



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE
INTERÉS BIOTECNOLÓGICO POR *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

MARIANA CONTRERAS CRUZ



MÉXICO, D.F.

2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** María del Carmen Wachter Rodarte

VOCAL: **Profesor:** Amelia María de Guadalupe Farrés González-Saravia

SECRETARIO: **Profesor:** José Adelfo Escalante Lozada

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Maricarmen Quirasco Baruch

2° SUPLENTE: **Profesor:** Beatriz Ruíz Villafan

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 312 Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México

ASESOR DEL TEMA:

DRA. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.A. ISRAEL GARCÍA CANO

SUSTENTANTE:

MARIANA CONTRERAS CRUZ

**EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE INTERÉS
BIOTECNOLÓGICO POR *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042”**

Contenido

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Alimentos fermentados.....	3
1.2. Bacterias ácido lácticas (BAL).....	4
1.2.1. Compuestos con efecto antimicrobiano.....	5
1.2.2. Compuestos con aportes organolépticos.....	7
1.3. Crecimiento microbiano.....	9
1.4. Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y metabolismo microbiano	10
1.5. Efecto de las condiciones de cultivo.....	11
1.6. Efecto de la temperatura y el pH	12
1.7. Estados de estrés y sustancias producidas por microorganismos.....	13
1.8. Enzimas de interés en BAL	13
1.8.1. Proteasas	13
1.8.2. Peptidoglucano hidrolasas (PGH).....	15
2. ANTECEDENTES	19
2.1. Género <i>Pediococcus</i>	19
2.2. <i>Pediococcus pentosaceus</i>	19
2.2.1. Bacteriocinas de <i>Pediococcus pentosaceus</i>	19
2.2.2. Actividad proteolítica de <i>Pediococcus pentosaceus</i>	20
2.3. <i>Pediococcus acidilactici</i>	20
2.3.1. Actividad lítica de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	20
2.3.2. Actividad proteolítica de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	23
5.1. OBJETIVO GENERAL	23
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	23
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	24
6.1. Primera fase experimental.....	24
6.1.1. Material biológico	25

6.1.2.	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	25
6.1.3.	Determinación de proteína de los distintos medios de cultivo utilizados	27
6.1.4.	Determinación del perfil proteico y de la actividad lítica y proteolítica por zimogramas.....	28
6.2.	Segunda fase experimental.....	29
6.2.1.	Condiciones de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 y extracción de proteínas adheridas a membrana	30
6.2.2.	Extracción de proteínas adheridas a membranas.....	31
6.2.3.	Cuantificación de proteína.....	31
6.2.4.	Evaluación de actividad antimicrobiana por difusión en agar.....	31
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
7.1.	Determinación del perfil proteico por SDS PAGE, de la actividad lítica y de la actividad proteolítica por zimogramas.....	41
7.1.1.	MRS.....	41
7.1.2.	APT	42
7.1.3.	TSB.....	43
7.1.4.	M17	44
7.1.5.	CGB.....	45
7.1.6.	TSB + Tween 80	46
7.1.7.	M17 + glucosa.....	46
7.2.	Efecto de la aireación en la producción de enzimas de interés biotecnológico	48
7.3.	Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de enzimas de interés biotecnológico por <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	48
7.4.	Efecto de la fuente de carbono en la producción de enzimas de interés biotecnológico por <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	50
7.5.	Efecto de otros nutrientes en la producción de enzimas de interés biotecnológico.....	51
7.6.	Segunda fase experimental.....	51
7.6.1.	Difusión en agar	52
8.	Conclusiones.....	54
9.	Bibliografía	56

1. RESUMEN

La fermentación es una de las tecnologías de preservación de alimentos más antiguas. Los métodos tradicionales para fermentar alimentos son espontáneos, sin la necesidad de adicionar un microorganismo de manera intencional. Sin embargo en los procesos industrializados actuales, el uso de cultivos iniciadores es común, para lo que se usan ampliamente las bacterias ácido lácticas.

En productos cárnicos fermentados uno de los iniciadores mas utilizados es *Pediococcus acidilactici*, el cual contribuye en la aceleración de la maduración y en la producción de aromas y sabores debido a la producción de distintos metabolitos, como proteasas y lipasas. También se ha reportado actividad antimicrobiana por esta cepa debido a la producción de ácido láctico, bacteriocinas y PGH (peptidoglucano hidrolasas). En el grupo de trabajo se reportó que la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 produce una proteína de 99 kDa con actividad de N-acetilmuramidasa (García-Cano *et al.*, 2011), una proteína adherida a membrana a los 110 kDa (Velasco-Pérez) y una proteína a los 116 kDa, todas con actividad lítica. También se reportó la producción de proteasas a los 80 y 99 kDa (Granados-Pérez, 2009; Casales-Cabrera, 2012), una proteasa de 120 kDa (Vendramin, 2013) y una extracelular >200 kDa (Llorente, 2008).

Se desconocen muchos detalles acerca de la producción de enzimas de importancia tecnológica como las mencionadas anteriormente. Sin embargo se sabe que el crecimiento celular y la acumulación de productos del metabolismo están fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales inorgánicas. Dado el efecto de los constituyentes del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento sobre la producción de metabolitos microbianos, en general y de enzimas en particular, en este trabajo se exploró el efecto de los mismos en la producción de estas enzimas de interés biotecnológico.

P. acidilactici creció en los medios comerciales MRS, APT, TSB, M17, CGB, TSB +Tween 80 y M17 +glucosa. Los distintos medios tuvieron un efecto en la capacidad del

microorganismo para crecer y producir enzimas de actividad lítica. El hecho de someter a la bacteria a condiciones limitantes de nutrientes influyó en la producción de enzimas proteolíticas con actividad contra gelatina, mientras que la aireación del medio de cultivo no tuvo un impacto importante en el crecimiento de la BAL pero si en la producción de metabolitos. En medio MRS la bacteria produjo dos enzimas de actividad lítica, y la proteína de 99 kDa no se obtuvo al aumentar la concentración de aire al medio con agitación.

2. INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos fermentados

La fermentación es una de las tecnologías más antiguas de procesamiento de alimentos conocida por el hombre, los primeros registros de la fabricación de productos fermentados con leche, carne y verdura como materia prima datan del año 6,000 a.C. Los métodos tradicionales para fermentar alimentos son espontáneos, sin la necesidad de adicionar un microorganismo de manera intencional sin embargo, en los procesos industrializados, el uso de cultivos iniciadores es común.

Un cultivo iniciador puede ser definido como una preparación microbiana de un gran número de células, de al menos un microorganismo, que es adicionado a la materia prima deliberadamente para su fermentación (Leroy y De Vuyst, 2004).

La fermentación de un alimento se puede llevar a cabo por hongos filamentosos, levaduras o bacterias los cuales convierten los carbohidratos fermentables en metabolitos, tales como ácidos orgánicos, alcohol y dióxido de carbono. Este proceso no sólo incrementa la vida de anaquel y la seguridad microbiológica de un producto, sino, también, hace a algunos alimentos más digeribles (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Los cultivos iniciadores deben ser capaces de crecer a las temperaturas de fermentación y condiciones de a_w del alimento así como generar enzimas que permitan la producción de metabolitos de interés (Fernandes *et al.*, 2009).

Las bacterias ácido lácticas son ampliamente usadas como cultivos iniciadores en la producción de productos lácteos, cárnicos, bebidas alcohólicas y vegetales (Carr *et al.*, 2002). En el caso de productos cárnicos, estas bacterias son los microorganismos más usados ya que producen suficiente cantidad de ácido láctico para disminuir el pH inicial de la carne de 6 hasta valores de 4.8 a 5 (Benito *et al.*, 2004). Además las enzimas proteolíticas de las BAL desempeñan un papel importante en la degradación de proteínas y péptidos y generan la liberación de aminoácidos en alimentos fermentados, los cuales contribuyen al sabor de estos productos (Benito *et al.*, 2007).

1.2. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Una descripción general para las bacterias ácido lácticas (BAL) es que son un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, catalasa negativas, aerotolerantes, exigentes nutricionalmente, tolerantes a pH ácido, estrictamente fermentativas y que producen ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos. Son asociadas normalmente con hábitats ricos en nutrientes, como lo son varios productos alimenticios, pero algunas son miembros comunes de la biota normal de la boca, intestino y vagina de mamíferos (Salminen, 2004). Los géneros que se incluyen dentro de esta descripción general de las BAL son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* y el género *Bifidobacterium* (Leroy, 2010).

Entre las BAL se pueden distinguir dos rutas metabólicas para la fermentación de carbohidratos, la glucólisis (La ruta de Embden-Meyerhof-Parnas) resulta casi exclusivamente en la producción de ácido láctico como producto final bajo condiciones estándar, este tipo de metabolismo es llamado la ruta de fermentación homoláctica. La segunda es la ruta del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa que resulta en cantidades significativas de otros productos finales como etanol, acetato y CO₂ además de ácido láctico (Figura 1). Este tipo de metabolismo es llamado fermentación heteroláctica (Salminen, 2004).

La gran mayoría de los procesos fermentativos de alimentos depende de las BAL como microbiota competitiva para mediar el proceso, ya que los productos finales del catabolismo de carbohidratos por estas bacterias contribuyen al sabor, aroma y textura del alimento que le da características únicas al producto final (Caplice y Fitzgerald, 1999), además de que sus propiedades antimicrobianas naturales extienden su vida de anaquel (Reis *et al.*, 2012).

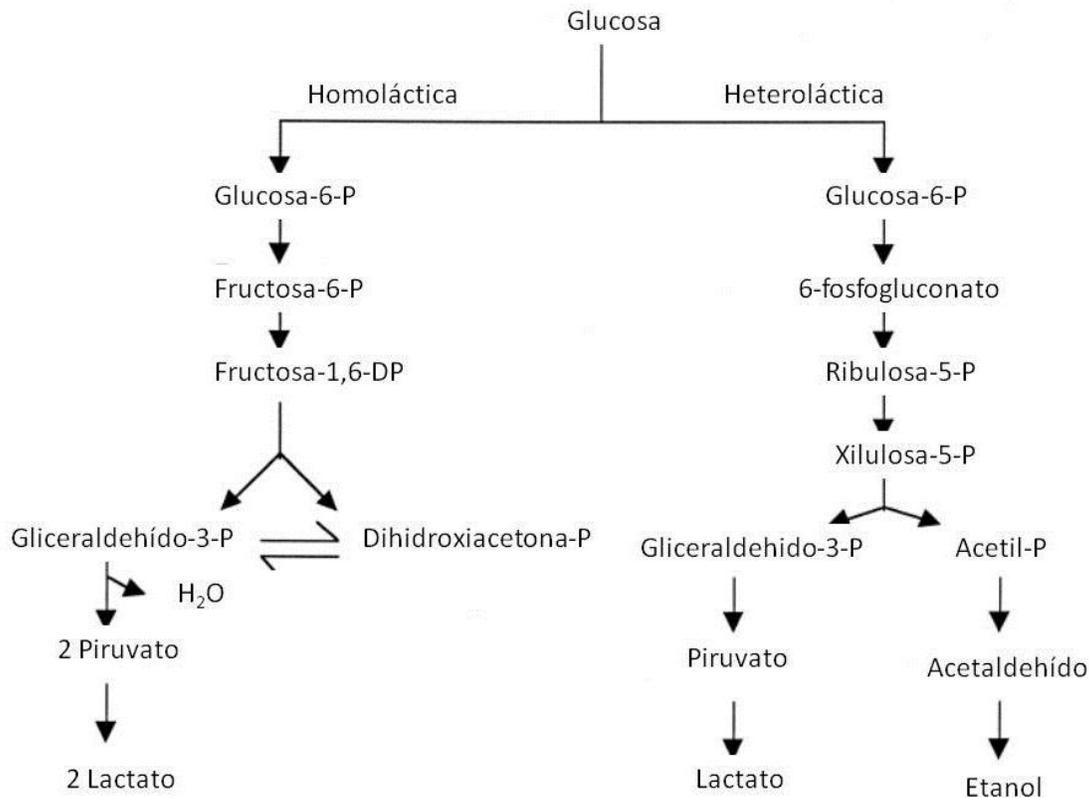


Figura 1. Esquema general del metabolismo de glucosa en las bacterias ácido lácticas (Tomado y modificado de Caplice y Fitzgerald, 1999)

1.2.1. Compuestos con efecto antimicrobiano

El efecto conservador que presentan estas bacterias se debe a la producción de uno o más metabolitos como ácidos orgánicos (láctico, acético, fórmico, propiónico y butírico) que intensifican su acción reduciendo el pH del medio y otras sustancias como etanol, ácidos grasos, acetoína, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, compuestos antifúngicos (propionato, fenil-lactato, hidroxifenil-lactato, dipeptidos cíclicos y ácidos grasos 3-hidroxi), proteasas (Villaruel *et al.*, 2004), peptidoglucano hidrolasas (PGH) (Lortal y Chapot-Chartier, 2005), sustancias inhibitorias parecidas a bacteriocinas y bacteriocinas (nisina, reuterina, reuterociclina, pediocina, lacticina, enterocina) (Salminen, 2004; Reis *et al.*, 2012).

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados ribosomalmente por algunas bacterias, presentan actividad antimicrobiana contra especies relacionadas filogenéticamente. En general son catiónicas, anfifílicas y capaces de permeabilizar la membrana celular; se

dividen en tres clases: la clase I son las bacteriocinas que contienen lantionina, la clase II aquellas bacteriocinas que no contienen lantionina y la clase III son bacteriolisinas. En la Tabla 1 se muestran ejemplos de cada una de ella y su descripción (Cotter *et al.*, 2005).

El uso de bacteriocinas en la industria alimentaria puede ayudar a reducir la adición de conservadores químicos, así como la intensidad del tratamiento con calor, lo que resulta en productos alimenticios conservados de forma más natural que mantengan sus propiedades sensoriales y nutricionales (Reis *et al.*, 2012).

Los alimentos pueden ser inoculados con la cepa productora de bacteriocinas o suplementados con preparados de bacteriocinas puros o parcialmente puros; ejemplos de usos de bacteriocinas en los alimentos se resumen en la Tabla 2 (Balciunas *et al.*, 2013).

Tabla 1. Clases de bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005)

Clasificación	Descripción	Ejemplos
<u>Clase I.</u> Bacteriocinas que contienen lantionina	Lantibióticos de uno o dos péptidos	Nisina
<u>Clase II.</u> Bacteriocinas que no contienen lantionina	Clase heterogénea de pequeños péptidos	Pediocina PA1
Clase III. Bacteriolisinas	Proteínas termolábiles y de alto peso molecular	Enterolisina A

Tabla 2. Aplicación de algunas bacteriocinas para la bioconservación de alimentos (Balciunas *et al.*, 2012)

Bacteriocina	Cepa productora	Microorganismo blanco	Alimento
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Carne de cerdo
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Leche fermentada
Pediocina AcH	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Queso
Enterocina	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Leche
Enterocina	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Salsas
Nisina Z	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Queso

En el grupo de trabajo se ha reportado la producción de una peptidoglucano hidrolasa por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 la cual podría ser considerada como una bacteriocina del tipo III (Tabla 1).

1.2.2. Compuestos con aportes organolépticos

Los productos finales del catabolismo de carbohidratos, como lo son el ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, diacetilo, proteasas, peptidasas y etanol, contribuyen no sólo a la conservación sino también al sabor, aroma y textura del alimento, ayudando así a dar propiedades únicas al producto. La fermentación también puede reducir la toxicidad del sustrato, como se ha visto en fermentación de vegetales, o incrementar la calidad nutricional cuando hay un aumento de la digestibilidad. Un ejemplo de lo anterior se presenta en la fermentación de leche para la fabricación de queso (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Tabla 3. Principales productos sintetizados por las BAL con aportes organolépticos (Caplice y Fitzgerald, 1999)

Durante la fermentación de carne, el pH desciende debido a la producción de ácido láctico, provocando la coagulación de las proteínas, confiriendo textura al producto (Ravyts *et al.*, 2012). El sabor de este tipo de productos se ve fuertemente influenciado

por muchos factores como lo son la carne, el tipo de ingredientes, la temperatura de la fermentación y el cultivo iniciador. La principal contribución de las BAL para la generación de sabor es la producción de grandes cantidades de ácido láctico y de ácido acético, a pesar de que también producen sustancias volátiles a través la fermentación de carbohidratos como lo son hidrocarburos, aldehídos, ácidos, cetonas, alcoholes, ésteres, nitrilos furanos y sulfuros (Stahnhe, 1999). Por lo general las BAL no poseen altas actividades proteolíticas y lipolíticas, aun así algunas cepas son utilizadas como iniciadores en carne.

Las enzimas proteolíticas endógenas de la carne, en particular las parecidas a la catepsina-D, son de mayor importancia para el sabor y son las responsables de la proteólisis y la formación de péptidos durante la fermentación, mientras que las enzimas microbianas ayudan en la liberación de oligopéptidos durante las etapas tardías de maduración. En el caso de los lactobacilos se han observado exopeptidasas que contribuyen, en conjunto con aminopeptidasas a la generación de aminoácidos libres que contribuyen al sabor (Leroy *et al.*, 2006).

En otro caso, para la fermentación de harinas y masas, la proteólisis y posteriores conversiones de aminoácidos llevadas a cabo por algunas BAL contribuyen al sabor de las masas madre. Aunque la actividad proteolítica por las BAL se limita en este tipo de productos, la acidificación debida a la descomposición de carbohidratos, activa proteasas endógenas de los cereales que, a su vez, liberan péptidos y aminoácidos que pueden ser ocupados por los microorganismos presentes. Las conversiones de aminoácidos abarcan la producción de precursores de aroma y sabor como aldehídos y alcoholes.

En el caso de la fermentación de lácteos, la proteólisis de las proteínas de la leche durante la fermentación, genera péptidos y aminoácidos que contribuirán a la formación de metabolitos que aportan sabor al producto. Los metabolitos que dan el sabor típico al yogurt son generados por los cultivos iniciadores (Ravyts *et al.*, 2012).

De acuerdo a los ejemplos anteriores las enzimas más importantes con acción sobre el alimento son las proteasas, las cuales aportan distintas cualidades al producto. En el caso de las bacterias ácido lácticas el sistema proteolítico más estudiado hasta este momento es el de *Lactococcus lactis*; sin embargo se sabe de la existencia de muchas

otras BAL con sistemas de proteasas complejos. Ejemplificando lo anterior esta *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, en el cual se han detectado diversas actividades de proteasa en fracciones celulares distintas (Granados-Pérez, 2009; Casales-Cabrera, 2012; Vendramin, 2013). Sin embargo hasta este momento no se sabe nada sobre el efecto de las condiciones de cultivo en la regulación de la producción de estas enzimas.

1.3. Crecimiento microbiano

En un cultivo en lote el número de células, graficado contra el tiempo, presenta una curva de crecimiento, que, como se puede observar en la Figura 2, se divide en fase de adecuación, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Madigan *et al.*, 2003).

Cuando se inocula una población microbiana en un medio fresco, por lo general, el crecimiento no comienza inmediatamente, sino tras un período que constituye la fase de adecuación, la cual puede ser breve o larga dependiendo de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento. Si un cultivo proveniente de una fase exponencial se inocula en el mismo medio y en las mismas condiciones de cultivo, no se observa una fase de adecuación y el crecimiento logarítmico se inicia inmediatamente. En cambio cuando se transfiere una población de un medio rico en nutrientes a otro con menor contenido de éstos, se presentará una fase de adecuación.

La fase exponencial es una consecuencia de la división celular, donde cada célula se divide para formar dos y así sucesivamente. En general, las células en crecimiento exponencial están en el estado fisiológico más sano y, por ello, son a menudo las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales. La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente pero las velocidades del crecimiento logarítmico son muy variables ya que se afectan por las condiciones ambientales y por las características genéticas del organismo. Este tipo de crecimiento no se puede prolongar de modo indefinido, ya que generalmente un nutriente esencial del medio de cultivo se usa por completo y se convierte en un factor limitante del crecimiento, o bien, se acumulan en el medio productos finales del metabolismo (ácidos orgánicos o alcoholes) y enzimas autolíticas, del tipo de las proteasas y de las nucleasas, que actúan como inhibidores de crecimiento. Frecuentemente ocurren ambos eventos. Esto provoca que la población alcance la fase estacionaria, en la cual no hay aumento ni descenso neto en el

número de células. Muchas funciones celulares continúan, como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. En algunos casos puede ocurrir un crecimiento lento durante la fase estacionaria: aunado al crecimiento de algunas células ocurre la muerte de otras y los dos procesos se equilibran, de modo que no hay aumento ni disminución en el número de células, fenómeno llamado crecimiento críptico (Madigan *et al.*, 2003).

Si la incubación continúa después de que la población alcanzó la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero también pueden morir. Si ocurre esto último, se dice que la población está en fase de muerte (Madigan *et al.*, 2003).

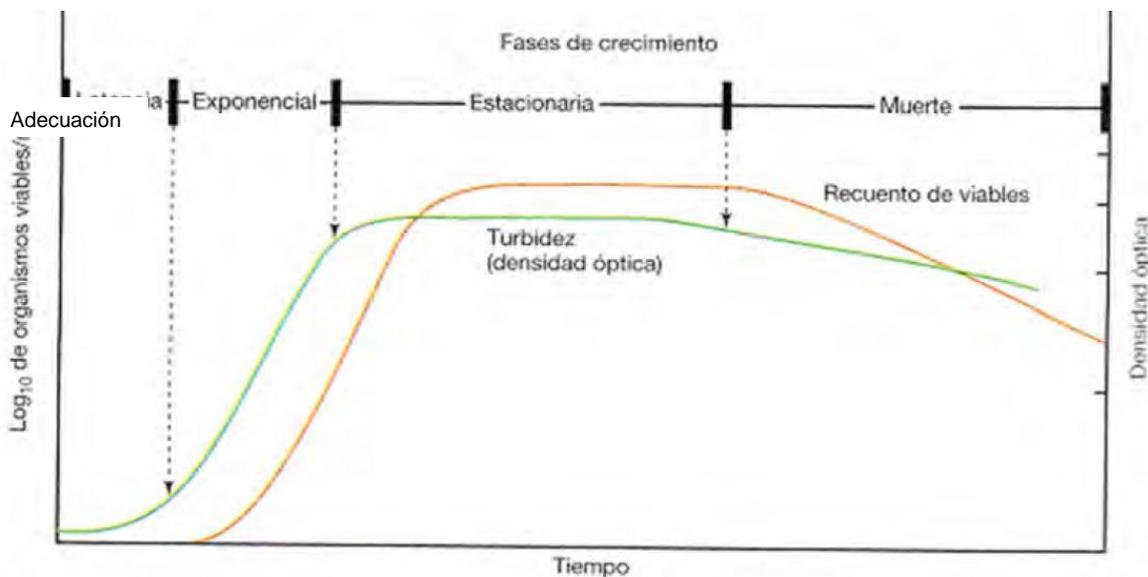


Figura 2. Curva de crecimiento (Stanier, 1996)

1.4. Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y metabolismo microbiano

El crecimiento celular y la acumulación de productos del metabolismo están fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales inorgánicas. Las condiciones que afectan el metabolismo y multiplicación de los microorganismos incluyen nutrientes, agua, pH, inhibidores, oxígeno, temperatura y tiempo. Todas las células requieren ciertas sustancias y reacciones químicas para sobrevivir y reproducirse. La célula debe ser

capaz de obtener una fuente de energía de su ambiente para sintetizar los componentes celulares y esta capacidad depende de los sistemas enzimáticos que el organismo produzca, de acuerdo a su código genético (Chan *et al.*, 2002).

El requerimiento de otros factores de crecimiento en el medio de cultivo, como por ejemplo los surfactantes, depende totalmente del tipo de microorganismo que se pretenda cultivar. Un caso específico es la necesidad de Tween 80 que presentan algunas bacterias, debido a sus propiedades surfactantes o a que podría actuar específicamente como una fuente de oleatos (Jacques, 1980).

1.5. Efecto de las condiciones de cultivo

Los factores ambientales son parámetros clave que tienen una influencia pronunciada en el índice de crecimiento y la magnitud de la formación de sustancias antibacterianas (Ganzle, 1999).

En el caso específico de las BAL, varios factores pueden alterar significativamente la formación de productos finales. Entre ellos están los que provocan alteraciones en el metabolismo del piruvato o en el uso de aceptores de electrones externos como oxígeno en aerobiosis o anaerobiosis o compuestos orgánicos (Salminen, 2004).

Las exigencias de oxígeno de una bacteria en particular reflejan el mecanismo empleado para satisfacer sus necesidades energéticas. Con base en sus requerimientos de oxígeno las bacterias pueden ser divididas en cinco grupos, anaerobios obligados, anaerobios aerotolerantes, anaerobios facultativos, aerobios obligados y microorganismos aerofílicos.

Para poder mantener un cultivo homogéneo y con un mismo pH en todo el medio es necesaria una cierta agitación, la cual además provoca una dispersión de oxígeno que cambia la concentración disponible de este para el microorganismo.

La toxicidad del oxígeno ha sido observada en el cultivo de algunos *Lactococcus* provocando un menor crecimiento. El oxígeno también puede causar la producción de peróxido de hidrógeno por algunas cepas iniciadoras, lo cual puede ser auto inhibitorio (Salminen, 2004).

1.6. Efecto de la temperatura y el pH

La temperatura ejerce dos tipos de efectos opuestos sobre los organismos vivos. A medida que se eleva la temperatura, las reacciones químicas y enzimáticas de la célula son más rápidas y el crecimiento se acelera. Sin embargo por arriba de una cierta temperatura algunas proteínas pueden sufrir desnaturalización irreversible. En consecuencia, dentro de un cierto margen, un aumento de temperatura supone un incremento en el crecimiento y en el metabolismo hasta un punto en que tienen lugar las reacciones de inactivación. Por encima de tal punto, las reacciones celulares caen rápidamente a cero. Así para cada organismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no es posible el crecimiento, una temperatura óptima a la que se produce el crecimiento más rápido y una temperatura máxima por encima de la cual no es posible el crecimiento.

Cada organismo tiene también un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo bien definido. Los organismos que crecen mejor a bajo pH constituyen un tipo de extremófilos llamados acidófilos. El factor crítico más importante para el carácter acidófilo estricto es la estabilidad de la membrana citoplasmática. Cuando el pH es neutro, la membrana citoplasmática de las bacterias muy acidófilas se disuelve y las células se lisan, lo que sugiere que para la membrana citoplasmática sea estable se requieren altas concentraciones de iones hidrógeno. Existen diversos mecanismos de adaptación que los microorganismos llevan a cabo para responder y adaptarse a estos cambios como lo son sistemas antiportes de bombas de sodio y potasio, síntesis de proteínas chaperonas que corrigen la desnaturalización o respuestas de tolerancia a medios ácidos con la síntesis de ATPasas traslocadoras de protones que mantienen la concentración de protones dentro y fuera de la célula.

Numerosos estudios, intentan elucidar las condiciones idóneas de crecimiento y/o de producción de compuestos de interés, ya que estas afectan de manera directa el comportamiento de los microorganismos. De esta manera se pueden llevar a cabo cultivos y fermentaciones direccionadas hacia lo que se intente obtener; ya sea biomasa o algún metabolito (Cheig *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2012).

1.7. Estados de estrés y sustancias producidas por microorganismos.

El término estrés se refiere a cualquier factor o condición que afecte el crecimiento o supervivencia microbiana, se sabe que algunos microorganismos son capaces de sobrevivir a condiciones ambientales presumiblemente letales debido a un fenómeno de adaptación a este estado.

Una vez que los microorganismos detectan el factor de estrés sigue una respuesta adaptativa o de protección, la cual incrementa la tolerancia del organismo a la condición estresante que impide su desarrollo. Este fenómeno es ocasionalmente descrito como adaptación. Casos de la respuesta adaptativa son por ejemplo, que algunas bacterias sean capaces de modificar la fluidez de su membrana o alterar la estructura de las proteínas de su pared celular. A nivel molecular, la respuesta al estrés incluye modificaciones transcripcionales que conducen a la síntesis de proteínas reguladoras. La regulación resultante puede llevar a la síntesis de otras proteínas que hagan frente al estrés impuesto. Las respuestas microbianas al estrés pueden producir lo siguiente (Yousef y Juneja, 2003):

- Producción de proteínas que reparen el daño, mantengan la célula o eliminen el agente de estrés.
- Aumento transitorio de la resistencia o tolerancia a factores nocivos.
- Transición de la célula a un estado latente, como por ejemplo la formación de esporas o a un estado viable no cultivable.
- Evasión de las defensas del organismo hospedero.
- Mutaciones adaptativas

1.8. Enzimas de interés en BAL

1.8.1. Proteasas

Las proteasas son un tipo de enzimas que son capaces de hidrolizar proteínas escindiendo enlaces peptídicos. Teniendo en cuenta, principalmente, la estructura terciaria de la proteína y sus sitios catalíticos, las proteasas se dividen en serín-proteasas, aspartil-proteasas, metaloproteasas y cisteín-proteasas (Tavano, 2013).

Las aplicaciones de la hidrólisis de proteínas van desde la producción de detergentes hasta el desarrollo de la biotecnología alimentaria. En el campo de los productos lácteos y cárnicos se pueden alcanzar muchos efectos positivos en los productos finales con el uso de proteasas específicas, como lo es cambiar las propiedades nutricionales, obtención de proteínas funcionales y bioactivas, mejora de la digestibilidad, modificaciones a la calidad sensorial (por ejemplo textura ó sabor), la mejora de la capacidad antioxidante o la reducción de compuestos alergénicos. En el caso de los alimentos fermentados, la proteólisis es uno de los fenómenos más importantes ya que genera péptidos y aminoácidos con distintas funciones que van desde ser precursores de compuestos de sabor y aroma hasta péptidos con actividad antimicrobiana. Esto últimos están constituidos por cadenas cortas de aminoácidos con características hidrofóbicas y carga positiva que les permite alterar la bicapa lipídica de los microorganismos, causando una modificación similar a la producida por las proteínas de canal, lo cual conlleva a la muerte de la célula debido a la pérdida de iones y sustancias metabólicas (Villaruel *et al.*, 2004).

Las bacterias ácido lácticas son conocidas por poseer una gran variedad de enzimas proteolíticas que las hacen capaces de utilizar las proteínas como una fuente de nitrógeno para garantizar su crecimiento. Generalmente las proteasas producidas por microorganismos son constitutivas o parcialmente inducibles y fuertemente influenciadas por los componentes del medio de cultivo, como la variación en la relación carbón/nitrógeno, presencia de iones metálicos y de algunos azúcares de fácil metabolismo, como la glucosa. La síntesis de proteasas también se ve afectada por fuentes de nitrógeno fácilmente metabolizables, como la presencia de aminoácidos en el medio. Además de esto, hay otros factores físicos como la aireación, densidad del inóculo, pH, temperatura y la incubación que afectan la cantidad de proteasas producidas (Álvarez, 2006).

Estos autores analizaron dos perfiles proteolíticos extracelulares y la influencia del medio de cultivo en su producción, tras cultivar a las cepas de interés en cinco medios distintos. Los resultados mostraron patrones de secreción de proteasas heterogéneos

cuya expresión era dependiente del medio de cultivo. En 2011, Akhavan y Jabalameli reportaron que la producción de una proteasa por *Bacillus* sp. CR 179 variaba significativamente dependiendo de la fuente de carbono que se usara. En ese mismo trabajo se evaluaron distintas velocidades de agitación, las cuales se ha encontrado que influyen en la homogeneidad alcanzada en los matraces donde se lleva a cabo el crecimiento y también en la disponibilidad de nutrientes, la máxima producción de proteasa en este caso se dio a 150 rpm.

1.8.2. Peptidoglucano hidrolasas (PGH)

La pared celular de las bacterias Gram-positivas se compone principalmente de una capa gruesa de peptidoglucano o mureína, que está formada por finas laminas compuestas por dos derivados de azúcares, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutámico y/o bien lisina o ácido diaminopimérico (DAP). Las cadenas peptídicas adyacentes que se proyectan de diferentes cadenas de glucanos pueden estar entrecruzadas por la formación de un enlace peptídico entre el grupo carboxilo de una D-alanina situada en la cuarta posición de una cadena y el grupo α -amino libre del aminoácido tipo diamino de otra (Figura 3.) (Voller y Bertsche, 2008). No todas las cadenas peptídicas participan en el entrecruzamiento, aunque lo hacen las suficientes como para formar una malla molecular. El número de puentes peptídicos no es igual en todas las especies de bacterias y las paredes más rígidas son aquellas que presentan mayor número de puentes intercatenarios (Madigan *et al.*, 2003). Estos componentes se unen entre sí para formar una estructura repetitiva que se denomina tetrapéptido de glicano, el cual además de ser responsable de mantener la forma de la célula, ayuda a proteger a las bacterias de estrés osmótico interno y externo que puede causar la lisis celular (Madigan *et al.*, 2003).

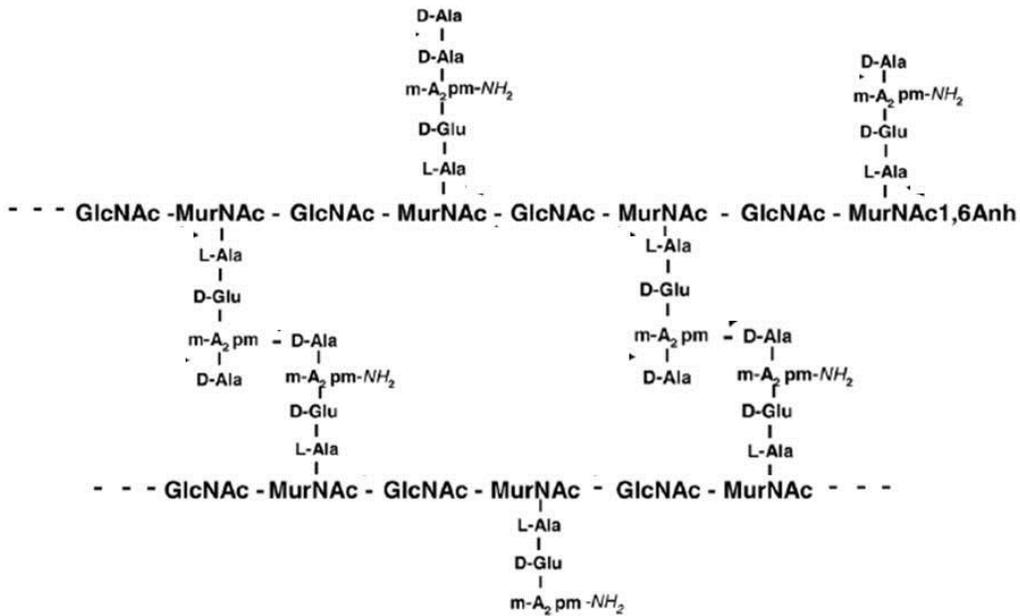


Figura 3. Estructura del peptidoglucano. Pared celular de *E. coli* (Vollmer y Bertsche, 2008).

Las bacterias producen enzimas que son capaces de hidrolizar enlaces de su propia pared de peptidoglucano que son llamadas peptidoglucano hidrolasas (PGH) o autolisinas bacterianas y están relacionadas en distintas funciones que requieren la remodelación de la pared celular durante el crecimiento y la división. Estas incluyen recambio de peptidoglucano, reciclaje, expansión de la pared, maduración y división celular (Huard *et al.*, 2004). Las enzimas están clasificadas dependiendo del tipo de enlace del peptidoglucano que hidrolicen en (Figura 4): N-acetilmuramidasa (Muramidasa), N-acetilglucoamidasa (Glucoamidasa), N-acetilmuramil-L-alanina amidasa (Amidasas) y Endopeptidasas (Φstlie *et al.*, 2007).

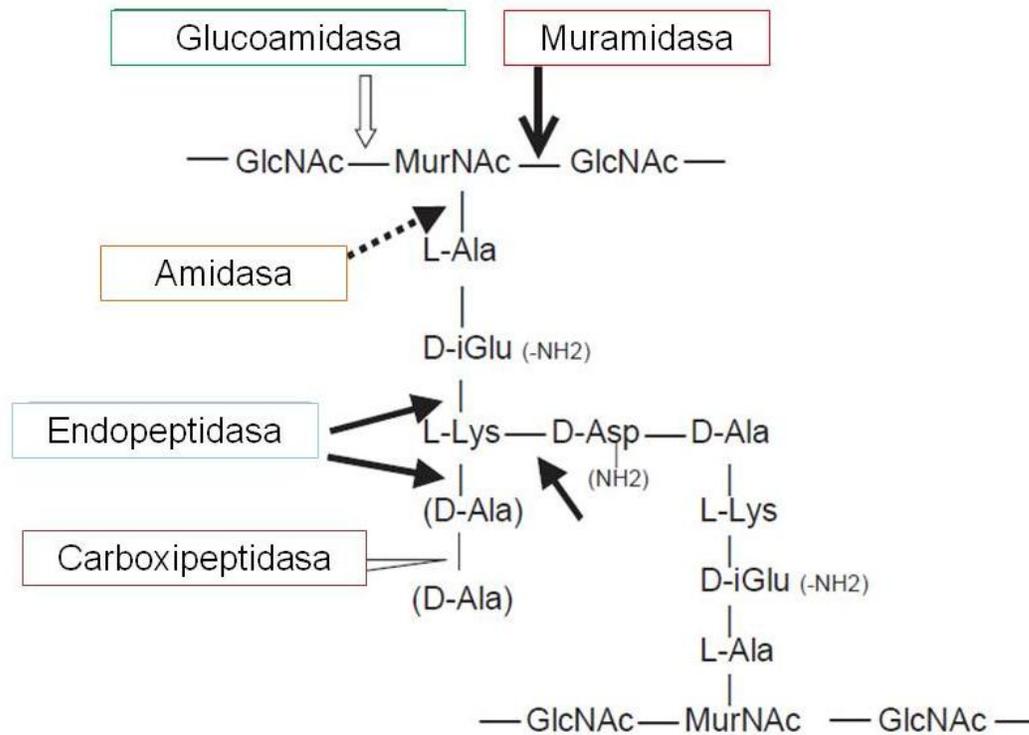


Figura 4. Estructura de la pared celular de bacterias y ejemplificación de las PGH hidrolizando diferentes enlaces (Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

Se ha demostrado que la actividad autolítica está regulada por las condiciones fisiológicas y ambientales de las células y que las autolisinas pueden ser estimuladas por la presencia de muramidasa, péptidos catiónicos, detergentes, enzimas proteolíticas, cationes monovalentes y se inhibe por ácidos lipoteicoicos; sin embargo hay poca información disponible sobre el mecanismo molecular de inducción y represión (Tobin *et al.*, 1994).

Durante la fermentación de productos alimenticios la lisis bacteriana es un factor muy importante debido a que puede llevar a la formación de productos finales deseables e indeseables en el alimento. Las PGH de las BAL han sido estudiadas para una mejor comprensión de su rol durante esta etapa y también por su potencial para facilitar la liberación de enzimas intracelulares en las fermentaciones lácticas (Turner *et al.*, 2007).

En el caso más específico de la producción de queso, las bacterias ácido lácticas se usan como cultivos iniciadores y su autólisis durante la maduración juega un rol importante en el desarrollo del sabor ya que conduce a la liberación de enzimas intracelulares en la cuajada de queso, lo que lleva a la conversión de los componentes de la leche en compuestos aromáticos (Huard *et al.*, 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1. Género *Pediococcus*

El género *Pediococcus* fue descrito por primera vez por Wochnschre F. Balcke en 1884. Está constituido por bacterias Gram-positivas de la familia *Lactobacillaceae*, cocos no móviles (1.0-2.0 µm de diámetro), catalasa negativa que se dividen en ángulo recto en dos planos, lo que resulta en una morfología de tétrada.

Este género requiere de compuestos complejos de nitrógeno, por lo tanto no son capaces de utilizar las sales de amonio como única fuente de nitrógeno o reducir los nitratos a nitritos. Van desde especies aeróbicas hasta microaerofílicas, fermentan la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y forman ya sea D- o L-lactato sin la producción de dióxido de carbono. Crecen a 30°C, la temperatura óptima de crecimiento es de 25-40°C, con un máximo de 52°C y se destruyen por calentamiento a 72°C por 10 min. El pH óptimo del medio de crecimiento es de 6-0-6.5 (Holt *et al.*, 1999 y Carr *et al.*, 2002).

Las especies pertenecientes a este género son: *P. acidilactici*, *P. argentinicus*, *P. cellicola*, *P. clausenii*, *P. damnosus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. lolii*, *P. parvalus*, *P. pentosaceus*, *P. siamensis* y *P. stilesii* (Holland *et al.*, 2011).

Este género se encuentra comúnmente asociado con varias plantas y sus productos, tales como, la col, pepinos y pepinillos, las uvas y el vino, y mosto de cereales (Carr *et al.*, 2002).

2.2. *Pediococcus pentosaceus*

2.2.1. Bacteriocinas de *Pediococcus pentosaceus*

Esta especie ha sido encontrada en vegetales y carnes fermentados (Leroy y De Vuyst, 2004). Se ha reportado con anterioridad que algunas cepas de esta especie son capaces de producir pediocinas (Reis *et al.*, 2012), siendo aisladas de diferentes fuentes como vino, chorizo, carne de cerdo refrigerada, jugo de uva, pepinos, judías y heces humanas.

En 2004, Wu *et al.*, fueron capaces de purificar y caracterizar una bacteriocina producida por la cepa *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. En 2010 Venkateshwari caracterizó una bacteriocina estable al calor producida por la cepa de *P. pentosaceus* CFR B19 la cual fue aislada de frijoles, mientras que en la cepa *P. pentosaceus* CFR SIII, aislada de pepino se caracterizó parcialmente una bacteriocina con actividad lítica contra *Listeria monocytogenes* (Halami *et al.*, 2010).

2.2.2. Actividad proteolítica de *Pediococcus pentosaceus*

Se ha reportado el uso de cepas de *Pediococcus pentosaceus* como cultivo iniciador en la producción de quesos debido a que puede contribuir a acelerar la maduración, así como en la producción de aromas y sabores. Evidencia de lo anterior se presenta en aislados de esta cepa de quesos madurados, que presentan actividad de aminopeptidasa, proteasa intracelular, dipeptidasa, dipeptidil aminopeptidasa y amino peptidasa; actividades sugerentes que esta cepa contribuye a la proteólisis y el desarrollo de sabor en quesos en virtud de la actividad de su sistema proteolítico (Vafopoulou-Mastrojiannaki *et al.*, 1994).

2.3. *Pediococcus acidilactici*

2.3.1. Actividad lítica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Como se mencionó con anterioridad, la búsqueda y caracterización de sustancias antimicrobianas, principalmente bacteriocinas, producidas por cultivos iniciadores ha sugerido su uso potencial como conservadores naturales en productos cárnicos. Muchas cepas de *P. acidilactici* han sido reportadas como productoras de bacteriocinas (Mora *et al.*, 1998; Nieto-Lozano *et al.*, 2010 y Eom *et al.*, 2012). La pediocina Ach/Pa-1, por ejemplo, pertenece a la clase II de bacteriocinas y muestra un amplio espectro de inhibición particularmente contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *C. botulinum* (Mora *et al.*, 1998).

P. acidilactici ATCC 8042 es una cepa no patógena, usada en la preparación de cultivos iniciadores para productos cárnicos y se sabe tiene un efecto bioconservador en salamis

(Llorente, 1998), sin embargo en 1998, Mora *et al.* reportaron que esta cepa en particular es no bacteriocinogénica por lo cual el efecto de inhibición que presenta es debido a sustancias distintas de las bacteriocinas (Mora *et al.*, 1998)

Se ha reportado en numerosas ocasiones actividad lítica presentada por esta cepa. En 2003 Mora *et al.* hicieron registro de la producción de una enzima de 116 kDa relacionada con el alto grado de autólisis que presentaba el microorganismo después de 48 h así como también bandas con actividad lítica secundarias en un rango entre los 45 y 110 kDa. Se ha reportado también la producción de una enzima con actividad de PGH con un peso 110 kDa cuando la BAL se hace crecer en medio MRS sin agitación (Llorente, 2008).

En reportes más recientes Velasco-Pérez en 2010 detectó la producción de una enzima adherida a membrana de aprox. 110 kDa, con actividad lítica, producida a las 8 h de crecimiento la cual presentó un amplio espectro antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En un intento de identificación de esta proteína se encontraron dos bandas con actividad lítica, ubicadas en 99 y 110 kDa. La de menor tamaño corresponde a una N-acetilmuramidasa y la de 110 kDa a una proteína de función desconocida, reportadas en el genoma de *Pediococcus acidilactici* 7_4. Ambos trabajos se realizaron en medio MRS a 30°C sin agitación (García-Cano *et al.*, 2011).

2.3.2. Actividad proteolítica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Con la finalidad de comprender el sistema proteolítico de esta cepa se ha estudiado su capacidad de hidrolizar proteínas; se ha reportado que, durante la fase logarítmica de crecimiento, presentó actividad extracelular proteolítica de >200 kDa y otra de 107 kDa al hacerse crecer en medio MRS sin agitación (Llorente, 2008). La proteasa extracelular >200 kDa es una metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} que se mantiene activa en un intervalo de pH de 4.5 a 11 y en un amplio rango de temperatura (de 25 a 92°C) siendo la óptima a 37°C (Granados-Pérez, 2009). Esta autora reportó una proteasa adherida a membrana de 80 kDa, tipo metaloproteasa, producida en medio MRS a 30°C y con agitación de 120 rpm.

En trabajos más recientes (2012) Casales-Cabrera reportó una proteasa citosólica que se produce durante la fase logarítmica de crecimiento, que alcanza una máxima

producción a las 8 h, con un peso molecular de 99 KDa y tuvo mayor actividad contra gelatina, aunque también presentó actividad proteolítica contra caseína y colágeno. Esta enzima fue más activa a pH alcalinos y resultó estable en un intervalo de temperaturas entre 37 y 60°C. Puesto que es inhibida por el PMSF, probablemente se trata de una serín-proteasa.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pediococcus acidilactici es ampliamente utilizado en la industria cárnica. Se desconocen muchos detalles acerca de la producción de enzimas de importancia tecnológica como lo son las proteasas y las peptidoglucano hidrolasas, estas últimas de importancia como antibacterianos.

Dado el efecto de los constituyentes del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento sobre la producción de metabolitos microbianos, en general, y de enzimas, en particular, en este trabajo se explorará el efecto de los mismos en la producción de estas enzimas de interés biotecnológico.

4. HIPÓTESIS

Si se modifican la fuente de nutrientes y las condiciones de aireación *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 producirá compuestos antibacterianos y proteolíticos distintos a los obtenidos en las condiciones iniciales.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto en la producción de enzimas antimicrobianas y proteolíticas por *P. acidilactici* ATCC 8042 en medios de cultivo y condiciones de aireación distintos.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de medios de cultivo con distintas fuentes de carbono, nitrógeno y factores de crecimiento para las BAL (MRS, APT, TSB, CGB, M17, TSB + Tween 80 y M17 + glucosa) sobre la velocidad de crecimiento, crecimiento y producción de las enzimas de interés.
- Observar el efecto de la aireación en el crecimiento de esta BAL.
- Obtener el perfil proteico por SDS-PAGE de células y sobrenadantes en distintos tiempos de cosecha y condiciones de cultivo.
- Determinar actividad lítica y proteolítica por medio de zimografía en células y sobrenadantes obtenidos en diferentes condiciones y tiempo de cultivo.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1. Primera fase experimental

Obtención de las cinéticas de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 en distintos medios de cultivo. La metodología seguida en la primera fase experimental se resume en la figura 5.

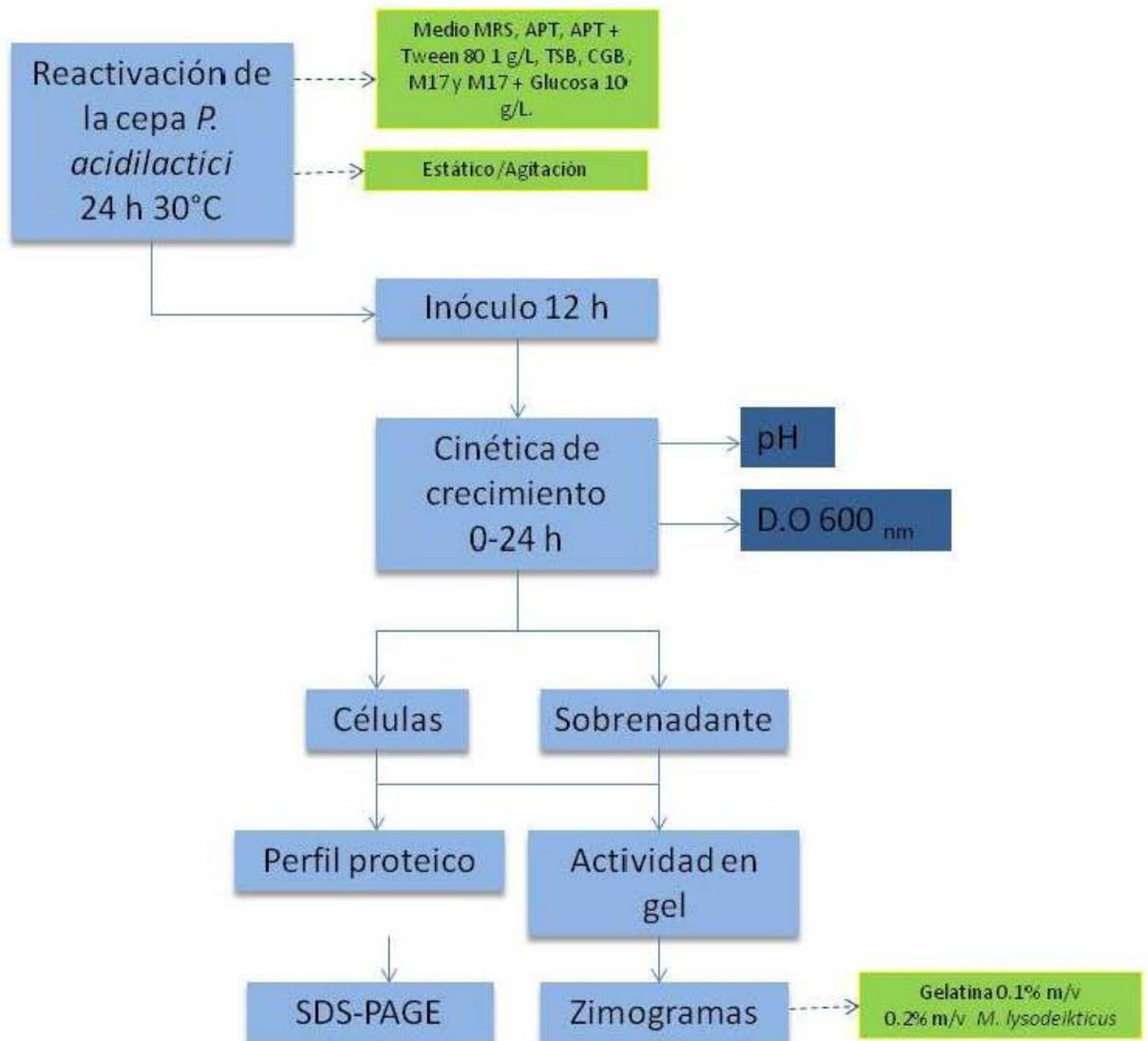


Figura 5. Diagrama de trabajo de la primera fase del estudio

6.1.1. Material biológico

P. acidilactici ATCC 8042 fue obtenida del cepario del CINVESTAV, México. Las células se almacenaron a -20°C en viales con esferas de vidrio perforadas y en caldo MRS (DeMan Rogosa and Sharp, Oxoid) con glicerol (80-20 %, v/v).

6.1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042

Se realizaron pre-inóculos adicionando 2 perlas de vidrio de *P. acidilactici* conservada a -20°C por cada 20 mL de medio de cultivo a evaluar (MRS, APT, TSB, TSB + Tween 80 1 g/L, CGB, M17 y M17 + glucosa 10 g/L). El pre-inóculo se incubó a 30°C por 24 h; en estático (Precision Gravity Convection Incubator Modelo 4) o con agitación a una velocidad de 250 rpm (INNOVA 4000, New Brunswick Scientific.), según condición de aireación a evaluar. Posteriormente se realizó una resiembra del pre-inóculo adicionando 1% de este a un matraz de 50 mL con 20 mL de medio, se incubó por 12 h bajo las mismas condiciones utilizadas para el pre- inóculo.

A 450 mL de medio fresco se adicionaron 4.5 mL del cultivo incubado por 12 h (inóculo al 1% v/v) y se incubaron bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura que se mencionaron anteriormente. Se tomaron alícuotas de 50 mL a las 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 24 h de crecimiento a las cuales se les midió la densidad óptica a una absorbancia de 600 nm (BIOMATE 3 Thermo Fisher Scientific Spectrophotometer) y el pH con un potenciómetro HANNA HI 4211. Se graficó densidad óptica y pH en función del tiempo.

Las alícuotas se centrifugaron a 8,500 rpm durante 15 min a 4°C (primo R Biofuge Heraeus) para poder separar células de sobrenadante.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo.

MRS (OXOID)		APT (DIFCO)	
Nutriente	g/L	Nutriente	g/L
Glucosa	20	Glucosa	10
Extracto de levadura	5	Extracto de levadura	7.5
Fosfato de potasio dibásico	2	Fosfato de potasio dibásico	5
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.2	Sulfato de magnesio	0.8
Tween 80	1 mL	Tween 80	0.2
Extracto de carne	10	Cloruro de manganeso	0.14
Acetato de Sodio 3H ₂ O	5	Digerido pancreático de caseína	12.5
Citrato de amonio	2	Citrato de sodio	5
Peptona proteasa	10	Sulfato ferroso	0.04
Sulfato de manganeso 4H ₂ O	0.05	Clorhidrato de tiamina	0.001

CGB		TSB (DIFCO)	
Nutriente	g/L	Nutriente	g/L
Glucosa	10	Glucosa	2.5
Extracto de levadura	5	Peptona de caseína	17
Fosfato de potasio dibásico	2	Fosfato de potasio dibásico	2.5
Citrato de amonio	2	Cloruro de sodio	5
Tween 80	0.05	Peptona de soya	3
Bactotripton	20		
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.1		
Sulfato de manganeso 4H ₂ O	0.05		

M17 (DIFCO)		TSB (DIFCO) + TWEEN 80	
Nutriente	g/L	Nutriente	g/L
Extracto de levadura	2.5	Glucosa	2.5
Peptona de soya	3	Peptona de caseína	17
Bactotripton	5.0	Peptona de soya	3
Extracto de carne	5.0	Cloruro de sodio	5
Ácido ascórbico	0.5	Fosfato de potasio dibásico	2.5
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.25	Tween 80	1
Glicerol fosfato de sodio	19		

M17(DIFCO) + Glucosa	
Nutriente	g/L
Glucosa	10
Peptona De soya	3
Extracto de levadura	2.5
Bactotripton	5.0
Extracto de carne	5.0
Ácido ascórbico	0.5
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.25
Glicerol fosfato de sodio	19

6.1.3. Determinación de proteína de los distintos medios de cultivo utilizados

Para determinar la cantidad de proteína en los medios de cultivo deshidratados se pesaron entre 0.1 y 0.2 g de muestra y se introdujeron en un tubo Kjeldahl, se agregaron 0.15 g de sulfato de cobre prehidratado, 2.5 g de sulfato de sodio y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. La muestra se somete a digestión en un digestor Kjeldahl (micro digestor kjeldahl Mod. DGMK – 630) y después a destilación colocando en un tubo la muestra diluida con 10 mL de agua destilada y 40 mL de NaOH al 36%. Se colocó en el equipo de destilación y el destilado se recolectó en un matraz con 50 mL de HCl 0.1 N y unas gotas de indicador rojo de metilo 0.1%. Se titulo el exceso de ácido con una solución de NaOH 0.1 N y se calculo de esta manera el porcentaje de proteína total.

6.1.4. Determinación del perfil proteico y de la actividad lítica y proteolítica por zimogramas

6.1.4.1. Perfil proteico

Para determinar el perfil proteico de las muestras de células y sobrenadantes se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Se prepararon los geles con los reactivos necesarios para su elaboración (Bis-acrilamida 30%, Tris-HCl 2 M pH 8.8, SDS 10%, H₂O, TEMED y APS 10%) (Manual Bio-Rad).

Se ajustó la densidad óptica a 600 nm a un valor de 1 de las muestras de células obtenidas con buffer de trabajo (Tris-HCl 100 mM pH 8), con el fin de cargar en el gel la cantidad de células más parecida posible. Se tomó 1 mL de esta resuspensión de células y se centrifugó a 8,500 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se le adicionaron 80 µL de buffer de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, 2% SDS, 2.5 % glicerol, 0.5% β-mercaptoetanol y 0.5% de azul del bromofenol). Las muestras se trataron a ebullición por 5 min. Las muestras de sobrenadante se prepararon tomando 80 µL de cada muestra y adicionado 40 µL de buffer de carga.

Después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada en agitación suave durante 30 min., se tiñó con azul de Coomassie (0.1% Coomassie R-250, 45% de metanol, 10% de ácido acético glacial y 45% agua v/v) durante 12 h en agitación suave y finalmente el gel se sumergió en solución desteñidora (10% metanol, 10% ácido acético glacial y 80% agua desionizada v/v). El peso molecular de las bandas de proteína fue determinado por la comparación con marcadores de alto peso molecular (Bio-Rad, 161-0303)

6.1.4.2. Determinación de actividad lítica en zimogramas

Se prepararon geles desnaturalizantes al 10% con 0.2% (m/v) de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, USA). Después de la electroforesis el gel se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada en agitación suave durante 30 min. Se incubó a 37°C con 200 mL de buffer de renaturalización (Tris-HCl 10 mM, pH 8 Tritón X-100 1% v/v) durante 12-16 h en agitación suave.

El gel se tiñó finalmente con una solución de azul de metileno durante 30 min (0.01% KOH y 0.1% de azul de metileno) y se destiñó con agua destilada. La actividad lítica fue

identificada como una zona clara en contra del fondo azul. El peso molecular de las bandas de proteína fue determinado por la comparación con marcadores comerciales de alto peso molecular (Manual Bio-Rad).

6.1.4.3. Actividad proteolítica en zimogramas

Se prepararon geles desnaturalizantes con 0.1% m/v de gelatina como sustrato proteico. Se sometieron a electroforesis y se lavaron con 50 mL de agua desionizada en agitación suave durante 30 min, posteriormente se lavaron por 30 min en una solución de tritón 2.5%. Se incubaron a 37°C con buffer de renaturalización (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, CaCl₂ 5 M, NaCl 200 mM) por un periodo de 12-16 h con agitación suave (50 rpm). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y la actividad proteolítica fue identificada como una zona clara en contra de un fondo azul al ser desteñidos (Lantz y Ciborowski, 1994).

6.2. Segunda fase experimental

Obtención de fracciones parcialmente puras con actividad lítica de PGH, un resumen de la segunda fase experimental se muestra en la figura 6.

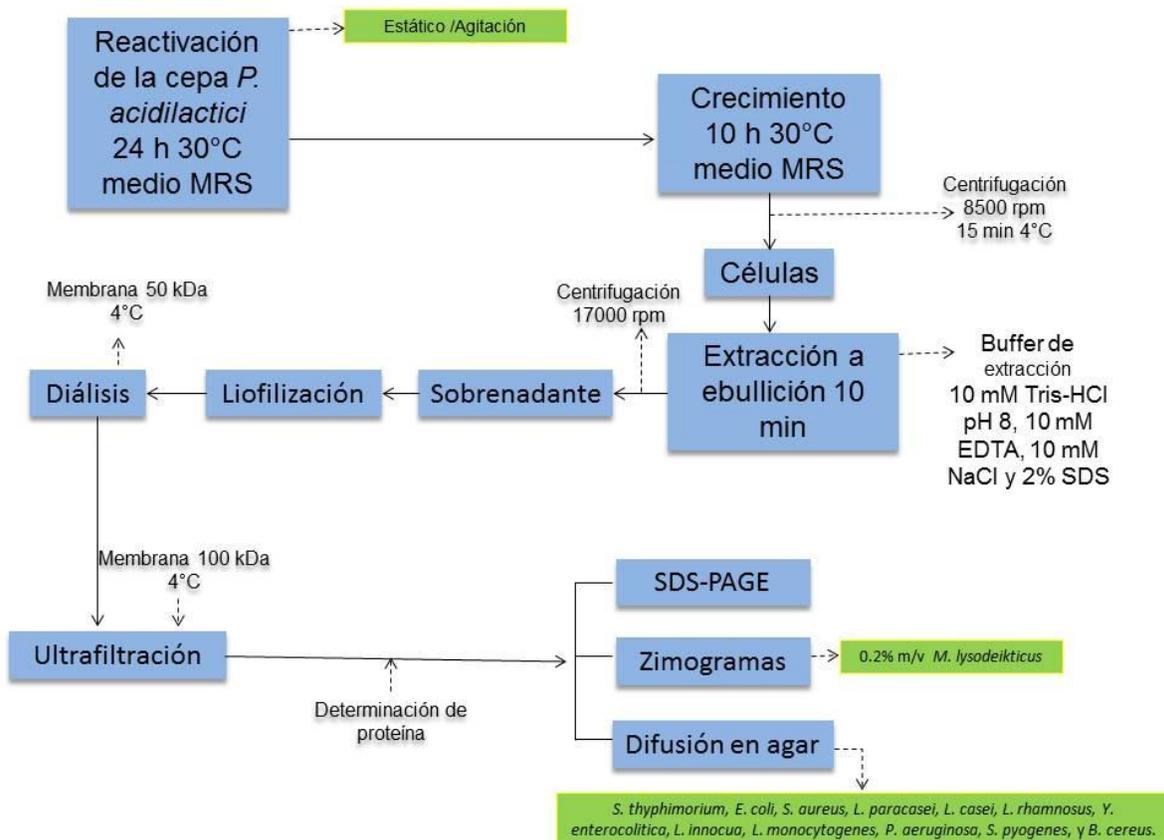


Figura 6. Diagrama de trabajo de la segunda fase experimental. Obtención de fracciones parcialmente puras con actividad lítica de PGH.

Debido a los resultados obtenidos en los geles de actividad lítica cuando *P. acidilactici* se hacía crecer en medio MRS con y sin agitación se optó por utilizar este medio para obtener fracciones parcialmente puras con actividad lítica de PGH.

6.2.1. Condiciones de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 y extracción de proteínas adheridas a membrana

P. acidilactici se cultivó en caldo MRS fresco realizando un pre-inóculo partiendo de la cepa conservada a -20°C y se adicionaron 2-3 esferas de vidrio por cada 20 mL de medio, se incubó a 30°C por 24 h, en cultivo estático ó con agitación a una velocidad de 250 rpm. Se realizó una resiembra del pre-inóculo adicionado 200 µL de este a 20 mL de medio fresco. Esta resiembra se incubó por 12 h bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

A un matraz Fernbach con 1 L de medio MRS se adicionaron 10 mL del inóculo de 12 h se incubó a 30°C en condiciones de agitación a 250 rpm o en estático. Posteriormente, a las 10 h de crecimiento se centrifugó el cultivo a 8,500 rpm durante 15 min a 4°C (Beckman J2-MC centrifuge). El paquete celular se resuspendió con buffer de trabajo (Tris-HCl 50 mM pH 8) y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 10 min a 4°C.

El paquete celular se resuspendió con 100 mL de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl y 2% SDS), se agitó vigorosamente y se colocó en baño de agua a ebullición por un tiempo de 10 min, se enfrió a temperatura ambiente para ser centrifugado a 17,000 rpm por 30 min a 10°C. El sobrenadante se decantó y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, finalmente se sometió a liofilización (Labconco, Freezone 4.5) (Velasco-Pérez, 2010).

6.2.2. Extracción de proteínas adheridas a membranas

Con la finalidad de eliminar la mayor cantidad posible de SDS de las muestras liofilizadas, estas se resuspendieron en 10 mL de buffer de trabajo y se dializaron contra agua destilada con una membrana con tamaño de corte de 50 kDa (SpectraPor 7) a una temperatura de 4°C por 12 h.

La muestra se ultrafiltró con una membrana de tamaño de corte de 100 kDa (Millipore) hasta un volumen de 3-4 mL, se le determinó la concentración de proteína, se distribuyó en alícuotas de 1 mL y se liofilizó.

Posteriormente las muestras liofilizadas se resuspendieron con 50 µL de buffer de carga y se cargaron en geles al 10% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes para determinar el perfil electroforético y en geles desnaturalizantes al 10% con células liofilizadas de *M. lysodeikticus* para determinar actividad lítica.

6.2.3. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína de las muestras se determinó por medio del método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (Epoch, Biotek), para lo cual se realizaron diluciones previas de la muestra hasta llevarla a una dilución 1:100. Se colocaron 160 µL de la dilución y 40 µL del reactivo de Bradford concentrado en un pozo de la microplaca y se homogenizó, se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se hicieron las mediciones. La curva patrón se realizó con albúmina sérica bovina (BSA) (Bradford *et al.*, 1976)

6.2.4. Evaluación de actividad antimicrobiana por difusión en agar

Buscando determinar el efecto antibacteriano, se realizaron pruebas en difusión en agar con la fracción parcialmente pura.

Como microorganismos blanco se utilizaron las siguientes cepas pertenecientes al cepario de la Facultad de Química: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus paracasei*, *Salmonella enterica* Thyphimurium, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estas cepas fueron almacenadas en caldo nutritivo a 4°C hasta su uso.

En cajas Petri se colocaron 15 mL de agar Brain Heart Infusion (BHI) al 1% (m/v) y se dejó solidificar, para posteriormente colocar sobre esta primera capa 10 mL de agar BHI al 0.8% m/v con 20 μ L de una dilución a una concentración 10^{-2} de células de los microorganismos seleccionados.

Se hicieron pozos sobre la doble capa de agar y en cada pozo se agregaron 200 μ L de las muestras obtenidas. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 h en estufa estática (Gravity Convection E-71).

Los halos de inhibición de los microorganismos se midieron con ayuda de un vernier. Para considerar como positiva la prueba se tomaron en cuenta los halos de inhibición mayores a 1 mm. Como controles positivos se utilizaron Nisaplin® y kanamicina (OXOID). El Nisaplin® es un producto comercial cuyo compuesto activo es la nisina, bacteriocina producida por *Lactococcus lactis subsp lactis*, de naturaleza polopetidica, compuesto de 34 aminoácidos y es clasificado como GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro). La kanamicina es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos que interfiere en la síntesis proteica bacteriana, es producida por la actinobacteria *Streptomyces kanamyceticus*, es activa sobre bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y *Mycobacterium*.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de explorar si los medios de crecimiento a evaluar incidían sobre el crecimiento del microorganismo y, potencialmente, sobre la producción de enzimas por el mismo, se evaluaron los medios de cultivo señalados mediante el análisis de las curvas de crecimiento, seguidas 24 h por densidad óptica a 600 nm. En todos los casos se evaluó en paralelo el efecto de presencia o ausencia de agitación. Se determinó también el pH como indicador de la actividad metabólica.

En el medio de cultivo MRS *P. acidilactici* muestra una fase de adecuación muy corta (Figura 7). El inóculo con el que se hizo esta cinética provenía de medio MRS y la densidad óptica máxima alcanzada en incubación estática fue de 2.85, mientras que con agitación fue de 1.65. La formulación del medio MRS fue desarrollada por de Man Rogosa y Sharpe (1960) para permitir y propiciar un buen crecimiento de bacterias ácido lácticas exigentes nutricionalmente, entre las que incluyó especies de los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, cuyo crecimiento se ve favorecido mediante condiciones de microaerofilia (OXOID Manual, 1998). Esto último concuerda con los resultados obtenidos, ya que al haber más oxígeno disuelto en el medio, cuando se aplica agitación, se presenta un menor crecimiento bacteriano.

En el medio APT la densidad óptica final osciló entre 2.01 y 2.05. Es importante notar que la fase de adecuación en este medio fue mas larga (Figura 8) que la obtenida en el medio MRS, lo cual indica que la capacidad del microorganismo de adaptarse al medio es menor. El medio APT solo tiene 50% de fuente de carbono, 38 % de fuente de nitrógeno y 50% de sulfato de magnesio en comparación con el medio MRS, siendo ésta la diferencia más notable.

Cuando la bacteria ácido láctica en estudio se hizo crecer en medio TSB alcanzó una densidad óptica de 0.70 al ser cultivada sin agitación y de 0.49 cuando se agitaba (Figura 9). La fase de adecuación tuvo una duración de 10-12 h, siendo la más larga comparada con otros medios, mostrando así que *P. acidilactici* encuentra dificultades para desarrollarse y adaptarse a este medio, que es muy restrictivo en nutrientes al sólo tener 12.5% de fuente de carbono y 31% de fuente de nitrógeno del total que aporta el medio MRS.

En el medio M17 fue en el que se alcanzó el menor crecimiento, ya que la densidad óptica fue de 0.35 para la condición estática y 0.30 con agitación. La fase de adecuación tuvo una duración de 2-4 h y la fase exponencial se alcanzó a las 6 h de crecimiento (Figura 10). La baja concentración celular obtenida en este medio puede atribuirse a que no contiene ningún monosacárido como fuente de carbono, además que la concentración de fuente de nitrógeno es muy baja (24%) en comparación con el medio MRS.

Cuando se hizo crecer a *P. acidilactici* en medio CGB (Figura 11) se obtuvo una densidad óptica alta, de 2.73 con agitación y 2.56 en condiciones estáticas. Fases de adecuación tan cortas, como en medio MRS (2-4 h) indican que el microorganismo se adapta rápidamente al medio y a las condiciones de crecimiento. La fase estacionaria se alcanzó rápidamente en el medio sin agitación, aunque la densidad óptica final de ambas condiciones fue muy parecida.

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 presenta un metabolismo homofermentativo, por el cual la fermentación de carbohidratos resulta casi exclusivamente en la producción de ácido láctico como producto final, lo que provoca una disminución del pH del medio. Los cambios más drásticos de este parámetro se presentan en el medio CGB con agitación, donde de un pH de 6.37 cae hasta 3.76, mientras que en el medio APT sin agitación va desde un 6.35 hasta 4.05 y en el medio MRS sin agitación se parte de un pH inicial de 5.76 y llega hasta 3.77. Lo anterior concuerda con que son los medios de mayor contenido de glucosa disponible para ser transformada en ácido láctico como producto final.

El menor descenso de pH se presentó en medio M17 con agitación, en el que sólo bajó desde 6.65 hasta 6.60 y el medio TSB con agitación, donde pasó de 7.24 a un pH final de 6.55. El medio TSB es el que menor contenido de glucosa tiene (Tabla 3) al aportar al microorganismo solo 12.5 % de glucosa en comparación con el medio MRS y el medio M17 no tiene glucosa como fuente de carbono, lo que explica el cambio de pH tan pequeño debido a la poca formación de ácido láctico por falta de sustrato. El descenso de pH es inversamente proporcional al crecimiento bacteriano y en estos dos medios fue donde *P. acidilactici* tuvo una menor densidad óptica final.

Los cambios en el crecimiento debido a un cambio en la concentración de oxígeno disuelto en el medio; inducido por la agitación de los matraces, son más evidente en el medio MRS, en el que el crecimiento es menor cuando se agita el cultivo. Para los medios APT y M17 no hubo gran diferencia en las densidades ópticas finales entre ambas condiciones de agitación, puesto que presentaron cambios solamente en el comportamiento de la curva de crecimiento, cuya fase estacionaria se alcanzó más rápidamente en el medio sin agitación.

En el caldo CGB se presentó una desviación a este comportamiento, al haber mayor crecimiento en el cultivo con agitación. Para el caldo CGB en condiciones estáticas el crecimiento exponencial es más corto mientras que para TSB la fase de adecuación se alcanza más rápidamente cuando el medio de cultivo se agita. En los dos medios podría presentarse una mayor disposición de los nutrientes para la bacteria cuando el cultivo se agita y de esta manera permitir un aumento en el crecimiento.

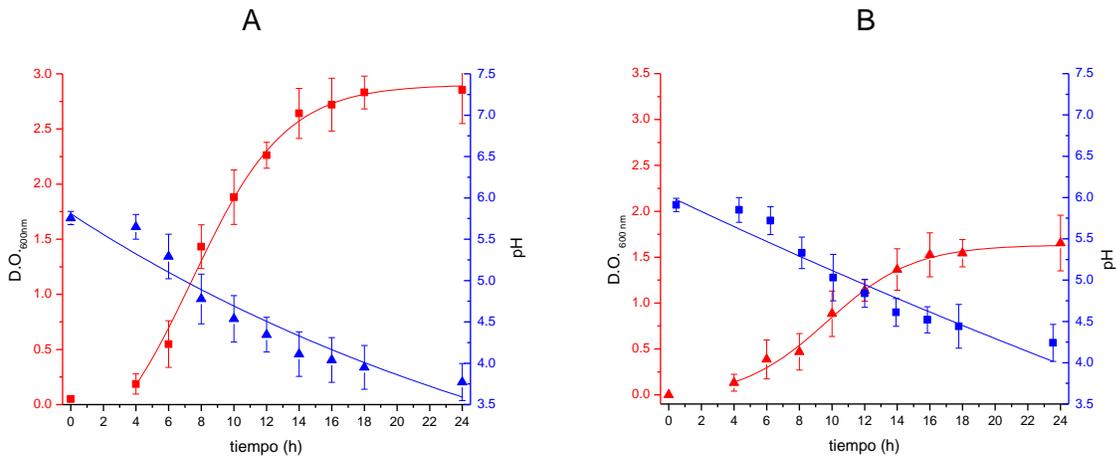


Figura 7. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* en medio MRS. Condiciones de crecimiento: A) Sin agitación B) Con agitación 250 rpm

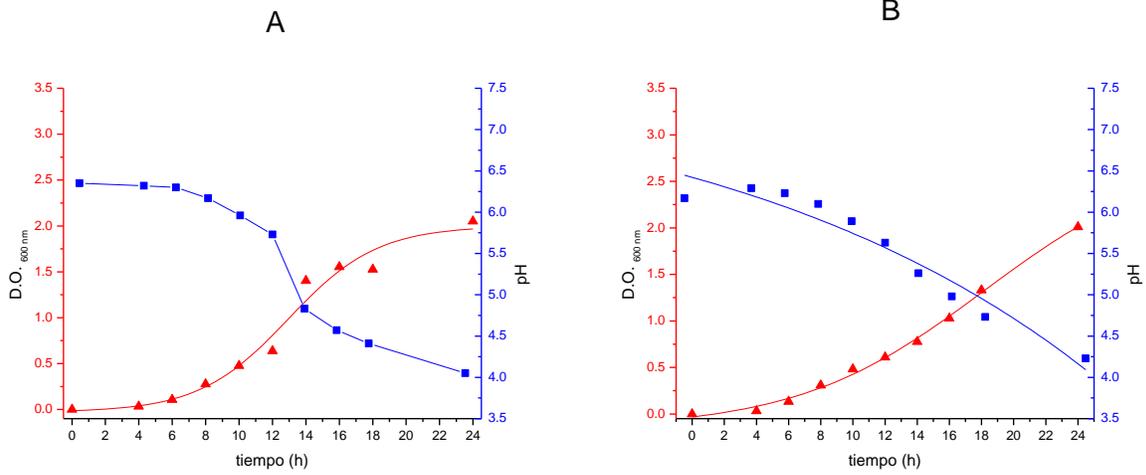


Figura 8. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* en medio APT. Condiciones de crecimiento: A) Sin agitación B) Con agitación 250 rpm

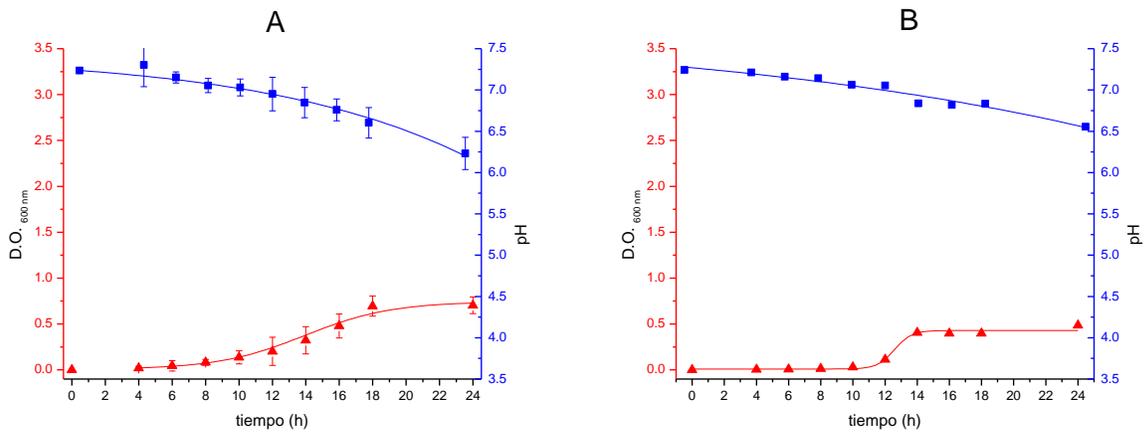


Figura 9. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* en medio TSB. Condiciones de crecimiento: A) Sin agitación B) Con agitación 250 rpm

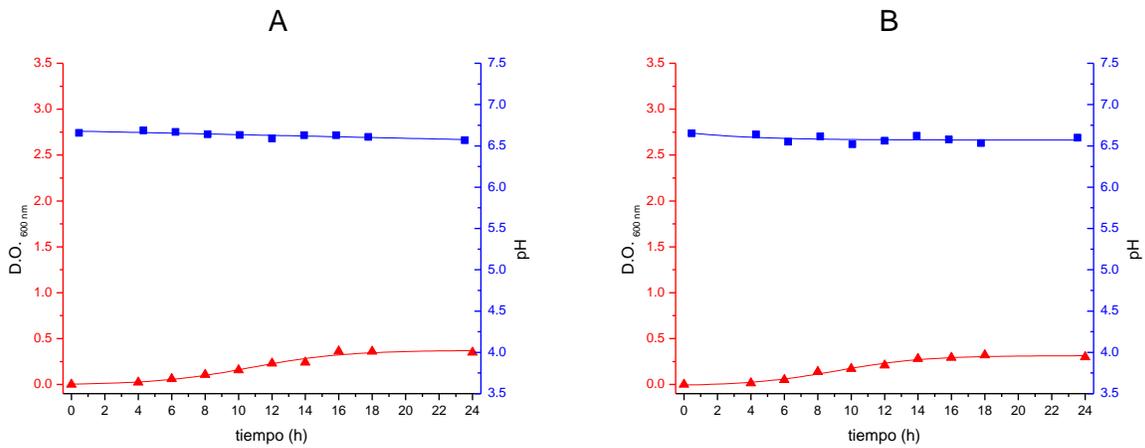


Figura 10. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* en medio M17. Condiciones de crecimiento: A) Sin agitación B) Con agitación 250 rpm

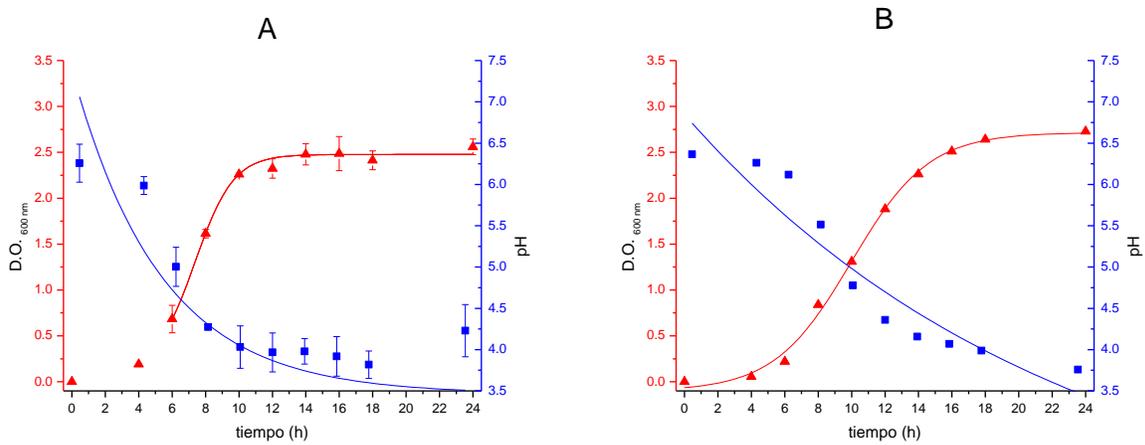


Figura 11. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* en medio CGB. Condiciones de crecimiento: A) Sin agitación B) Con agitación 250 rpm

Cálix–Lara *et al.* (2012) intentando desarrollar un medio de cultivo que permitiera el crecimiento de bacterias patógenas y de bacterias ácido lácticas para el estudio de producción de compuestos antimicrobianos, reportaron que la suplementación del medio TSB con Tween 80 permite el crecimiento de una mezcla de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus amylovorus* M35, *Lactobacillus animalis* LA51 y *Pediococcus acidilactici*

D3) a niveles similares a los observados en medio MRS, debido a que la presencia del surfactante proporciona al medio cierta homogeneidad de sus componentes (Jacques *et al.*, 1980). Con base en estos antecedentes se decidió probar el efecto del Tween 80 (1g/L) con caldo TSB en el crecimiento de *P. acidilactici* (Figura 12 A). El Tween 80 podría incidir sobre el crecimiento debido a sus propiedades tensoactivas o a que podría estar actuando específicamente como una fuente de oleato que aporte cadenas carbonatadas y ácidos grasos al microorganismo (Jacques *et al.*, 1980). Sin embargo no hubo diferencias en el cambio de pH y de la densidad óptica entre el caldo TSB y el caldo TSB + Tween 80, ni en el comportamiento de la curva de crecimiento.

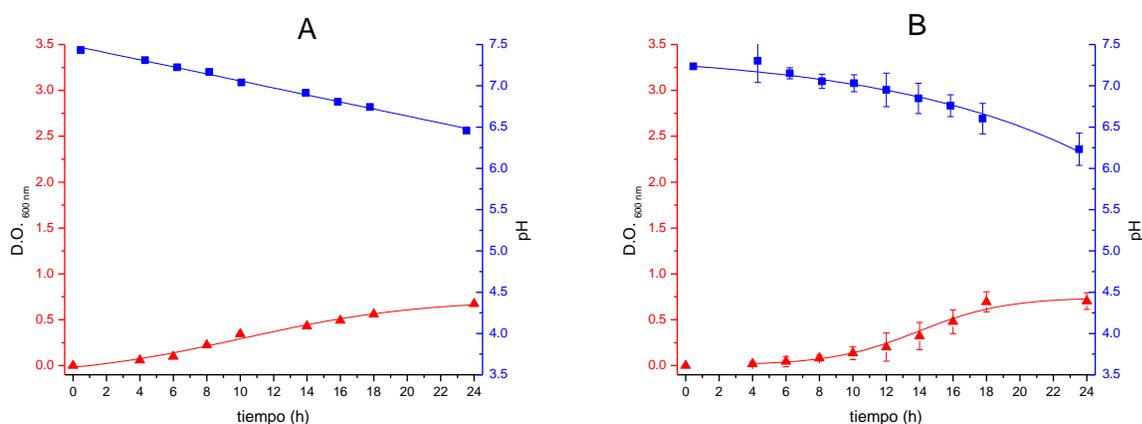


Figura 12. Curva de crecimiento de *P. acidilactici*. Medios de cultivo utilizados A) Medio TSB + Tween 80 (0.1%) sin agitación B) TSB sin agitación.

El medio M17 es el único que no cuenta con glucosa como fuente de carbono y es en el que se presentó el menor incremento de la densidad óptica. Por tanto se decidió probar el efecto en el crecimiento de *P. acidilactici* si el medio M17 se adicionaba con glucosa, este monosacárido se adicionó al medio M17 en una concentración de 10% (m/v). Las diferencias entre éste y el medio M17 sin glucosa tampoco fueron significativas en el crecimiento del microorganismo (Figura 13 A). La poca capacidad para crecer y adaptarse a este medio de la BAL en estudio no es sólo debido a la insuficiencia en fuente de carbono sino a la restricción de alguno de los demás nutrientes.

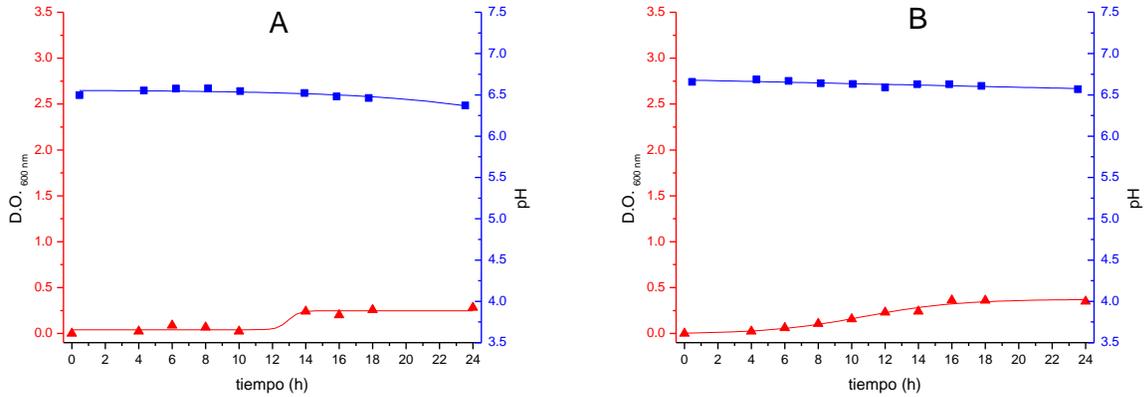


Figura 13. Curva de crecimiento de *P. acidilactici*. Medios de cultivo utilizados A) Medio M17 + glucosa sin agitación B) Medio M17 sin agitación.

La constante específica de la velocidad de crecimiento microbiano (μ) se utiliza para caracterizar el comportamiento de una población en determinadas condiciones de cultivo. Su valor depende principalmente de la composición y concentración de nutrientes en el medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH. Existen diversas expresiones para μ : la más difundida es la ecuación de Monod, que relaciona el valor de μ con la concentración de un componente del medio de cultivo que está en menor cantidad respecto de los requerimientos del microorganismo: el sustrato limitante.

Se determinaron las constantes específicas de la velocidad de crecimiento de *P. acidilactici* en distintos medios y los valores se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Velocidad específica de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 en distintas condiciones de cultivo, pH y Densidad óptica final

Medio de cultivo		μ (h ⁻¹)	pH final	D.O. final _{600 nm}
MRS	Sin agitación	0.50	3.77	2.85
	Con agitación	0.31	4.24	1.65
APT	Sin agitación	0.25	4.05	2.05
	Con agitación	0.127	4.23	2.01
TSB	Sin agitación	0.199	6.23	0.70
	Con agitación	0.66	6.56	0.49
M17	Sin agitación	0.19	6.57	0.35
	Con agitación	0.11	6.60	0.30
CGB	Sin agitación	0.53	4.23	2.56
	Con agitación	0.68	3.76	2.73
TSB + Tween 80	Sin agitación	0.079	6.46	0.67
M17 + glucosa	Sin agitación	0.018	6.37	0.28

Al analizar los valores de la tabla 4 vemos que para los medios MRS, APT y M17 la agitación tiene un impacto en el valor de μ , el cual desciende cuando se agita el medio resultando en un valor de densidad óptica final menor. En el caso del medio TSB se presenta un valor de μ menor con agitación a pesar de que la densidad óptica final es más alta cuando el cultivo es estático. El valor de μ en este medio no tiene efecto en la densidad final alcanzada.

El medio CGB es el único en el que el valor de μ y de densidad óptica final es mayor cuando se agita el medio, pudiendo deberse a que la agitación propicie que el microorganismo pueda crecer mejor, debido a una mayor homogenización de los nutrientes.

Los valores más bajos de μ se presentan en el medio M17, cuya fase logarítmica es muy corta y dura aproximadamente 4 h, además de que su densidad óptica final es la menor de todos los medios. El adicionar con Tween 80 al medio TSB no tuvo ningún efecto en el crecimiento de la BAL. En contraste, cuando se adiciona glucosa al medio M17 su valor de μ es mucho menor, aunque alcanza la misma densidad óptica, y el pH final

alcanzado que es menor cuando tiene glucosa, debido a que el microorganismo tiene mayor cantidad de sustrato para la producción de ácido láctico, haciendo así que el pH baje en mayor cantidad.

7.1. Determinación del perfil proteico por SDS PAGE, de la actividad lítica y de la actividad proteolítica por zimogramas

Se realizaron geles de acrilamida con SDS al 10% para obtener el perfil proteico, así como zimogramas con *M. lysodeikticus* o con gelatina como sustratos para determinar actividad lítica y proteolítica respectivamente de la muestra de células y sobrenadante tomadas a diferentes tiempos, para los 7 medios de cultivo utilizados. Estos experimentos tenían el propósito de conocer la localización celular, el tiempo de producción y si se producía la misma enzima en todos los casos o la actividad correspondía a diferentes polipéptidos.

7.1.1. MRS

Las tablas 5 y 6 muestran los resultados obtenidos al someter a las muestras de sobrenadantes y células cosechadas de medio MRS a electroforesis para obtener perfil proteico, actividad lítica y proteolítica.

Tabla 5. Actividad lítica y proteolítica por *P. acidilactici* en MRS sin agitación para distintos tiempos

	MRS sin agitación	Peso
Células	Actividad lítica	99 y 110 kDa
	Actividad proteolítica	120 kDa
Sobrenadante	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	—

Tabla 6. Actividad lítica y proteolítica por *P. acidilactici* en MRS con agitación para distintos tiempos

	MRS con agitación	Peso
Células	Actividad lítica	110 kDa
	Actividad proteolítica	—
Sobrenadante	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	—

La tabla 5 muestra que para el cultivo en medio MRS sin agitación, las células presentaron actividad lítica en todos los tiempos a los 99 kDa y 110 kDa (Figura 14 A) las cuales coinciden con lo reportado por García-Cano *et al.* en 2011, así como actividad proteolítica para todos los tiempos hasta las 24 h con un peso de 120 kDa.

Las bandas de actividad lítica se observaron más intensas conforme el tiempo de fermentación avanzó, la agitación incidió negativamente en la producción de la enzima lítica de 99 kDa ya que sólo se distingue la de 110 kDa (Figura 14 B). También se afecta negativamente la actividad proteolítica, que desapareció. Los sobrenadantes obtenidos en este medio no presentaron ninguna actividad en ninguna de las condiciones de aireación.

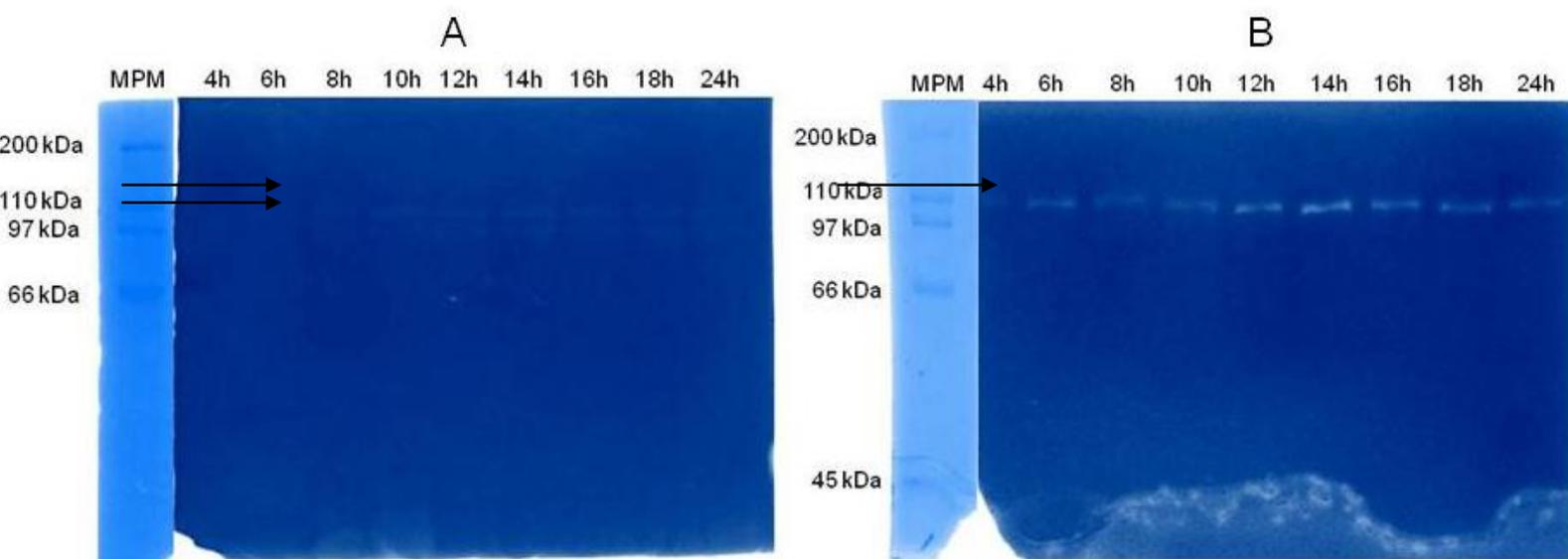


Figura 14. Zimograma de actividad lítica de células de *P. acidilactici* a distintos tiempos en dos condiciones de aireación. A) Condiciones estáticas, B) Con agitación 250rpm.

7.1.2. APT

Tabla 7. Actividad lítica y proteolítica producida por *P. acidilactici* en APT sin agitación para distintos tiempos

	APT sin agitación	Peso
Células	Actividad lítica	110 kDa
	Actividad proteolítica	–
Sobrenadante	Actividad lítica	–
	Actividad proteolítica	–

Tabla 8. Actividad lítica y proteolítica producida por *P. acidilactici* en APT sin agitación para distintos tiempos

	APT con agitación	Peso
Células	Actividad lítica	110 kDa
	Actividad proteolítica	120 kDa
Sobrenadante	Actividad lítica	--
	Actividad proteolítica	--

Para las células cosechadas de medio APT en ambas condiciones de aireación presentaron actividad lítica a los 110 kDa mientras que para la actividad de proteasa se observaron patrones de bandeo distintos: se observaron bandas de 120 kDa para todos los tiempos cuando el medio se agitaba; mientras que en condiciones estáticas no se producía actividad proteolítica (Tabla 7 y 8).

Ninguno de los sobrenadantes presentó actividad en este medio. Cabe resaltar que en los geles SDS se aprecian muy pocas bandas de proteína, por lo cual sabemos que la producción de enzimas extracelulares en este medio es baja.

7.1.3. TSB

En el medio TSB solo se presentó actividad lítica con las células del cultivo en condiciones estáticas (Tabla 9) con una banda de actividad a los 110 kDa que se observó a partir de las 8 h, tiempo correspondiente a la fase logarítmica temprana. Cabe señalar que este tipo de enzimas podría estar relacionado con el crecimiento y la división celular de la BAL. La fracción celular presentó actividad a los 120 kDa, que coincide con la proteína reportada por Vendramin, 2013 la cual es una serín-proteasa.

La actividad proteolítica se observó en el sobrenadante del cultivo con agitación, presentando dos bandas de distintos pesos para todos los tiempos (Tabla 10). Se cree que la actividad proteolítica presentada en este medio por *P. acidilactici* se debe a un estado de estrés nutricional que hace que la BAL necesite la producción de proteasas que hidrolicen nutrimentos con mayor facilidad para satisfacer sus necesidades (Vendramin, 2012).

El medio TSB es un medio líquido de enriquecimiento, utilizado en procedimientos cualitativos para la prueba de esterilidad y para el cultivo de microorganismos aerobios no exigentes en exceso (BD, Manual). El digerido enzimático de caseína y la harina de soya presentes proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas compleja, mientras que el cloruro de sodio sirve para mantener el equilibrio osmótico y el fosfato de potasio dibásico actúa como tampón para controlar el pH. El medio TSB es el que cuenta con la menor concentración de glucosa, no tiene en su formulación un surfactante y el aporte de sales es bajo en comparación con los medios utilizados en este trabajo, lo que se refleja en un crecimiento pobre y un descenso leve del pH.

Tabla 9. Actividad lítica y proteolítica producida por *P. acidilactici* en TSB sin agitación para distintos tiempos

TSB sin agitación		Peso
Células	Actividad lítica	110 kDa
	Actividad proteolítica	120 kDa
Sobrenadante	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	---

Tabla 10. Actividad lítica y proteolítica producida por *P. acidilactici* en TSB con agitación para distintos tiempos

TSB con agitación		Peso
Células	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	----
Sobrenadante	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	<60 kDa y 120 kDa

7.1.4. M17

Los sobrenadantes obtenidos en las dos condiciones de aireación presentaron actividad proteolítica (Tabla 11 y 12) En este medio no se presentó actividad lítica. El medio M17 fue el que permitió el menor aumento de la densidad óptica (Tabla 4) siendo esto atribuido a la restricción de nutrientes. El hecho de que en medio M17 y TSB se presentó la mayor cantidad de enzimas proteolíticas confirma que el suprimir o reducir la cantidad de nutrientes disponibles provoca en la célula un estado de estrés que la hace producir

este tipo de compuestos para obtener los sustratos necesarios del medio en el que se encuentre.

Tabla 11. Actividad lítica y proteolítica producida por *P. acidilactici* en M17 sin agitación para distintos tiempos

	M17 sin agitación	Peso
Células	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	—
Sobrenadante	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	200 kDa

Tabla 12. Actividad lítica y proteolítica producida por *P. acidilactici* en M17 con agitación para distintos tiempos

	M17 con agitación	Peso
Células	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	—
Sobrenadante	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	200 kDa

7.1.5. CGB

Para el medio CGB, en el que se obtuvo el máximo valor de densidad óptica después del medio MRS, se observaron actividades líticas en células con agitación, cuyos pesos moleculares son similares a los de las bandas de actividad presentes en medio MRS (Tabla 14).

Tabla 13. Actividad lítica y proteolítica producida por *P. acidilactici* en CGB sin agitación para distintos tiempos

	CGB sin agitación	Peso
Células	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	—
Sobrenadante	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	—

Tabla 14. Actividad lítica y proteolítica producida por *P. acidilactici* en CGB con agitación para distintos tiempos

CGB con agitación		Peso
Células	Actividad lítica	99 y 110 kDa
	Actividad proteolítica	—
Sobrenadante	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	—

7.1.6. TSB + Tween 80

La adición de un surfactante, como lo es el Tween 80, al medio TSB no tuvo efecto en el crecimiento de *P. acidilactici*, sin embargo si lo tuvo en la producción de compuestos con actividad lítica al producirse dos bandas, una 99 kDa y la otra de 110 kDa (Tabla 15). En medio sin Tween sólo se produjo una banda de proteína con actividad a 99 kDa.

Tabla 15. Actividad lítica y proteolítica producida por *P. acidilactici* en TSB+Tween 80 sin agitación para distintos tiempos

TSB + Tween 80 sin agitación		Peso
Células	Actividad lítica	99 y 110 kDa
	Actividad proteolítica	—
Sobrenadante	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	—

7.1.7. M17 + glucosa

La BAL en estudio mostró poca capacidad para adaptarse al medio M17 aún cuando éste se adicionara con una fuente de carbono como la glucosa. En estas condiciones el microorganismo produjo solamente dos bandas con actividad lítica (Tabla 16) de pesos de 99 y 110 kDa que no aparecían en el medio comercial sin monosacárido. La banda con actividad proteolítica es de menor peso molecular en el medio modificado.

Tabla 16. Actividad lítica y proteolítica producida por *P. acidilactici* en M17+glucosa sin agitación para distintos tiempos

M17 + glucosa sin agitación		Peso
Células	Actividad lítica	99 y 110 kDa
	Actividad proteolítica	100 kDa
Sobrenadante	Actividad lítica	—
	Actividad proteolítica	—

Tabla 17. Resumen de actividades líticas y proteolíticas en distintos medios de cultivo en fracción celular

Actividad	Lítica		Proteolítica	
	Agitación 250 rpm	Estático	Agitación 250 rpm	Estático
Medio				
MRS	110 kDa	99 y 110 kDa	ND	120kDa
APT	110 kDa	110 kDa	120 kDa	ND
CGB	99 y 110 kDa	ND	ND	ND
TSB	ND	110 kDa	ND	120 kDa
M17	ND	ND	ND	40 kDa
TSB+T	--	99 Y 110 kDa	--	ND
M17+gluc	--	99 y 110 kDa	--	100 kDa

Tabla 18. Resumen de actividades líticas y proteolíticas en distintos medios de cultivo en fracción extracelular

Actividad	Lítica		Proteolítica	
	Agitación 250 rpm	Estático	Agitación 250 rpm	Estático
Medio				
MRS	ND	ND	ND	ND
APT	ND	ND	ND	66 kDa y 90 kDa
CGB	ND	ND	ND	ND
TSB	ND	ND	<60 kDa y 110 kDa	ND
M17	ND	ND	200 kDa	200 kDa
TSB+T	ND	ND	ND	ND
M17+gluc	ND	ND	ND	ND

7.2. Efecto de la aireación en la producción de enzimas de interés biotecnológico

Se ha encontrado que la variación en la velocidad de agitación influye en la homogeneidad de los componentes del medio de cultivo en los matraces lo que afecta la disponibilidad de nutrientes para la bacteria. Algunos estudios describen el efecto de la velocidad de agitación en la producción de proteasas. Cuando *Bacillus sp.* CR-179 crece en condiciones de agitación a 150 rpm la producción de proteasas es la óptima ya que a esta velocidad, se aumentó la aireación del medio de cultivo, lo que podría dar lugar a un suministro suficiente de oxígeno disuelto que haga que la absorción de nutrientes por la bacteria también se incremente, resultando en una mayor producción de proteasas. A velocidades de agitación mayores la actividad de la proteasa se podría reducir debido a la desnaturalización de las enzimas causada por la alta velocidad de agitación. Además de verse afectada la producción de metabolitos también puede verse afectado el crecimiento del microorganismo, de manera que a menor crecimiento el rendimiento de proteasas sea menor (Akhavan y Jabalameli, 2011). Este efecto de la aireación en el crecimiento y la producción de metabolitos es particular para cada microorganismo. En el presente trabajo, el crecimiento no se ve afectado de manera significativa cuando el medio se agita a 250 rpm, pero si hay diferencias en las actividades presentadas dependiendo de si el medio se airea o no.

Un punto a notar es la presencia de actividad lítica sólo en la fracción celular, sin importar el grado de aireación al medio, mientras que la actividad proteolítica se presenta en ambas fracciones; celular y citosólica. Esto sugiere que hay producción de proteasas tanto extracelulares como intracelulares y que de las enzimas de actividad lítica sólo se han detectado intracelularmente.

7.3. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de enzimas de interés biotecnológico por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Se ha observado que algunas fuentes de nitrógeno pueden provocar un aumento en el crecimiento de ciertos microorganismos, otras pueden afectar sólo en la producción de compuestos antibacterianos y algunas incluso en ambos (Akhavan y Jabalameli, 2011). Los medios de cultivo utilizados usaron distintas fuentes de nitrógeno como lo son: peptona proteasa, extracto de carne, extracto de levadura, digerido pancreático de

levadura, bacto triptona, peptona de soya, peptona de caseína. Estas fuentes tienen distintos contenidos de nitrógeno, el cual no siempre puede ser asimilado por la bacteria de manera eficaz, siendo mejor fuente la peptona de caseína o peptona proteasa que ofrecen un mayor contenido de aminoácidos asimilables que los extractos de carne o levadura.

Algunos autores han reportado que las BAL son propensas a responder a los cambios en la disponibilidad de nitrógeno mediante la regulación de sus sistemas proteolíticos para asegurar un equilibrio de nitrógeno apropiado para la célula. Se ha sugerido incluso que di- y tri-péptidos con residuos hidrofóbicos actúan como moléculas efectoras en la regulación transcripcional de el sistema Opp, el cual regula el transporte de oligopéptidos en la célula bacteriana, influyendo de esta manera en todo el sistema proteolítico de *L. lactis*. En un estudio más reciente, la expresión de seis unidades transcripcionales mostraron que eran reprimidas desde 5 hasta 150 veces después de la adición de un hidrolizado de caseína al medio que contenía 80% péptidos y 20% de aminoácidos libres y se veía incrementada su actividad cuando las células se encontraban en un medio en condiciones limitadas de fuente de nitrógeno. Como el anterior, numerosos estudios han demostrado el efecto de inhibición por fuentes de nitrógeno en la expresión y producción de metabolitos proteolíticos (Savikoji *et al.*, 2006).

En el estudio presente la mayor cantidad de nitrógeno la presentó el medio CGB y la menor cantidad el medio MRS (Tabla 17), estos dos medios son en los que la BAL crece más, el hecho de que crezca más en medio MRS podría deberse a la presencia de otros componentes del medio y no a la cantidad de fuente de nitrógeno.

El medio M17 y el medio TSB son en los que se presenta una mayor producción de proteasas; sus fuentes de nitrógeno son peptona de caseína y peptona de soya para el medio TSB y extracto de levadura, peptona de soya, bacto triptona y extracto de carne para el medio M17. El hecho de que en estos medios haya una mayor producción de proteasas puede deberse a las diferentes fuentes de nutrientes y a la concentración en que están presentes.

Tabla 17. Contenido de nitrógeno en los medios de cultivo

Medio de cultivo	Contenido de nitrógeno (% p/p)
MRS	3.46
APT	4.06
TSB	7.02
M17	4.4
CGB	8.64

7.4. Efecto de la fuente de carbono en la producción de enzimas de interés biotecnológico por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

La fuente de carbono es una de las variables más estudiadas en la producción de proteasas, bacteriocinas, BLIS y otros péptidos antimicrobianos.

En 2005 un estudio reveló que la concentración de glucosa para la producción óptima de bacteriocinas era de 20 g/L (Todorov y Dicks, 2005) ya que a 30 y 40 g/L dicha actividad se veía reducida a la mitad. El medio de cultivo que cuenta con esta concentración de glucosa idónea es el medio MRS.

Se ha reportado que el medio MRS es el óptimo para la producción de compuestos con naturaleza antibacteriana, debido a que les provee los requerimientos de nitrógeno, carbohidratos y cofactores que estimulan su producción (Settanni *et al.*, 2008). En el caso particular de *P. acidilactici* se observó que aunque si es capaz de producir compuestos antibacterianos cuando se hace crecer en MRS, no es el medio que promueve su mayor nivel de producción de compuestos antibacterianos o de enzimas proteolíticas.

En el caso de las proteasas, un estudio del efecto de la fuente de carbono en su producción por *Bacillus licheniformis* concluyó con anterioridad que al agregar glucosa al medio como única fuente de carbono se presentaba una represión catabólica debido a un exceso de ésta en el medio (Ageitos *et al.*, 2007).

7.5. Efecto de otros nutrientes en la producción de enzimas de interés biotecnológico

Se ha reportado que en general el Tween 80, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y el citrato de amonio, no tienen efecto sobre la producción de sustancias de carácter inhibitorio (Settanni *et al.*, 2008).

De Vuyst y Vandamme reportaron en que la presencia de fosfato de potasio dibásico no tiene efecto directo sobre la producción de bacteriocinas, sin embargo este es la mejor fuente de iones potasio así como agente amortiguador en el medio de cultivo.

En el caso particular de *P. acidilactici* ATCC 8042 el Tween 80 sí tuvo un efecto sobre la producción de proteínas con actividad lítica ya que promovió la producción de una banda de actividad a los 110 kDa en el caso del medio TSB, probablemente al generar una mayor homogeneidad del medio debido a sus propiedades surfactantes.

7.6. Segunda fase experimental

Al evaluar el efecto de la aireación en la producción de enzimas antimicrobianas y proteolíticas por *P. acidilactici* ATCC 8042 en medio MRS pudimos observar que la agitación incidió negativamente sobre la actividad lítica ya que sólo se producía la proteína de 110 kDa y no ambas; la de 99 y 110 kDa, como en el cultivo sin agitación. Ambas proteínas ya habían sido reportadas como peptidoglucano hidrolasas (Velasco-Pérez, 2010; García-Cano *et al.*, 2011) y se intentaron purificar para ser caracterizadas; sin embargo, en el proceso de purificación de la preparación con actividad de peptidoglucano hidrolasa no se logró la separación eficiente de las bandas obtenidas en el perfil proteico debido a lo cercano de los pesos moleculares, y sólo fue capaz de caracterizar la preparación parcialmente pura (Valenzuela-Rosas, 2011).

En el grupo de trabajo se intenta clonar y expresar los genes responsables de la producción ambas proteínas para así separarlas, caracterizarlas y observar el efecto individual de estos factores sobre cada una de ellas.

Al obtenerse la fracción de 110 kDa en el cultivo con agitación se decidió intentar extraer las fracciones de proteínas adheridas a membrana y observar el efecto que tienen cuando se producen ambas y cuando sólo se produce la correspondiente a 110 kDa,

tanto en zimogramas de *M. lysodeikticus* como con técnicas de determinación de halos de inhibición por difusión en agar para determinar el espectro de acción de los antibacterianos con el objetivo de conocer más sobre la producción de enzimas de interés biotecnológico.

7.6.1. Difusión en agar

En 2011 García-Cano *et al.*, reportaron un efecto antibacteriano de la fracción parcialmente pura contra una serie de microorganismos blanco tanto Gram-positivos como Gram-negativos.

En el presente trabajo se realizaron pruebas de inhibición de crecimiento evaluando por difusión en agar contra los mismos microorganismos de la fracción parcialmente pura de la proteína de 110 kDa obtenida de medio MRS sin agitación y se compararon los resultados con los reportados por García-Cano (2011).

Tabla 18. Espectro antibacteriano reportado por García-Cano (2011) para la preparación que contiene las proteínas de 99 y 110 kDa y para la que sólo tiene la de 110 kDa

	Espectro antibacteriano de las PGHs de 99 y 110 kDa (García-Cano <i>et al.</i> , 2011)	Espectro antibacteriano de la PGH de 110 kDa
Microorganismo	mm inhibición/mg proteína	mm inhibición/mg proteína
Gram +		
<i>Bacillus cereus</i>	206.4	44.99
<i>Bacillus subtilis</i>	127.2	38.24
<i>Streptococcus pyogenes</i>	188.9	50.99
<i>Staphylococcus aureus</i>	180.2	Actividad en gel
<i>Enterococcus faecium</i>	99.4	ND
<i>Enterococcus faecalis</i>	88.9	ND
<i>Listeria monocytogenes</i>	77.8	ND
<i>Pediococcus acidilactici</i>	89.6	ND
<i>Lactobacillus paracasei</i>	79.2	ND
Gram –		

<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	200.6	ND
<i>Escherichia coli</i>	76.6	Actividad en gel
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	ND

ND= No detectado

El espectro antibacteriano obtenido para la proteína de 110 kDa abarca un menor número de microorganismos y presenta halos de inhibición menores.

Lo anterior sugiere que la actividad contra *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *P. acidilactici*, *L. paracasei*, *S. typhimurium*, y *E. coli*, se debe a la proteína de 99 kDa y que para el resto de los microorganismos podría haber una actividad sinérgica de las dos proteínas. Esta hipótesis sólo podría comprobarse si se purifica la proteína de 110 kDa y 99 kDa, para hacer pruebas y espectros de inhibición con cada proteína por separado.

8. Conclusiones

- Los distintos medios para el cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 empleados en este trabajo ejercieron un efecto sobre el crecimiento del microorganismo y su capacidad de producir enzimas con actividad lítica y proteolítica. Creció en los medios MRS, APT, TSB, M17, CGB, TSB suplementado con Tween 80 y M17 adicionado de glucosa. Los mayores valores de crecimiento determinado indirectamente por densidad óptica, se alcanzaron en medio MRS con un valor de densidad óptica de 2.85 y el menor en M17 con 0.30.
- La mayor velocidad específica de crecimiento se presentó cuando el microorganismo se hizo crecer en medio CGB sin agitación con un valor de 0.68 h^{-1} y la velocidad más baja se presentó en el medio M17 suplementado con glucosa con un valor de μ de 0.018 h^{-1} .
- La aireación afectó los valores de velocidad específica de crecimiento, que disminuyeron en casi todos los casos. La producción de enzimas con actividad lítica y proteolítica también es susceptible al efecto de la agitación.
- Se observó la producción de dos enzimas con actividad lítica contra *M. lysodeikticus* (99 y 110 kDa), las cuales se localizaron en la fracción celular. Se observó actividad proteolítica tanto en la fracción celular como en la extracelular, y se detectaron ocho proteínas con esta actividad, en un intervalo de peso de entre 40 y 200 kDa.
- En los medios TSB y M17 se presenta una mayor producción de enzimas proteolíticas con actividad contra gelatina. Esto sugiere que las fuentes de carbono y nitrógeno, que se encuentran en mayores cantidades en los otros medios de cultivo, pueden ejercer un efecto de regulación en la producción de proteasas, cuya producción se favorece ante la limitación de nutrientes en los medios TSB Y M17.

- En medio MRS sin agitación la bacteria es capaz de producir dos enzimas con actividad de 99 y 110 kDa, sin embargo la producción de la proteína de 99 kDa se suprime al aumentar la concentración de aire al medio con agitación.
- La proteína de 110 kDa tiene actividad contra *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. pyogenes*, *S. aureus* y *E. coli*. El espectro antimicrobiano es menor que el reportado cuando las dos proteínas están presentes (99 y 110 kDa), la cual podría sugerir un efecto sinérgico o de cooperatividad entre ambas.

9. Bibliografía

- Abbas Akhavan S. y Jabalameli L. (2011) Effect of culture conditions on the production of an extracellular protease by *Bacillus sp.* isolated from soil sample of Avizan Jungle Park. *Enzyme Research*. 2011.
 - Alvarez V. M., von der Weid I., Seldin L. y Santos A. L. S. (2006) Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. *Letters in Applied Microbiology*. 43 625-630.
 - Ageitos J. M., Vallejo J. A., Sestelo A. B. F., Poza M. y Villa T. G. (2007) Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *Journal of Applied Microbiology*. 103 2205-2213.
 - Balciunas E. M, Castillo-Martínez F. A., Todorov S. V., Gombossy de Melo Franco B. D, Coverti A., Pinheiro de Souza R. (2013) Novel biotechnology applications of bacteriocins: A review. *Food Control*. 32 134-142.
 - Barros R.R., Carvalho M.G, Peralta J. M., Facklam R. R. and Teixeira L. M. (2001). Phenotypic and genotypic characterization of *Pediococcus* strains isolated from human clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 1241-1246.
- Benito M.J., Rodríguez M., Martín A., Aranda E., Córdoba J.J., (2004) Effect of the fungal protease EPg222 on the sensory characteristics of dry fermented sausage “salchichón” ripened with commercial starter cultures. *Meat Science*. 67 497-505.
- Benito M.J., Martín A., Aranda E., Pérez-Nevado F., Ruiz-Moyano S. y Córdoba M.G. (2007) Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Journal of Food Science*. 76 193-201.

- Callewaert L., Walmagh M., Michiels C. W. and Lavigne R. (2011) Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*. 22 164-171.
- Cálix-Lara T. F., Duong T. y Taylor T. M. (2012) Addition of a surfactant to tryptic soy broth allows growth of a Lactic Acid Bacteria food antimicrobial, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella enterica*. *Letters in Applied Microbiology*. 54 392-397.
- Caplice E. y Fitzgerald G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50 131-149.
- Casales-Cabrera G. X. (2012) Localización y caracterización de la actividad proteolítica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Carr F. J., Chill D. y Maida N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28 281-370.
- Chan L., Bai J., Cai Z. y Ouyang F., (2002). Optimization of a culture medium for bacteriocina production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of biotechnology* 83 27-34.
- Cheig C., Choi H., Park H., Kim S., Kook M., Kim T., Hwang J. y Pyun Y. (2002) Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp., *lactis* A164 isolated from kimchi, *Journal of Biotechnology*. 95 225-235.
- De Vuyst L. y Vandamme E. (1994) Bacteriocin of lactic acid bacteria. Microbiology, genetics and applications. London, Editorial Blackie Academic and Professional. Pp 107-125.

- De Vuyst L. y Leroy F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 13 194-199.
- Eom J., Park J., y Moon G., (2012) Increased bacteriocin activity of a recombinant *Pediococcus acidilactici*. *Food Science and Biotechnology*. 21 1781-1784.
- Fernandés R. (2009) Microbiology Handbook: Meat Products. Ed. RSC Publishing, pp.
- Ganzle M. G., Weber S. y Hammes W. p. (1994) Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. 46 207-217.
- García-Cano I., Velasco-Pérez L., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Mendoza-Hernández G., Llorente-Bousquets A. y Farrés A. (2011) Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology*. 111 607-615.
- Granados-Pérez E. A., (2009). Caracterización de la actividad proteolítica extracelular de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM, México D.F.
- Halami P. M., Badarinath V., Manjulata Devi S. y Naga Vijayendra S. V. (2011) Partial characterization of heat-stable, antilisterial and cell lytic bacteriocin of *Pediococcus pentosaceus* CFR SIII isolated from a vegetable source. *Annals of Microbiology* 61 (2) 323-330.
- Holland R., Crow V. y Curry B. (2011) Lactic Acid Bacteria / *Pediococcus spp.* Encyclopedia of Dairy Sciences. 2nd Edition 149-152.

- Holt J. G., Noel R., Krieg P., Sneath H. A., Stanley J. T. y Williams T. (1999). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. Lippincott Williams. 9th Edition.
- Huard C., Miranda G., Redko Y., Wessner F., Foster S. J. y Chapot-Chartier M. (2004) Analysis of the peptidoglycan hidrolase complement of *Lactococcus lactis*: Identification of a third N-Acetylglucosaminidase, AcmC. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 3493-3499.
- Jacques N. A., Hardy L., Knox K. W. y Wicken A. J. (1980) Effect of tween 80 on the morphology and physiology of *Lactobacillus salivarius* strain IV CL-37 grown in a chemostat under glucose limitation. *Journal of General Microbiology*. 119 195-201.
- Lacks S. A. y Springhorn S. S. (1980). Renaturation of enzyme after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *The Journal of Biological Chemistry*. 255 7467-7473.
- Lantz M. S. y Ciborowski P. (1994). Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods in enzymology*. 235 563-594.
- Lalpuria M., Karwa V., Anantheswaran R. C. y Floros J.D. (2012) Modified agar diffusion bioassay for better quantification of Nisaplin. *Journal of Applied Microbiology*. 114 663-671.
- Leroi F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*.. 27 698-709.
- Leroi F., Fall P., Pilet M., Chevalier F. y Baron R. (2012) Influence of temperature, pH and NaCl concentration on the maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus psicium* CNCM I-4031. *Food Microbiology*. 31 222-228.

- Leroy F. y De Vuyst L (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. 15 67-78.
- Leroy F., Verluyten J. y De Vuyst L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 106 270-285.
- Llorente B. A. (1998). Evaluación de la producción de bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Maestría en Microbiología. FESC. UNAM, México D.F.
- Llorente-Bousquets A., Pérez-Munguía S. y Farrés A. (2008). Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Canadian Journal of Microbiology*. 54 694-699.
- Lortal S. y Chapot-Chartier M. –P. (2005) Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*. 15 857-871.
- Madigan M.T., Martinko J. M. y Parker J. (2003) Brock. Biología de los Microorganismos. 10a edición . Pearson Prentice Hall. Madrid. Pp 144-145
- Mora D., Parini C., Grazia Fortina M. y Manachini P. L. (1998) Discrimination among pediocin Ach/PA-1 producer strains by comparison of pedF and pedD amplified genes and by multiplex PCR assay. *Systematic and applied microbiology*. 21 454-460.
- Mora D., Musacchio F., Fortina M.G., Senini L. y Manachini P. L. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 94 561-570.
- Nieto-Lozano J.J., Reguera-Useros J. I., Peláez-Martínez M., Sacristán-Pérez-Minayo G., Gutiérrez-Fernández A. y Hardisson de la Torre A. (2010) The effect of

the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*. 21 679-685.

- Reis J. A., Paula A.T., Casarotti S.N., Penna A. L. B. (2012) Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*. 4 124-140.
- Savijoki K, Ingmer H y Varmanen P.(2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71 394-406.
- Salminen S., Von Wright A. y Ouwehand A. (2004). Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3rd edition. Marcel Dekker. U.S.A. pp 19,20, 22-24, 37,38,389-395.
- Settani L., Valmorri S., Suzzi G. y Corsetti A. (2008) The role of environmental factor and medium composition on bacteriocina-like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. *Food Microbiology*. 25 722-728.
- Stahnke L. (1999) Volatiles produced by *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausage minces. Part I. Collection and Identification. *Food Science and Technology*. 32 357-364.
- Tavano O. L. (2013) Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 90 1-11.
- Todorov S. D. y Dicks L. M. T. (2005) Effect of medium components on bacteriocina production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbial Research*. 161 102-108.
- The OXOID Manual, 1998. 8th Ed. OXOID limited. United Kingdom.

- Tobin P. J., Mani N. y Jayaswal R. K. (1994) Effect of physiological conditions on the autolysis of *Staphylococcus aureus* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*. 65 71-78.
- Turner M. S., Waldherr F., Loessner M.J. y Giffard P.M. (2007) Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 30 58-67.
- Vafopoulou-Mastrojiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E. y Tzanetakis N. (1994). Proteinase, peptidase and esterase activity of crude cell-free extracts of *Pediococcus pentosaceus* isolated from cheese. *LWT-Food Science and Technology*. 27 342-346.
- Valenzuela-Rosas A. (2011) Caracterización de las peptidoglucano hidrolasas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Velasco-Pérez, L. Y., (2010) Caracterización y espectro antibacteriano de la Peptidoglucano Hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Vendramin A. S. (2012). Caracterización del sistema proteolítico de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. En revisión.
- Venkateshwari S., Halami P. M. y Vijayendra S.V. (2010). Characterization of the heat-stable bacteriocin-producing and vancomycin-sensitive *Pediococcus pentosaceus* CFR B19 isolated from beans. *Beneficial microbes*. 1 159-164.

- Villaruel, R., Huizar R., Corrales M., Sánchez T e Islas A. (2004). Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune. *Investigación en Salud* 6 170-179.
- Vollmer W. y Bertsche U. (2008) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 1714-1734.
- Wu C.W., Yin L. J. y Jiang S.T. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.52 1146-1151.
- Yousef, A.E., Juneja, V.J. (2003) Microbial stress adaptation and food safety. CRC Press, pp. 3-6.
-
- Østlie H. M., Vegarud G. y Langsrud T. (2007) Autolysis of propionibacteria: Detection of autolytic enzymes by renaturing SDS-PAGE and additional buffer studies. *International Journal of Food Microbiology* 117 167-174.

Fuentes de internet

- Garrity G., Bell J. y Lilburn T., (2004) Taxonomic outline of prokariotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition. (Revisado el 14 de abril del 2013). http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_5_2004.pdf
- Medios en frascos listos para usar. BD Tryptic Soy Broth. BD Becton, Dickinson and Company. (Revisado en marzo del 2012) <http://www.bd.com/>