agar a menor concentración de la capa base.

Las pruebas de dilución en agar y caldo se usan generalmente cuando se desean datos cuantitativos para determinar cuando un antimicrobiano es letal para el microorganismo de prueba, microorganismo con velocidad de crecimiento variable y microorganismo anaeróbicos o microaerofílicos. Estos métodos ofrecen al microbiólogo en alimentos gran flexibilidad en la determinación sobre el crecimiento de un microorganismo en la presencia de un antimicrobiano conocido. En ambos métodos se genera un estadístico conocido como la concentración mínima inhibitoria (MIC), que es definida como la concentración mas baja de un antimicrobiano que previene el crecimiento de un microorganismo después de un período de incubación especificado (Barry, 1986; Sahm y John, 1991).

En el método de dilución en agar se preparan diversos agares no selectivos y una sola concentración de antimicrobiano es adicionada a cada placa, lo que permite probar gran número de cepas de una sola vez. El rango de concentración usado se determina por ensayo y error y solo una especie de microorganismo puede ser usada en cada placa. Se prepara una placa control sin antimicrobiano y se inocula para tener un crecimiento control del microorganismo. Las placas son incubadas a la temperatura óptima del microorganismo por 16-24 horas (NCCLS, 1991). Para algunos microorganismo patógenos puede ser deseable incubar por períodos de tiempo mas prolongados bajo condiciones de estrés ambiental.

La MIC es considerada la concentración mas baja que inhibe completamente el crecimiento de microorganismo (el crecimiento de una sola colonia, o el no crecimiento indican un resultado negativo). Son muchas las ventajas del método de dilución en agar, incluyendo la posibilidad de probar gran número de cepas de una sola vez y que la contaminación es fácilmente detectada o que el medio puede contener material opaco (Barry,1986).

En la prueba de dilución en caldo se diluye un antimicrobiano seriadamente y una sola concentración se adiciona a un tubo de cultivo un caldo no selectivo. Las concentraciones son seleccionadas en la misma manera como el método de dilución en agar. Los tubos son inoculados con aproximadamente 5.7 log de UFC/ml del microorganismo de prueba (Pidcock, 1990 y NCCLS, 1991). Al igual que con la prueba de dilución en agar, se adiciona un tubo control sin antimicrobiano, los tubos son incubados por 16-24 horas a la temperatura óptima del

microorganismo de prueba. El tiempo de incubación puede ser ajustado dependiendo de las condiciones ambientales que se están evaluando. La MIC es definida como la concentración mas baja a la cual no ocurre crecimiento (ausencia de turbidez) en un medio nutritivo seguido de incubación.

La prueba de dilución en caldo puede utilizarse para determinar la letalidad del microorganismo de prueba. La concentración mas baja que produce >99.9% de muerte del microorganismo de prueba es designada como la concentración mínima bactericida (MBC) o concentración mínima letal (MLC). Los puntos críticos de control para la estandarización de la prueba son: el tipo de medio, pH, soluciones stock, rango de concentración, densidad del inóculo y condiciones de incubación. Los métodos de punto final son excelentes para investigar compuestos antibacterianos, pero dan poca información concerniente al efecto del compuesto, sobre el crecimiento dinámico del microorganismo. En alimentos es importante conocer la concentración mínima antimicrobiana necesaria para causar la inhibición potencial del microorganismo patógeno o de deterioro. Una vez que se ha determinado la MIC de un microorganismo es importante observar el crecimiento del microorganismo respecto al tiempo.

Existen varios métodos descriptivos para esto, sin embargo dos de los mas utilizados son la prueba turbidimétrica y la curva de inhibición o muerte con el procedimiento de conteo de microorganismos, conocidas como curvas de "tiempo de muerte" (NCCLS, 1991).

La prueba turbidimétrica. Es la prueba mas simple y económica que mide el efecto de un compuesto con actividad antimicrobiana en el crecimiento de microorganismos, ya que determina la efectividad de un antimicrobiano al medir el incremento en turbidez con respecto al tiempo con un espectrofotómetro y se pueden ver diferentes tipos de inhibición en el microorganismo indicador: incremento en la extensión de la fase lag de las células tratadas, supresión de la fase estacionaria, disminución en la velocidad de crecimiento en la fase log, reflejándose esto en una supresión del nivel de crecimiento total, comparado con un control. Uno de los problemas con los análisis turbidimétricos es el rango de detección, ya que el espectrofotómetro requiere de 6-7 log UFC/ml, que de no ser así se genera una situación aparente de no crecimiento, al no detectar el

umento en la absorbancia, interpretándose erróneamente como letalidad (Davidson y Parish, 1989).

La curva de inhibición o muerte, debe acompañar a las pruebas turbidimétricas. Incluye la inoculación de un microorganismo en un medio adicionado con un antimicrobiano, seguida de un período de incubación y de un muestreo periódico para determinar sobrevivencia o crecimiento en UFC/ml. Esta prueba es mas segura que la turbidimétrica, debido a su amplio rango de detección. Algunos resultados son fáciles de interpretar, otros no. Puede detectarse el nivel de supresión de crecimiento denominado como porcentaje de inhibición del crecimiento, observándose un incremento en la fase lag, una disminución en la velocidad de crecimiento con poco efecto en la fase lag y/o un efecto letal o curva de tiempo de muerte, sólo esta prueba puede mostrar este efecto. Siguiendo la prueba de un antimicrobiano en que ocurre la letalidad, frecuentemente un porcentaje muy pequeño de la población original permanece viable. Esta población que generalmente permanece estática por un período de tiempo, bajo condiciones ideales de crecimiento, comienza a incrementar su concentración celular.

Para sintetizar , en el uso de métodos *in vitro* se recomienda sean utilizados juntos uno de punto final y uno descriptivo. El método de punto final ayudaría a determinar la concentración efectiva aproximada y el descriptivo a evaluar el efecto de un compuesto sobre la inhibición o muerte de un microorganismo indicador con respecto al tiempo.

1.5. Cultivo de BAL y producción de bacteriocinas.

Factores como el pH, actividad de agua, presión parcial de oxígeno, concentración de CO₂ atmosférico, potencial redox, temperatura de incubación y coeficiente de partición parcial, pueden tener efecto en las propiedades físico-químicas de compuestos antimicrobianos específicos. Otros, menos obvios, que pueden influir los resultados de la prueba incluyen la interacción de los compuestos de la prueba con componentes del medio, efectos combinados que dan la apariencia de susceptibilidad incrementada o disminuída, variabilidad del equipo, limitaciones del método para enumerar microorganismos, pureza del agua y errores de análisis. Por

ejemplo en técnicas de difusión en agar, la carga neta negativa del agar debido a sus grupos sulfato, pueden hacer mas lenta la velocidad de difusión de los agentes antimicrobianos catiónicos, afectando los patrones de actividad esperados (Pidlock 1990).

La mayoría de los estudios realizados para optimizar la producción de bacteriocinas de BAL ha utilizado medios comerciales (o medios comerciales modificados) para abastecer de un medio rico en nutrientes para crecimiento de microorganismos.

Cuando se investigan bacteriocinas sintetizadas por BAL, se debe ser siempre cuidadoso de la presencia de cantidades relativamente altas de ácidos orgánicos (láctico, acético, etc.), y otros antimicrobianos (peróxido de hidrógeno), que pueden también inhibir a las células indicadoras, interfiriendo en la actividad de bacteriocina que se esté investigando. Lewus y Montville (1991) sugieren modificaciones en el manejo de los microorganismos productores de bacteriocinas para evitar la inhibición por ácido, como adicionar un buffer al medio de crecimiento, reducir la cantidad de carbohidratos fermentables en el medio o el seleccionar una cepa de prueba que no se afecte por el ácido, prefiriendo aquellas resistentes al ácido, como *Lactobacillus plantarum*, según indican Daeschel y Klaenhammer (1985). Los autores también señalan debe eliminarse la inhibición debida a peróxido de hidrógeno, incorporando catalasa en el agar o realizando las pruebas de actividad de bacteriocinas en anaerobiosis, para que de este modo se pueda asegurar que el efecto inhibitorio en los microorganismos de prueba se deba exclusivamente a la presencia de bacteriocinas.

De este modo Bhunia *et al.* (1988) utilizaron agar y caldo con tripticasa, glucosa y extracto de levadura (al 1% c/u), para la producción de pediocina AcH de *Pediococcus acidilactici* H. Biswas *et al.*, (1991), ajustaron el caldo de soya tripticasa, extracto de levadura, glucosa, Tween 80, Mg²⁺, Mn²⁺ (CSTEG), para lograr una producción máxima de pediocina AcH de *Pediococcus acidilactici* H, observando a su vez el efecto del pH, produciendo cantidades despreciables de pediocina AcH cuando el caldo TGE fue mantenido a pH <5.0. Estos datos indican que la optimización del medio de crecimiento puede incrementar la producción de bacteriocinas y potencialmente contribuir grandemente en la purificación del producto González y Kunka (1987) aplicaron el medio MRS para *P. acidilactici* PAC1.0 en el estudio de

la pediocina PA-1 y Barry *et al.* (1991) el mismo medio en *P. acidilactici* JD1-23 ; así como Daeschel y Klaenhammer usaron MRS en el crecimiento de *P. pentosaceus* FBB61 para estudiar la pediocina A y Hoover *et al.* (1989) emplearon el medio APT con *P. acidilactici* PO2.

En una investigación de la actividad antibacteriana de *L. acidophilus*, Fernandes *et al.* (1988) adicionaron sales biliares al caldo MRS para simular las concentraciones en el tracto intestinal humano, afectando estas favorablemente la actividad antibacteriana de *L. acidophilus*.

La prueba descrita por Kekessy y Piguet (1970) es un ejemplo de un procedimiento en que la producción de la cepa indicadora y del microorganismo productor de bacteriocinas, puede realizarse por separado, sobre medios óptimos diferentes. En este caso el cultivo productor es inoculado sobre una placa de agar, y la cepa de prueba en caldo, de donde se estandariza a cierta concentración de inóculo en una sobrecapa de agar suave y de nuevo son reincubados para observar las zonas de inhibición de la cepa indicadora.

La composición del agar es un factor importante en cualquiera de las pruebas realizadas en placas para demostrar actividad de bacteriocina. Lindgren y Clevstrom (1978) sugirieron que los métodos de difusión en agar u otro agente gelificante puede ser inconveniente para probar la actividad de bacteriocina porque el agente antibacteriano puede no difundir. Por ejemplo, Hoover *et al.* (1989) encontraron que la actividad de bacteriocina de *P. acidilactici* PO2 fue severamente disminuída al usar agar M17 para preparar la sobrecapa de agar al utilizar la técnica de Kekessy y Piguet (1970). Aparentemente un compuesto del medio, β -glicerofosfato, se une a la proteína. También encontraron dificultad al demostrar actividad de bacteriocina de *P. pentosaceus* FBB61 y FBB63-DG2 al utilizar el medio M17-glucosa.

1.6. Conservación de BAL y producción de bacteriocinas

El mantenimiento de cultivos es un problema común a muchas áreas de la microbiología, y de la industria. La liofilización considerada por muchos microbiólogos como el mejor método de

conservación de cultivos, es un proceso de congelación y sublimación del agua congelada, manteniéndolos por períodos largos de tiempo.

Los factores que afectan la sobrevivencia de los microorganismos liofilizados incluyen:

- **Tipo de microorganismo**
- **Edad fisiológica**
- **Concentración celular**
- **Medio de suspensión**
- **Velocidad de Congelación y Temperatura de Secado**
- **Extensión del Secado**
- **Atmósfera de Almacenamiento**
- **Temperatura de Almacenamiento**
- **Método de Reconstitución**

Los criterios de conservación de microorganismos que se deben considerar son:

- 1. Capacidad para reproducirse**
- 2. Propiedades funcionales**
- 3. Mantenimiento del material genético intacto**

Las mediciones cuantitativas de crecimiento en términos de UFC/ml, proporcionan mucha información acerca de la calidad de la técnica de conservación. Si éstas se aplican antes y después del almacenamiento, pueden proporcionar un medio objetivo para seleccionar el medio óptimo. El contenido completo de un vial, se transferirá a un medio de crecimiento, en el cual se determine su viabilidad. La selección del medio apropiado para evaluar la capacidad para reproducirse debe considerarse en función del daño (definido como subletal o reparable y permanente). Algunas células dañadas sólo son incapaces de crecer en medio completos, como el Agar Soya Trypticaseína, y pueden requerir además de una suplementación con vitaminas y minerales para crecer (Heckly, 1978; Rudge, 1991; Snell, 1991).

La viabilidad basada en el número de microorganismos sobrevivientes no es un criterio satisfactorio para evaluar la efectividad de la conservación de un microorganismo. Es necesario

evaluar sus propiedades funcionales como: infectividad, inmunogenicidad, medición directa de la producción de ácido, producción de bacteriocinas, etc.

La utilización de agentes crioprotectores mantienen alta la viabilidad de *Streptococcus cremoris* durante su congelación-descongelación, aunque la producción de ácido durante la incubación subsecuente es retardada. Este caso es un ejemplo de que la actividad bioquímica o biológica sirve como criterio para evaluar la conservación. El material genético de la progenie debe ser la misma que la del cultivo original. La experiencia indica que se producen mas cambios en cultivos líquidos almacenados, que en liofilizados de microorganismos de la misma especie (Heckly, 1978).

La ventaja de la liofilización es que la mayoría de microorganismos sobreviven de este modo y los cultivos son fácilmente almacenados a temperatura de cuarto, sin pérdida significativa de la viabilidad. En la liofilización de BAL es recomendable la utilización de agentes crioprotectores. Vergara *et al.* (1993), indican que *Pediococcus acidilactici* liofilizado perdió su viabilidad cuando se almacenó a 25°C, después de 2 meses, cuando no se utilizaron agentes crioprotectores. Es deseable también aplicar un sistema de vacío durante la liofilización. La compañía Wiesby Biofermentation (1996) sugiere que el producto Biocarna® Ferment PA a base de *Pediococcus acidilactici* liofilizados se almacene a temperaturas de congelación (-18°C) hasta su uso, para evitar que se produzcan cambios en viabilidad y/o funcionalidad.

2.0. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General:

Evaluar la presencia de actividad de bacteriocina en *Pediococcus acidilactici* MIT B-41 P-60 ATCC 8042 b-67 usando *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p como microorganismo de prueba y el efecto que tienen las condiciones de crecimiento y conservación en la manifestación de la misma.

2.2. Objetivos Particulares:

1. Caracterizar la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en términos de perfil de fermentación de carbohidratos, detección de plásmidos y perfil de proteínas.
2. Determinar la presencia de actividad de bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 usando como microorganismo de prueba *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p.
3. Evaluar el efecto de las condiciones de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en diferentes medios de cultivo (diseño ortogonal L₈) en la producción de bacteriocina.
4. Establecer las condiciones de conservación de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 para garantizar la producción de bacteriocina contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p.

3.0. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

La cepa MIT-B-41 P-60 ATCC 8042 b-67 de *Pediococcus acidilactici* (liofilizados) fue obtenida en cultivo en Agar MRS del cepario del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), la cual se mantuvo en refrigeración a 4°C y cada tres meses se realizó la resiembra de la misma, así como las pruebas bioquímicas primarias y secundarias.

Se utilizó como cepa indicadora de actividad de bacteriocina *Staphylococcus aureus* ATCC 65385p (liofilizados) obtenidos a partir de un cultivo en Agar BHI, del Laboratorio de Biotecnología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC).

Se consideraron los siguientes parámetros en las cepas: productora de bacteriocina e indicadora de actividad:

- Pureza
- Concentración celular (Absorbancia y UFC/ml)
- Edad del cultivo
- Fase de crecimiento
- La formulación del medio de cultivo debe ser la misma que se utiliza tanto en el desarrollo del inóculo como en la determinación de cuentas viables
- Utilización de medios de cultivo siempre frescos

Figura No 2
CUADRO METODOLÓGICO GENERAL

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de actividad de bacteriocina en *Pediococcus acidilactici* MIT B-41 P-60 ATCC 8042 b-67 usando *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p como microorganismo de prueba y el efecto que tienen las condiciones de crecimiento y conservación en la manifestación de la misma

OBJETIVOS PARTICULARES

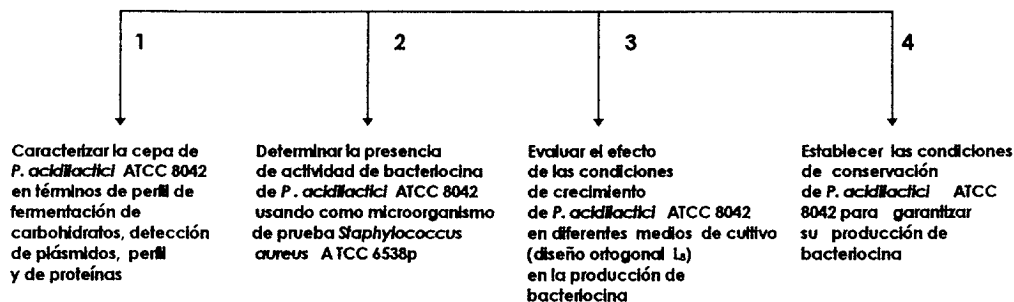


Figura No 3
OBJETIVO PARTICULAR 1

Caracterizar la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en términos de perfil de fermentación de carbohidratos, detección de plásmidos y perfil de proteínas

Cultivo de *P. acidilactici*
en CMRS modificado a $30 \pm 2^\circ\text{C}$



Determinación del perfil
de fermentación de carbohidratos
(base de Caldo Rojo de Fenol +
sacarosa, glucosa, fructosa,
lactosa arabinosa, xilosa
y sorbitol)(Axelsson, 1993,
Manual Bloxón)

Cultivo de *P. acidilactici*
en CSTES modificado
a $30 \pm 2^\circ\text{C}$



Extracción de DNA total y
detección de la presencia
de plásmidos mediante
electroforesis en geles
de agarosa
(Ausubel et al. 1992)

Cultivo de *P. acidilactici*
en CMRS modificado (con
glucosa o sacarosa)
 $30 \pm 2^\circ\text{C}$



Electroforesis de proteínas
intra y extra celulares
en geles de poliacrilamida
(SDS-PAGE)-Lowry
(Laemmli, 1970)

3.1. Caracterización de la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042

3.1.1. Determinación del perfil de fermentación de carbohidratos (Axelsson, 1993; Manual Bioxon).

Se prepararon tubos con Base de Caldo Rojo de Fenol para observar la producción de ácido de la fermentación de los siguientes carbohidratos: Sacarosa 0.5 %, Glucosa 1.0 %, Fructosa 1.0 %, Lactosa 2.0 %, Arabinosa 3.0 %, Sorbitol 1.0 % y Xilosa 1.0 % y se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

3.1.2. Extracción de DNA para la detección de la presencia de plásmidos (Ausubel *et al.* 1992)

Se cultivó *P. acidilactici* en 100 ml de Caldo de Soya Tripticaséina, Extracto de Levadura, Sacarosa (CSTES) modificado a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Se centrifugó el cultivo a 10,000 g/10 min a 4°C . Se resuspendió el pellet en 1ml de buffer TE (Tris EDTA), por pipeteo. Se agregó 1 ml de SDS al 10 % y 20 mg de pronasa E, agitando bien en vortex e incubando a 37°C durante una hora. Se agregaron 200 μl de NaCl 5 M, mezclando perfectamente. Después se adicionaron 160 μl de Bromuro de Hexadecil Trimetil Amonio/Cloruro de Sodio (CTAB/NaCl), mezclando suavemente e incubando a $65^{\circ}\text{C}/10$ min. Se añadió un volumen equivalente (160 μl) de cloroformo/alcohol isoamílico, mezclando suavemente, microcentrifugando de 4-5 min y transfiriendo a un tubo Ependorff nuevo. Se adicionó un volumen equivalente de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, mezclando suavemente y microcentrifugando durante 5 min, transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionó 0.6 ml de isopropanol y se guardó en congelación durante 10 min (precipitación de DNA), luego se microcentrifugó y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70 %, se volvió a microcentrifugar 5 min, se desechó el sobrenadante y se secó el pellet en estufa a 50°C brevemente, éste se resuspendió en 1 ml de buffer TE (Tris EDTA), y se corrió electroforesis en gel de agarosa (0.6, 0.8 y 1.0 %). Se utilizaron los marcadores de peso molecular VII de Boehringer Mannheim (DNA de SPP1 dig. Eco R1). Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal (Hoefel-Biokav), donde se colocaron 10-15 μl de muestra, mezclada con un volumen equivalente de stop mix-glicerol utilizando un pozo para colocar los marcadores de peso molecular, se aplicó un voltaje de 75 volts durante 1 hora, posteriormente se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio al 0.4%, durante 15 minutos y después el gel se observó con un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografió.

3.1.3. Electroforesis de proteínas intra y extracelulares de *P. acidilactici* en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)-Lowry, según Laemmli, (1970)

Se realizaron cultivos de *P. acidilactici* en CSTE (con glucosa o sacarosa como fuente de carbono, haciendo 8 pases en cada medio), se centrifugaron a 15,000 rpm/10' a 4°C. La pastilla (células), se lavó con agua destilada estéril dos veces y se centrifugó nuevamente.

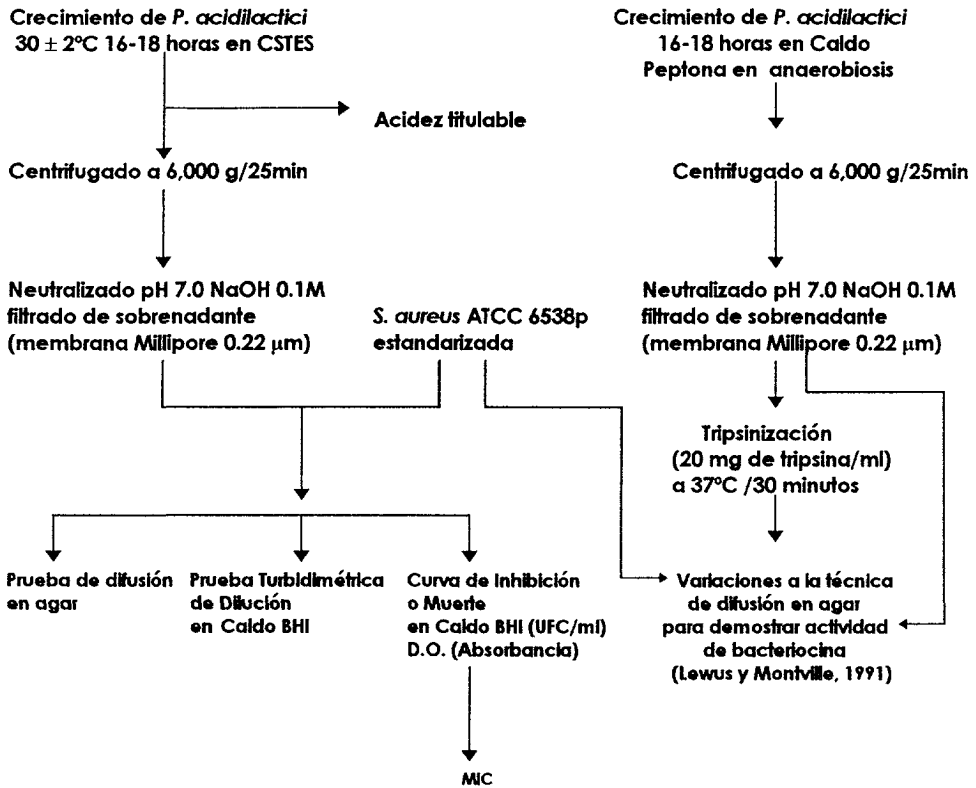
La pastilla se congeló con nitrógeno líquido y se maceró en un mortero, la proteína total se extrajo con un regulador Tris pH 8.5, 0.025 M. El extracto se centrifugó 15,000 rpm/10' a 4°C. Con el sobrenadante se procedió a determinar proteína total por Lowry (Peterson, 1977) y las muestras se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE) al 10% bajo condiciones desnaturizantes con persulfato de amonio y un buffer de corrida TE Tris EDTA. Las muestras se corrieron a 30 mA por 2-3 horas.

Se utilizaron como marcadores de peso molecular: miosina, 200kDa; galactosidasa, 116 kDa; fosforilasa b, 97 kDa; albúmina bovina, 66 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa; inhibidor de tripsina, 21 kDa; lisozozima, 14 kDa; aprotinina, 6.5 kDa.

Para el caso de las proteínas intracelulares se aplicaron 25 y 50 µg de proteína, mientras que en el caso de las proteínas extracelulares se aplicaron entre 200 y 250 µg por carril. Se aplicó un voltaje de 30 mA durante 2-3 horas. Posteriormente se tiñó el gel con una solución de azul de Coomasie al 0.125% en metanol al 40% y ácido acético al 7%/agua y se decoloró primero con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% /agua y luego con una segunda solución de ácido acético al 7% y metanol al 5%/agua. Finalmente los geles se fijaron para secarlos y leerlos en un densitómetro Biorad GS-700.

Figura No 4
OBJETIVO PARTICULAR 2

Determinar la presencia de actividad de bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 usando como microorganismo de prueba *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p



3.2. Determinación de la presencia de actividad de bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 usando como microorganismo de prueba *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p

Para la evaluación de actividad de bacteriocina se cultivó *P. acidilactici* en Caldo de Soya Tripticaseína, Extracto de Levadura Sacarosa (CSTES) al 1% cada uno, según lo sugerido por Bhunia *et al.* (1988); Biswas *et al.* (1991); se adicionó además, sacarosa al 1 % en lugar de glucosa + 0.1% de Acido Ascórbico + 0.03 % de Mn SO₄, según Llorente *et al.* (1993) y se incubó a 30°C. Se construyó la gráfica de crecimiento, se determinó la fase estacionaria (16-18 horas) y se ajustó a 1 x 10⁹ UFC/ml la concentración de células.

3.2.1. Obtención del sobrenadante de *Pediococcus acidilactici* para las pruebas de actividad de bacteriocina.

El cultivo de *P. acidilactici* manejado como se menciona en el punto anterior se centrifugó a 6,000 g/25 min y el sobrenadante se decantó, se neutralizó a pH 7 con NaOH 0.1 M y se filtró con membrana Millipore (0.22 µm).

3.2.2. Estandarización de la cepa de prueba (*S. aureus* ATCC 6538p) (NCCLS,1991)

Para estandarizar el inóculo a utilizar en la prueba de actividad de bacteriocina se cultivó *S. aureus* en Caldo BHI y se incubó a 37° 16-18 horas, se realizó un pase a medio fresco y se llevó a fase logarítmica (2-3 horas) en las mismas condiciones.

Para determinar el número de células viables (UFC/ml) se prepararon diluciones decimales de *S. aureus* y se prepararon placas de Agar BHI donde se colocaron en cada uno de los cuatro cuadrantes de la caja de agar, 20 µl de cada dilución, por triplicado (Figura No 5).

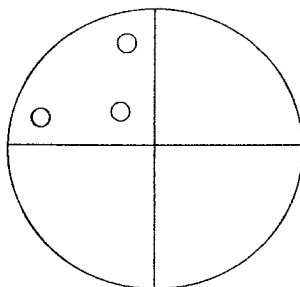


Figura No 5. Determinación de células viables (UFC/ml) en placas de agar

Se incubaron a 37°C y se leyeron a las 24 horas. Se eligió la dilución que permitiera contar entre 20 y 200 colonias y se multiplicó por el inverso de la dilución para obtener las UFC/ml.

En paralelo se midió Absorbancia al inicio y cada hora, en alícuotas de 5 ml, utilizando un Espectrofotómetro Spectronic 20D (Bausch and Lomb) a una longitud de onda de 600 nm para construir la gráfica de crecimiento y de este modo determinar la fase logarítmica y poder ajustar a 1×10^6 UFC/ml la concentración de células.

3.2.3. Prueba de inhibición de *S. aureus* por difusión en agar de sobrenadantes de *P. acidilactici*. (Barry, 1986; NCLS, 1991; Hoover, 1993)

Se prepararon cajas con una capa base de Agar Antibióticos No 11 con un espesor de 4 mm, a la cual se adicionó una sobrecapa o capa siembra de 4 ml de STES (Agar al 0.6 %) con 40 μ l de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p estandarizada, como se indica previamente, para formar un césped homogéneo de cepa indicadora. En la superficie de la capa siembra se colocaron penicilindros de acero inoxidable, los cuales se llenaron con 300 μ l del sobrenadante neutralizado y filtrado de *Pediococcus acidilactici* que se probó en cada caso. Para la capa siembra de la

cepa indicadora de *S. aureus* se utilizó Agar BHI. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, se examinaron zonas de no crecimiento en las placas, por un halo de inhibición alrededor de los penicilindros y se midieron en mm con un Vernier (NCCLS 1991).

3.2.3.1. Variaciones a las técnicas de difusión en agar para demostrar actividad de bacteriocina (Lewus y Montville, 1991)

a) Los cultivos de *P. acidilactici* se realizaron en Caldo Peptona Proteosa (CPP) y para evitar confundir el efecto inhibitorio del ácido láctico y del peróxido de hidrógeno con la inhibición debida a la actividad de bacteriocina, no se adicionaron carbohidratos al medio de cultivo y se incubaron 16-18 horas a 30°C en cámara de anaerobiosis usando el sistema BBL Gas Pack Plus.

b) Para determinar actividad de bacteriocina se inoculó *P. acidilactici* de a) sembrando por estría en PP-(Agar al 2.0%) según Kekessy y Piguet (1970), y se incubó, (16-18 horas-30°C-anaerobiosis). El agar con la estría de la cepa productora se desprendió de la caja con una espátula estéril y se colocó volteado sobre la base de la caja, sembrando en este lado del agar la cepa de prueba *S. aureus* 6538p en fase logarítmica (2-3 horas de crecimiento a 37°C) por estría perpendicular a la otra y se incubaron (16-18 horas-30°C-anaerobiosis) (Figura No 6).

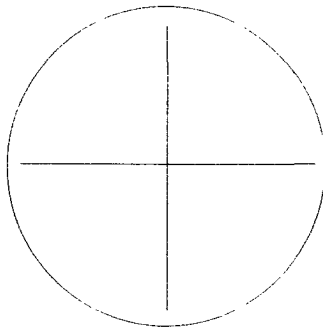


Figura No 6. Prueba cualitativa de actividad de bacteriocina mediante el método de estriado de Kekessy y Piguet (1970)

La producción de bacteriocina fue detectada por una zona de inhibición en la intersección entre ambas cepas.

c) Se siguió una modificación al método de césped, para lo cual se prepararon cajas de PP- (Agar al 1.5%), se dejaron 16-18 horas en la incubadora y luego se sembraron con 2 μ l del cultivo a) de *P. acidilactici* (Figura No 7).

Se preparó una sobrecapa de 8 ml con BHI-(Agar al 0.6%) a 45°C, inoculada con una concentración estándar de la cepa de prueba (40 μ l de un cultivo de *S. aureus* a una concentración de 1×10^6 UFC/ml, ajustada con espectrofotómetro a 600 nm), la cual se vertió encima. Las cajas se incubaron (16-18 horas-30°C-anaerobiosis). La inhibición se detectaría por una zona de transparencia alrededor de la colonia productora.

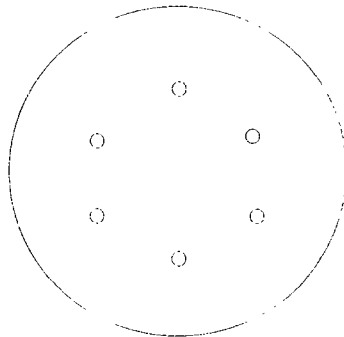


Figura No 7. Prueba cualitativa de actividad de bacteriocina aplicando una sobrecapa de agar con la cepa indicadora

d) Para demostrar la naturaleza proteica de la bacteriocina se realizó la prueba difusión en agar utilizando sobrenadantes tratados con tripsina.

Se prepararon cajas con BHI (Agar al 2%), se preparó una sobrecapa a 45°C (como se señala en el inciso anterior), encima de ésta se colocaron penicilindros con 300 μ l de sobrenadante (tripsinizado y un control sin tripsinizar) de cultivo a) y se incubaron a 37°C 16-18 horas. La inhibición fue detectada por una zona de no crecimiento alrededor de la colonia productora (Figura No 8).

Tratamiento con tripsina: el sobrenadante se neutralizó con NaOH 0.1 M a pH 7.0 y se filtró con membrana Millipore (0.45 μm), se inactivó con tripsina (Sigma) a una concentración de 20 mg/ml a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se inactivó la tripsina por calentamiento a 80°C/3 minutos.

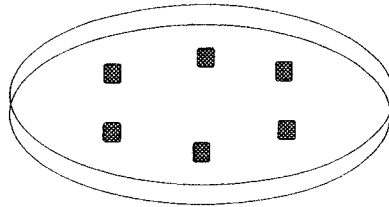


Figura No 8. Prueba de difusión en agar incluyendo la cepa indicadora en una sobrecapa de agar y colocando los sobrenadantes de la cepa con actividad de bacteriocina en penicilindros

3.2.4. Prueba turbidimétrica de dilución en caldo (NCCLS, 1991, Hoover, 1993)

Se utilizaron las siguientes combinaciones de sobrenadante, medio, cepa indicadora y ácido láctico, en tubos tal y como se indica en la Tabla No 6.

Tabla No. 6. Prueba turbidimétrica de dilución en caldo con diferentes volúmenes del sobrenadante de *P. acidilactici*

	Proporción							
	1/6	1/3	1/2	2/3	5/6	1 control 1	0 control 2	0/ácido control 3
Sobrenadante¹ (ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	–	–
Medio² (ml)	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5	–	3.0	3.0
Estándar de <i>S. aureus</i>³ (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Acido Láctico⁴ (g)	–	–	–	–	–	–	–	0.0078

Sobrenadante¹ de cultivos de *P. acidilactici* en fase estacionaria, obtenidos por centrifugación a 6,000 g/25min, neutralizados con NaOH 0.1M y filtrados con membrana Millipore 0.22 μm .

Medio² Caldo BHI

Estándar de *S. aureus*³ cepa de indicadora estandarizada como se indicó anteriormente

Acido láctico⁴ se utilizó la misma concentración que la producida por *P. acidilactici* en fase estacionaria, obtenida por titulación con NaOH y reportada en g de ácido láctico/3ml de medio.

Se incluyeron los siguientes controles:

Control 1: 3.0 ml de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici*/0.1 ml de *S. aureus* en fase logarítmica. **(1)**.

control 2: 0 ml de sobrenadante/3.0 ml de BHI medio/0.1 ml de *S. aureus* en fase logarítmica. **(0)**.

control 3: 0 ml de sobrenadante/3.0 ml de BHI/0.1 ml de *S. aureus* en fase logarítmica/ácido láctico 0.0078 g. **(0/ácido)**.

Los tubos se incubaron a 37°C. Se determinó densidad óptica (Absorbancia) al inicio y cada hora, durante 10 horas.

3.2.5. Curva de inhibición o muerte (NCCLS, 1991; Hoover, 1993)

En paralelo se contó el número de células viables (UFC/ml) en Agar BHI, al inicio y cada dos horas, durante 10 horas.

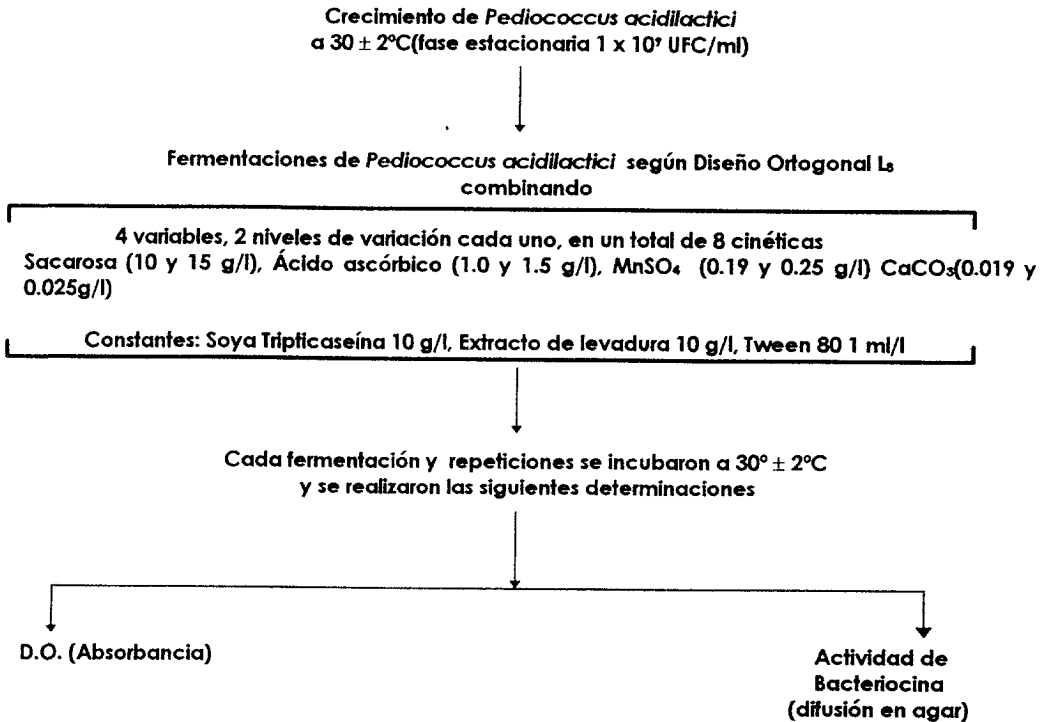
Con los datos así obtenidos se construyeron las cinética de inhibición de crecimiento o curva de muerte.

3.2.5.1. Concentración mínima inhibitoria

De los resultados de inhibición de la prueba anterior se estableció la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) como la concentración mas baja de sobrenadante de *P. acidilactici* ATCC 8042 que previene el crecimiento del *S. aureus* ATCC 6538p después de un tiempo determinado de incubación (NCCLS, 1991).

Figura No 9
OBJETIVO PARTICULAR No 3

Evaluar el efecto de las condiciones de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en diferentes medios de cultivo (diseño ortogonal L_8) en la producción de bacteriocina



3.3. Fermentaciones de *Pediococcus acidilactici*

3.3.1. Diseño ortogonal para la formulación de los medios de fermentación

(Ross, P.J., 1989)

Se aplicó un diseño factorial fraccionado L_8 (Ortogonal), utilizando diferentes niveles de variación: en la formulación del medio de cultivo se emplearon concentraciones constantes de Extracto de Levadura y Caldo Soya Tripticaseína (10 g/l de cada uno), como fuente de nitrógeno, Sacarosa (10 y 15 g/l) como fuente de carbono, ácido ascórbico (1.0 y 1.5 g/l) y $MnSO_4$ (0.19 y 0.25 g/l), como requerimientos especiales; $CaCO_3$ (0.019 y 0.025 g/l), como agente neutralizante del lactato producido por la fermentación de la sacarosa y Tween 80 (1 g/l) como emulsificante.

Se realizaron 8 pruebas de crecimiento de *P. acidilactici* con 4 repeticiones, según diseño ortogonal L_8 con una concentración inicial de 1×10^9 UFC/ml a $30^\circ \pm 2^\circ C$. Se estableció la combinación de la concentración de las variables (sacarosa, ácido ascórbico, $MnSO_4$, $CaCO_3$), en el medio de cultivo mediante tablas para un Diseño Ortogonal L_8 a dos niveles de variación, (ver anexo 3, tabla 14).

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua desionizada, bajo las condiciones indicadas en el Anexo 3, tabla 15.

Los medios para cada cinética fueron identificados de acuerdo al nivel de concentración del ingrediente a evaluar.

Por ejemplo: Cinética 1211

Donde: 1= Primer nivel de Sacarosa

2= Segundo nivel de Acido Ascórbico

1= Primer nivel de $MnSO_4$

1= Primer nivel de $CaCO_3$

Se determinaron como variables de respuesta: densidad óptica (Absorbancia) y actividad de bacteriocina mediante prueba de difusión en agar.

3.3.2. Determinación de Densidad Óptica (Absorbancia)

En paralelo se midió Absorbancia en alícuotas de 5 ml utilizando un Espectrofotómetro Spectronic 20D (Bausch and Lomb) a una longitud de onda de 600 nm. Estas se realizaron al inicio y cada 2 horas durante 12 horas y luego a las 24 horas.

3.3.3. Determinación de velocidad de crecimiento (μ)

Se determinó la velocidad de crecimiento (μ) del microorganismo en cada fermentación, utilizando para ello los resultados de Densidad Óptica, utilizando el siguiente procedimiento:

1. Se obtuvo el ln de cada D.O. desde el inicio hasta la fase estacionaria
2. Se hizo la regresión lineal donde:

x = horas

y = D.O.

Se obtuvo la pendiente m

$m = \mu$

3. Se sustituyó en $t_D = \frac{\ln^2}{\mu}$

y se relacionaron con actividad de bacteriocina determinada mediante los halos de inhibición obtenidos de las pruebas de difusión en agar de las diferentes formulaciones utilizadas.

3.4. Liofilización de *P. acidilactici* con y sin crioprotectores

Pediococcus acidilactici se cultivó en Caldo MRS modificado, se incubó a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta fase estacionaria (1×10^9 UFC/ml) y se realizaron los controles de viabilidad y funcionalidad de la cepa, previo a la liofilización, determinando:

- Células viables (UFC/ml, densidad óptica) (descripción previa)
- Patrón de Fermentación (utilización-fermentación de los azúcares indicados)
- Actividad de Bacteriocina: (difusión en agar) (descripción previa)

El cultivo en fase estacionaria se centrifugó a 6,000 g durante 25 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en tres diferentes medios de suspensión:

1. 0.1 ml del paquete de células + 1 ml de Caldo MRS modificado
2. 0.1 ml del paquete de células + 1 ml de Caldo MRS modificado + 10% de leche en polvo descremada
3. 0.1 ml del paquete de células + 1 ml de Caldo MRS modificado + 10% de leche en polvo descremada + 0.1 % de CaCO_3 .

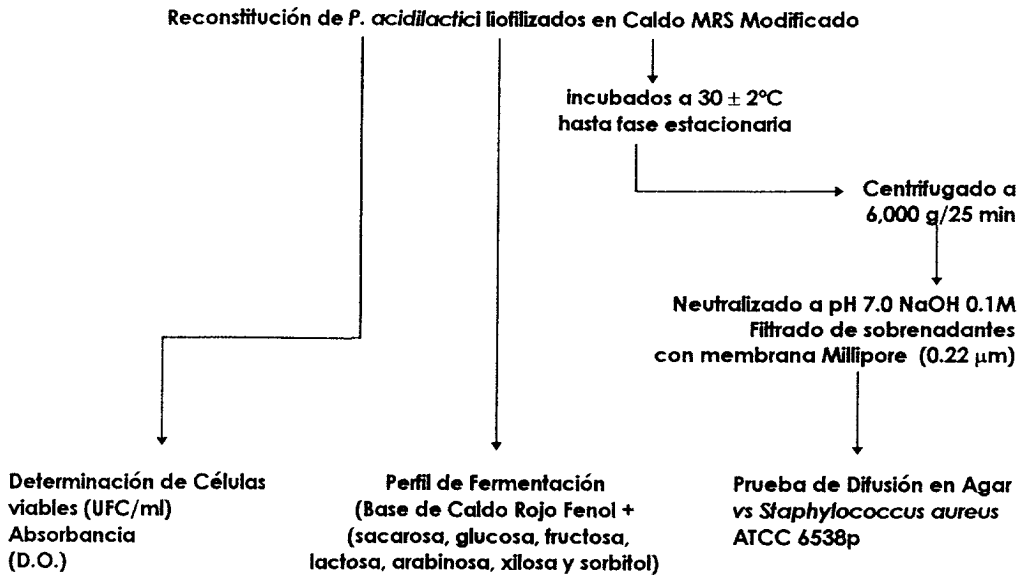
Los viales y sus duplicados de todos los tratamientos se marcaron cuidadosamente cada uno y se congelaron en baño de acetona mas hielo seco. Ya congelados se colocaron en la liofilizadora (marca Labconco Modelo Freezone 6).

La velocidad y temperatura de secado fueron las siguientes:

- Secado primario: 18 horas a -35°C y 375 mbar
- Secado secundario: aumento de $0.06^\circ\text{C}/\text{min}$ aprox. hasta 4°C .
- Secado final: 3 horas a 4°C y 130 mbar

Al terminar el secado se cerraron todos los viales, se engargolaron y se almacenaron en congelación a -20°C .

Figura No 11
RECONSTITUCIÓN DE *P. acidilactici* (LIOFILIZADOS)



3.4.1. Reconstitución de las cepas

Se adicionó 1 ml de MRS modificado para reconstituir cada vial y su duplicado de cada uno de los lotes.

3.4.2. Determinación de la viabilidad y funcionalidad de las cepas

Se determinó viabilidad, midiendo UFC/ml así como densidad óptica (Absorbancia) en cada uno de los viales reconstituídos. En paralelo se analizó el perfil de fermentación de carbohidratos. Para la determinación de actividad de bacteriocina mediante la prueba de difusión en agar se

propagó la cepa en Matraz de cultivo con 50 ml de Caldo MRS modificado, incubándolos a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta fase estacionaria y se realizó el proceso descrito previamente.

3.5. Análisis Estadísticos

Se utilizó el Programa Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS, Chicago IL 60611, USA). El efecto de las diferentes formulaciones utilizadas (medios de crecimiento) del diseño ortogonal en la velocidad de crecimiento y producción de bacteriocina, se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA), en el cual se incluyó la comparación múltiple de medias de Duncan ($p < 0.05$ y 0.01). El efecto de la adición de crioprotectores durante la liofilización, sobre la viabilidad de las cepas se determinó mediante un análisis de varianza simple (una vía) ($p < 0.05$). Se buscó la correlación entre el medio de crecimiento y de suspensión para la liofilización y los resultados de las pruebas de inhibición en agar.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos años se observa un interés creciente en el desarrollo de bacteriocinas como conservadores para alimentos. Como se menciona anteriormente, entre las bacteriocinas más estudiadas las producidas por especies del Género *Pediococcus* arrojan resultados alentadores debido a que han demostrado inhibir tanto especies relacionadas (otras BAL), como bacterias patógenas Gram-positivas.

La información encontrada en la literatura no incluye aspectos relevantes para su producción a escala mayor, como es el efecto del método y condiciones de conservación de estas cepas en la producción de bacteriocinas (pediocinas). En todos los casos han sido estudiadas de cepas silvestres, aisladas de alimentos, y algunos autores hacen hincapié en el hecho de que las cepas de colección difícilmente son productoras de bacteriocinas (Lewus y Montville, 1991).

En este trabajo se ofrecen evidencias de que la cepa de colección *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 tiene actividad de bacteriocina, mediante pruebas cualitativas de difusión en agar y turbidimétricas, así como cuantitativas (curva de inhibición o muerte), además de la identificación de la presencia de un plásmido que no coincide con los reportados en la literatura.

Por último se presentan los resultados de la influencia de los requerimientos especiales en el crecimiento y producción de bacteriocinas, así como el efecto del uso de crioprotectores en la viabilidad de cepas liofilizadas-reconstituídas y actividad de bacteriocina de esta cepa.

4.1. Caracterización de *P. acidilactici* ATCC 8042 en términos de perfil de fermentación, de carbohidratos, presencia de plásmidos y perfil de proteínas.

4.2.1. Perfil de fermentación de carbohidratos de *P. acidilactici*

Los resultados experimentales del patrón de fermentación de carbohidratos correspondieron con lo reportado en la literatura para esta especie y se presentan en la Tabla No 7.

Tabla No 7 Resultados del perfil de fermentación de carbohidratos de *P. acidilactici*

producción de gas a partir de la fermentación de carbohidratos (-)	
glucosa 1% (+)	dextrina 2% (+)
fructosa 1% (+)	almidón soluble 2% (+)
sacarosa 0.5% (+)	ramnosa 1% (-)
lactosa 2% (+)	salicina 2% (+)
arabinosa 3% (-)	celobiosa 1% (+)
xilosa 1% (-)	glicerina 1% (+)
sorbitol 1% (-)	manosa 1% (+)
manitol 3% (-)	galactosa 1% (+)
trehalosa 0.5% (+)	adonitol 1% (-)
maltosa 2% (+)	dulcitol 1% (-)
rafinosa 3% (-)	melobiosa 0.5% (+)

Fuente: Axelsson, 1993; Bergy's, 1986; Schffner, 1978.

Se seleccionaron como control de actividad fermentativa sólo los carbohidratos que forman parte regularmente de los medios de cultivo para BAL y algunos que permiten diferenciar entre especies de *Pediococcus*, como los 3 últimos que se indican en la Tabla 8.

Tabla No 8. Carbohidratos empleados como control de actividad fermentativa de *Pediococcus acidilactici*

sacarosa 0.5%	+
glucosa 1.0%	+
fructosa 1.0%	+
lactosa 2.0%	+
arabinosa 3.0%	-
xilosa 1.0%	-
sorbitol 1.0%	-

En todos los casos la producción de ácido de la fermentación de carbohidratos fue positiva, como corresponde a las bacterias homolácticas.

4.1.2. Electroforesis de DNA de *P. acidilactici* en geles de agarosa para detectar la presencia de plásmidos

Hoover *et al.* (1988) demostraron que la actividad de la bacteriocina PO₂ de *P. acidilactici* está asociada con un plásmido de 5.5 MDa. González y Kunka (1986 y 1987) al realizar la caracterización de la pediocina designada PA-1 de *P. acidilactici*, revelaron que se encuentra asociada con un plásmido de 6.2 MDa.

Daeschel y Klaenthammer (1985) estudiaron un plásmido de 13.6 MDa asociado con actividad de bacteriocina contra *S. aureus* en *P. pentosaceus*. Las investigaciones que se han realizado en la identificación de bacteriocinas de diferentes BAL indican que la actividad antibacteriana se encuentra ligada a la presencia de plásmidos de diferentes tamaños (Puci *et al.* 1988; Ray *et al.* 1989; Henderson *et al.* 1992; Luchansky *et al.* 1992).

Para la búsqueda de plásmidos de *P. acidilactici* 8042 se utilizó el medio de crecimiento y las condiciones sugeridas por Bhunia *et al.* (1987) y las modificaciones en cuanto a requerimientos especiales sugeridas por Llorente *et al.* (1993). Se detectó la presencia de un plásmido con 2,799 kDa mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.6% que no coincide con los PM de los reportados en la literatura para otras cepas (Figura No 12).

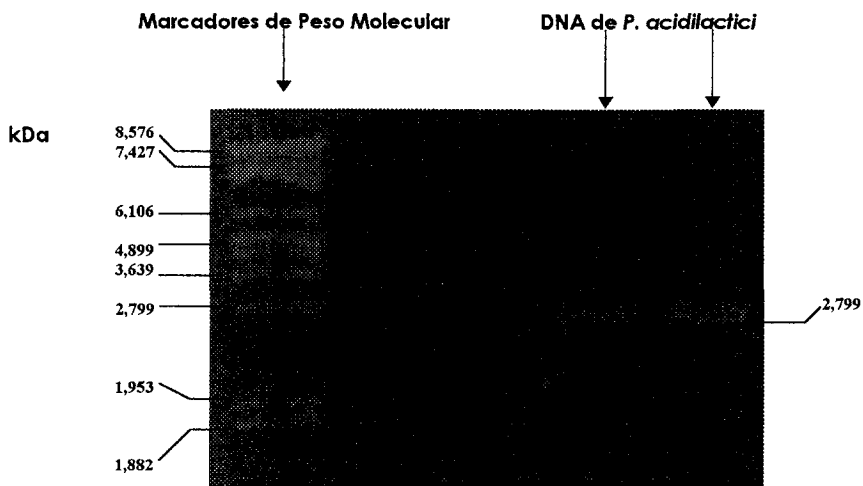


Figura No12 Detección de la presencia de plásmidos de *P. acidilactici* en gel de agarosa al 0.6%

4.1.3. Electroforesis de proteínas intra y extracelulares de *P. acidilactici* en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Se realizó el crecimiento de *P. acidilactici* en diferentes fuentes de carbono (glucosa y sacarosa, haciendo 8 pases en cada uno) con objeto de observar su efecto en el perfil de proteínas intra y extracelulares de la cepa, determinadas por electroforesis SDS en geles de poliacrilamida, los resultados se observan en la Figura No 13.

Figura No 13
Proteínas intra y extracelulares de *P. acidilactici*
mediante electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

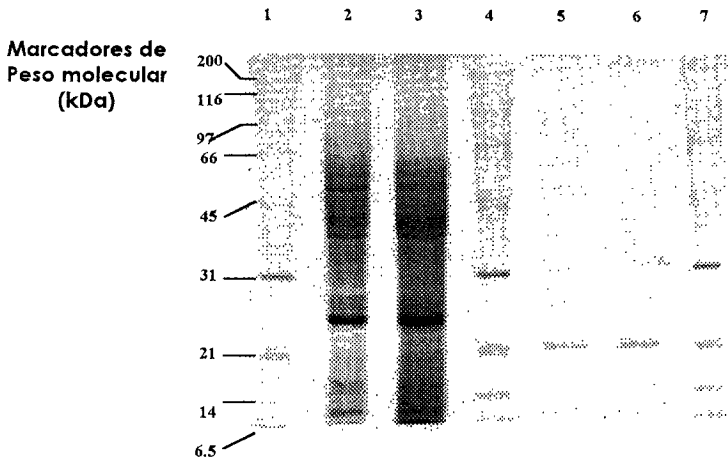


Figura No 13. Patrón electroforético de las proteínas *P. acidilactici*. La electroforesis se realizó en gels de poliacrilamida al 10 % bajo condiciones desnaturizantes. Las muestras se corrieron a 30 mA por 2 a 3 horas. En los carriles 1, 4 y 7 se colocaron los marcadores de peso molecular. En los carriles 2 y 3 la proteína intracelular total correspondiente a la misma cepa crecida en CSTEG (glucosa) y CSTES (sacarosa) respectivamente. Los carriles 5 y 6 corresponden a la proteína extracelular total de la cepa en los mismos medios de crecimiento ya mencionados, para el caso de las proteínas intracelulares se aplicaron 25-50 μ g de proteína, mientras que para las extracelulares se aplicaron 200-250 μ g por carril.

Es importante resaltar que independientemente de la fuente de carbono (glucosa o sacarosa) utilizada en el cultivo de *Pediococcus acidilactici*, su perfil de proteínas (Figura No 13) se presenta de manera similar para las proteínas intra y extracelulares, éstas últimas son poco abundantes, sin embargo la banda que corresponde a 21 kDa no se observa en las proteínas intracelulares, por lo que se tendría que purificar por filtración en gel para determinar si es la responsable de la actividad de bacteriocina.

4.2. Evaluación cualitativa y cuantitativa de la presencia de actividad de bacteriocina de *P. acidilactici*

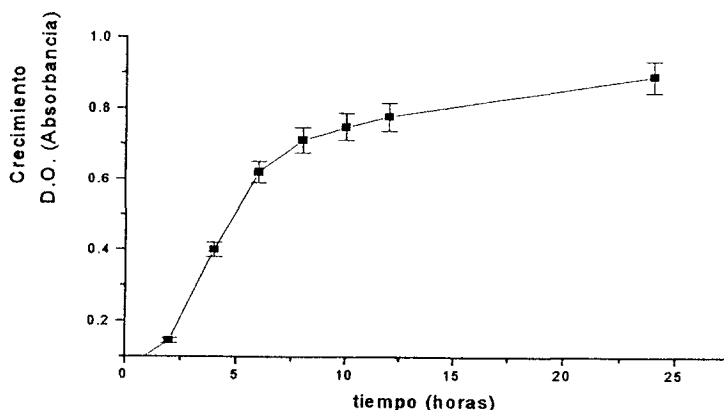
Para evaluar la actividad de bacteriocina de *P. acidilactici* se utilizaron: **prueba presuntiva** (difusión en agar) además se aplicó la **prueba modificada de difusión en agar**, en las que se aplicaron las consideraciones de Lewus y Montville, que permitieron corroborar que la inhibición se debía a una bacteriocina y que esta tenía naturaleza proteica, **pruebas cuantitativas (turbidimétrica de dilución en caldo y cinética de inhibición o muerte)**, estableciendo por último la **Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)**. A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada uno de ellas.

4.2.1. Cinética de crecimiento de la cepa productora (*P. acidilactici* ATCC 8042)

Bhunía y Ray (1988) sugirieron el uso del medio CSTEG para la producción de bacteriocina AcH de *P. acidilactici* H. En el presente trabajo la glucosa fue sustituida por sacarosa, ya que de acuerdo con resultados previos de Llorente *et al.* (1993) la sacarosa fue mejor fuente de carbono que la glucosa.

En la figura No 14 se incluyen los resultados de la cinética de crecimiento de *P. acidilactici*, a $30^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ donde se identifica la fase estacionaria a las 24 horas, punto que se eligió para el manejo de los sobrenadantes de cultivo de la cepa productora para su uso en las pruebas de inhibición, de acuerdo con los resultados obtenidos por Morales, (1995), en donde la actividad de bacteriocina fue posible de observar con sobrenadantes de cultivo de esta edad.

Figura No 14
CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *P. acidilactici* en CSTES modificado



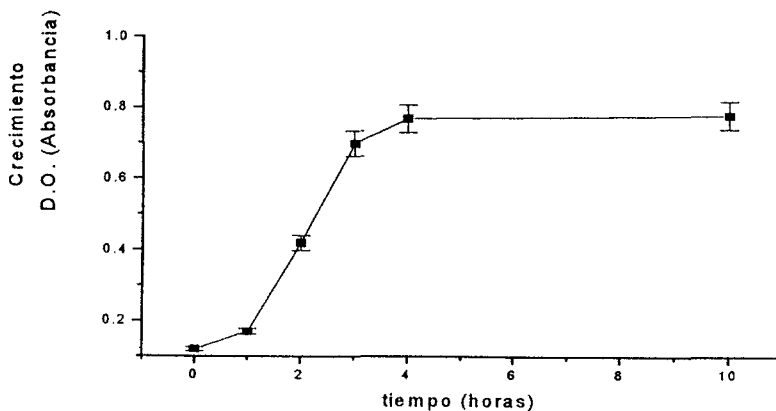
Los resultados aquí graficados son el promedio de 3 repeticiones de la cinética de crecimiento

4.2.2. Cinética de crecimiento de la cepa indicadora *S. aureus* ATCC 6538p (NCCLS, 1991)

La selección del microorganismo de prueba para las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos, según Thornsberry, (1991) debe hacerse entre aquéllos de rápido crecimiento, destacando las especies de la familia *Enterobacteriaceae*, especies de *Staphylococcus* y *Enterococcus*, etc. El AOAC, ya en 1984, había aprobado el *S. aureus* ATCC 6538 como microorganismo indicador para pruebas de desinfectantes y sanitizantes. Por otro lado, para probar bacteriocinas se sugiere utilizar bacterias Gram-positivas relacionadas. Bhunia (1988) en la caracterización del espectro de actividad de la pediocina AcH de *Pediococcus acidilactici* H utilizó *Staphylococcus aureus* como microorganismo indicador. Con base en esta información la cepa seleccionada como microorganismo de prueba *S. aureus* ATCC 6538p la cual permitió identificar actividad de bacteriocina de los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042.

Para poder identificar la fase logarítmica del microorganismo de prueba (*S. aureus*) y según lo establecido por el NCCLS (1991), se realizó la cinética de crecimiento incubando en el medio y temperatura óptimos. Los resultados de la cinética de crecimiento se presentan en la Figura No 13. La fase logarítmica se alcanzó en 2-3 horas con una D.O. final de 0.6, equivalente a una población del orden de 7 log.

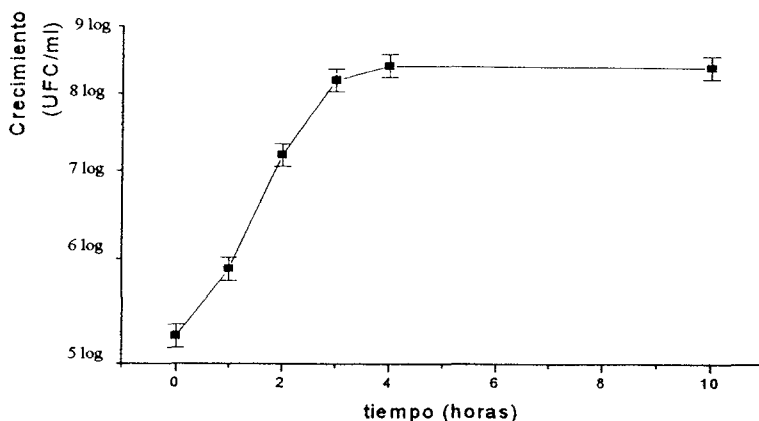
Figura No 15
CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *S. aureus* en BHI
(D.O. vs tiempo)



Los resultados aquí graficados son el promedio de 3 repeticiones de la cinética de crecimiento.

En paralelo se determinó el número de células viables, para poder conocer el número inicial de células viables a utilizar en las pruebas de actividad de bacteriocina y obtener de este modo resultados cuantitativos de sobrevivencia o letalidad del microorganismo indicador. El número de células viables UFC/ml en Agar BHI se presenta en la Figura No 16.

Figura No 16
CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* EN BHI
(UFC/ml vs tiempo)



Los resultados son el promedio de 3 repeticiones de la cinética de crecimiento

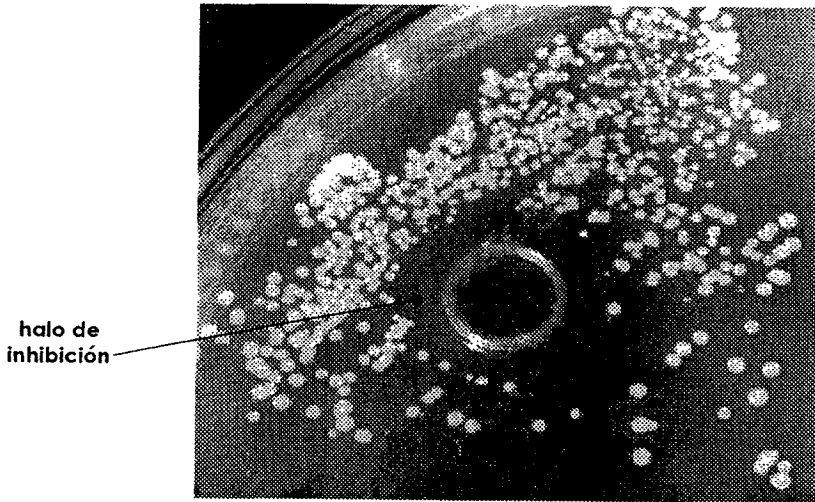
4.2.3. Prueba de actividad de bacteriocina por difusión en agar de sobrenadantes de *P. acidilactici*

Los métodos mas comunes para demostrar actividad antibacteriana son los de difusión en placas de agar colocando el antimicrobiano de prueba en disco o en penicilindros sobre el agar. Davidson y Parish (1989) establecieron la metodología de la prueba de difusión en placa de Agar BHI con *S. aureus* como microorganismo de prueba e inocularon por la técnica de estriado.

Harris *et al* (1989) demostraron gran número de resultados falsos negativos en los ensayos de difusión en agar usando pozos, y ellos sugirieron la utilización de penicilindros.

Los resultados que se observan en esta Figura No 17 se obtuvieron al seguir la metodología de David y Parish (1989) utilizando Agar BHI, con penicilindros sobre el agar según Harris *et al* (1989), siendo evidente la zona de inhibición de crecimiento de *S. aureus* alrededor de los penicilindros.

Figura No 17. Inhibición de *S. aureus* al aplicar sobrenadante de *P. acidilactici* en la prueba presuntiva de difusión en agar



Fotografía tomada por el Técnico Rodolfo Robles del Lab. de Microscopía Electrónica C-1 FESC-UNAM

El NCCLS (1991) sugiere como medios de cultivo para realizar la prueba de difusión en agar el Agar Müller-Hinton o el Agar Antibióticos No 11, por lo que se probaron ambos como capa base, y el Agar Antibióticos No 11 permitió una mejor difusión del sobrenadante, hecho que no ocurrió al utilizar el Agar Müller-Hinton. La adición de una sobrecapa de agar suave (BHI con 0.8% de Agar) permitió una dispersión homogénea del inóculo estándar del microorganismo de prueba (formación de un césped) y una mayor difusión del sobrenadante además de observar mas claramente los halos de inhibición y poder realizar su medición (Montville y Kaiser, 1993).

La prueba de difusión en agar modificada, empleando una capa base de Agar Antibióticos No 11 y sobrecapa de BHI (con 0.8% de Agar) con una concentración estándar de *S. aureus* fue la técnica seleccionada para evaluar posteriormente el efecto de las diferentes formulaciones establecidas en el Diseño Ortogonal y el efecto de la adición de crioprotectores en *P. acidilactici* liofilizados-reconstituídos en la actividad de bacteriocina de la cepa.

4.2.4. Consideraciones en la determinación de actividad de bacteriocina en la prueba de difusión en agar

Se tuvieron en consideración los aspectos que deben estar presentes al trabajar con BAL, como la capacidad inhibitoria del ácido láctico producido de la fermentación de carbohidratos, que en el caso de las cepas homolácticas (en especial las especies del género *Pediococcus* altamente acidificantes), es el producto mayoritario y principio de conservación en los productos en donde se encuentran. Con el fin de evitar la interferencia de estas sustancias en la actividad inhibitoria de la bacteriocina, se resolvió no utilizar carbohidratos en la formulación del medio de crecimiento de la cepa productora y la producción de peróxido de hidrógeno se evitó al cultivar las cepas en anaerobiosis (Lewus y Montville, 1991; Montville y Kaiser, 1993).

En la parte superior de la Figura No 18 se distingue una zona de inhibición de crecimiento. Tras realizar los experimento en las condiciones antes descritas, todo indica que la inhibición se debe a la actividad de bacteriocina del sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici*.

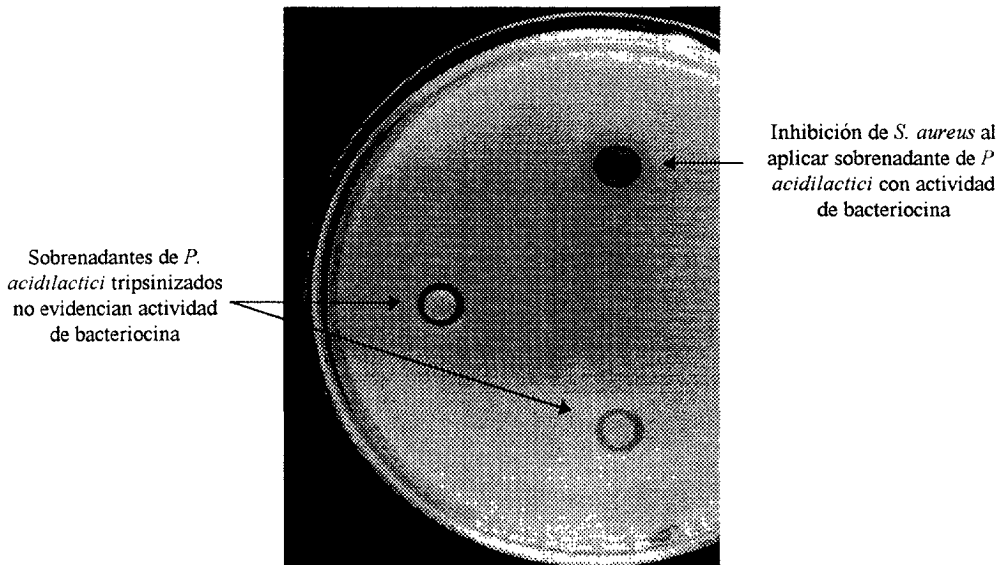
La naturaleza proteica de la bacteriocina quedó confirmada, ya que al utilizar sobrenadantes tripsinizados estos perdían su actividad, como se observa en los círculos de la izquierda y abajo, donde no hubo inhibición de la cepa de prueba (Lewus y Montville, 1991; Montville y Kaiser, 1993).

4.2.4.1 Sobrenadante de *P. acidilactici* tripsinizado y efecto en actividad de bacteriocina

Uno de los criterios de identidad de las bacteriocinas utilizado por los investigadores de estos compuestos ha sido el confirmar su naturaleza proteica por tratamiento con diferentes proteasas como: tripsina, quimotripsina, ficina, papaína, etc. Diferentes estudios demuestran que aquéllas fracciones con actividad inhibitoria que eran tratadas con alguna enzima proteolítica de las mencionadas antes, perdían su capacidad de inhibir a otras bacterias, en la mayoría de los casos esta prueba permitió identificar la fracción responsable de la actividad de bacteriocina después de purificar los compuestos (Bhunja *et al.*, 1988; Montville y Winkowski, 1997; Ray y Hoover, 1993).

En este trabajo se realizó el tratamiento del sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* con tripsina, que llevó a la pérdida de actividad inhibitoria, demostrando de este modo su naturaleza proteica, como se observa en la Figura No 18.

Figura No18
Inhibición de *S. aureus* al aplicar sobrenadante de *P. acidilactici* en la prueba de difusión en agar realizando las consideraciones de Lewus y Montville



4.2.5. Inhibición de *S. aureus* al utilizar diferentes volúmenes de sobrenadante de *P. acidilactici* en la prueba turbidimétrica de dilución en caldo (NCCLS, 1991; Hoover, 1993)

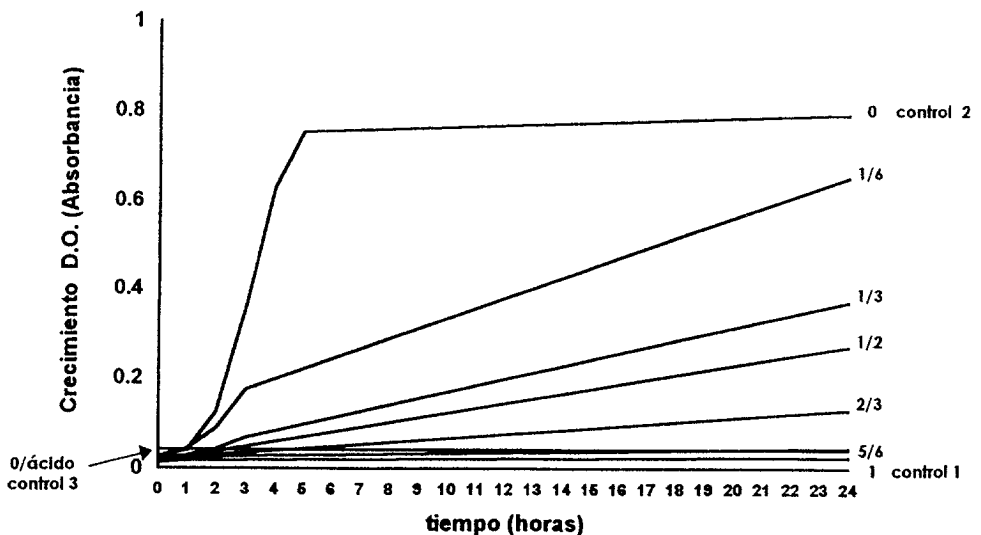
Los resultados de las mediciones de Absorbancia para la prueba turbidimétrica de inhibición de *S. aureus*, incluyendo los de los 3 controles de inhibición de crecimiento se reportan en la Figura No 19.

El crecimiento del microorganismo de prueba al adicionar diferentes volúmenes de sobrenadante de *P. acidilactici* fue siempre por debajo del crecimiento de *S. aureus* sin sobrenadante, lo que indica un efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*, se observa un retardo en la fase lag y en la fase log.

El incremento en Absorbancia después de las 10 horas en aquéllos adicionados de sobrenadante puede ser debido a que se esté produciendo lisis de las células de *S. aureus*, ya que se sugiere que las bacteriocinas son bactericidas, según Pucci *et al.* (1988) y Nielsen *et al.* (1990).

En el control donde se adicionó sólo ácido láctico no se observó modificación en la absorbancia, lo que indica la función bacteriostática de los ácidos orgánicos como señala Smulders *et al.* (1986).

Figura No 19
Inhibición de *S. aureus* por diferentes volúmenes de sobrenadante de *P. acidilactici* en la prueba turbidimétrica de dilución en caldo



Los resultados graficados son el promedio de 3 curvas de inhibición realizadas para cada condición

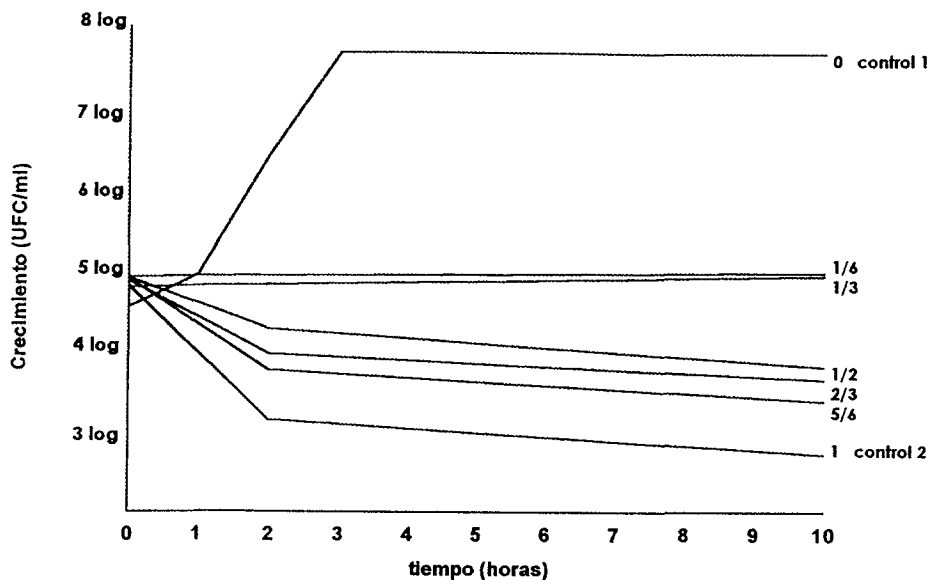
- **control 1:** 3 ml de sobrenadante y *S. aureus* (0.1 ml de cultivo en fase logarítmica) **(1)**
- **control 2:** 3 ml de BHI y *S.aureus* (0.1 ml de cultivo en fase logarítmica) **(0)** y
- **control 3:** 3 ml de BHI, *S. aureus* (0.1 ml de cultivo en fase logarítmica) y ácido láctico (a la misma concentración de la obtenida por fitulación en sobrenadantes de *P. acidilactici* en fase estacionaria) **(0/ácido)**.

4.2.6. Curva de inhibición o muerte (NCCLS, 1991; Hoover, 1993)

Tagg *et al.*, (1976) indican que deben realizarse tanto pruebas cualitativas como cuantitativas de actividad de bacteriocina utilizando cepas sensibles antes de definir que una bacteriocina es bactericida o bacteriostática, por lo tanto se realizó en paralelo la determinación de células viables en UFC/ml, con objeto de demostrar si el aumento en absorbancia se debía a crecimiento de la cepa indicadora o podía deberse a la lisis celular.

En la Gráfica No 20 se presentan los resultados de células viables (UFC/ml) obtenidos al utilizar diferentes volúmenes de sobrenadante/BHI, en donde se observa un efecto inhibitorio mayor conforme se aumenta la cantidad de sobrenadante adicionado. El nivel de supresión de crecimiento en % de inhibición corresponde a 66% con el sobrenadante sin diluir, no se llegó a la Concentración Mínima Bactericida (MCB), pues se requería alcanzar el 90% de inhibición (NCCLS,1991; Hoover, 1993).

Figura No 20
Curva de inhibición o muerte de *S. aureus* al utilizar
diferentes volúmenes de sobrenadante de *P. acidilactici*



Los resultados graficados son el promedio de 3 curvas de inhibición realizadas para cada condición

Las unidades arbitrarias de actividad (UAA) de bacteriocina según González y Kunka (1987) se calcularon a partir del inverso de la dilución mas alta que produjo inhibición de crecimiento de la cepa indicadora.

$$UAA = \frac{\text{Concentración}}{\text{ml de medio de crecimiento BHI}}$$

$$UAA = \frac{0.5 \text{ ml de sobrenadante de } P. \text{ acidilactici}}{3.0 \text{ ml de medio de crecimiento BHI}}$$

$$\frac{1}{\text{concentración}} = \frac{1}{6} = 6UAA$$

4.2.6.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

De los resultados presentados en la Figura No 20 se estableció la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para esta investigación, y la concentración mas baja de sobrenadante de *P. acidilactici* ATCC 8042 que previno el crecimiento de *S. aureus* ATCC 65385p después de 2 horas de incubación fue la relación 1:6 (sobrenadante:BHI).

4.3. Efecto de la formulación del medio de cultivo en la velocidad de crecimiento (μ) de *P. acidilactici* y en la actividad de bacteriocina vs *S. aureus*

Raccach y Marshall (1985) señalan que las BAL homofermentativas transportan carbohidratos por la vía fosfoenolpiruvato (PEP), sistema fosfotransferasa (PTS) y aunque el magnesio es el activador natural, es posible que el manganeso pueda activarlo también, por ejemplo en el caso de la piruvato cinasa en *S. cremoris* ésta se activó 100 veces en presencia de manganeso. La máxima actividad de β -galactosidasa de *S. thermophilus* se obtuvo también en presencia de manganeso y la fermentación de sacarosa sustituyendo a la dextrosa fue estimulada por manganeso en *L. plantarum*. La fermentación de sacarosa por BAL fue estimulada por el manganeso, completando su crecimiento en 12-16 horas con manganeso y en 40 horas en ausencia. Los mejores resultados los consiguieron en cultivos congelados-descongelados reduciendo 4 a 7 horas de tiempo de cultivo al adicionar el manganeso para fermentar sacarosa.

Es importante señalar que en presencia de manganeso la sacarosa-6-fosfato hidrolasa y la sacarosa-fosfotransferasa permiten la entrada de la sacarosa a la ruta glucolítica. González y Kunka (1987) presentaron evidencia de un plásmido que codifica para la utilización de sacarosa y la producción de bacteriocina en *P. acidilactici* PAC1.0. La aplicación de técnicas de curación para la eliminación del plásmido de 23 MDa, resultó en la pérdida simultánea de la capacidad de fermentar la sacarosa y de la actividad de sacarosa-hidrolasa.

Archibald (1988) y Zaika *et al.* (1984) indican que las bacterias oxígeno tolerantes son estimuladas por manganeso acelerando su crecimiento y sugieren que quizá esté asociado con un importante mecanismo de defensa contra la toxicidad del radical superóxido y la superóxido dismutasa en *Lactobacillus casei*, *L. fermentum* y *P. pentosaceus*.

En este trabajo se buscó relacionar la producción de bacteriocina de *P. acidilactici* y su crecimiento, con objeto de encontrar las mejores condiciones para producir la bacteriocina. De acuerdo con la literatura revisada la fuente de carbono es importante para el crecimiento de las BAL, aunque los resultados en crecimiento demostraron que fue mejor el uso de sacarosa como fuente de carbono, siempre que estuviese presente el manganeso. Estudios previos de Llorente *et al.* (1993) señalan que tanto el manganeso como el ácido ascórbico son requerimientos especiales de crecimiento para *Pediococcus*.

Olson (1959) señaló que el carbonato de calcio es el más utilizado en el cultivo de BAL ya que permite una mayor neutralización del lactato producido durante la fermentación, además de ser un constituyente de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, por lo que fue importante su adición.

La información antes citada sirvió para seleccionar como factores relevantes en el crecimiento de *P. acidilactici*, la fuente de carbono (sacarosa), los requerimientos especiales (manganeso y ácido ascórbico) y un neutralizante del lactato producido, (carbonato de calcio). Con estos cuatro factores en un diseño ortogonal L_8 se trabajaron diferentes formulaciones de medios de cultivo y de este modo se observó la influencia que guardan estos compuestos en el crecimiento y en la producción de bacteriocina.

Los resultados analizados con el Programa Estadístico SPSS mediante análisis de varianza (ANOVA) indicaron que existe una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) en la concentración celular medida en absorbancia de los diferentes tratamientos y que estos factores son los responsables de favorecer o controlar el crecimiento de la cepa. El análisis así obtenido sugirió realizar también una comparación de medias de Duncan ($p < 0.01$) para ver cuáles eran las variables que guardaban alguna analogía o afectaban en mayor medida la respuesta en crecimiento o actividad inhibitoria.

Los resultados de la Prueba de Duncan de los datos de crecimiento en D.O. (Absorbancia) llevaron a la formación de 4 subgrupos que se presentan en la Tabla No 9. En cada caso se indica la clave asignada. La función de la fuente de carbono, ácido ascórbico y sulfato de manganeso fue primordial en el nivel de actividad de bacteriocina, ya que se obtuvieron halos de inhibición de mayor tamaño en las pruebas de difusión en agar realizadas con los sobrenadantes de cada formulación, consideradas de acuerdo a lo expuesto anteriormente por diversos autores (Foegeding *et al.* 1992; Biswas *et al.* 1991; González y Kunka, 1983; Bhunia *et al.* 1987 y 1988).

El subgrupo I quedó formado por 5 de los 8 tratamientos del diseño ortogonal, los 3 primeros (1122, 2121 y 2222) tiene el nivel alto de manganeso y los halos de inhibición pequeños, los 2 últimos (1221 y 1212) tienen en común nivel bajo de sacarosa y alto de ácido ascórbico. En este último caso se lograron la velocidad de crecimiento mas pequeña y los halos de inhibición mas grandes.

En el subgrupo II las 2 últimas formulaciones (1212 y 1111) tuvieron nivel bajo de sacarosa y de manganeso con las que se obtuvieron halos de inhibición grandes que no correlacionaron con la velocidad de crecimiento. En el subgrupo III las combinaciones 1221, 1212 y 1111 tienen en común nivel bajo de sacarosa obteniendo así los halos mas grandes. Los tratamientos 1212, 1111 y 2211 del subgrupo III y 1111, 2211 y 2112 del IV tienen el nivel bajo de manganeso, sin mostrar correlación con velocidad de crecimiento ni halo de inhibición.

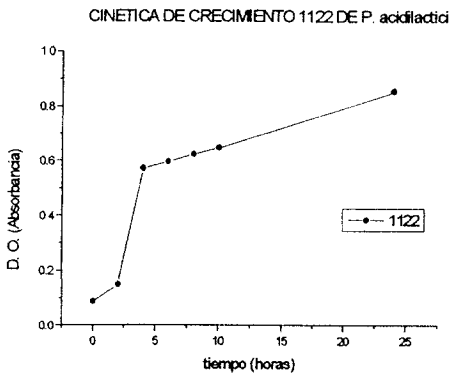
Tabla No 9
Resultados de la Prueba de Duncan ($p < 0.01$)
de las formulaciones del diseño ortogonal

subgrupo 1	subgrupo 2	subgrupo 3	subgrupo 4
1122			
2121	2121		
2222	2222		
1221	1221	1221	
1212	1212	1212	
	1111	1111	1111
		2211	2211
			2112

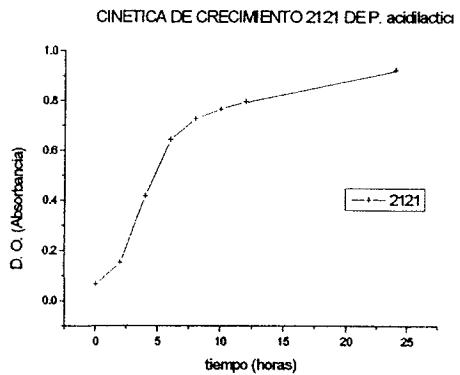
En general, los tratamientos **1221** y **1212** presentaron los valores más pequeños de μ (0.22 y 0.23 respectivamente) y los diámetros de halo de inhibición más grandes (12.25 y 11.0), presentando una relación inversa entre ambas variables, además estas formulaciones tuvieron identidad en 3 de los 4 subgrupos resultantes de la Prueba de Duncan. El tratamiento **1111** con niveles bajos de las 4 variables también se incluye en 3 subgrupos y presenta halo de inhibición grande aunque con μ mayor.

El resultado sobresaliente de este análisis es que los tratamientos **1221**, **1212** y **1111** incluidos en 3 subgrupos cada uno, presentaron la mayor respuesta inhibitoria en *S. aureus*.

Figuras No 21
Cinéticas de crecimiento Subgrupo 1 (Duncan p<0.01)

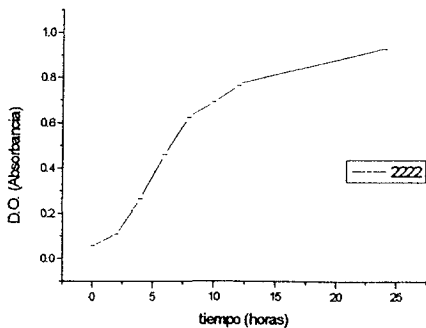


1122 (1.0% sacarosa, 0.1% ácido ascórbico, 0.025% MnSO₄, 0.0025% CaCO₃)



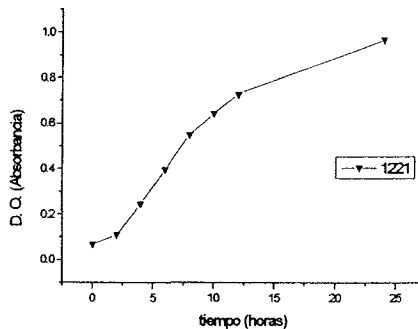
2121 (1.5% sacarosa, 0.1% ácido ascórbico, 0.025% MnSO₄, 0.0019% CaCO₃)

CINETICA DE CRECIMIENTO 2222 DE P. acidilactici



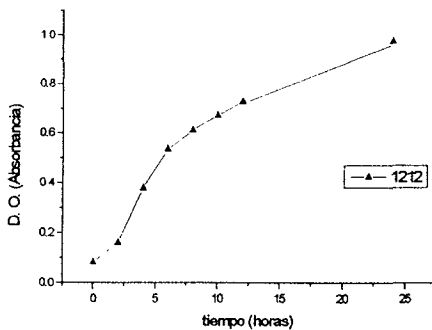
2222 (1.5% sacarosa, 0.15% ácido ascórbico, 0.025% MnSO₄, 0.0025% CaCO₃)

CINETICA DE CRECIMIENTO 1221 DE P. acidilactici



1221 (1.0% sacarosa, 0.15% ácido ascórbico, 0.025% MnSO₄, 0.0019% CaCO₃)

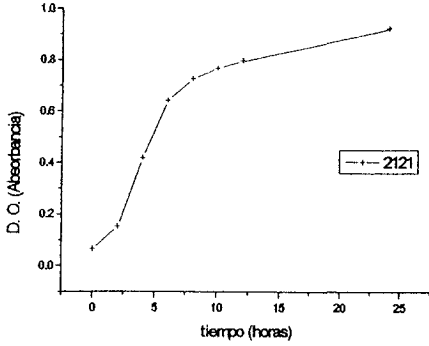
CINETICA DE CRECIMIENTO 1212 DE P. acidilactici



1212 (1.0% sacarosa, 0.15% ácido ascórbico, 0.019% MnSO₄, 0.0025% CaCO₃)

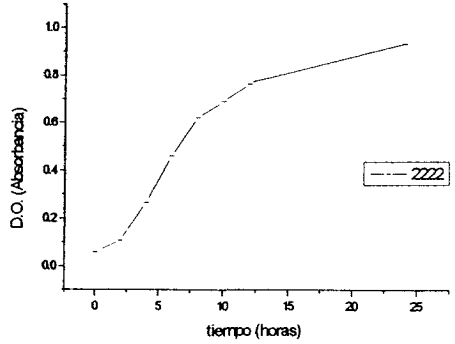
Figuras No 22
Cinéticas de crecimiento Subgrupo 2 (Duncan p<0.01)

CINETICA DE CRECIMIENTO 2121 DE P. acidilactici



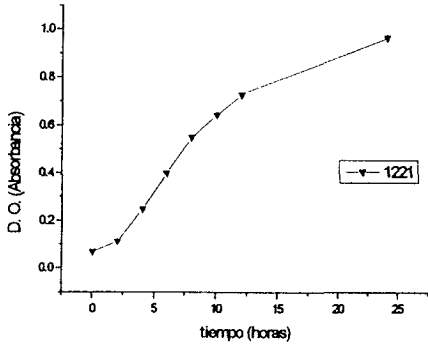
2121 (1.5% sacarosa, 0.1% ácido ascórbico, 0.025% MnSO₄, 0.0019% CaCO₃)

CINETICA DE CRECIMIENTO 2222 DE P. acidilactici



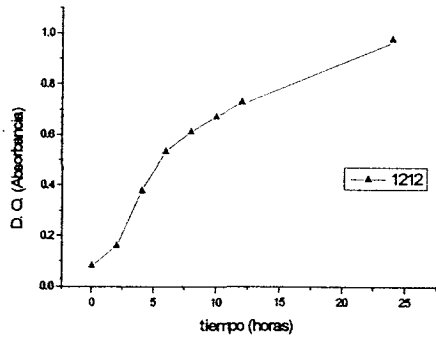
2222 (1.5% sacarosa, 0.15% ácido ascórbico, 0.025% MnSO₄, 0.0025% CaCO₃)

CINETICA DE CRECIMIENTO 1221 DE P. acidilactici



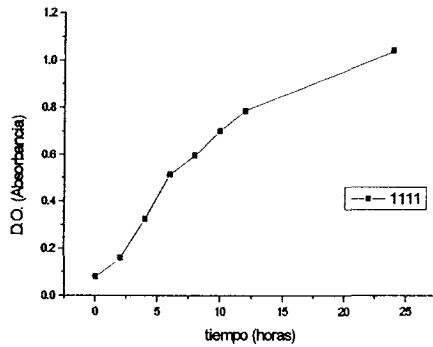
1221 (1.0% sacarosa, 0.15% ácido ascórbico, 0.025% MnSO₄, 0.0019% CaCO₃)

CINETICA DE CRECIMIENTO 1212 DE P. acidilactici



1212 (1.0% sacarosa, 0.15% ácido ascórbico, 0.019% MnSO₄, 0.0025% CaCO₃)

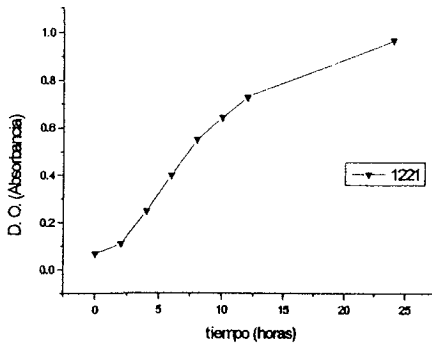
CINETICA DE CRECIMIENTO 1111 DEP. acidlactici



1111 (1.0% sacarosa, 0.1% ácido ascórbico, 0.019% MnSO₄, 0.0019% CaCO₃)

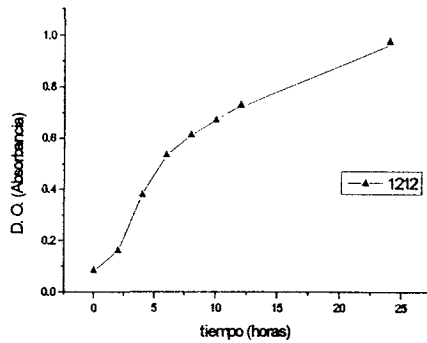
Figuras No 23
Cinéticas de crecimiento Subgrupo 3 (Duncan p<0.01)

CINETICA DE CRECIMIENTO 1221 DEP. acidlactici

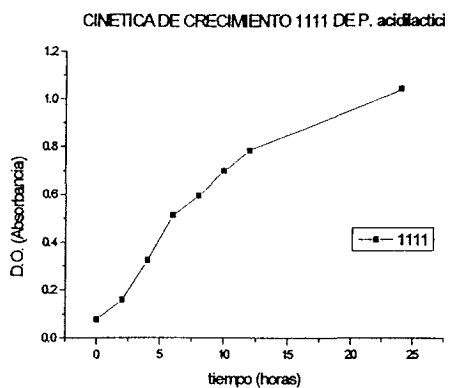


1221 (1.0% sacarosa, 0.15% ácido ascórbico, 0.025% MnSO₄, 0.0019% CaCO₃)

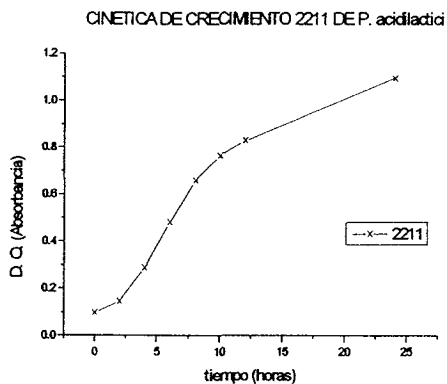
CINETICA DE CRECIMIENTO 1212 DEP. acidlactici



1212 (1.0% sacarosa, 0.15% ácido ascórbico, 0.019% MnSO₄, 0.0025% CaCO₃)

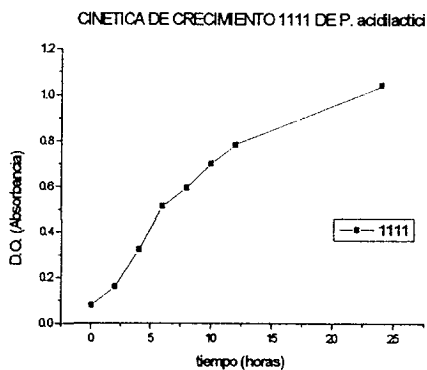


1111 (1.0% sacarosa, 0.1% ácido ascórbico, 0.019% MnSO₄, 0.0019% CaCO₃)

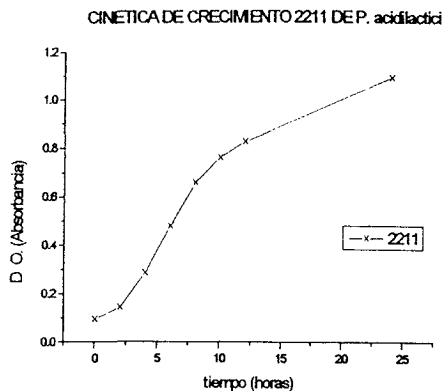


2211 (1.5% sacarosa, 0.15% ácido ascórbico, 0.019% MnSO₄, 0.0019% CaCO₃)

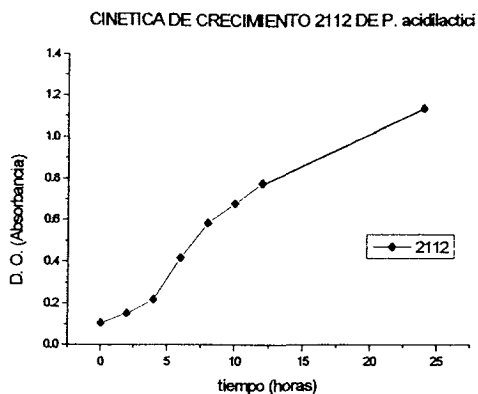
Figuras No 24
Cinéticas de crecimiento Subgrupo 4 (Duncan p<0.01)



1111 (1.0% sacarosa, 0.1% ácido ascórbico, 0.019% MnSO₄, 0.0019% CaCO₃)



2211 (1.5% sacarosa, 0.15% ácido ascórbico, 0.019% MnSO₄, 0.0019% CaCO₃)



2112 (1.5% sacarosa, 0.1% ácido ascórbico, 0.019% MnSO₄, 0.0025% CaCO₃)

Los resultados del análisis que se presentan en la Tabla No 10 señalan que la velocidad de crecimiento no tiene correlación con el tamaño de halo de inhibición obtenido, ya que en los tratamientos 1111 y 2121 se obtuvieron los resultados de velocidad de crecimiento mas altos, sin embargo en 2121 el diámetro de halo de inhibición es pequeño y en 1111 es intermedio. En los valores medios de μ de las formulaciones 1122, 2211 y 2112 se observan valores altos y bajos de diámetros de halos de inhibición y cuando se tuvieron los valores pequeños de μ en 1212, 1221, se tuvieron los halos de inhibición mas grandes. Sin embargo en 2222 la velocidad de crecimiento y el halo de inhibición fueron pequeños .

Tabla No 10
Efecto de la formulación del medio de crecimiento (diseño ortogonal)
en la velocidad de crecimiento de *P. acidilactici* y en la producción de bacteriocina

Cinética de crecimiento	D.O. (Absorbancia)	tiempo de duplicación t_D (h)	velocidad de crecimiento μ (h)	Diámetro de halo de inhibición (mm) en placas de Agar Antibióticos No 11	
				tamaño de poro de membrana 0.22 μ m	0.45 μ m
1111	1.042	2.68	0.27	10.5	8.0
1122	0.856	2.89	0.24	9.5	8.5
1212	0.976	3.22	0.22	-	12.25
1221	0.967	3.03	0.23	11.0	8.5
2112	1.129	2.63	0.25	10.25	8.75
2121	0.922	2.87	0.29	9.0	9.0
2211	1.095	2.81	0.24	8.75	8.5
2222	0.930	3.07	0.23	8.25	9.0

Se incluyen los promedios de 4 repeticiones de cada cinética

La producción de bacteriocina se presenta como diámetro de halo de inhibición de *S. aureus* de la prueba de difusión en agar al utilizar el sobrenadante de cada formulación de medio de cultivo.

4.4. Condiciones de Liofilización de *Pediococcus acidilactici*

Muchos métodos han sido utilizados para preservar bacterias, pero no todas las especies responden de la misma manera ante un método dado. La liofilización tiene grandes ventajas sobre otros procesos de remoción de humedad, especialmente cuando se utiliza para materiales biológicos y productos sensibles a la temperatura.

Una de las principales claves del éxito en la preparación de cultivos para la conservación es a partir de cultivos activos y constituidos por un gran número de células viables, siendo un cultivo activo aquél que se encuentra en la curva de crecimiento entre la región superior de la fase logarítmica y el comienzo de la fase estacionaria (Ibarra, 1997).

En este trabajo y previa a la aplicación de los diferentes medios de suspensión, se realizó la determinación de UFC/ml de las células viables de *P. acidilactici* a una concentración de 9 log. Se utilizaron 2 viales de vidrio para cada lote con 1 ml de cada medio de suspensión, donde se resuspendieron las células antes cosechadas y cuantificadas.

4.4.1. Efecto del uso de crioprotectores sobre la viabilidad de *P. acidilactici*

La adición de ciertos agentes, como azúcares, aminoácidos, péptidos, proteínas y otras sustancias en los medios de suspensión, mejoran la sobrevivencia de los microorganismos conservados por diferentes métodos (Heckly, 1978).

Morichi e Irie (1973) han reportado el efecto positivo de usar leche descremada en polvo como agente de suspensión en la liofilización, ya que el porcentaje de microorganismos que mueren durante la liofilización puede ser mayor que el que se pierde durante el almacenamiento subsecuente.

Olson (1959) encontró que el CaCO_3 dió el mejor resultado entre varios amortiguadores insolubles aplicados a cultivos iniciadores líquidos para yoghurt preservados en refrigeración, además el calcio es un constituyente de la pared celular de las bacterias Gram-positivas por lo cual fue importante considerar su adición.

En la Tabla No 11 se presentan los resultados en viabilidad de *Pediococcus acidilactici* liofilizados con y sin crioprotectores y neutralizante.

Tabla No 11
Resultados de la viabilidad de *P. acidilactici*
adicionados o no de crioprotectores y neutralizante
(almacenamiento a -20°C)

Medios de suspensión (vial y duplicado)	Viabilidad		Viabilidad	
	(UFC/ml)	(%)	(UFC/ml)	(%)
Antes de liofilizar	1.31×10^9	100	1.31×10^9	100
	2 meses de almacenamiento		7 meses de almacenamiento	
MRS modificado	1.05×10^9	79.24	1.04×10^9	78.29
MRS modificado +10% leche descremada	1.225×10^9	92.45	1.21×10^9	91.50
MRS modificado +10% leche descremada + 0.1% CaCO_3	1.25×10^9	94.34	1.25×10^9	94.34

El lote en que se usó únicamente el medio MRS modificado como medio de suspensión ante la liofilización, presentó los menores porcentajes de viabilidad a los 2 meses de almacenamiento en congelación (79.24%), disminuyendo a 78.29% a los 7 meses.

En el segundo lote la adición de 10% de leche descremada al MRS modificado permitió un incremento sensible en la viabilidad a 92.45%, a los 2 meses y de 91.50% a los 7 meses de almacenamiento a -20°C y en el lote que se adicionó además CaCO₃ (neutralizante) el incremento alcanzó 94.34% a los 2 y 7 meses de almacenamiento, 18% más de células viables que el control con MRS modificado sin crioprotectores ni neutralizante. En este lote la viabilidad no se modificó a los 2 y 7 meses de almacenamiento en congelación.

Los resultados de porcentaje de células viables ante la liofilización indican que esta cepa requiere de la adición de agentes crioprotectores, como la leche descremada y la sacarosa, para conservar mayor viabilidad. Heckly (1978) señala que la sacarosa es un agente crioprotector para *Lactobacillus*.

Morichi e Irie (1973) y Heckly (1978) han reportado el efecto benéfico de utilizar leche descremada en polvo como un medio de suspensión ante la liofilización, aunque no son entendidos claramente los mecanismos exactos por los cuales estos compuestos y otros crioprotectores proporcionan protección contra el daño producido durante la congelación.

Castro *et al.* (1997) señalan que la reducción del efecto letal de la concentración de solutos, la prevención de la formación de hielo intracelular o la reducción de sus consecuencias letales debido a la formación de puentes de hidrógeno entre el agua y las estructuras celulares, pueden ser algunas de las explicaciones para *Lactobacillus bulgaricus* liofilizados.

4.4.2. Efecto del uso de crioprotectores sobre la actividad de bacteriocina de *P. acidilactici*

La viabilidad basada sólo en el número de células de *P. acidilactici* sobrevivientes ante la liofilización no es un criterio suficiente para evaluar su efectividad como método de conservación. Era importante además evaluar las propiedades funcionales de la cepa en su actividad fermentativa y la producción de bacteriocinas.

Los resultados de la actividad de bacteriocina medida por los diámetros de los halos de inhibición producidos por los diferentes lotes de *P. acidilactici* se muestran en la tabla No 12, en donde se incluyen también los resultados obtenidos con una cepa comercial liofilizada y almacenada a la misma temperatura, la cual fue reconstituída y analizada del mismo modo que los otros lotes.

Tabla No 12
Resultados de la actividad de bacteriocina de *P. acidilactici* tras conservar la cepa por liofilización con medios de suspensión adicionados o no de crioprotectores y neutralizante (almacenamiento a -20°C)

Medio de suspensión (vial y duplicado)	Diámetro de Halo de inhibición(mm)	
	2 meses	7 meses
MRS modificado	12.5	12.5
MRS modificado + 10% leche descremada	15	15
MRS modificado + 10% leche descremada + 0,1% CaCO ₃	20	20
Cultivo Comercial	no se sabe medio de suspensión, ni fecha de liofilización	18
Cultivo Comercial 4° pase en CTS	no se sabe medio de suspensión, ni fecha de liofilización	19

Los lotes conservados en MRS modificado mostraron el tamaño mas pequeño de los halos de inhibición (12.5 mm). En aquéllos donde se adicionó leche descremada se detectó un aumento a 15 mm en el tamaño de los halos y cuando además se adicionó neutralizante el aumento fue a 20 mm quedando en evidencia que la producción de bacteriocina también se beneficia con la adición de crioprotector y amortiguador.

El tiempo de almacenamiento no tuvo ningún efecto en los resultados de inhibición de *S. aureus* ya que no hubo diferencia entre los resultados a los 2 y a los 7 meses de almacenamiento a -20°C, sin embargo se pudo observar que las cepas en MRS modificado aumentaban el tamaño de los halos de inhibición al realizar la prueba de difusión en agar conforme mayor era el número de pases en CSTES y se alcanzaron resultados similares en el control y los lotes adicionados con leche descremada.

4.4.3. Efecto del uso de crioprotectores sobre el perfil de fermentación de carbohidratos de *P. acidilactici*

Los resultados de actividad fermentativa no mostraron cambio en ninguno de los lotes liofilizados como se aprecia en la Tabla No 13, aunque se sugiere ampliar el número de carbohidratos a evaluar, ya que Ibarra (1997) señala que la liofilización puede generar cambios en el perfil de fermentación de carbohidratos de otras BAL.

Tabla No 13
Resultados de la actividad fermentativa de *P. acidilactici*
lío filizados con o sin crioprotector y neutralizante

sacarosa 0.5%	+
glucosa 1.0%	+
fructosa 1.0%	+
lactosa 2.0%	+
arabinosa 3.0%	-
xilosa 1.0%	-
sorbitol 1.0%	-

En todos los casos la producción de ácido de la fermentación de carbohidratos fue positiva.

5.0 CONCLUSIONES

1. Se demostró mediante pruebas cualitativas y cuantitativas que la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 produce bacteriocinas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p. La naturaleza proteica del compuesto se estableció al perder éste su actividad por tratamiento con tripsina.
2. La Concentración Mínima Inhibitoria de sobrenadante vs *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p fue de 1.66µl/ml. La curva de muerte demostró una relación inversa entre el número de células viables (UFC/ml) y el sobrenadante sin diluir, alcanzando un 66% de inhibición de las células de *S. aureus* en 10 horas.
3. Se detectó la presencia de un plásmido con peso molecular de 2,700 kDa que no había sido reportado con anterioridad para otras cepas de *P. acidilactici*.
4. El análisis estadístico demostró una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre los resultados de Absorbancia de las diferentes formulaciones de cada medio de crecimiento. La prueba de Duncan ($p < 0.01$) estableció la formación de 4 subgrupos donde resalta que los diámetros de los halos de inhibición de mayor tamaño se obtuvieron de los medios con sacarosa al 1.0%, ácido ascórbico al 0.15% y $MnSO_4$ al 0.019%
5. La mejor formulación de medio de producción para producir mayor velocidad de crecimiento (μ) fue el MRS modificado con 2% de sacarosa, 0.1% de ácido ascórbico, 0.025% de $MnSO_4$, 0.0019% de $CaCO_3$.
6. La producción de bacteriocina mostró independencia entre los resultados de D.O. (Absorbancia), velocidad de crecimiento y halos de inhibición de cada formulación y no existe correlación entre ellos.
7. Los resultados obtenidos señalan un efecto muy favorable en la cepa liofilizada en MRS modificado adicionado de 10% de leche descremada y 0.1% de $CaCO_3$ ya que de este modo conserva una mayor viabilidad (94.34%). El medio de suspensión si tuvo una influencia altamente significativa ($p < 0.01$) en los halos de inhibición obtenidos mediante la prueba de difusión en agar ya que fueron mayores los obtenidos de los lotes con adición de crioprotector y neutralizante. Se observó que la liofilización no modificó el perfil de fermentación de los carbohidratos al utilizar el MRS modificado solo o con adición de crioprotector y neutralizante.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

LITERATURA CITADA.

- Ahn, C. y Stiles, M.E. 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 302-310.
- Anderson, R. 1988. Lactic acid bacteria in the production of food. *Food Process.*, 14: 17-21.
- Archibald, F.S. 1988. Manganese, superoxide dismutase and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 146(6):928-936.
- Ausubel, F.M. 1992. *Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology*. 2nd ed. Greene Pub. Assoc. y John Wiley & Sons. 2.10., 2.11., New York.
- Axelsson, L.T. 1993. Chap. 1: Lactic acid bacteria: Classification and physiology En: von Wright A., Salminen, S. *Lactic acid bacteria*. 1st ed. Marcel Dekker Inc. N.Y. EUA.
- Bacus, J. N.; Brown, W. L. 1981. Use of microbial cultures: meat products. *Food Technol.*, 35(1): 71-78.
- Barry, A.L. 1986. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations. En: *Antibiotics in laboratory medicine*. 2nd ed. V. Lorian (Ed.) Williams & Wilkins, Baltimore, EUA. pp 1-7.
- Barry, A.L. y Thornsberry, C. 1991. Chap. 111. Susceptibility tests: diffusion test procedures. En: Ballows, A., Hausler, W.J., Herrman, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*", 5th ed. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.
- Bello, H. H. y Durán, B. I. 1992. Aplicación de *Pediococcus acidilactici* en la elaboración de un embutido tipo salami. Tesis. Ingeniería en Alimentos. F.E.S.C. U.N.A.M., México, pp 66-70.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C. y Ray B. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.*, 2: 319.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C. y Ray B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*; *J. Appl. Bacteriol.*, 65: 261-268.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray B., y Belden, E.L. 1990. Antigenic property of pediocin Ach produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 211-215.

- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., y Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1265-1267.
- Buchanan R. E. and Gibbons, N. (Eds.) 1986. *The Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp 999-1012.
- Castro, H.P., Teixeira, P.M. and Kirby, R. 1997. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *J. Appl. Microbiol.*, 82:87-94.
- Collins, M.D., Ash, C., Farrow, J.A. E., Phillips, B.A., Feruso, S., y Jones, D. 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative, asporogeneous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 310-316.
- Collins, M.D., Ash, C., Farrow, J.A. E., Walbanks, S., y Williams, A. M. 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analysis of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp., nov. *J. Appl. Bacteriol.*, 67: 453-460.
- Collins M.D., Williams, A.M., y Wallbanks, S. 1990. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, 70: 255-262.
- Daeschel, M.A., and Klaenhammer, T.R. 1985. Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 1538.
- Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as preservatives. *Food Technol.*, 42(1): 164.
- Davey, G.P. 1981. Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. N.Z. *J. Dairy Sci. Technol.*, 187.
- Davidson, P.M. y Parish, M.E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials; *Food Technol.*, 42(1): 148-155.
- Egan, H., Kirk, R.S. y Sawyer, R. 1981. Análisis de Alimentos. 8th ed. Churchill Livingstone. New York. pp 499.
- Fernandes, C.F., Shahani, K.M., y Amer, M.A. 1988. Effect of nutrient media and bile salts on growth and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 71: 3222.
- Foegeding, P.M. Thomas, A.B., Pilkington, D.H. y Klaenhammer, T.R. 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by *in situ*-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 884.

- Garvie, E. 1984. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of *Leuconostoc* from other lactic acid bacteria. *Met. Microbiol.*, 16: 147-178.
- Garvie E.I. 1986. Genus *Pediococcus*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (Sneath, P.H.A. Ed.). vol.2 Williams and Wilkins, Baltimore, pp 1075-1079. Gilliland, S. E. y Speck, M. L. 1975. Inhibition of psychrotrophic bacteria by *Lactobacilli* and *Pediococci* in non fermented refrigerated foods. *J. Food Sci.*, 40: 903-905.
- Gonzalez, C.F. y Kunka, B. 1983. Plasmid transfer in *Pediococcus* spp: Intragenetic and intragenetic transfer of pIP501. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 81-89.
- Gonzalez, C.F. y Kunka, B. 1986. Evidence for plasmid linkage of raffinose utilization and associated α -galactosidase and sucrose hydrolase activity in *Pediococcus pentosaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 105-109.
- Gonzalez, C. F. y Kunka, B. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(10): 2534-2538.
- Graham, D.C., y Mckay, L.L. 1983. Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 532-534.
- Guerrero, L. I. 1989. La biotecnología de los productos cárnicos. Curso PUAL-UNAM, México, pp 1-6.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. y Klaenhammer, T.R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 52: 384.
- Heckly, R. J. 1978; Preservation of microorganisms. *Adv. Appl. Microb.* 24: 1-78.
- Henderson, J.T., Chopko, A.L., y van Wassenaar, P.D. 1992. Purification and Structure of Pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Bioph.*, 295(1): 5-12.
- Hoover, D.G., Dishart, K.J. y Hermes, M.A. 1989. Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.*, 3: 183.
- Hoover, D.G. 1993. Chap. 12. Bacteriocins with potential for use in foods, en Davidson, P.M. and Larry, B.A. (Eds.) *Antimicrobials in foods*. 1st ed. Marcel Dekker Inc.N.Y.
- Ibarra, G.E.B. 1997. Estudio del comportamiento de *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* ante tres métodos de conservación. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Alimentos) Fac. Quím. UNAM.
- Jack, R.N., J.R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59:171-200.

- Kashket, E.R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Rev.*, 46: 233-244.
- Kekessy, D.A., y Piguet, J.D. 1970. New method for detecting bacteriocin production. *Appl. Microbiol.*, 20: 282-283. Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12:39-86.
- Konings, W.N., Poolman, B. y Driessen, A.J.M. 1989. Bioenergetics and solute transport in lactococci, *Crit. Rev. Microbiol.*, 16: 419-476.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature.*, 227: 680-685.
- Lewus, C.B., Kaiser, A., y Montville, T.J. 1991. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1683.
- Lewus, C.B. y Montville, T.J. 1991. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods.*, 13: 145-150.
- Lindgren, S., y Clevström, G. 1978. Antibacterial activity of lactic acid bacteria. 2. Activity in vegetables silages, Indonesian fermented foods and starter cultures. *Swed. J. Agric. Res.*, 8: 67.
- Llorente B.A., Herrera R.C., Sacristán R.M.S., Mendoza E.S. y Farrés G.S.A. 1993. Crecimiento de *Pediococcus acidilactici* bajo diferentes condiciones de cultivo. *Biocología.*, 3(1-2): FB 77.
- Luchansky, J.B., Glass, K.A., Harsono, K.D., Degnan A.J., Faith, N.G., Cauvin, V., Baccus-Taylor, G., Arihara, K., Bator, B. Maurer, A.J. y Cassens, R.G. 1992. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(9): 3053-3059.
- Maloney, P.C. 1990. Microbes and membrane biology, *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 91-102.
- Manual de Bioxon, 1986.
- Marugg, J.D., González, C.F., Kunka, B.S., Ledebor, A.M., Pucci, M.J., Toonen, M.Y. Walker, S.A., Zoetmulder, L.C. y Vanderbergh, P.A. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(8): 2360-2367.

- Montville, T.J. y Kaiser, A.L. 1993. Chap. 1: Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins. En: Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (Eds.) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*; Acad. Press. Inc. 1st ed. New York, U.S.A.
- Montville, T.J., and Winkowski K., Chap. 30. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds). *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*; 1st ed. Am. Soc. Microbiol. Washington, 1997.
- Morichi, T. and Irie, R. 1973. Factors affecting repair of sublethal injury in frozen or freeze-dried bacteria. *Cryobiology*, 10:393-399.
- Motlagh, A.M., Johnson, M.C. y Ray, B. 1991. Viability loss of food borne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food Prot.*, 54(11): 873-884.
- Motlagh, A.M., Holla, S., Johnson, M.C., Ray, B. y Field, R.A. 1992. Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food systems by pediocin Ach, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J. Food Prot.*, 55: 337.
- Morales, V. 1995. Comunicación personal.
- Muriana, P. M., y Klaenhammer, T.R. 1987. Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 553.
- NCCLS. 1991. *Antimicrobial Susceptibility Testing*. 3rd ed., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
- Nettles, C.G., and Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 56:338-356.
- Nielsen, J.W., Dickson, J.S. y Crouse, J.D. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2142.
- Olson, H. C. 1959. Preservation of lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 42(388): 13.
- Parish, M.E. y Davidson P.M. 1993. Chap. 17 Methods for evaluation En: Davidson, P.M. and Larry, B.A. *Antimicrobials in Foods*. 1a ed. Marcel Dekker Inc. N.Y.
- Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem.*, 83: 346-356.
- Piddock, L.J. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 68: 307-318.

- Raccach, M. y Marshall, P. 1985. Effect of manganese ions on the fermentative activity of frozen, thawed *Lactobacilli*. *J. Food Sci.*, 50(3): 665-668.
- Programa estadístico para ciencias sociales SPSS, Chicago, IL. 60611, U.S.A.
- Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S. y Vandenberg, P.A. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 Produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2349.
- Ray, B. y Hoover, D.G. 1993. Chap. 8: Pediocins. En: Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (Eds.) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.*, 1st ed. Acad. Press. Inc.. N.Y.
- Ray, B. and Daeschel, M.A. 1992. *Food biopreservation of microbial origin*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Riebel, W. J. y Washington, J. A. 1990. Clinical and microbiologic characteristics of *Pediococci*. *J. Clin. Microbiol.*, 28(6): 1348-1355.
- Ross, P.J. 1989 "Taguchi Techniques for Quality Engineering" Ed. McGraw-Hill, Singapore., pp 229.
- Rudge, R.H. Maintenance of bacteria by freeze-drying En: Kirsop, B. and Doyle, A. 1991 Maintenance of microorganisms and cultured cells. *A manual of laboratory methods*. 2nd ed. Acad. Press. England, pp 31-44.
- Sahm, D.F. and Jonh A.W. 1991. Chap. 110: Antibacterial susceptibility tests: dilution methods En: Ballows, A., Hausler, W.J., Herrman, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J., (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Amer. Soc. Microb. Washington.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D., and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* ge. nov., *Syst. Appl. Microbiol.*, 6:183-195.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., and Kilpper-Bälz, R., 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10:1-19.
- Schiffner, M. 1978. Cullivos bacterianos para la Industria Cárnica. Ed. Acribia, España, pp 4-25, 57-59, 122-127.
- Smulders, F. J. M. , Barendsen, P., van Logtestijn, J.G., Dmossel, D.A.A. y van der Marel, G.M. 1986. Review: Lactic acid: considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant. *J. Food Technol.*, 21(4): 419-436.

- Snell, J.J.S. General introduction to maintenance methods En: Kirsop, B. and Doyle, A. 1991. *Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods*. 2nd ed. Acad. Press. England, pp 21-30
- SPSS *Programa estadístico para ciencias sociales (SPSS)*, Chicago IL. 60611. USA. Tagg, J.R., Dajani, A.S., and Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40:722-756.
- Tagg J.R., Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria; *Bacteriol. Rev.*, 40(3): 722-756.
- Thornsberry, C. 1991. Chap. 107: Antimicrobial susceptibility testing: general considerations. En. Ballows, A., Hausler, W.J., Herrman, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J., (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Amer. Soc. Microb. Washington.
- Vergara C.A., Llorente B.A, Hernández D.E., y Mendoza E.S. 1993. Conservación de *Pediococcus acidilactici* mediante liofilización. Memorias del VII Foro Interno de Investigación; FESC-UNAM pp. 148
- Wallbanks, S., Martínez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A., y Collins, M.D. 1990. 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmonarium* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 224-230.
- Wiesby Biofermentation GmbH & Co KG. Germany.
- Yang, R., Johnson, M.C., y Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3355-3359.
- Zajdel, J.K., Ceglowski, P. y Dobrzanski, W.T. 1985. Mechanism of action of lactostrepticin S, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. *Appl. Environ. microbiol.*, 49: 969.
- Zaika, L.L., Kissinger, C.J. 1984. Fermentation enhancement by spices: identification of active component. *J. Food Sci.* 49(1):5-9.

ANEXO 1 Extracción de DNA bacteriano para la detección de la presencia de plásmidos (Ausubel et al 1992, 2.10, 2.11)

Reactivos:

TE buffer Tris EDTA
SDS al 10% (w/v)
pronasa E (20 mg/ml) de *Streptomyces griseus*
NaCl 5 M
CTAB/NaCl (elimina polisacáridos que no son del ADN)
Cloroforno/alcohol isoamílico (24:1)
Fenol/cloroforno/alcohol isoamílico (25:24:1)
Isopropanol
Etanol al 70%

Solución CTAB/NaCl (10% CTAB/0.7M NaCl)

Disolver 4.1 g NaCl en 80 ml de H₂O y lentamente adicionar 10 g de CTAB (bromuro de hexadecil trimetil amonio), calentando y agitando simultáneamente a 65°C para disolver si es necesario, ajustar el volumen final a 100 ml.

Solución Tris/DTT

25 mM tris-Cl
1mM DTT
20% (v/v) glicerol pH 8.1- 8.3

Tris-Cl [Tris (hidroximetil) amino etano], 1 M

disolver 121g Tris base en 80 ml de H₂O, ajustar a pH deseable con HCl concentrado, mezclar y adicionar H₂O hasta 1 l.

NaCl 5 M

292 g NaCl llevarlos a 1 l de H₂O.

TE buffer pH 7.4, 7.5, 8.0
10 mM tris-Cl, pH 7.4, 7.5, 8.0
1 mM EDTA, pH 8.0

SDS 10% (w/v) 10g de duodecilsulfato de sodio llevar a 100 ml con H₂O.

ANEXO 2 Obtención de proteína total a partir de células intactas y análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Según Laemmli (1970)

Soluciones stock

1. Solución monomérica (30% + 2.7% C bis)

Acrilamida	58.4 g
Bis	1.6 g
H ₂ O a	200 ml
2. Buffer de corrimiento (1.5 M Tris + HCl, pH 8.8)

Tris	36.3 g
H ₂ O a	200 ml
3. Buffer del gel concentraDo (0.5 Tris-HCl, pH 6.8)

Tris	3.0 g
H ₂ O a	50 ml
4. SDS al 10%

SDS	3.0 g
H ₂ O a	500 ml
5. Indicador (Persulfato de amonio al 10%)

Persulfato de amonio	0.5 g
H ₂ O a	5.0 ml
6. Regulador de tratamiento 2X
(0.125M Tris.HCl, 4% SDS, 20% Glicerol, 10% 2-mercaptoetanol pH 6.8)

SDS	4.0 ml (Soln. 4)
Glicerol	2.0 ml
2-Mercaptoetanol	1.0 ml
7. Regulador de tanque (0.025 M Tris, 0.192 M Glicina, 0.1%, pH 8.3)

Tris	12.0 g
Glicina	57.6 g
SDS	40.0 ml (Soln. 4)
H ₂ O a	4000.0 ml
8. Tinción (0.125% Azul de Coomassie R-250, 40% Metanol, 7% Ácido Acético)

Azul de Coomassie	0.5 g
Metanol	800.0 ml
Ácido Acético	140.0 ml
H ₂ O a	2000.0 ml
9. Solución decolorante I (50% Metanol, 10% Ácido Acético)

Metanol	500.0 ml
Ácido Acético	100.0 ml
H ₂ O a	1000.0 ml

10. Solución decolorante II (7% Ácido Acético, 5% Metanol)

Ácido Acético	700.0 ml
Metanol	500.0 ml
H ₂ O a	1000.0 ml

TABLA DE PREPARACIÓN

	Gel separador 10%, 2.7% C	Gel concentrador 4% T
2.7% C		
Solución (1)	20 µl	2.66µl
Buffer (2)	15 µl	—
Buffer (3)	—	5.0 µl
SDS (4)	0.6 µl	0.2 µl
H ₂ O	24.1µl	12.2 µl
Persulfato Amonio (5)	300 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl

ANEXO 3
Diseño ortogonal para para fermentaciones de *P. acidilactici*
(variables de prueba e interacciones)

A: Sacarosa

Fuente de Carbono

B: Ac. Ascórbico

Requerimiento especial

AxB: Sacarosa/Ac. Ascórbico

C: MnSO₄

Requerimiento especial

AxC: Sacarosa/ MnSO₄

BxC: Ac. Ascórbico/ MnSO₄

D: CaCO₃

Agente neutralizante

Nota: FACTORES INTERACCIONES

TABLA 14
Fermentaciones de *Pediococcus acidilactici* (diseño ortogonal)

Cinética No.	Sacarosa	Ac. Ascórbico	MnSO ₄	CaCO ₃
	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	1	2	2
3	1	2	1	2
4	1	2	2	1
5	2	1	1	2
6	2	1	2	1
7	2	2	1	1
8	2	2	2	2

1 Primer nivel de variación

2 Segundo nivel de variación

Fuente: Ross, 1989

Tabla No 15
Fermentaciones de *P. acidilactici* (diseño ortogonal L_8)
concentraciones de cada variable

Cinética No	Sacarosa (%)	Ac. ascórbico (%)	MnSO ₄ (%)	CaCO ₃ (%)
1	10	1.0	0.19	0.019
2	10	1.0	0.25	0-025
3	10	1.5	0.19	0.025
4	10	1.5	0.25	0.019
5	15	1.0	0.19	0.025
6	15	1.0	0.25	0.019
7	15	1.5	0.19	0.019
8	15	1.5	0.25	0.025

ACIDEZ TITULABLE (mg de ácido láctico/ml)
Egan et al. 1981

Se tomó una alícuota de 5 ml de un cultivo de *Pediococcus acidilactici* y se centrifugó por 25' a 6,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se filtró con membrana Millipore (0.22µm). Se añadieron unas gotas de solución de fenolftaleína como indicador a 3 ml de este sobrenadante y se titularon con NaOH 0.1 M.

La acidez se calculó como mg de ácido láctico donde:

1 ml de NaOH 0.1 M = 0.0090 g de ácido láctico

Tabla No 16
Resultados de la D.O. (Absorbancia) de la cinética de crecimiento
de *P. acidilactici* en CSTES modificado

tiempo (horas)	D.O. (Absorbancia)
Inicio	0.066
2	0.144
4	0.400
6	0.620
8	0.710
10	0.747
12	0.776
24	0.890

Tabla No 17
Resultados de la D.O. (Absorbancia) de la cinética de crecimiento
de *S. aureus* en BHI

tiempo (horas)	D.O. (Absorbancia)
Inicio	0.026
1	0.040
2	0.124
3	0.356
4	0.630
5	0.752
24	0.792

Tabla No 18
Resultados de las cuentas viables de la cinética de crecimiento
de *S. aureus* en Agar BHI

tiempo (horas)	UFC/ml
Inicio	3.58×10^5
1	8.79×10^5
2	2.57×10^7
3	3.20×10^8
4	4.89×10^8
5	5.27×10^8

Tabla No 19
Inhibición de *S. aureus* al adicionar diferentes volúmenes de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* en la prueba turbidimétrica

tiempo (horas)	1/6	1/3	1/5	2/3	5/6	1 Control 1	0 Control 2	0/ácido Control 3
Inicio	0.026	0.024	0.023	0.020	0.020	0.012	0.026	0.041
1	0.041	0.029	0.029	0.028	0.023	0.017	0.040	0.041
2	0.089	0.043	0.037	0.030	0.025	0.017	0.124	0.041
3	0.174	0.068	0.048	0.034	0.028	0.017	0.356	0.041
4							0.630	0.041
5							0.752	0.041
24	0.652	0.370	0.270	0.129	0.045	0.025	0.792	0.041

Tabla No 20
Curva de inhibición o muerte de *S. aureus* al adicionar diferentes volúmenes de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici*

tiempo (horas)	1/6	2/3	1/2	2/3	5/6	1 Control 1	0 Control 2	0/ácido Control 3
Inicio	6.22×10^5	8.36×10^5	8.16×10^5	7.54×10^5	7.94×10^5	6.45×10^5	3.58×10^5	6.16×10^5
1							8.80×10^5	
2			1.91×10^5	9.31×10^4	5.83×10^4	1.40×10^4	2.57×10^7	6.16×10^5
3							4.90×10^8	
4								
10	8.75×10^5	9.72×10^5	6.42×10^4	4.43×10^4	2.41×10^4	5.27×10^3	4.90×10^8	