

16

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

**AISLAMIENTO Y
CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE
UNA BACTERIOCINA PRODUCIDA
POR *Pediococcus* sp. 347, DE
ORIGEN CÁRNICO**

Wagner Luiz Moreira Dos Santos

MADRID, 1993

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Departamento de Nutrición y Bromatología III
(Higiene y Tecnología de los Alimentos)
Facultad de Veterinaria

AISLAMIENTO Y
CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE
UNA BACTERIOCINA PRODUCIDA
POR *Pediococcus* sp. 347, DE
ORIGEN CÁRNICO

Memoria que, para optar al grado
de Doctor en Veterinaria,
presenta el Licenciado:

WAGNER LUIZ MOREIRA DOS SANTOS

Madrid, Noviembre de 1993

PABLO ELPIDIO HERNANDEZ CRUZA, CATEDRÁTICO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

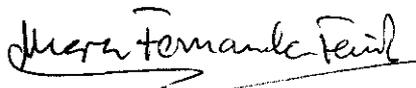
CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada " AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *Pediococcus* sp. 347, DE ORIGEN CÁRNICO", de la que es autor D. Wagner Luiz Moreira dos Santos, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos), bajo la dirección conjunta de la profesora titular Dña María F. Fernández Alvarez, del Profesor Catedrático D. Bernabé Sanz Perez y del que suscribe y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

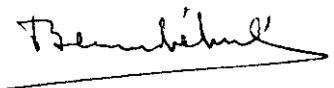
Madrid, 10 de Noviembre de 1993



Fdo: Pablo E. Hernández Cruza



Fdo: María F. Fernández Alvarez



Fdo: Bernabé Sanz Pérez

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, al Prof. Dr. Bernabé Sanz Pérez su acogida en el Departamento que ha dirigido durante tantos años, sin cuya colaboración, consejos y ayuda no hubiera sido posible este trabajo. Así mismo, al Prof. Dr. Juan. A. Ordoñez Pereda, actual director del Departamento, por todo apoyo, colaboración y amistad demostrados durante estos años.

Mi especial agradecimiento al **Prof. Dr. Pablo E. Hernández Cruza**, mentor intelectual y fundador de la línea de investigación en que se basa este proyecto, por su paciencia, esfuerzo, capacidad y, sobre todo por su ejemplo profesional y constante dedicación, lo que ha estimulado en mí el interés por la investigación. Sus orientaciones, pensamientos e ideas han contribuido enormemente en mi formación científica y personal.

A la Prof^a Dr^a M^a Fernanda Fernández Álvarez por su excelente guía durante mis primeros pasos, lentos y vacilantes, por el laboratorio, así como por sus orientaciones enriquecedoras que han contribuido de manera importante a llevar a feliz término este trabajo. Deseo agradecer también a la Prof^a Dr^a Rosario Martín de Santos, su competente tutoría en los experimentos de inmunología, así como la amistad, cariño y compañerismo demostrados durante todos estos años.

A **Odón**, me resulta difícil expresarle mi agradecimiento, ya que nunca podré aliviar su amistad y su manera de ser. Por ello, querido compañero "MUITO OBRIGADO" de todo corazón.

Mi agradecimiento a los miembros del Laboratorio de Bacterias Lácticas (LAB Hogar del Lactobacilo); a Juan M. Rodríguez ("cofundador") gran amigo en los experimentos iniciales; a Odón (el otro "cofundador") el guía más grande; a Luis M. Cintas actual

"comandante" y excelente colega en todos los niveles, durante todos estos años de ardua labor compartida (práctica y teórica) en esta línea investigadora; a Pilar Casaus y Ana Suárez las felices y recién llegadas investigadoras del Laboratorio, por la amistad y cariño demostrados.

A los demás miembros del Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos), por la amistad desinteresada y por sus muestras de afecto y de ánimo, así como por las agradables tertulias que juntos hemos compartido en estos años.

A Abundio, Faustino, Aurora y Rosa, por su amistad, paciencia y sensibilidad de las que han hecho gala durante estos años inolvidables en España.

También quiero agradecer a los demás profesores y funcionarios de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, su compañerismo y agradable convivencia durante estos años. De manera especial a Juan, siempre al pie de la Fotocopiadora, así como a los amigos del equipo de fútbol de Veterinaria (Pablo, "Tino", Mariano, Alfonso, "Pive" y todos en general) por la amistad, alegrías y algunas veces tristezas compartidas, en las ligas disputadas.

A la Dr^a Maria Carmen Fernández Criado, jefe del Gabinete Veterinario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, así como al personal facultativo y auxiliar del Pabellón de Medicina y Cirugía experimental del Hospital Militar "Gomez Ulla", por su colaboración en el proceso de inmunización de los conejos.

Al "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq/BRASIL" por la concesión de una "Bolsa de Estudo de Doutorado no Exterior", así como al "Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinaria da Universidade Federal de Minas Gerais" que me concedió el permiso necesario para la realización de este trabajo. Este trabajo también ha sido subvencionado por el BRIDGE

(Biotechnology Research for Innovation, Development and Growth in Europe) T-Project on Lactic Acid Bacteria (Contract BIOT-O263) de la Comunidad Europea y por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Proyecto ALI91-0255) del Ministerio de Educación y Ciencia de España.

Finalmente, estoy profundamente agradecido a mi esposa Sônia y a mis hijos Eric, Thiago y Matheus por su estímulo, paciencia y buen espíritu demostrados durante la realización de este trabajo. Me siento afortunado y feliz por el tiempo delicioso pasado en España en la realización de este trabajo.

" Nós vos pedimos com insistência
Não digam nunca
Isso é natural
Sob o familiar
Descubram o insólito
Sob o cotidiano desvelem o inexplicável
Que tudo o que é considerado habitual
Provoque inquietação
Na regra descubram o abuso
E sempre que o abuso for encontrado
Encontrem o remédio".

Bertold Brecht

A mis padres, Ennes (in memoriam) e Ivone y a
mis hermanos

A mi mujer, Sônia

A mis hijos, Eric, Thiago y Matheus.

INDICE

CAPITULO I: EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	1
CAPITULO II: INTRODUCCION	6
II.1.- Las bacterias lácticas	7
1.- Definición y características generales	7
2.-Taxonomía	10
a) diferenciación por la morfología	10
b) diferenciación por la fisiología	11
II.2.- Bacterias del grupo cocos Gram-positivos	13
1.- El género <i>Pediococcus</i>	13
1.1.- Morfología	13
1.2.- Pared y membrana celular	14
1.3. -Características de las colonias	14
1.4.- Nutrición y condiciones de cultivo	14
1.5.- Metabolismo	15
1.6.-Ecología	15
1.7.- Taxonomía	16
1.8.- Diferenciación entre las especies del género <i>Pediococcus</i>	16
1.8.1. - <i>Pediococcus damnosus</i>	16
1.8.2. - <i>Pediococcus parvulus</i>	17
1.8.3. - <i>Pediococcus inopinatus</i>	17
1.8.4. - <i>Pediococcus dextrinicus</i>	17
1.8.5. - <i>Pediococcus pentosaceus</i>	19
1.8.6. - <i>Pediococcus acidilactici</i>	19
II.3.- Las bacterias lácticas de la carne y productos cárnicos	20
II.4.- Efecto beneficioso de las bacterias lácticas en los alimentos	22
1. - Extensión de la vida útil	22

2. - Control de microorganismos patógenos y de sustancias tóxicas	23
2.1.- bacterias	23
2.2.- virus	26
2.3.- hongos y micotoxinas	27
2.4.- <i>Trichinella spiralis</i>	27
2.5. - nitrosaminas	28
2.6. - aminas biógenas	29
II.5.- Sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias	
lácticas	30
1.- Ácidos orgánicos	30
2.- Peróxido de hidrógeno	31
3.- Diacetilo	33
4.- Compuestos antimicrobianos no proteícos	33
5.- Compuestos antimicrobianos proteícos	34
II.6.- Bacteriocinas	35
1.- Biosíntesis y producción óptima de bacteriocinas	35
2.- Tolerancia de las bacteriocinas al calor, acidez y enzimas	37
3.- Propiedades de las bacteriocinas	37
3.1.- Características bioquímicas y físicas	38
3.2.- Antigenicidad	40
3.3.- Estabilidad de las bacteriocinas	40
4.- Espectro antimicrobiano de las bacteriocinas	40
5.- Mecanismo de acción de las bacteriocinas	41
6.- Purificación de las bacteriocinas	42
7.- Composición aminoacídica y secuencias de las bacteriocinas	
de las bacterias lácticas.....	45
8.- Bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas	46
8.1.- Bacteriocinas producidas por especies del género <i>Lactococcus</i>	46
8.2.- Bacteriocinas producidas por especies del género <i>Lactobacillus</i>	49
8.3.- Bacteriocinas producidas por especies del género <i>Leuconostoc</i>	51
8.4.- Bacteriocinas producidas por especies del género <i>Carnobacterium</i>	51
8.5.- Bacteriocinas producidas por especies del género <i>Pediococcus</i>	53

II.7.- Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en el control de microorganismos alterantes y patógenos	56
II.8.- Técnicas inmunológicas de interés en la detección y caracterización de bacteriocinas	58
1.- Métodos inmunoenzimáticos (ELISA)	59
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	67
III.1.- Materiales	68
1.- Material biológico	68
1.1.- Microorganismos empleados	68
1.2.- Enzimas y proteínas	68
1.3.- Obtención de los inmunosueros	69
1.4.- Productos y reactivos	69
2.- Material de laboratorio	69
III.2.- Métodos	76
1.- Medios de cultivo para el crecimiento de los microorganismos	76
1.1.- Medios de cultivo empleados en el crecimiento de las bacterias lácticas.....	76
1.2.- Medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos indicadores distintos de las bacterias lácticas	78
1.3.- Medio para cultivos mixtos de bacterias lácticas y microorganismos psicrotrofos	78
2.- Aislamiento y selección de las bacterias lácticas de los embutidos crudos curados	79
3.- Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas	80
3.1.- Soluciones tampón empleadas	80
3.2.- Prueba directa de antagonismo	81
3.2.1.- Prueba directa de antagonismo por siembra en picadura	81
3.3.- Detección de la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células	81
3.3.1.- Preparación de los sobrenadantes	81

3.3.2.- Actividad inhibidora por el método de difusión en agar	82
4.- Identificación y caracterización bioquímica de las bacterias lácticas con actividad inhibidora	82
4.1.- Morfología y tinción por el método de Gram	82
4.2.- Prueba de la catalasa	83
4.3.- Crecimiento a diversas temperaturas	83
4.4.- Tolerancia al Cloruro Sódico	83
4.5.- Tolerancia al pH 3,9	83
4.6.- Hidrólisis de la arginina.....	84
4.7.- Producción de gas a partir de glucosa	85
4.8.- Producción de ácido sulfídrico	87
4.8.1.- Técnica de Shay y Egan (1981)	87
4.8.2.- Agar hierro de Klieger	87
4.9.- Prueba de Voges-Proskauer	88
4.10.- Fermentación de carbohidratos	89
5.- Espectro antimicrobiano de la sustancia inhibidora producida por las cepas de <i>Pediococcus</i> sp. 209, 211, 241, 346, 347 y 438	90
6.- Crecimiento de <i>Pediococcus</i> sp. 347, cinética del desarrollo y producción de la sustancia antimicrobiana a diversas temperaturas	91
6.1.- Crecimiento de los cultivos	91
6.2.- Parámetros cinéticos del desarrollo microbiano	91
6.2.1.- Velocidad específica de crecimiento (μ)	91
6.2.2.- Tiempo de duplicación (td)	91
6.2.3.- Número de generaciones por hora (g/h)	93
6.2.4.- Determinación del peso celular seco	94
6.2.4.1.- Elaboración de la recta patrón para la determinación del peso celular seco	94
7.- Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de <i>Pediococcus</i> sp. 347	96
7.1.- Efecto de la composición del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347	96
7.2.- Efecto de diversos enzimas en la actividad antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347	97
7.3.- Cinética de la termodestrucción de la actividad inhibidora de <i>Pediococcus</i> sp. 347	98

7.3.1. Tratamiento térmico	98
7.3.2. Parámetros cinéticos de termodestrucción	98
7.4.- Mecanismo de acción de la sustancia inhibidora de <i>Pediococcus</i> sp. 347	103
8.- Purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de <i>Pediococcus</i> sp. 347	104
8.1.- Cromatografía de filtración en geles	104
8.1.1.- Soluciones tampón empleadas	104
8.1.2.- Geles	105
8.1.3.- Condiciones de trabajo	105
8.2.- Determinación de la proteína	106
8.3.- Determinación del peso molecular de la sustancia inhibidora por cromatografía de filtración en Sephadex G-50	109
8.4.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)	111
8.4.1.- Técnica de Swank y Munkres (1971)	112
8.4.1.1.- Tampones, geles y soluciones empleadas	112
8.4.1.2.- Preparación de las muestras	114
8.4.1.3.- Preparación de los geles	114
8.4.1.4.- Electroforesis	114
8.4.1.5.- Tinción de los geles	115
8.4.1.6.- Determinación del peso molecular	115
8.4.2.- Técnica de Laemli (1970)	117
8.4.2.1.- Tampón, geles y soluciones empleadas	117
8.4.2.2.- Preparación de las muestras	119
8.4.2.3.- Preparación de los geles y electroforesis.....	119
8.4.2.4.- Tinción de los geles	119
8.4.2.5.- Determinación del peso molecular (Laemli)	119
9.- Purificación a homogeneidad de la sustancia antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347	120
9.1.- Obtención del sobrenadante libre de células	120
9.2.- Precipitación con sulfato amónico	120
9.3.- Cromatografía de intercambio catiónico	120
9.3.1.- Reactivos y tampón empleados	121
9.3.2.- Condiciones de trabajo	122
9.4.- Cromatografía de interacción hidrofóbica	123

9.4.1.- Reactivos y tampón empleados	123
9.4.2.- Condiciones de trabajo	123
9.5.- Cromatografía de fase reversa (CFR)	124
9.5.1.- Reactivos y tampón empleados	125
9.5.2.- Condiciones de trabajo	125
9.6.- Detección y cuantificación de la actividad inhibidora de <i>Pediococcus</i> sp. 347 en placas.....	126
9.6.1.- Técnica	126
10.- Determinación de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347, parcialmente purificada por cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)	127
10.1.- Digestión ácida de la muestra problema	127
10.2.- Preparación de los patrones	127
10.3.- Marcado y derivatización de los aminoácidos	128
10.4.- Desarrollo cromatográfico	128
10.5.- Identificación y cuantificación de los aminoácidos	129
11.- Concentración inhibidora mínima de la sustancia antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347 parcialmente purificada, en diversos microorganismos indicadores.....	131
12.- Caracterización inmunológica parcial de la sustancia antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347 parcialmente purificada.....	131
12.1.- Obtención de los extractos antigénicos.....	131
12.2.- Determinación de proteínas.....	132
12.3.- Obtención de los inmunosueros.....	132
12.3.1.- Pauta de inmunización.....	132
12.3.2.- Sangría final.....	133
12.4.- Técnicas inmunológicas	135
12.4.1.- Inmunodifusión clásica en geles de agarosa, según la técnica de Ouchterlony, modificada por Chordi y Kagan (1964)	135
12.4.1.1.- preparación del gel de agarosa.....	136
12.4.1.2.- preparación de las placas de inmunodifusión.....	136
12.4.2.- Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).....	137
12.4.2.1.- Técnica del ELISA indirecto.....	137
12.4.2.2.- Técnica del ELISA indirecto clásico.....	137
12.4.2.3.- Técnica del ELISA indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina.....	142

12.4.2.3.1.- Biotinización de los anticuerpos.....	142
12.4.2.3.2.- Metodología del ELISA indirecto utilizando el sistema amplificación biotina-avidina.....	144
12.5.- Detección inmunológica de sustancias antimicrobianas en los de sobrenadantes libres de células de diversas bacterias lácticas origen cárnico	145
12.6.- Detección de la sustancia antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347 en diferentes extractos cárnicos.....	145
12.6.1.- Obtención de los extractos cárnicos	145
12.6.2.- Neutralización de los anticuerpos anti-P347.....	146
 CAPITULO IV: RESULTADOS	 148
IV.1.- Aislamiento y selección de bacterias lácticas	149
IV.2.- Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas	149
1.- Actividad inhibidora directa.....	149
2.- Actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células de las bacterias lácticas seleccionadas.....	152
IV.3.- Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas seleccionadas	152
1.- Morfología y tinción por el método de Gram	152
2.- Prueba de la catalasa	159
3.- Crecimiento a diversas temperaturas	159
4.- Tolerancia al Cloruro Sódico	159
5.- Tolerancia al pH 3,9	159
6.- Hidrólisis de la arginina.....	159
7.- Producción de gas	161
8.- Producción de ácido sulfídrico	161
9.- Producción de acetoina	161
10.- Utilización de hidratos de carbono	161

IV.4.- Espectro antimicrobiano de la sustancia inhibidora exocelular de <i>Pediococcus</i> sp. 209, 211, 241, 346, 347 y 438	165
IV.5.- Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de <i>Pediococcus</i> sp. 347	168
1.- Parámetros cinéticos del desarrollo y actividad inhibidora de <i>Pediococcus</i> sp. 347 a diversas temperaturas	168
1.1.- Crecimiento y actividad antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347	168
1.2.- Parámetros cinéticos del crecimiento bacteriano	173
2.- Efecto de diversos enzimas en la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de <i>Pediococcus</i> sp. 347	173
3.- Termorresistencia de la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de <i>Pediococcus</i> sp. 347	175
4.- Determinación de la actividad antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347 en diversos medios de cultivo	177
5.- Mecanismo de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>Pediococcus</i> sp. 347	180
IV.6.- Purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de <i>Pediococcus</i> sp. 347	182
1.- Cromatografía de filtración en geles de Sephadex G-150, G-75 y G-50.....	182
2.- Determinación del peso molecular por cromatografía de filtración en Sephadex G-50	183
IV.7.- Determinación del peso molecular de <i>Pediococcus</i> sp. 347 por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)	189
1. Electroforesis según la técnica de Swank y Munkres	189
2. Electroforesis en geles de 18 % de poliacrilamida con SDS según la técnica de LAEMLI (1970)	190
IV.8.- Determinación de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de <i>Pediococcus</i> sp. 347 ...	192
IV.9.- Concentración inhibidora mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>Pediococcus</i> sp. 347	194

IV.10.- Purificación a homogenidad de la sustancia antimicrobiana producida por <i>Pediococcus</i> sp. 347.....	196
IV.11.- Caracterización inmunológica parcial de la sustancia antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347	201
1.- Análisis por inmunodifusión en geles de agarosa de los inmunosueros obtenidos de conejos frente a la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>Pediococcus</i> sp. 347,	201
2.- Detección de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de <i>Pediococcus</i> sp. 347, por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)	205
2.1.- Detección por el ELISA indirecto clásico	205
2.1.1.- Evaluación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo	205
2.1.2.- Evaluación de la respuesta inmunológica de los conejos frente al extracto antigénico P347	206
2.2.- Detección de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de <i>Pediococcus</i> sp. 347, mediante la técnica del ELISA indirecto con el sistema de amplificación biotina-avidina	211
2.2.1.- Evaluación de la concentración idonea de los reactivos que intervienen en el ensayo	211
2.2.2.- Detección de la sustancia antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347, en el medio MM-Triptosa	211
2.2.3.- ELISA indirecto de los sobrenadantes libres de células de diversas bacterias lácticas de origen cárnico, frente al inmunosuero anti-P347	215
2.2.4.- Detección de la sustancia antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347 en extractos cárnicos	218
3.- Detección de de la bacteriocina P347 en extractos cárnicos con inmunosuero anti-P347 neutralizado	222
CAPITULO V: DISCUSION	222
V.1.- Aislamiento de bacterias lácticas de embutidos crudos curados....	229

V.2.- Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas...	230
1.- Pruebas directas de antagonismo microbiano	230
2.-Actividad inhibidora de los sobrenadantes libres de células	233
3.- Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas	236
V.3.- Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana	237
V.4.- Parámetros cinéticos del desarrollo y actividad inhibidora de <i>Pediococcus</i> sp. 347 a diversas temperaturas	241
V.5.- Caracterización bioquímica parcial de la actividad antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347.....	243
1.- Determinación de la actividad antimicrobiana de <i>Pediococcus</i> sp. 347, en diversos medios de cultivo	243
2.- Efecto de diversos enzimas en la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de <i>Pediococcus</i> sp. 347	244
3.- Termorresistencia y mecanismo de acción de la actividad inhibidora de <i>Pediococcus</i> sp. 347	245
4.- Caracterización bioquímica parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de <i>Pediococcus</i> sp. 347	246
V.7.- Mecanismo de acción de la bacteriocina producida por <i>Pediococcus</i> sp. 347	256
V.8.- Propiedades antigénicas de la bacteriocina de <i>Pediococcus</i> sp. 347.....	257
CAPITULO VI: CONCLUSIONES	260
CAPITULO VII: TRABAJO FUTURO	264
CAPITULO VIII: BIBLIOGRAFIA	266

CAPITULO I
EXPOSICION GENERAL
DEL
PROBLEMA A INVESTIGAR

1 - EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

Durante cientos de años los microorganismos han desempeñado un papel importante en la obtención y producción de la mayor parte de los alimentos fermentados que actualmente se consumen, entre los que se incluyen el yogur, quesos, embutidos crudos curados, encurtidos y otros. En este contexto las bacterias lácticas desempeñan un papel fundamental en la tecnología de los alimentos fermentados, siendo algunas especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* las más utilizadas en la elaboración de estos alimentos. La industria láctea fue la primera en emplear estos microorganismos como cultivos iniciadores; sus productos fermentados representan cerca de 20% del comercio mundial de los alimentos fermentados (Sharpe, 1979a). No obstante, antes de esta exitosa inversión industrial y comercial, fue necesario aislar, caracterizar y seleccionar las bacterias lácticas de mayor interés en la obtención de productos fermentados estandarizados de alta calidad. Ello ha conducido también al conocimiento del metabolismo y de otras características fisiológicas, bioquímicas, inmunológicas y genéticas de dichas bacterias; sin estos conocimientos el avance experimentado por la industria láctea, seguramente no sería el mismo.

Las bacterias lácticas no solo son interesantes en la industria alimentaria por inducir el desarrollo de características organolépticas y estructurales deseables en los alimentos, sino también, por inhibir en ellos el desarrollo de microorganismos perjudiciales, alterantes y patógenos; por ello se pensó en la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil de los alimentos y mejorar su calidad higiénica (Raccach y Baker, 1978; Rodriguez y col., 1989; Schillinger y Lucke, 1989). Su antagonismo microbiano se debe principalmente a la disminución del pH y a la utilización de los carbohidratos disponibles, en la producción de ácidos (Daeschel, 1989). Se sabe además que las bacterias lácticas producen, no solo ácidos orgánicos, sino otras sustancias antagonistas como peróxido de hidrógeno, radicales libres, diacetilo, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos y otros metabolitos como moléculas

pequeñas no proteicas y bacteriocinas (Daeschel, 1989; Klaenhammer, 1988; Piard y Desmazeaud, 1991, 1992).

De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente, ya que debido a su naturaleza proteica (Tagg y col., 1976), las inactivan los enzimas proteolíticos del tracto gastrointestinal y no son tóxicas, ni inmunógenas en los animales de experimentación (Bhunia y col., 1990), lo que las convierte en candidatos adecuados a conservadores de los alimentos. Debido a la preocupación constante que en la sociedad actual plantean los conservadores químicos, las bacterias productoras de bacteriocinas o las bacteriocinas producidas por ellas podrían desempeñar un papel importante en el procesado y conservación de los alimentos. De otra parte conviene recordar los buenos efectos nutricionales de la ingestión de bacterias lácticas viables en los consumidores; se ha sostenido y, existen pruebas a favor que las bacterias lácticas incrementan la calidad nutritiva de los alimentos, controlan ciertas infecciones intestinales, facilitan la digestión de la lactosa, actúan como antimutagénicas, inhiben el desarrollo de algunos tipos de cáncer y reducen el colesterol sanguíneo (Fernandes y Sahani, 1990; Gilliland, 1990; Hosoda y col., 1992).

En los últimos años la industria cárnica viene experimentando unos cambios similares a los experimentados por la industria láctea, con el desarrollo de métodos y procesos cada vez más automatizados y modernos. La finalidad es poner a disposición del consumidor un producto de calidad definida en cuanto a sus características organolépticas y, sobre todo, exento de riesgos higiénico-sanitarios. Por ello, la utilización de bacterias lácticas como cultivos iniciadores se está convirtiendo en una práctica cada vez más habitual en la elaboración de embutidos crudos curados y en otros derivados cárnicos.

Desgraciadamente se suelen utilizar como cultivos iniciadores bacterias lácticas no bien caracterizadas o aisladas de alimentos distintos de aquellos en los que se pretende emplearlas. Se piensa que las bacterias lácticas aisladas de la carne o de sus derivados, serán probablemente las más eficaces para asegurar su calidad microbiológica, al estar mejor adaptadas a dichos sustratos por lo que serán más competitivas que las bacterias lácticas de otros orígenes. Es evidente que el aislamiento y caracterización bioquímica, inmunológica y genética de las bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocina así como de las bacteriocinas que producen, son condiciones indispensables para evaluar su potencial como factores de seguridad en el control de la calidad higiénica de la carne y derivados cárnicos.

En este trabajo se propone el aislamiento y caracterización parcial de aquellas bacterias lácticas, que aisladas de embutidos crudos curados, manifiesten una mayor actividad inhibidora de diversos microorganismos indicadores. Las bacterias seleccionadas, serán sometidas a una identificación y caracterización bioquímica, así como a una evaluación de sus parámetros cinéticos de crecimiento. De especial interés, es la identificación y detección de las que producen bacteriocinas con capacidad inhibidora del desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes que puedan encontrarse en las carnes y sus productos derivados. Se pretende purificar y caracterizar las bacteriocinas seleccionadas utilizando técnicas bioquímicas e inmunológicas.

Para la consecución de los objetivos propuestos se necesitan alcanzar los siguientes objetivos parciales :

- 1 - Aislar las bacterias lácticas de los embutidos crudos curados, que son teóricamente los sustratos cárnicos más adecuados para su desarrollo, seleccionando las que presenten una actividad inhibidora máxima de los microorganismos indicadores elegidos.

2 - Identificación morfológica y caracterización bioquímica de estas bacterias y estudio de sus parámetros cinéticos de crecimiento.

3 - Evaluación de la actividad inhibidora de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, frente a microorganismos saprófitos de diversos orígenes, así como frente a bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. , *Clostridium botulinium* y *Clostridium perfringens*.

4 - Purificación y caracterización bioquímica e inmunológica parcial, de la bacteriocina de mayor poder inhibidor frente al desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes, potencialmente presentes en la carne y derivados cárnicos.

CAPITULO II
INTRODUCCION

II. 1. - LAS BACTERIAS LACTICAS

Este grupo de bacterias, probablemente sea el más abundante y más difundido en la naturaleza, debido a la capacidad que poseen de crecer en una variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas. Se encuentran en sustratos de origen animal de un pH neutro, así como en los de elevada acidez como son, normalmente, los de origen vegetal. También se encuentran bacterias lácticas en ambientes de elevadas temperaturas y de altas concentraciones de cloruro sódico; su adaptación a estas dos últimas condiciones puede deberse a la necesidad del hombre de conservar sus alimentos. Afortunadamente, estas bacterias producen ácido láctico como producto final de su metabolismo, que este además de no ser tóxico para el hombre y de poseer un sabor agradable, influye en el pH del medio reduciendolo e impidiendo así el desarrollo de microorganismos perjudiciales (Carr, 1973).

II. 1. 1. - Definición y características generales

Los microorganismos que poseen la característica común de producir ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos, se conocen genéricamente con el nombre de bacterias lácticas. Este término fue utilizado por primera vez por Weigmamn en 1899, aunque las primeras referencias a este tipo de bacterias se deben a Hueppe (1884) que denominó "Milchsauerbazillus" a la flora microbiana responsable de la acidificación y coagulación de la leche. Desde entonces se han identificado y descrito estos microorganismos en tan diversas fuentes, como la leche y productos lácteos, carne y derivados cárnicos, vegetales, tracto gastrointestinal y urinario de hombres y animales, aguas residuales y estiércol, etc.

Esta diversidad ecológica se corresponde con una gran diversidad morfológica y fisiológica; las bacterias lácticas se componen de cocos, cocobacilos y bacilos Gram-positivos,

no esporulados, microaerófilos, catalasa negativos, inmóviles y no reductores de los nitratos (Sharpe, 1979b). Sin embargo, estas características están sometidas a discusión, debido a una serie de factores, entre los que destacan la excesiva especialización de los medios de cultivo y la arbitrariedad en la elección de las pruebas de identificación de las cepas aisladas (Ingram, 1975). Por otro lado, existen pocos estudios acerca de las bacterias lácticas que no proceden de la leche, lo que ha llevado a algunas interpretaciones equivocadas al asumir, para las procedentes de otros orígenes las mismas características que las que poseen las de origen lácteo (Egan, 1983).

Se admite que las bacterias lácticas no producen endosporas, sin embargo, algunos investigadores han citado la presencia de esporas en lactobacilos aparentemente típicos (Thornley y Sharpe, 1959; Kitahara y Suzuki, 1963). Es de destacar que, en todos los casos, las esporas se producían en medios de cultivo con cantidades muy pequeñas de carbohidratos, lo que dificultaba el desarrollo microbiano. A este respecto, se ha sugerido que el uso generalizado de medios de cultivo con altas concentraciones de carbohidratos podría inhibir la formación de endosporas en cepas con dicha propiedad (Kitahara y Suzuki, 1963).

El carácter microaerófilo de las bacterias lácticas es también variable, si bien ciertas especies necesitan condiciones aerobias para desarrollarse en determinados sustratos (Whittenbury, 1963). Estas diferencias de comportamiento respecto al oxígeno son especialmente numerosas entre los lactobacilos heterofermentativos y en las especies del género *Leuconostoc* (Ingram, 1975).

Aunque las bacterias lácticas son catalasa negativas, se sabe que muchas cepas de los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus* producen una "pseudocatalasa" que descompone el peróxido de hidrógeno (Felton y col, 1953; Dacre y Sharpe, 1956; Vankova, 1957). Whittenbury (1964) demostró que esta reacción depende de dos catalasas distintas: 1) una

pseudocatalasa, estable al cianuro y a la azida de sodio; y 2) la catalasa clásica, sensible a estas dos sustancias y que solamente se produce si el medio contiene hemo como grupo prostético. De hecho, algunas bacterias lácticas tienen capacidad de sintetizar la apocatalasa pero no su grupo prostético (Ingram, 1975). Recientemente, Hastings y Holzapfel (1987) han observado la presencia de una pseudocatalasa en 100 cepas de *Lactobacillus sake* aisladas de carne radurizada.

Las bacterias lácticas se consideran microorganismos inmóviles. Sin embargo, también se han aislado y descrito cepas móviles, generalmente de fuentes distintas de la leche y sus derivados (Mann y Oxford, 1954; Vankova, 1957; Deibel y Niven, 1958). Entre las especies móviles se encuentran *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus ruminis* (Stamer, 1979).

Hasta muy recientemente se ha sostenido que las bacterias lácticas no reducen los nitratos, por ello no se ha considerado la posibilidad de que lo hiciesen durante la maduración de los embutidos, por ejemplo, en la maduración de los embutidos. Esto puede deberse a que, tradicionalmente, la reducción de los nitratos no se ha admitido como rasgo importante en la caracterización de las bacterias lácticas (Sharpe y col., 1966). Rogosa (1961) observó, que en muchos casos esta propiedad, se inhibe por la acidez desarrollada cuando el medio de cultivo contiene concentraciones elevadas de glucosa; dicho investigador sugirió emplear para la realización de esta prueba un 0,1 % de glucosa en vez del 2 % habitual. Con esta modificación, Spencer (1969) y Dempster (1972), observaron que varias cepas aisladas de carnes frescas eran nitrato-reductoras. Ingram (1975), también ha señalado que la mayor parte de las bacterias lácticas aisladas de carnes curadas reducen los nitratos lo mismo que *L. plantarum* (Smith y Palumbo, 1978).

II. 1. 1. 2. - Taxonomía

Debido a los recientes avances científicos y a la mejora de las técnicas analíticas, la taxonomía bacteriana ha adquirido un gran dinamismo y las bacterias lácticas no constituyen una excepción a esta regla. A pesar de ello, las líneas maestras indicadas por Orla-Jensen (1919), todavía proporcionan criterios racionales para su identificación y clasificación. Estos criterios incluyen principalmente diferenciaciones fisiológicas y morfológicas, utilizando propiedades como el metabolismo fermentativo y su producto final, temperatura de crecimiento, motilidad, coloración de Gram, requerimientos nutricionales etc.

Actualmente el grupo comprende cocos de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* y, bacilos, del género *Lactobacillus*. Los estreptococos del grupo serológico D de Lancefield se han excluido de las bacterias lácticas y los del grupo serológico N se han transferido al género *Lactococcus* (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984; Schleifer y Col., 1985), mientras que las especies *Lactobacillus divergens* y *Lactobacillus carnis* se han incluido en un nuevo género denominado *Carnobacterium* (Collins y col., 1987). La identificación de las especies se basa en los siguientes aspectos:

a) Diferenciación por la morfología

Aunque la morfología de las bacterias lácticas corresponde a la esférica (cocos) y de baston (bacilos), algunas veces la interpretación final de esta característica es difícil e incluso frustrante (Stamer, 1979); por ello con el intento de caracterizar mejor morfológicamente las bacterias lácticas se utilizaron términos como "cocobacilos" (Perry y Sharpe, 1960) y "cocoides" (Buchanan y Gibbons, 1974).

b) Diferenciación por la fisiología

Las bacterias lácticas se han dividido en dos grandes grupos, de acuerdo con los productos finales de la fermentación de la glucosa. Las especies que producían fundamentalmente ácido láctico se denominaron homofermentativas, mientras que las que producían una mezcla de productos finales (lactato, acetato, etanol, CO₂) se consideraron heterofermentativas. La configuración de los esteroisómeros del ácido láctico (D, L o DL) producido durante la fermentación del carbohidrato, también puede ser utilizada en la clasificación (Tabla II-1) de algunas bacterias lácticas (Sharpe, 1979b).

En realidad, la distinción entre bacterias lácticas homo y heterofermentativas reside en los enzimas asociados con la fermentación de la glucosa. De esta manera, Buyze y col., (1957) dividieron las bacterias lácticas en tres grupos fisiológicos diferentes: 1) Heterofermentativos obligados, que poseen los enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, pero no fructosa difosfato aldolasa, 2) Homofermentativos obligados, que carecen de las dos deshidrogenasas pero poseen aldolasa, y 3) Homofermentativos facultativos, que aunque poseen las dos deshidrogenasas degradan la glucosa preferentemente como los homofermentadores obligados.

Además de estos criterios, la utilización en los últimos años de nuevas técnicas bioquímicas y de biología molecular, como la determinación de la estructura y composición química de las paredes y membrana celulares y la homología DNA-DNA y DNA-RNA, así como la determinación de los porcentajes de guanina más citosina en el DNA y la regulación enzimática de la glicolisis, han clarificado mucho mejor tales relaciones taxonómicas, concluyéndose que los géneros *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* forman parte del mismo grupo filogenético (London, 1976).

Tabla II.1.- Tipos de fermentación y productos finales de los géneros microbianos que integran el grupo de las bacterias lácticas.

Género (Subgénero)	Tipo de fermentación	Producto final mayoritario	Configuración del lactato
1 - <u>COCOS</u>			
1.1. <i>Lactococcus</i>	Homofermentativa	lactato	L(+)
1.2. <i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativa	lactato:acetato:CO ₂	D(-)
1.3. <i>Pediococcus</i>	Homofermentativa	lactato	DL,L(+)
1.4. <i>Streptococcus</i>	Homofermentativa	lactato	L(+)
2 - <u>BACILOS</u>			
2.1. <i>Lactobacillus</i>			
<i>Thermobacterium</i>	Homofermentativa	lactato	D(-),L(+),DL
<i>Streptobacterium</i>	Homofermentativa	lactato	D(-),L(+),DL
	Heterofermentativa	lactato:acetato (1:1)	D(-), L(+),DL
<i>Betabacterium</i>	Heterofermentativa(1)	lactato:acetato:CO ₂	(1:1:1)DL
2.2. <i>Bifidobacterium</i>	Heterofermentativa	lactato:acetato:CO ₂	(2:3)L(+)
2.3. <i>Carnobacterium</i>	Heterofermentativa		

(1) Utilización de pentosas

Fuente: adaptado de Kandler (1983) y Collins y col., (1987)

II. 2. - BACTERIAS DEL GRUPO COCOS GRAM-POSITIVOS

El Manual Bergey (Bergey's of Determinative Bacteriology, 1986), agrupa a los cocos Gram-positivos en 15 géneros filogenéticamente y fenotípicamente muy distintos que poseen pocas características morfológicas y fisiológicas comunes, entre ellas ser Gram-positivas, quimioorganotróficas, mesófilas y no esporuladas. No obstante, su morfología y ordenación celular, necesidades de oxígeno y actividad catalasa constituyen características muy interesantes en la separación inicial de los distintos géneros.

La posesión o no de catalasas y citocromos separa a los cocos Gram-positivos en dos grupos. A su vez los cocos Gram-positivos, catalasa-negativos se dividen en otros dos grupos, uno que comprende los microorganismos microaerófilos o anaerobio facultativos y otro formado por los anaerobios obligados. El género *Pediococcus*, pertenece al primero de los grupos últimamente citados.

II. 2. 1. - El género *Pediococcus*

II. 2. 1. 1. - Morfología

El género *Pediococcus* comprende los microorganismos pertenecientes al grupo de los cocos Gram-positivos, catalasa negativos. Se trata de bacterias esféricas cuya división tiene lugar en dos planos en ángulos rectos con lo que se forman tétradas, si bien no siempre sucede así, observándose solamente parejas de células. Es rara la existencia de células aisladas y no forman cadenas ni esporas. A veces se observan cadenas cortas, que se deben a parejas celulares y no a su división en un solo plano. El tamaño celular varía de 0,6-1,0 μm dependiendo de las cepas pero en un mismo cultivo esta característica es uniforme.

II. 2. 1. 2. - Pared y membrana celular

El peptidoglicano de la pared celular de los pediococos está formado por los aminoácidos L-Lys-L-Ala-D-Asp, salvo en el caso de *Pediococcus urinae-equi* que carece en su pared celular del aminoácido D-Asp.

II. 2. 1. 3. - Características de las colonias

En medios sólidos las colonias son de unos 1-2,5 mm de diámetro, lisas, redondas y de color blanco grisáceo.

II. 2. 1. 4. - Nutrición y condiciones de cultivo

Los pediococos crecen lentamente, aunque bien, en el medio MRS tanto líquido (caldo) como sólido (agar), sin embargo, algunas cepas requieren modificaciones especiales (Back y Stackebrandt, 1978). La leche es un medio de cultivo pobre debido a la falta de algunos factores de crecimiento. Algunas especies de este género pueden separarse en función de su tolerancia a la temperatura, pH y cloruro sódico. *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* crecen rápidamente en medios de cultivo apropiados así como en la superficie de agar en aerobiosis o cuando se incuban en atmósferas de H₂ + 10 % de CO₂. Todavía, no se conocen bien sus requerimientos de aminoácidos, aunque para su crecimiento *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* exigen la mayoría de los aminoácidos. Algunas cepas de *P. pentosaceus* requieren ácido fólico, que puede ser parcialmente sustituido por tiamina (Nakagawa y Kitahara, 1959; Jensen y Seeley, 1954). Este requerimiento de ácido fólico no es compartido por ninguna otra especie (Deibel y Niven, 1960; Gunther y White, 1961).

II. 2. 1. 5. - Metabolismo

El desarrollo y crecimiento de los pediococos depende de la presencia de un carbohidrato fermentable; si bien la glucosa y la mayoría de los monosacáridos son fermentables, la capacidad de utilizar las pentosas se limita a *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. urinae-equi* y algunas cepas de *P. halophilus*. Los polisacáridos generalmente no los utilizan, con excepción de la dextrina que es fermentada por *P. dextrinicus*. Existe poca información acerca de las rutas metabólicas de fermentación de los carbohidratos, pero se sabe que algunas especies contienen aldolasa (London y Chace, 1976) y que todas las cepas poseen el enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La tasa de D/L lactato formado puede variar con las condiciones de crecimiento de los microorganismos. Aunque el lactato es el producto principal de la fermentación de los carbohidratos, algunas especies como *P. damnosus* pueden formar acetato/diacetilo. Este hecho, raramente ocurre con otras especies. En la mayoría de las bacterias lácticas, la reducción de piruvato a lactato está controlado por el requerimiento de NAD. El crecimiento de pediococos en medios de cultivo que contengan cantidades adecuadas de glucose, pero faltando otros nutrientes, puede llevar a la conversión del piruvato en acetato/diacetilo.

II. 2. 1. 6. - Ecología

Los pediococos crecen bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas facultativas en todos los habitats que les proporcionen carbohidratos, productos del catabolismo proteico, nucleótidos y vitaminas. Las temperaturas mesófilas les son favorables, y solamente *P. acidilactici* crece a 50 °C.

Los pediococos son generalmente acidúricos o acidófilos, disminuyendo el pH de los sustratos en los que crecen hasta por debajo de 4.0, debido a la formación de ácido láctico,

previniendo así, o al menos retrasando considerablemente, el desarrollo de otros microorganismos competidores e incluso patógenos. Estas propiedades han convertido últimamente a los pediococos en elementos importantes para el control de la calidad microbiológica y tecnológica de la carne y de los productos cárnicos. En este sentido, *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* son utilizados, principalmente en Norteamérica, como cultivos iniciadores en la elaboración de los productos cárnicos fermentados (Garvie, 1986).

II. 2. 1. 7. - Taxonomía

Difícilmente se confunde a los pediococos con otras bacterias lácticas, pues morfológicamente son distintas. A veces se confunden con bacterias del género *Micrococcus* en función de la morfología y de que presentan a veces una débil reacción catalasa-positiva. Los micrococos son tolerantes a la sal y se confunden con *P. halophilus*. Sin embargo, los micrococos son frecuentemente pigmentados y no producen gran cantidad de ácido láctico (Garvie, 1986). Los pediococos ocurren juntos con lactobacilos y leuconostocs en las plantas, teniendo por ello mucho más afinidad fisiológica con estos dos géneros que por los estreptococos que son microorganismos específicos de ambientes animales.

II. 2. 1. 8. - Diferenciación entre las especies del género *Pediococcus*

Las características fisiológicas y bioquímicas de las diferentes especies del género *Pediococcus* se muestran en la Tabla II-2. Estas características pueden ser utilizadas para una separación inicial entre estas especies.

II. 2. 1. 8. 1. - *Pediococcus damnosus*

Este microorganismo crece lentamente exigiendo de 2-3 días y temperaturas de 22 °C

para un buen desarrollo. En caldo de cultivo, este crecimiento mejora con la adición de cisteína. En placas se desarrolla peor, a menos que se incube en condiciones anaeróbicas. Durante la fermentación de la cerveza, puede producir acetona o diacetilo rápidamente, causando un olor similar a la mantequilla.

II. 2. 1. 8. 2. - *Pediococcus parvulus*

La adición de Tween 80 y cisteína mejoran sensiblemente su crecimiento en caldos de cultivo; normalmente forma colonias muy pequeñas en agar con jugo de tomate. La distribución de este microorganismo no se conoce suficientemente.

II. 2. 1. 8. 3. - *Pediococcus inopinatus*

Existe una similitud taxonómica de este microorganismo con *P. parvulus* dado que se encuentran en el mismo habitat. Por hibridización del DNA/DNA se há determinado una certa correlación entre estas especies y también con *P. damnosus* (Back y Stackebrandt 1978). Por electroforesis del isómero del acetato producido L-(+) o D-(-) se puede mejorar la identificación entre estas especies. Este microorganismo se aísla fácilmente de vegetales y bebidas.

II. 2. 1. 8. 4. - *Pediococcus dextrinicus*

Se aísla de vegetales fermentados y cerveza. En caldo MRS el pH final del medio desciende por debajo de 4,4 y su crecimiento óptimo se sitúa en torno a 6,5. En agar las colonias se desarrollan en aerobiosis, aunque su crecimiento mejora en atmósferas de H₂ + CO₂.

Tabla II. 2. - Características fisiológicas y bioquímicas de las diferentes especies del género *Pediococcus*.

Características	Especie de <i>Pediococcus</i> (a)							
	Pd	Pp	Pi	Pde	Ppe	Pa	Ph	Pu
Crecimiento a:								
35 °C	-	+	+	+	+	+	+	+
40 °C	-	-	-	+	+	+	+	+
45 °C	-	-	-	-	d	+	-	-
50 °C	-	-	-	-	-	+	-	-
pH 4,2	+	+	-	-	+	+	-	-
pH 7,5	-	+	d	+	+	+	+	+
pH 8,5	-	-	-	-	d	d	+	+
4% NaCl	-	+	+	+	+	+	+	+
6,5% NaCl	-	+	d	-	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	d	-	+	-
18% NaCl	-	-	-	-	-	-	+	-
Catalasa	-	-	ND	-	+	+	-	-
Hidrólisis Arginina	-	-	-	-	+	+	-	-
Fermentación de:								
Arabinosa	-	-	-	-	+	d	+	d
Ribosa	-	-	-	-	+	+	+	ND
Xilosa	-	-	-	-	d	+	-	d
Rammosa	-	-	-	-	d	d	-	ND
Lactosa	-	-	+	d	d	d	-	d
Maltosa	d	+	+	+	+	-	+	+
Melezitosa	d	-	-	-	-	-	+	-
Trealosa	+	d	+	-	+	d	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	+	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	d
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Metilglucosido	d	d	d	+	-	-	+	ND
Lactato	DL	DL	DL	L(+)	DL	DL	D(-)	L(+)

a) Símbolos: Pd=*P. damnosus*, Pp=*P. parvulus*, Pi=*P. inopinatus*, Pde=*P. dextrinicus*, Ppe=*P. pentosaceus*, Pa=*P. acidilactici*, Ph=*P. halophilus*, Pu=*P. urinaeequi*, ND= No Detectable y d=débil.

II. 2. 1. 8 .5. - *Pediococcus pentosaceus*

La morfología y apariencia de las colonias se ajustan a la descripción general del género *Pediococcus*. No se necesita incubación anaeróbica y las colonias son visibles en el agar después de 24 h en incubación aeróbica a 30 °C. El requerimiento de ácido fólico varía de unas especies a otras. London y Chace (1976), en un estudio sobre aldolasas del género *Pediococcus* señalaron que *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* son especies taxonómicamente relacionadas.

El crecimiento en caldos de cultivo es más rápido y el pH final normalmente desciende por debajo de 4,0. El pH óptimo de crecimiento es de 6,0-6,5 y la temperatura 28-32 °C. Presenta baja resistencia al calor y las células se inactivan en 8 minutos a 65 °C. Un rápido crecimiento, así como un bajo pH final y la ausencia de citocromos distingue a *P. pentosaceus* de las especies del género *Micrococcus*.

II. 2. 1. 8. 6. - *Pediococcus acidilactici*

Sus propiedades morfológicas, fisiológicas no se separan mucho de las descritas para *P. pentosaceus*. Su temperatura óptima de crecimiento es de 40 °C y resisten a 70 °C durante 10 minutos, aunque algunas cepas son más tolerantes al calor, sobre todo recién aisladas (Garvie, 1986).

Back y Stackebrandt, (1978) y Dellagio y col., (1981), han demostrado por estudios de hibridación DNA/DNA que *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* constituyen especies distintas, mientras que los resultados de afinidad electroforética de las aldolasas, sugieren que son especies taxonómicamente relacionadas. No obstante, en cuanto a la caracterización de la cepa tipo, existe una polémica no solucionada totalmente. Así la cepa NCDO 1859 designada

anteriormente como *P. acidilactici* se vió, tras estudios de hibridación DNA/DNA, que en realidad es *P. pentosaceus* (Garvie, 1986). Por otro lado, los últimos trabajos con estas especies indican que es muy difícil separar claramente las dos especies.

II. 3.- LAS BACTERIAS LÁCTICAS DE LA CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS

La carne fresca se altera rápidamente debido al crecimiento de bacterias Gram-negativas, por lo que se han desarrollado muchos métodos para preservarla, incluidas las de curado y fermentación. Las bacterias lácticas pertenecen a la microflora normal de las carnes y de muchos productos cárnicos, siendo los lactobacilos su componente predominante, aunque acompañados de microorganismos estrechamente relacionados como pediococos, leuconostocos, enterococos y *Brochothrix thermosphacta*.

Las bacterias lácticas se desarrollan en condiciones que impiden el crecimiento de microorganismos aerobios Gram-negativos como las pseudomonas. No requieren oxígeno para crecer, son tolerantes al CO₂, nitritos, humo y concentraciones de sal relativamente altas y, además, toleran valores de pH bajos. Por ello, las condiciones existentes en las carnes desecado-saladas, en las envasadas a vacío y en los productos cárnicos curados, favorecen el crecimiento de estos microorganismos. Los lactobacilos son frecuentes en los embutidos curados o madurados. Las especies más frecuentemente aisladas son *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. farciminis*, *L. alimentarius* y los lactobacilos "atípicos" (Reuter, 1975); estos últimos se han identificado recientemente como *L. sake* y *L. curvatus* (Shillinger y Lücke, 1987b; Rodríguez y col. 1989).

En la moderna tecnología de los alimentos fermentados, las bacterias lácticas se utilizan como cultivos iniciadores. Esta utilización se reconoció inicialmente en los Estados Unidos (EE.UU.) cuando Jensen y Paddock en 1940 obtuvieron patentes para el uso de *Lactobacillus*

plantarum, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum* en estos alimentos.

Niven y col., (1955) aislaron *Pediococcus cerevisae* como un contaminante natural de varios productos cárnicos. Posteriormente utilizaron este microorganismo como cultivo iniciador, en la elaboración de un tipo de embutido estadounidense denominado "Summer sausage" , lo que contribuyó a mejorar la textura y el sabor de este productos. Como consecuencia de los resultados obtenidos, estos investigadores desarrollaron un cultivo iniciador comercial que contenía *Pediococcus cerevisae*, cuya utilización presentaba en los productos cárnicos fermentados las siguientes ventajas : 1) Disminuye el periodo de ahumado; 2) La calidad de la partida es más uniforme; 3) No se producen ablandamiento, ni gases ni coloración desfavorable durante la maduración y 4) Podría inhibir el desarrollo de bacterias productoras de toxiinfecciones alimentarias. Más tarde, Everson y col., (1970) clasificaron este microorganismo como *Pediococcus acidilactici* .

Sin embargo, en Europa se prefieren los embutidos crudos curados menos ácidos que se elaboran utilizando el nitrato como agente de curado y se maduran varias semanas e incluso hasta meses. Por ello en 1966, además de *Pediococcus acidilactici*, se introdujo como cultivo iniciador de embutidos fermentados *Lactobacillus plantarum* , tanto en Europa como en EE.UU. (Everson y col., 1974).

La elección de los pediococos en la tecnología de elaboración de embutidos crudos curados en Estados Unidos, se debió más a la excelente resistencia y supervivencia de este microorganismo a la liofilización y congelación, que a la acción que desarrolla en el proceso de fermentación de estos productos (Hammes y col., 1990).

II.4. - EFFECTO BENEFICIOSO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LOS ALIMENTOS

II. 4. 1. - Extensión de la vida útil

Un aspecto interesante de las bacterias lácticas, es su capacidad de prolongar la vida útil de determinados alimentos, al inhibir el desarrollo de los microorganismos causantes de alteraciones. Mather y Babel (1959) demostraron que la alteración del queso tipo Cottage por *Ps. fragi* y *Ps. putrefaciens*, se retrasaba considerablemente si durante su elaboración se le adicionaba un cultivo de *Str. citrovorus*. Elliker y col. (1964) observaron también en el queso Cottage que el aumento de su vida útil se debía a la inhibición de las bacterias alterantes por el desarrollo de las bacterias lácticas; la inhibición estaba directamente relacionada con la concentración de *Lact. lactis susp. diacetylactis* en el producto final. Gilliland y Speck (1975) confirmaron y ampliaron estas observaciones, demostrando que en un medio a base de leche desnatada *L. bulgaricus* inhibía rápidamente el desarrollo de *Ps. fragi* y de otras bacterias Gram-negativas psicrotófas.

Otros investigadores han estudiado también la inhibición y el retraso de la alteración de las carnes, especialmente de las frescas, por la acción de las bacterias lácticas. Reddy y col. (1970; 1975) han demostrado una prolongación de la vida útil de la carne picada de vacuno inoculada con *Lact. lactis* y *Leuc. citrovorum* y almacenada a 7 °C. Gilliland y Speck (1975) han descrito fenómenos de antagonismo frente a *Ps. fragi*, incluso cuando el inóculo de bacterias lácticas (*L. bulgaricus* y *P. cerevisiae*) no se desarrollaba activamente. Roth y Clark (1975) observaron que las bacterias lácticas inhibían el crecimiento de *Br. thermosphacta* en las carnes envasadas a vacío.

Raccach y col. (1979) demostraron que los cultivos iniciadores comerciales de *P.*

cerevisiae y *L. plantarum* incrementaban la vida útil de la carne de pollo. No obstante, Smith y col. (1980) han señalado que la inoculación con bacterias lácticas no mejoraba la vida de almacén de la carne de vacuno.

Las bacterias lácticas prolongan la vida útil de las carnes y productos cárnicos debido, principalmente, a la acidificación que originan. La acidez del medio inhibe el desarrollo de los microorganismos indeseables y permite una buena deshidratación del alimento, con lo que su vida útil no se ve limitada por el deterioro bacteriano, sino por otras alteraciones de naturaleza química o física (Bacus y Brown, 1981). Actualmente se admite que las bacterias lácticas tienen gran interés como agentes que prolongan la vida útil de los alimentos (Gibbs, 1987).

II. 4. 2. - Control de microorganismos patógenos y de sustancias tóxicas

II. 4. 2. 1. - Bacterias

Gilliland y Speck (1972), Park y Marth (1972) y Rubin y Vaughan (1979), utilizando cultivos mixtos de bacterias lácticas y salmonelas, observaron en la leche desnatada, que el efecto inhibitorio de las bacterias lácticas sobre las salmonelas dependía de la bacteria láctica empleada. Cuando en la elaboración del queso Camembert se utilizaban cultivos iniciadores lácticos comerciales (Park y Marth, 1973.; Frank y Marth, 1977; Frank y col.,1978) se inhibía significativamente el desarrollo de *Escherichia coli* enteropatógeno. Asimismo, Ahmed y col., (1986) han observado que el escaso desarrollo de *Y. enterocolitica* en el yogur se debe a su pH ácido y a otros fenómenos competitivos generados por el cultivo iniciador. Westhoff y Engler (1972) detectaron, en los requesones, una rápida inactivación, tanto de *S. typhimurium* como de *Staph. aureus*, y sugirieron que se debía al bajo pH (4,5-4,6) que las bacterias lácticas habían desarrollado en el sustrato.

Debido al peligro que la carne y los diversos productos cárnicos representan como fuentes de toxiinfecciones alimentarias, se han realizado un gran número de investigaciones para determinar el efecto de numerosos parámetros en el desarrollo de los microorganismos patógenos del hombre. Goepfert y Chung (1970) observaron que el número de salmonelas disminuía durante la maduración de los embutidos correctamente formulados y adicionados de cultivos iniciadores de *Pediococcus* sp. o *Lactobacillus* sp. Riemann y col. (1972), analizando los resultados de diversos investigadores, concluyeron que el desarrollo de *Staph. aureus* en los alimentos y su síntesis de enterotoxinas dependían de la interacción entre pH y concentración de sal. Daly y col. (1972) observaron que los cultivos iniciadores comerciales no inhibían completamente el desarrollo de *Staph. aureus*, pero sí lo reducían considerablemente, de tal manera que se eliminaba la síntesis de enterotoxinas. Resultados similares fueron obtenidos por Baran y Stevenson (1975) y Niskanen y Nurmi (1976) (Tabla II.3).

Las bacterias lácticas en presencia de concentraciones adecuadas de sacarosa o glucosa inhiben el desarrollo y la producción de toxinas de *Clostridium botulinum* (Christiansen y col., 1975; Tanaka y col., 1980) (Tabla II.4). Este efecto se manifiesta incluso en ausencia de nitritos, por lo que algunos investigadores han postulado que las concentraciones de nitritos empleados en ciertos productos cárnicos podrían disminuirse significativamente sin que disminuyese su seguridad, siempre que se añadieran determinadas bacterias lácticas y carbohidratos (Tanaka y col., 1980). También se ha demostrado la eficacia de las bacterias lácticas para el control del desarrollo de *Y. enterocolitica* en la carne y en diversos productos cárnicos (Racah y Henningsen, 1984).

En los últimos años la detección de varios brotes de listeriosis humana asociados al consumo de alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes* ha hecho que se multipliquen las investigaciones para controlar este microorganismo en los alimentos. A este

Tabla II.3. - Producción de enterotoxinas estafilocócicas en embutidos crudos curados.

Formulación	Después de 3 días			Después de 7 días		
	Log ECP ^a	pH	Enterotoxina	Log ECP ^a	pH	Enterotoxina
Sin cultivo iniciador	8,84	5,9	+	8,88	5,7	+
Con cultivo iniciador	6,78	5,6	-	7,53	5,3	-

ECP: estafilococos coagulasa-positivos

Fuente: adaptado de Niskanen y Nurmi, 1976

Tabla II. 4. - Producción de toxinas botulínicas en embutidos crudos curados.

Nitrito (ppm)	Formulación		Nº de muestras tóxicas de 25 totales
	Cultivo iniciador	Dextrosa	
0	-	+	8
0	+	-	22
0	+	+	2
50	+	+	0
150	-	-	14
150	+	+	0

Fuente: Christiansen y col., 1975.

respecto se ha observado que muchas bacterias lácticas, de las utilizadas como cultivos iniciadores, ejercen una importante actividad inhibidora del desarrollo de *List. monocytogens* en los alimentos. En la mayoría de los casos esta acción se debe, en parte, a las bacteriocinas elaboradas por las bacterias lácticas inhibidoras (Bhunja y col., 1988; Hoover y col., 1988; Pucci y col., 1988; Harris y col., 1989; Schillinger y Lücke, 1989; Rodriguez y col., 1989; Carminati y col., 1989).

II. 4. 2. 2. - Virus

Tanto la leche cruda, como la pasteurizada deficientemente, han transmitido virus a los consumidores (Cliver, 1976). Cliver (1973) comprobó que los virus de la poliomielitis, influenza humana y de la estomatitis vesicular bovina presentes en la leche de vaca, no se destruían durante la maduración del queso tipo Cheddar, ni siquiera con el empleo de cultivos iniciadores.

De otra parte, los avatares de los virus potencialmente presentes en las carnes empleadas en la obtención de productos cárnicos curados han recibido muy poca atención. Hermann y Cliver (1973) observaron que la concentración de coxackievirus disminuía mucho durante la maduración de los embutidos de tipo Thuringer en los que una cepa de *Lactobacillus* bajó el pH de 6,2 a 4,8. Kantor y Potter (1975) observaron que los virus de la polio perdían su infectividad durante la maduración del salami elaborado con cultivos iniciadores de *L. plantarum* y *P. cerevisiae*. En embutidos crudos curados con un cultivo iniciador de *Pediococcus* sp. Mckercher y col., (1978) observaron que el virus de la peste porcina africana perdía su infectividad al final de su maduración.

De los trabajos citados se deduce que durante la elaboración de los productos cárnicos curados se destruye la infectividad de varios virus; sin embargo, las pocas investigaciones

realizadas hasta el momento no permiten generalizar.

II. 4. 2. 3. - Hongos y micotoxinas

Coallier-Ascah y Idziak (1985) observaron que al inocular esporas de *Aspergillus flavus* en un cultivo de *Lact. lactis*, la acumulación de aflatoxinas B₁ y G₁ era mínima o no se detectaba. Los niveles de aflatoxinas también se reducían significativamente cuando se inoculaba *Lact. lactis* en un cultivo de *A. flavus*; El-Gendy y Math (1980) y Wiseman y Marth (1980) habían obtenido previamente resultados similares. Sin embargo, Coallier-Ascah e Idziak (1985) observaron que la cepa de *Lact. lactis* utilizada poseía también la capacidad de degradar las aflatoxinas ya preformadas. Utilizando el ensayo de Ames, estos autores demostraron que los sobrenadantes de los cultivos mixtos de *Lact. lactis* y *A. flavus* carecían de actividad mutagénica residual y, por lo tanto, de actividad carcinogénica potencial.

Karunaratne y col. (1980) han observado que cuando se cultivan en medios líquidos, tres especies de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*) se inhibe el desarrollo de *A. flavus* subsp. *parasiticus* lo que disminuye la cantidad de aflatoxinas B₁ y G₁ producidas. Este efecto se ha relacionado con la disminución del pH y con fenómenos de competición microbiana todavía no bien conocidos.

II. 4. 2. 4. - Trichinella spiralis

En los embutidos crudos curados, Bacus y Brown (1981) han sugerido que los cultivos indicadores contribuyen indirectamente a la inactivación de las larvas de *T. spiralis*, debido a una fermentación inicial controlada, rápida y consistente. Este parásito se afecta por el descenso del pH (Castro y col., 1973), por lo que es posible que las bacterias lácticas y

principalmente los pediococos, en presencia de carbohidratos fermentables, contribuyan considerablemente a la inactivación del verme.

Childers y col. (1982) han estudiado la inactivación de *T. spiralis* en salami elaborado con un cultivo iniciador de *P. cerevisiae* concluyendo que el factor más importante para la inactivación del parásito es la concentración de ClNa; lamentablemente, estos autores no estudiaron el efecto de la bacteria láctica en el proceso de inactivación.

II. 4. 2. 5. - Nitrosaminas

Los nitratos y nitritos se adicionan a los productos cárnicos para inhibir el desarrollo de *Cl. botulinum* y para estabilizar el color de las carnes curadas. Sin embargo, el nitrito residual reacciona con las aminas secundarias formando nitrosaminas, sustancias altamente carcinogénicas (Sen y col., 1974).

Varias bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores, entre ellas *L. plantarum*, reducen los nitratos a nitritos, tanto en medios de cultivo líquidos como en la carne (Smith y Palumbo, 1978). La capacidad de estos microorganismos de reducir los nitratos a nitritos podría favorecer la formación de nitrosaminas. Tal formación debería ocurrir sobretodo en embutidos formulados con niveles altos de nitratos. Sin embargo, un estudio relativamente reciente con un gran número de productos cárnicos fermentados curados ha puesto de manifiesto que no había niveles detectables de nitrosaminas volátiles (Anónimo, 1980). Otros estudios realizados con productos cárnicos formulados con nitratos o nitritos y con bacterias lácticas de origen natural o de cultivos iniciadores, han demostrado bajos niveles de nitrosaminas en dichos alimentos (Palumbo y col., 1974; Dethmers y col., 1975).

El nivel que alcanza la N-nitrosopirrolidina en el bacon está directamente relacionado

con la concentración de nitritos (Gray y Randall, 1979). Sin embargo, la concentración residual de nitritos en dicho producto disminuye cuando se emplean cultivos iniciadores lácticos (Bacus, 1979) (Tabla II.4). Durante la elaboración del bacon, las bacterias lácticas crecen y utilizan los carbohidratos existentes, reduciendo el pH de la carne; de otra parte, el bacon acidulado por la presencia de *L. plantarum* y un 0,5 % de sacarosa o glucosa impediría el desarrollo de *Cl. botulinum* en el caso de que se produjera un abuso en la temperatura de almacenamiento incluso cuando el contenido de nitrito del bacon es escaso o inexistente (Tanaka y col., 1980). En Estados Unidos el USDA (Depto. de Agricultura) autoriza el empleo de cultivos iniciadores de bacterias lácticas en el bacon para inhibir o disminuir la formación de nitrosaminas. Tras un año de producción comercial de bacon, Brown (1980) ha señalado que dicha medida es muy eficaz.

II. 4. 2. 6. - Aminas biógenas

La producción de aminas biógenas en los alimentos se debe a la actividad metabólica de los microorganismos y específicamente a la acción de las descarboxilasas microbianas que transforman los aminoácidos en aminas potencialmente tóxicas (Smith y Palumbo, 1983). Las aminas biógenas o vasoactivas pueden originar graves crisis hipertensivas en pacientes tratados con inhibidores de la monoamino-oxidasa (MAO). Los síntomas incluyen hipertensión, cefalea, fiebre, sudoración, vómitos y, en algunos casos, incluso muerte (Blackwell y col., 1967).

Rice y Koehler (1976) demostraron que la actividad tirosina descarboxilasa e histidina descarboxilasa de *P. cerevisiae* y *L. plantarum*, integrantes corrientes de muchos cultivos iniciadores, era muy baja. La actividad descarboxilasa es mucho mayor cuando los embutidos crudos curados se someten a fermentación natural que cuando se debe a los cultivos iniciadores lácticos (Taylor, 1978; Eitenmiller y col., 1978). El empleo en los productos

cárnicos fermentados de *P. cerevisiae* y de ciertas especies del género *Lactobacillus* disminuye o inhibe el desarrollo de otros microorganismos presentes naturalmente en la mezcla cárnica dotados de actividad proteolítica o aminoácido descarboxilasa. La inhibición de esta microflora indeseable impide la formación de niveles peligrosos de aminas biógenas (Eitenmiller y col., 1978).

II. 5. - SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR LAS BACTERIAS LÁCTICAS

II. 5. 1. - Acidos orgánicos

La supervivencia y el desarrollo de los microorganismos en los alimentos están gobernados por muchos parámetros, uno de los cuales es el pH. Una manera eficaz de limitar el desarrollo de muchos microorganismos es aumentando la acidez del alimento, con lo que se crea un ambiente desfavorable para su crecimiento. Ello puede conseguirse mediante la adición de un acidulante o facilitando el desarrollo de fermentaciones microbianas naturales o controladas. El efecto de los ácidos orgánicos en los microorganismos depende de la especie microbiana y del tipo y concentración de ácido, del tiempo de exposición, de la capacidad neutralizante o tampón del alimento y de las condiciones preexistentes, que hacen a las bacterias más o menos sensibles o resistentes a la acidez.

Las bacterias lácticas no sólo toleran los ácidos débiles lipofílicos, sino que, de hecho, las producen durante su metabolismo (sección II.2.5.). El ácido láctico es el que producen en mayor cantidad las bacterias lácticas; su efecto inhibitor del desarrollo de otros microorganismos se ha estudiado en fermentaciones controladas en las que se acelera la producción de tal ácido, con lo que se retrasa o inhibe el crecimiento de los microorganismos patógenos y alterantes como, *Staph. aureus* (Genigeorgis y col., 1971; Barber y Deibel, 1972; Daly y col., 1973; Metaxopoulos y col., 1981), *Salmonella* sp. (Goepfert y Chung, 1970;

Park y Marth, 1972; Masters, y Col., 1981), *Cl. botulinum* (Christiansen y col., 1975; Tanaka y col., 1980), *Br. thermosphacta* (Grau, 1980) y *Y. enterocolitica* (Ahmed y col., 1986).

Otros ácidos orgánicos producidos por las bacterias lácticas y que también son antagonistas del desarrollo de diversos microorganismos alterantes o patógenos son el ácido cítrico (Subramanian y Marth, 1968), el acético (Daly y col., 1972) y algunos ácidos grasos volátiles (Goepfert y Hicks, 1969).

II. 4. 2. - Peróxido de hidrógeno.

En la Figura 2.1 se muestran las reacciones metabólicas que conducen a la producción de peróxido de hidrógeno por las bacterias lácticas. La acumulación de peróxido de hidrógeno en los medios de cultivo se debe a que las bacterias lácticas, en general, no poseen catalasa (Kandler y Weiss, 1986). La actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno está bien documentada. El efecto antagónico de este compuesto se observa en muchos microorganismos, entre los que se encuentran *Staph. aureus* (Dahiya y Speck, 1968) y *Pseudomonas* sp. (Price y Lee, 1970).

El peróxido de hidrógeno puede reaccionar con otros componentes para formar sustancias inhibitoras. En la leche cruda el peróxido de hidrógeno generado por las bacterias lácticas reacciona con el tiocianato endógeno en una reacción catalizada por la lactoperoxidasa, lo que genera productos intermediarios de la oxidación que inhiben el desarrollo de muchos microorganismos. Este mecanismo de inhibición se conoce como "sistema antibacteriano lactoperoxidasa" (Reiter y Härnultv, 1984; Banks y col., 1986).

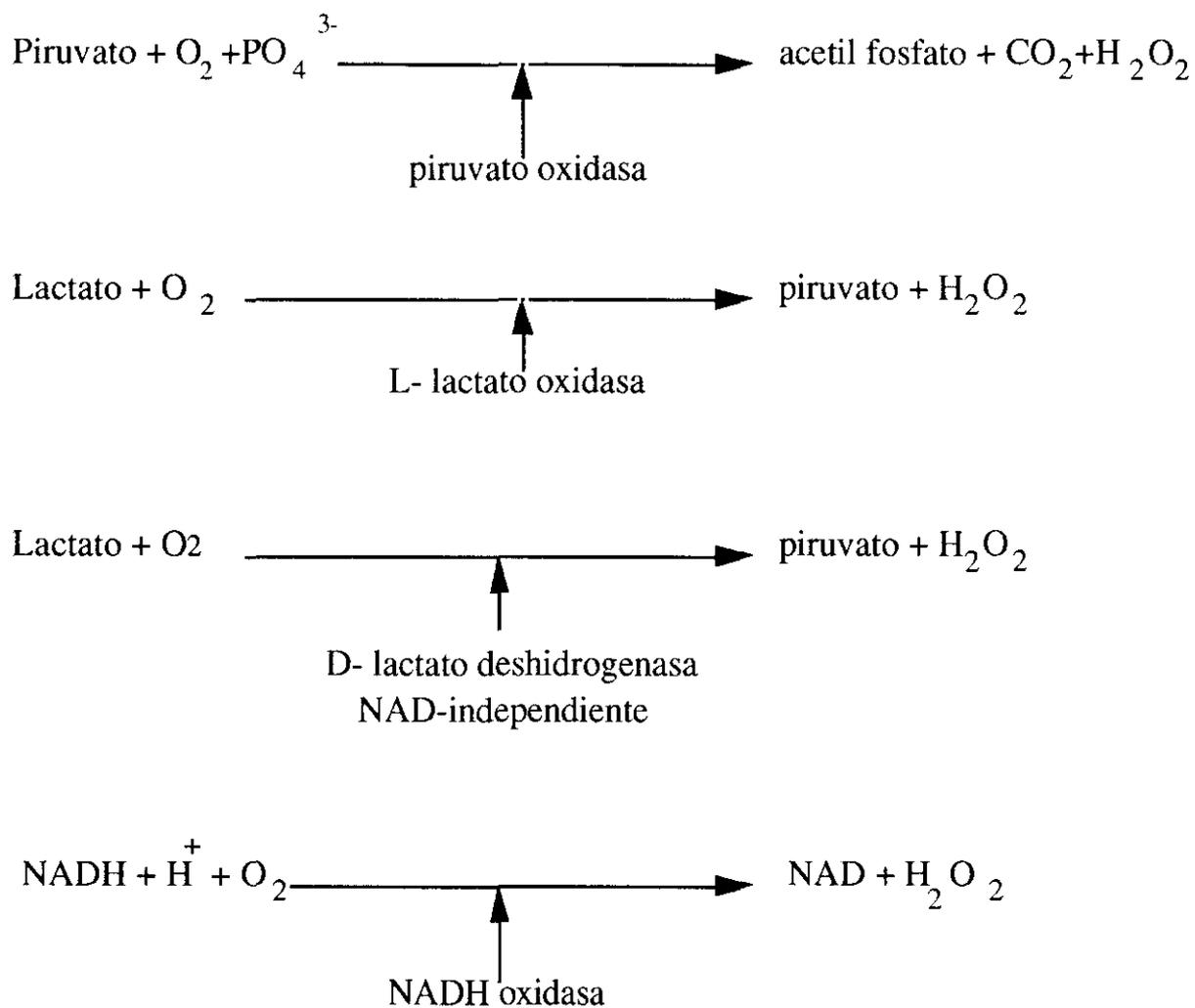


Figura 2. 1. - Producción de peróxido de hidrógeno por las bacterias lácticas.

Fuente: Kandler, 1983.

II. 5. 3. - Diacetilo

El diacetilo (2,3 - butanodiona) que procede del piruvato es otro de los productos finales del metabolismo de las bacterias lácticas (Kandler, 1983). Muchas especies de bacterias lácticas poseen la capacidad de sintetizar este compuesto. El diacetilo es bien conocido por el aroma que imparte a los productos lácteos sobretudo a la mantequilla y porque es un antagonista del desarrollo microbiano.

Jay (1982) demostró que el diacetilo inhibía a las levaduras y a las bacterias Gram-negativas a una concentración de 200 µg/ml, y a las bacterias Gram-positivas a una concentración de 300 µg/ml. Las bacterias lácticas no se inhiben a concentraciones menores de 350 µg/ml.

El diacetilo es bacteriostático frente a las bacterias Gram-positivas y bactericida frente a las Gram-negativas, sin embargo la pequeña cantidad de este compuesto, producido por las bacterias lácticas, y su potencial mutagénico (Jay, 1982; Piard y Desmazeaud, 1991), dificultan su utilización en la industria alimentaria. La acción antagonista del acetaldehído originado fundamentalmente por *Lactobacillus bulgaricus* está poco estudiada (Kulshrestha y Marth, 1975). La producción de algunos isómeros D de los aminoácidos por las bacterias lácticas es discutible dado que carecen de actividad racemasa (Piard y Desmazeaud, 1991).

II. 5. 4. - Compuestos antimicrobianos no proteícos

Algunos estudios han destacado la importancia para el control de los microorganismos alterantes de los alimentos de ciertas moléculas pequeñas, no proteicas, producidas por las bacterias lácticas. Así por ejemplo, Pulusani y col. (1979), señalan que *Str. thermophilus* produce un compuesto, de unos 700 daltons, que es un antagonista de las bacterias

Gram-positivas y Gram-negativas, mientras que Abdel-Bar y col. (1987), han descrito un compuesto similar en *Lactobacillus bulgaricus*.

De las sustancias hasta ahora descritas destaca la reuterina, producida por *Lactobacillus reuteri* que ha sido aislado del tracto gastrointestinal de personas y animales. Su actividad antimicrobiana es extraordinariamente amplia afectando a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, levaduras, mohos y protozoos. La reuterina se forma durante la utilización anaerobia del glicerol por *Lactobacillus reuteri* e inhibe la actividad del enzima ribonucleotido reductasa (Talarico y col., 1988) que está involucrado en la síntesis del DNA, lo que determina su amplio espectro antimicrobiano. Sin embargo todavía no se ha estudiado su potencial tóxico, pero dada su naturaleza existen dudas razonables acerca de su posible utilidad en la industria alimentaria (Talarico y Dobrogosz, 1989).

II. 5. 4. - Compuestos antimicrobianos proteicos

De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente, ya que debido a su naturaleza proteica (Tagg y col., 1976), las inactivan los enzimas proteolíticos del tracto gastrointestinal y no son tóxicas ni inmunógenas en animales de experimentación (Bhunia y col., 1990), lo que las convierte en candidatos adecuados como conservadores de los alimentos. Debido a la preocupación constante que en la sociedad actual plantean los conservadores químicos, las bacterias productoras de bacteriocinas o las propias bacteriocinas producidas podrían desempeñar un papel importante en el procesado y conservación de los alimentos. Tampoco conviene olvidar el buen efecto nutricional derivado de la ingestión de bacterias lácticas viables; se ha hipotetizado y, algunas veces, demostrado que las bacterias lácticas incrementan la calidad nutritiva de los alimentos, controlan las infecciones intestinales, facilitan la digestión de la lactosa, son antimutagénicas, inhiben el desarrollo de algunos tipos de cáncer y reducen el

colesterol sanguíneo (Gilliland, 1990; Hosoda y col., 1992).

II. 6. - BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas se definen como sustancias proteicas antimicrobianas producidas por un gran número de especies bacterianas (Tagg y col. 1976). Estas sustancias constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que varían mucho en su espectro antimicrobiano, propiedades bioquímicas, mecanismo de acción y características genéticas (Piard y Desmazeaud, 1992; Tagg y col. 1976). La actividad antimicrobiana y su estructura proteica, probablemente sean las únicas características comunes a todas ellas (Stiles y Hastings, 1991). El término "bacteriocinogenicidad" se emplea para describir la capacidad de las bacterias de sintetizar y eliminar al exterior proteínas antagonistas del desarrollo de otros microorganismos (Daeschel y col., 1990).

Estas sustancias se detectaron por primera vez en *E. coli* (Hardy, 1975) y más tarde en algunas bacterias Gram-positivas (Tagg y col., 1976). La producción de bacteriocinas de un espectro antibacteriano relativamente amplio, es propia de las bacterias lácticas de origen alimentario incluidas las de la carne y los derivados cárnicos (Lewus y col., 1991). Ciertas investigaciones indican que la producción de bacteriocinas constituye un fenotipo bastante extendido en las bacterias lácticas (Nielsen y Zeuthen, 1985; Piard y Desmazeaud, 1992).

II. 6. 1. - Biosíntesis y producción óptima de bacteriocinas

La biosíntesis de bacteriocinas ocurre o en la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma y, en la mayoría de los casos guarda relación con la biomasa producida (Piard y Desmazeaud, 1992), si bien la producción máxima en los medios de cultivo puede ocurrir en diferentes fases del ciclo de crecimiento (Tagg y Col., 1976).

Algunos investigadores han señalado que ciertos componentes específicos del medio de cultivo interfieren sensiblemente en la producción de alguna bacteriocina individual. Así, varios trabajos indican la necesidad de algunos nutrientes, como extracto de levadura, aminoácidos, manganeso y manitol para aumentar, disminuir o suprimir la producción de diversas bacteriocinas (Rogers, 1972; Clarke y col., 1975; Hale y Hinsdill, 1973 y Tagg y col., 1975).

Las variaciones de las condiciones de cultivo, como por ejemplo temperatura y tiempo, ejercen un profundo efecto en la producción de bacteriocinas activas. Generalmente, se producen más bacteriocina cuando la cepa productora se cultiva a su temperatura óptima de crecimiento (Tagg y Col., 1976). El desarrollo de la cepa productora a temperaturas elevadas puede suprimir completamente la producción de bacteriocina (Dajoni, 1974. Tagg y col., 1975) y, algunas veces eliminar irreversiblemente esta propiedad (Dajoni, 1974; Jetten y Vogels, 1973). Schlegel y Slade, (1973) demostraron que la producción de estreptocina era máxima en la fase logarítmica descendiendo algo cuando el cultivo entraba en la fase estacionaria. Por otro lado, Tagg y Col., (1976) observó que la producción de estreptococcina A se iniciaba al final de la fase logarítmica del desarrollo de la cepa productora y que dicha actividad disminuía lentamente tras un período de incubación prolongado. Similarmente, la producción de estafilococcina C55 comienza en la fase exponencial de desarrollo alcanzando la producción máxima entre las 24 y 48 h de crecimiento para, después, declinar gradualmente (Dajoni y Wannamaker, 1969). Otras investigaciones también han descrito pérdidas sustanciales en la actividad de las bacteriocinas de cultivos incubados durante mucho tiempo. Este efecto puede deberse a la existencia de inactivadores específicos de las bacteriocinas, digestión enzimática o a la reabsorción de la bacteriocina por la cepa productora (Tagg y Col., 1976).

II. 6. 2. - Tolerancia de las bacteriocinas al calor, acidez y enzimas

De acuerdo con su definición, las bacteriocinas se inactivan, al menos por un enzima proteolítico, entre los que conviene citar los de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y gástrico (pepsina). Algunas bacteriocinas son sensibles a otros enzimas como lipasas, amilasas y fosfolipasas, lo que indica la heterogeneidad de las bacteriocinas y la influencia de los compuestos no proteicos en su estructura y actividad (Jimenez y col., 1990; Lewus y col., 1992; Upreti y Hindill, 1973).

Generalmente las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son termorresistentes, lo que les permite mantener su actividad antimicrobiana a temperaturas similares a las de pasterización y esterilización de la leche (Piard y col., 1992). Esto sugiere que su actividad recae en estructuras pequeñas y poco complejas, probablemente sin estructura terciaria. Sin embargo, la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1990), y las bacteriocinas de *L. casei* (Rammelsberg y Radler, 1990) y *Lb. delbrueki* subsp. *lactis* (Toba y col., 1991) son muy sensibles al calentamiento, lo indica que poseen una estructura proteica más compleja.

Las bacteriocinas son generalmente estables a pH ácido o neutro, aunque existen excepciones interesantes. Así por ejemplo, la solubilidad y estabilidad de la nisina decrece desde un pH óptimo de 2 a un pH de 6, lo que constituye un inconveniente tecnológico importante para su utilización como aditivo en los alimentos no ácidos, como carne y pescados enlatados y derivados lácteos.

II. 6. 3. - Propiedades de las bacteriocinas

Con el objeto de poseer una buena información sobre la composición y estructura de las bacteriocinas, conviene determinar y conocer el mayor número posible de sus propiedades

fisico-químicas. Por desgracia las técnicas de determinación de estas propiedades todavía no están estandarizadas, lo que imposibilita la comparación pura y simple de las diversas bacteriocinas aisladas. Por ello, para que su identificación sea eficaz, la caracterización bioquímica de las bacteriocinas debe incluir su purificación a homogeneidad, y su composición y secuencia aminoacídica. No obstante, existen diferencias que son fácilmente detectables entre las bacteriocinas producidas por una misma especie bacteriana y a veces, por la misma cepa.

II. 6. 3. 1. - Características bioquímicas y físicas

La sensibilidad a enzimas específicos (proteinasas, lipasas, etc.) se utiliza frecuentemente en la identificación de los componentes químicos de las bacteriocinas. Así, por ejemplo, del estudio de la sensibilidad de la estreptocina STH a diversos enzimas, se dedujo que poseía una molécula compleja que contenía en su estructura además de proteína, grupos lipídicos y fosfatos (Schlegel y Slade, 1972). Estos resultados sugieren que algunas bacteriocinas son proteínas simples, o moléculas más complejas que llevan en su estructura proteica componentes lipídicos y glucídicos.

Aunque se conocen poco las características de las bacteriocinas aisladas, Klaenhammer, (1988) sugiere que se clasifiquen en tres grupos: (a) proteínas de bajo peso molecular, resistente al calor e hidrofóbicas, (b) proteínas de alto peso molecular y sensible al calor y (c) lantibióticos muy modificados, como la nisina. Sin embargo, los últimos resultados disponibles, sugieren su clasificación en solo dos grupos: 1) bacteriocinas con aminoácidos no modificados y 2) bacteriocinas con aminoácidos modificados.

En la Tabla II.5 se muestran las características más significativas de algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas.

Tabla II.5.- Principales características de algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas.

Bacteriocina	Inactivación enzimática	Termorresistencia ^a Tolerancia a la acidez	Referencia
Pediocina PA-1	a-quimiotripsina, pepsina, papaina	+ (10 min, 100 °C) - (15 min, 121 °C)	Pucci y col. (1988)
Pediocina AcH	Tripsina	+ (1 h, 100 °C, pH 7) Inestable a pH 11	Ray y col. (1989a)
Pediocina A	Pronasa	+ (1 h, 100 °C)	Daeschel yKlaenhammer(1985)
Brevicina 37	Tripsina, pronasa	+ (1h,121 °C, pH 2 a 4) Estable 24 h pH 1 a 11	Rammelsberg y Radler (1990)
Lactocina S	Tripsina, proteasa XIV	50%inactivadadespués de 1 h a 100 °C	Mørtvedt y Nes (1990)
Sakacina A	Tripsina, pepsina	+ (20 min, 100 °C)	Schillinger y Lücke (1989)
Plantaricina S	a-quimiotripsina ficina, pronasa, proteasa K, tripsina termolisina, dextrasa, a-amilasa, fosfolipasa	+ (1 h, 100 °C)	Jiménez-Díaz y col. (1990)
Nisina	a-quimiotripsina, nisinas	+ (115 °C, pH 2) - (pH neutro)	Hurst (1981)
Helveticina J	Tripsina, pronasa ficina, proteasa K, subtilisina, pepsina, tripsina	- (30 min, 100 °C)	Joerger y Klaenhammer (1986)
Lactacina F	Tripsina, ficina proteasa K	+ (15 min, 121 °C)	Muriana y Klaenhammer (1987)
Plantaricina A	Tripsina, pepsina	+ (30 min, 100 °C)	Daeschel y col. (1990)

^a +: Estable, -: Inestable

II. 6. 3. 2. - Antigenicidad

Dada su estructura proteica es muy posible que algunas bacteriocinas funcionen como antígenos (Tagg y Col., 1976). Se ha visto que las bacteriocinas producidas por algunas bacterias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* (Gagliano y Hinsdill, 1970) y *Clostridium perfringens* tipo A (Tubylewicz, 1970), y Gram-negativas como *Escherichia coli* (Tzannetis y col., 1972) son antigénicas en los animales de experimentación.

II. 6. 3. 3. - Estabilidad de las bacteriocinas

La estabilidad de las bacteriocinas disminuye a medida que aumenta su purificación (Ellison y Kautter, 1970; Mahony, 1974; Tagg y col., 1975). La adición de sero-albumina bovina protege de la pérdida excesiva de actividad experimentada por algunas bacteriocinas durante su purificación. La mayoría de las bacteriocinas son mucho más tolerantes a los pHs muy ácidos que a los alcalinos (Barrow, 1963; Ellison y Kauter, 1970). Los criterios de termoestabilidad de las bacteriocinas son difíciles de definir, pues dependen de su purificación y de factores tales como pH, fuerza iónica y presencia de moléculas protectoras.

II. 6. 4. - Espectro antimicrobiano de las bacteriocinas

El espectro antimicrobiano de las bacteriocinas parece estar asociado a presencia de receptores apropiados en los microorganismos receptores (Tagg y col., 1976). Sin embargo, la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-negativas actúan fundamentalmente sobre especies microbianas relacionadas taxonómicamente con ellas, mientras que las bacteriocinas de las Gram-positivas son antagonistas de una mayor diversidad de especies Gram-positivas (Tagg y Col., 1976). Además, las bacterias Gram-positivas como *Lactobacillus acidophilus* (Vicent y col., 1959), *Bacillus cereus*

(Johnson y col., 1949), *Streptococcus* sp. (Dajoni y col., 1976), *Staphylococcus* sp. (Hsun y Wiseman, 1967) y *Corynebacterium* sp. (Meitert, 1969), producen bacteriocinas que inhiben el desarrollo de bacterias Gram-negativas. Asimismo, aunque las bacterias Gram-negativas son resistentes a la nisina, se sensibilizan a la misma al permeabilizarse de su membrana externa bajo la acción de compuestos quelantes, shock osmótico o por la formación de vesículas en las membranas citoplásmicas. Klaenhammer, (1988) ha clasificado las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas en dos clases, según su espectro antimicrobiano: a) bacteriocinas activas frente a bacterias taxonómicamente relacionadas y b) bacteriocinas con un amplio rango de actividad frente a bacterias Gram-positivas.

II. 6. 5. - Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Tagg y col, (1976) señalan que la acción de las bacteriocinas sobre las células sensibles ocurre en dos etapas. En la primera fase, la bacteriocina se adsorbe en receptores específicos y no específicos de la célula hospedadora. En este estadio, las bacteriocinas son sensibles a las proteasas. En una segunda fase, ésta ya irreversible, la bacteriocina origina alteraciones celulares en las células sensibles de acuerdo con cada tipo de bacteriocina. No obstante, no está suficientemente claro que este modo de acción, descrito de una manera general para las bacterias Gram-positivas, sea aplicable a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas (Piard y Desmazeud, 1992).

Algunos investigadores han demostrado que las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, no son adsorbidas específicamente por las bacterias Gram-positivas sensibles o resistentes a la bacteriocina estudiada (Upreti y Hinsdill, 1975; Davey y Richardson, 1981; Zajdel y col., 1985; Bhunia y col., 1991). Asimismo, Piard y Desmazeud (1992) sugieren que la actividad de las bacteriocinas no depende de su adsorción específica en la superficie de las células sensibles y que la adsorción inespecífica deriva de su naturaleza

hidrofóbica, mientras que la inmunidad de las cepas resistentes a la bacteriocina se debe, más a la producción de un enzima implicado en la inmunidad que a la alteración de los receptores.

Con excepción de la lactocina 27, que es bacteriostática (Upreti y Hinsdill, 1975), la actividad de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas posee un efecto bactericida (Andersson y col., 1988; Pucci y col., 1988; Piard y col., 1990). La acción lítica es rápida, disminuyendo las células viables de un cultivo tras algunos minutos de tratamiento con la bacteriocina (Barefoot y Klaenhammer, 1983; Zajdel y col., 1985; Piard y col., 1990); su efecto letal es mayor en la fase logarítmica que en la estacionaria.

De las dos bacteriocinas mejor conocidas, la nisina se sabe que actúa como despolarizante de las membranas bacterianas energizadas produciendo poros en la membrana lipídica (Sahl y col., 1987). La lactocina A, actúa como la nisina, al aumentar la permeabilidad de la membrana citoplasmática y disipar el potencial de membrana de las células sensibles (Van Belken y col., 1991). Con el microscopio electrónico no se observa lisis celular de las células sensibles, lo que indica que la permeabilización de la membrana ocurre por la formación de poros.

II. 6. 6. - Purificación de las bacteriocinas

En la Tabla II.6 se muestran la purificación, la composición aminoacídica y otras propiedades de varias bacteriocinas. La mayoría de los investigadores primero someten a pré-purificación los sobrenadantes tras su precipitación con sales o solventes. La Lactocina 481 y Lactocina B aumentaron 450 veces su actividad biológica tras el tratamiento de sus sobrenadantes libres de células con altas concentraciones de sulfato amónico (Piard y col., 1991; Muriana y Klaenhammer 1986; Piard y Desmazeaud, 1992). Estos investigadores creen que la sales actuarían tanto disociando la bacteriocina nativa en monómeros más activos, como

cambiando su conformación. Las bacteriocinas, en forma nativa, producidas por diversos lactobacilos, tiende a formar agregados proteicos de un peso molecular de 100.000 a 300.000 Daltons. Estos agregados se disocian por ultrafiltración (Muriana y Klaenhammer, 1991) o por tratamientos con SDS (Upreti y Hinsdill, 1973; Joerger y Klaenhammer, 1986; Muriana y Klaenhammer, 1991), con urea (Barefoot y Klaenhammer, 1984) o con diversos detergentes (Muriana y Klaenhammer, 1991).

La purificación del precipitado activo de los sobrenadantes por cromatografía de intercambio iónico, ha permitido una buena recuperación de la nisina (Bailey y Hurst, 1971), diplococina (Davey y Richardson, 1981) y lactocina A (Holo y col. 1991). Sin embargo, este método no sirve para la purificación de la lactocina B (Barefoot y Klaenhammer, 1984) ni de la lactocina 481 (Piard y col. 1992). La purificación de la caseicina-80 por cromatografía de intercambio iónico, no dió resultados satisfactorios, ya que afectaba sensiblemente a la recuperación de la actividad biológica de dicha bacteriocina (Rammelsberg y col., 1990).

La cromatografía de interacción hidrofóbica se ha utilizado con éxito en la purificación de la nisina, lactocina A y lactocina S. No obstante, esta técnica no sirve para la purificación de las bacteriocinas de gran hidrofobicidad, como la lactocina 481 y la plantaricina S, que en ausencia de sal reaccionan espontáneamente con la matriz del gel (Piard y col., 1992; Jimenez-Diaz y Piard, comunicación personal). Otros investigadores han utilizado en la purificación de bacteriocinas la cromatografía de fase reversa, que es una técnica más adaptada a las moléculas hidrofóbicas. Este método dió un buen resultado en la purificación final de la nisina, lactocina F, lactocina 481 y lactocina S (Tabla II.6).

Aunque es difícil generalizar y establecer un método único de purificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, los mejores resultados se obtiene con el basado en: 1) concentración de los sobrenadantes libres de células con sulfato amónico, 2) cromatografía de

Tabla II. 6.- Purificación y estructura químico-física de algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas

Bacteriocina	Purificación ^a	Composición química	Consideraciones	Referencias
Nisina	Precipitación con solv. orgánicos, CIA + CGpH, CIH + HPLC -FR	Péptido de 34 aminoácidos conteniendo aas. α,β -insaturados, Lantionina (Lan) y β -metil lantionina	5 tipos (A, B, C, D, E), difieren ligeramente en su composición aminoacídica	Baley y Hurst (1971) Gross y Morel (1971) Mulders y col. (1991)
Diplococina	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + CIC	51 aas.(5.300 Da), sin Lan. o aas. α,β -insaturados. Alto contenido en glicina	Recuperación del 45% de la actividad	Davey y Richardson (1981)
Pediocina AcH	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +GF + CIC Bhunia y col. (1988)	Péptido de 2.700 Da		
44 Pediocina PA-1	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +CIC + CIH + C ₁₈ -FPLC-FR	Péptido 43-44 aas.(4.600 Da).	Actividad específica aumenta 80.000 tras su purificación	Nieto y col. (1992)
Lactocina S	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +CIA + CIH + GF + CIH-FPLC + C ₁₈ -HPLC-FR	Péptido de 33 aas: MELLPTAAVL YXDVAGXFKYXAKHH + 8 aas.	aas. X no identificados	Mørtvedt y col. (1991)
Helveticina J	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +GF +SDS-PAGE	Proteína de 37.000 Da	Agregados de 300.000 Da, solubilización con SDS	Joerger y Klaenhammer (1989)
Lactococina A	Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +CIC + CIH	54 aas. (5.778 Da), alto contenido en glicina y alanina	Aas. C- y N- terminal hidrofóbicos	Holo y col. (1991)

^a Abreviaturas: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = Sulfato Amónico, CIA= Cromatografía de Intercambio Aniónico, CIC= Cromatografía de Intercambio Catiónico, CIH= Cromatografía de Interacción hidrofóbica, GF= Filtración en Gel, HPLC-FR= Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa, FPLC= Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas, CG=Cromatografía en fase gaseosa, aas = Aminoácidos

intercambio iónico, 3) cromatografía de interacción hidrofóbica y 4) cromatografía en fase reversa.

II. 6. 7.- Composición aminoacídica y secuencias de las bacteriocinas de las bacterias lácticas

Los análisis de la composición y secuencias aminoacídicas de las bacteriocinas de las bacterias lácticas indican que existen 3 grupos de moléculas: a) lantibióticos, que son polipéptidos de bajo peso molecular con aminoácidos poco usuales como deshidroalanina (Dha), deshidrobutirina (Dhb), lantionina (Dha + cisteína) y β -metil-lantionina (Dhb + cisteína) y en este grupo se encuentran la nisina, lacticina 481 y sakacina M; grupo b) constituido por péptidos de bajo peso molecular sin aminoácidos modificados, incluyendo lactocina A, lactocina F y diplococcina; y grupo c) formado por proteínas de peso molecular más alto (10.000 - 100.000 Da) como la caseicina 80 (Piard y Desmazeaud, 1992).

La nisina que fue el primer lantibiótico estudiado presenta 5 tipos diferentes (A, B, C, D y E), que pueden ser producidos por la misma cepa de *Lact. lactis* (Tabla II.6). Las diferencias entre ellas proceden de su composición de aminoácidos, así como de los niveles específicos de actividad biológica. Sin embargo, no está claro que las nisinas B, C, D y E sean variantes procedentes de la nisina A, o sean bacteriocinas distintas (Chan y col., 1989). Recientemente se ha caracterizado otra variante natural de la nisina denominada nisina Z (Mulders y col., 1991).

II. 6. 8. - Bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas

II. 6. 8. 1. - Bacteriocinas producidas por especies del género *Lactococcus*

En la Tabla II.7 se muestran las bacteriocinas más relevantes producidas por lactococos. Los estreptococos del grupo N de Lancefield, actualmente en el género *Lactococcus*, se conocen bien en la industria láctea por su utilidad como cultivos iniciadores. El primer compuesto antimicrobiano descrito producido por las bacterias lácticas fué la nisina que producen las cepas de *Lactococcus lactis*, cuyo espectro antimicrobiano frente a bacterias Gram-positivas es muy amplio. La nisina se obtiene comercialmente y algunos países permiten su utilización en los alimentos (Delves-Broughton, 1990).

La nisina es un antibiótico, es decir, un polipéptido antimicrobiano con aminoácidos poco usuales. Las proteínas que contienen aminoácidos no codificados en su DNA proceden de rutas metabólicas complejas, activadas por complejos multienzimáticos, o de una modificación post-translacional del péptido precursor (Harris y col., 1992), lo que parece ocurrir en el caso de la nisina. El determinante genético del gen estructural de la nisina se ha clonado y caracterizado en tres cepas diferentes de *Lact. lactis*, ATCC11454 (Buchanan y col., 1989), 6F3 (Kalleta y Eutian, 1989) y NCFB894 (Dodd y col., 1990). En la cepa NCFB894, cerca del gen estructural de la nisina se detecta un elemento de inserción (IS904), todo ello incluido en el elemento genético trasponible Tn5301 (Horn y col., 1991). Aunque la nisina posee un espectro antimicrobiano muy amplio frente a bacterias Gram-positivas, interacciona fuertemente con los fosfolípidos lo que limita su utilización en alimentos que contienen emulsionantes. Además, la nisina es menos soluble a pH neutro o ligeramente alcalino lo que limita su utilización en muchos sustratos alimenticios (Stiles y Hastings, 1991). Finalmente, el microorganismo productor no se desarrolla bien en sustratos no lácteos.

También conviene destacar que, además de la nisina y lacticina 481, que son lantibióticos, los lactococos producen otras bacteriocinas sin aminoácidos modificados como la diplococina (Davey, 1984) y lactococina A (Holo y col., 1991; Van Belkum y col., 1991), producidas en diversas cepas de *Lact. cremoris* y *Lact. diacetylactis* (Stoddard y col., 1992). Es interesante señalar que en las cepas de *Lact. cremoris* y *Lact. diacetylactis* analizadas, el gen estructural de la lactococina A posee la misma secuencia, aunque se localiza en plásmidos de tamaño molecular diferente.

TABLA II. 7.- BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS DEL GENERO *LACTOCOCCUS*

BACTERIOCINA	PRODUCTOR	LOCALIZACION GENETICA	TAMAÑO	CARACTERISTICAS BIOQUIMICA	REFERENCIA
			MOLECULAR (daltons)		
Nisina	<i>Lact. lactis</i>	Cromosoma/ plásmido	3.334	Lantibiótico, 34 aminoácidos	Hurst, 1981
Lactostrepcinas	<i>Lact. lactis</i>	ND	ND	8 grupos activos	Kozak y col., 1978
Lacticina 481	<i>Lact. lactis</i>	ND	1.700	Lantibiótico, 21 aminoácidos	Piard y col., 1992
Diplococina	<i>Lact. cremoris</i>	Plásmido 54 MDa	5.300	51 aminoácidos	Darvey, 1984
Lactococina A	<i>Lact. cremoris</i> LMG2130	Plásmido 55 Kb	5.778	54 aminoácidos	Holo y col., 1991
Lactococina A	<i>Lact. cremoris</i> 9B4	Plásmido 60 Kb	5.778	54 aminoácidos	Van Belkun, 1991
Lactococina A	<i>Lact. diacetylactis</i>	Plásmido 131 Kb	5.778	54 aminoácidos	Stoddard, 1992

Fuente: Hernández y col., 1993

II. 6. 8. 2. - Bacteriocina producidas por especies del género *Lactobacillus*

La Tabla II.8 muestra las bacteriocinas más significativas producidas por lactobacilos. Algunas bacteriocinas proceden de lactobacilos de origen lácteo pero otras aisladas de otros sustratos alimenticios poseen un espectro antimicrobiano más amplio. Se sabe que la carne y derivados cárnicos constituyen un sustrato excelente para el aislamiento de lactobacilos productores de bacteriocinas, según los resultados obtenidos por Schillinger y Lücke, (1989) en Alemania, Rodriguez y col., (1989) y Sobrino y col., (1991) en España y Lewus y col., (1991) en EE.UU. Otros lactobacilos aislados durante la fermentación de aceitunas (Jimenez y col., 1990), pepinillos (Daschel y col., 1990) y otros productos vegetales (Toba y col., 1991), y del intestino de niños lactantes (Toba y col., 1991) producen también bacteriocinas.

Las bacteriocinas originadas por lactobacilos de origen cárnico y, concretamente por *L. sake*, podrían utilizarse como factores de seguridad higiénica en las carnes frescas refrigeradas y en otros derivados cárnicos. De las descritas, hasta ahora la sakacina A y lactocina S poseen un espectro antimicrobiano reducido, mientras la sakacina M es activa frente a otras bacterias lácticas y frente a bacterias Gram-positivas de los géneros *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Listeria* y *Staphylococcus*, pero no frente a *Bacillus* ni frente a bacterias Gram-negativas incluidas *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica* (Cintas y col., 1992; Sobrino y col., 1992). Conviene destacar que la lactocina S y la sakacina M (Sobrino y col., 1992) son lantibióticos que parecen poseer la misma secuencia de aminoácidos. Esta observación permite surgerir la existencia en el género *Lactobacillus* de bacteriocinas, cuya presencia ya se ha demostrado en *Lactococcus*. Asimismo, las bacteriocinas producidas por lactobacilos de origen vegetal podrían utilizarse para asegurar una fermentación segura e higiénica en la obtención de alimentos vegetales.

TABLA II.8.- BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS DEL GENERO *LACTOBACILLUS*

BACTERIOCINA	PRODUCTOR	LOCALIZACION GENETICA	TAMAÑO MOLECULAR (daltons)	CARACTERISTICAS BIOQUIMICA	REFERENCIA
Bac	<i>L. fermenti</i>	ND	ND	Proteína-lipocarbohidrato	Klerk y Smit, 1967
Lactocina 27	<i>L. helveticus</i> 27	ND	>2.000.000	Proteína-lipopolisacárido	Upreti y Hinsdill, 1973
Helveticina J	<i>L. helveticus</i>	Cromosoma	37.000	334 aas	Joerger y Klaenhammer, 1990
Lactacina B	<i>L. acidophilus</i>	Cromosoma	6.000-6.500	ND	Barefoot y Klaenhammer, 1984
Lactacina F	<i>L. acidophilus</i>	Plásmido 110Kb	6.300	57 aas	Muriana y Klaenhammer, 1991
Plantaricina A	<i>L. plantarum</i>	ND	8.000	ND	Daeschel y col., 1990
Plantaricina S	<i>L. plantarum</i>	ND	ND	ND	Piard y Desmazeaud, 1990
Sakacina A	<i>L. sake</i> Lb706	Plásmido 18 MDa	ND	ND	Schillinger y Lucke, 1989
Lactocina S	<i>L. sake</i> L45	Plásmido 50 Kb	3.771	Lantibiótico, 37 aas	Mortved y col., 1991
Sakacina M	<i>L. sake</i> 148	ND	4.467	ND	Sobrino y col., 1992
Caseicina 80	<i>L. casei</i>	ND	40.000-42.000	ND	Rammelsberg y col., 1978
Brevicina 37	<i>L. brevis</i>	ND	ND	ND	Rammelsberg y col., 1990

Fuente: Hernandez y col., 1993

II. 6. 8. 3. - Bacteriocinas producidas por especies del género *Leuconostoc*

Se ha observado que hay especies del género *Leuconostoc* que también producen bacteriocinas (Tabla II.9). Diversas cepas de *Leuc. gelidum* producen bacteriocinas activas frente a otras bacterias lácticas y frente a *List. monocytogenes* (Ahn y Stiles, 1990a; Charmaigne y Shaw, 1990); la leucocina A de *Leuc. gelidum* UAL187 es un péptido de 37 aminoácidos y un peso molecular de 3.930 daltons cuya síntesis está mediada por un plásmido de 76 megadaltons (Hastings y Stiles, 1991; Stiles y Hastings, 1991).

Se ha comprobado recientemente, que una cepa de *Leuc. mesenteroides* produce una bacteriocina, mesentericina 5, cuyo espectro antimicrobiano es muy reducido pero es activa frente a *List. monocytogenes* (Daba y col., 1991); otra cepa de la misma especie produce un leuconocina S, con un espectro antimicrobiano más amplio, al parecer es una glucoproteína porque su actividad se inactiva por el enzima alfa-amilasa (Lewus y col., 1992).

II. 6. 8. 4. - Bacteriocinas producidas por especies del género *Carnobacterium*

Los microorganismos del género *Carnobacterium* productores de bacteriocinas se muestran en la Tabla II.10. Schillinger y Holzapfel, (1990), fueron los primeros en describir la producción de bacteriocinas por este género. Posteriormente, se ha señalado que *Carn. piscicola* UAL26 produce un bacteriocina activa frente a bacterias Gram-positivas incluidas especies de *Bacillus* y *Clostridium* (Ahn y Stiles, 1990a), mientras *Carn. piscicola* LV17 origina dos bacteriocinas, una mediada por un plásmido de 40 MDa y la otra por otro de 49-MDa. Los últimos resultados de la purificación de estas carnobacteriocinas A y B, indican que en medios de cultivo apropiados ambas presentan tres formas activas durante el desarrollo del microorganismo productor (Stiles y Hastings, 1991).

TABLA II. 9.- BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS DE LOS GENEROS *LEUCONOSTOC* Y *CARNOBACTERIUM*

BACTERIOCINA	PRODUCTOR	LOCALIZACION GENETICA	TAMAÑO MOLECULAR (daltons)	CARACTERISTICAS BIOQUIMICA	REFERENCIA
Leucocina A	<i>Leuc. gelidum</i>	Plásmido 7,6 MDa	3.930	37 aminoácidos	Hastings y Stiles, 1991
Mesenterocina 5	<i>Leuc. mesenteroides</i>	ND	4.500	ND	Daba y col., 1991
Leucocina S	<i>Leuc. paramesenteroides</i>	ND	2.000-10.000	Glucoproteína	Lewus y col., 1992
Bac	<i>Carn. piscicola</i> UAL26	Cromosoma	ND	ND	Ahn y Stiles, 1990a
Carnobacteriocinas A y B	<i>Carn. piscicola</i> LV17	Plásmido 40 MDa Plásmido 49 MDa	ND ND	3 formas activas de cada una	Ahn y Stiles, 1990b
Carnocina U149	<i>Carnobacterium sp.</i>	ND	4.635	Lantibiótico 35-37 aminoácidos	Stoffels y col., 1992

Fuente: Hernández y col., 1993

Sttoffels y col., (1992), han descrito otra bacteriocina, la carnocina U149, producida por una cepa no bien caracterizada de *Carnobacterium* sp. Esta bacteriocina es un lantibiótico de 35 a 37 aminoácidos y un tamaño molecular de 4.635 daltons.

II. 6. 8. 5. - Bacteriocinas producidas por especies del género *Pediococos*

La Tabla II.11 muestra las características más relevantes de las bacteriocinas producidas por los pediococos. La pediocina A de *P. pentosaceus* FBB61 la origina una cepa aislada de pepinillos fermentados, cuya producción e inmunidad a la bacteriocina está codificada en un plásmido de 13,6 MDa. Esta bacteriocina es activa frente a otras bacterias lácticas y frente a microorganismos patógenos como *Cl. botulinum*, *List. monocytogenes* y *Staph. aureus* (Daeshel y Klaenhammer, 1985; Klaenhammer, 1988).

La pediocina "Bac" producida por *P. pentosaceus* FBB63, también de origen vegetal, está asociada a un plásmido de 10,5 MDa, aunque se desconoce si su inmunidad se encuentre asociada al mismo plásmido. Esta bacteriocina es antagonista de diversos microorganismos patógenos que pueden presentarse en los alimentos, entre los que se incluyen *Staph. aureus*, *B. cereus* y *Str. faecalis* (Fleming y col., 1975).

De embutidos crudos curados se ha aislado *Pediococcus acidilactici* H, cuya pediocina AcH posee actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias Gram-positivas entre las que se incluyen *Cl. perfringens*, *List. monocytogenes* y *Staph. aureus*, así como bacterias Gram-negativas como *A. hydrophila* y *Ps. putida*. La bacteriocina se encuentra codificada en un plásmido de 7,5 MDa y posee un tamaño molecular de 2.700 daltons (Bhunias y col., 1987; Biswas y col., (1991)). La adsorción de la pediocina AcH en la pared celular de las células sensibles, pero no de las resistentes, origina rápidamente la muerte celular (Bhunias y col., 1991). Además, es activa en un rango de pH de 2,0 a 9,0, y permanece estable después de

tratada a 95 °C durante 15 minutos (Stiles y Hastings, 1991). La actividad antimicrobiana de la pediocina AcH se pierde al tratarla con las proteasas IX, IV y K, tripsina, quimiotripsina y ficina. Sin embargo, los enzimas RNasa, lipasa y algunos solventes orgánicos no influyen en su actividad inhibidora.

Finalmente, conviene resaltar que los resultados de Mortlagh y col. (1992) han demostrado que la pediocina AcH consiste en un prepérido de 62 aminoácidos, de los que 44 constituyen la bacteriocina activa. La secuencia de nucleótidos del gen estructural de la pediocina AcH es igual que la de la pediocina PA-1, al igual que la secuenciación parcial de los primeros 23 aminoácidos de la pediocina AcH con relación a la PA-1.

La pediocina PA-1 producida por *P. acidilactici* PAC 1.0 procedente de un cultivo comercial, está mediada por un plásmido de 6,2 MDa llamado pSQ11 y posee un tamaño molecular de unos 16.500 daltons (Gonzalez y Kunka, 1987). Esta cepa, al contrario que *P. pentosaceus* no utiliza los azúcares melobiosa o rafinosa. Existen prueba que indican que la utilización de la sacarosa por *P. acidilactici* PAC 1.0 y la producción de la bacteriocina se encuentran codificados en diferentes plásmidos. La bacteriocina es activa frente a diversas cepas de *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. bifementans*, y *Leuc. mesenteroides* subesp, *dextranicum* y *List. monocytogenes* (Pucci y col., 1988). Sin embargo, no es activa frente a *Lact. lactis*, *Lact. lactis* subesp *diacetylactis*, *Str. cremoris* o *Str. thermophilus*.

Pucci y col., (1988), han observado que la pediocina PA-1 es activa frente a muchas bacterias lácticas y *List. monocytogenes*. La inhibición de *List. monocytogens* por esta bacteriocina se ha observado en salchichas (Berry y col., 1991) y en carne refrigerada (Nielsen y col., 1990).

TABLA II. 10.- BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS DEL GENERO *PEDIOCOCCUS*

BACTERIOCINA	PRODUCTOR	LOCALIZACION GENETICA	TAMAÑO MOLECULAR (daltons)	CARACTERISTICAS BIOQUIMICA	REFERENCIA
Bac	<i>P. pentosaceus</i> FBB63	Plásmido 10,5 MDa	ND	ND	Graham y Mckay, 1985
Pediocina A	<i>P. pentosaceus</i> FBB61	Plásmido 13,6 MDa	ND	ND	Daeschel y Klaenhammer, 1985
Pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Plásmido 6,2 MDa	16.500	ND	Gonzalez y Kunka, 1987
Pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i>	ND	4.640	44 aminoácidos	Nieto y col., 1992
Pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Plásmido 9,4 Kb	ND	44 aminoácidos	Marug y col., 1992
Pediocina AcH	<i>P. acidilactici</i> H	Plásmido 7,4 MDa	2.700	ND	Bhunja y col., 1988
Pediocina AcH	<i>P. acidilactici</i> H	Plásmido 8,9 MDa	4.268	44 aminoácidos	Mortlagh y col., 1992

Fuente: Hernández y col., 1993.

Los últimos resultados experimentales indican que la pediocina PA-1 posee 44 aminoácidos no modificados y un tamaño molecular de 4.640 daltons, mientras la zona N-terminal de su secuencia es similar a las de la sakacina A, leucocina A y curvaticina A, poseyendo en común con las 2 últimas bacteriocinas, 16 y 13 aminoácidos respectivamente (Nieto y col., 1992). Marugg y col., (1992) han señalado que son 4 los genes involucrados en la síntesis y expresión de la pediocina PA-1 *P. acidilactici* PAC 1.0 de los que uno es estructural.

II. 7. - BACTERIAS LÁCTICAS PRODUTORAS DE BACTERIOCINAS EN EL CONTROL DE MICROORGANISMOS ALTERANTES Y PATÓGENOS

Como se deduce de lo descrito anteriormente, la idea de utilizar bacterias lácticas en el control de microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos no es nueva. Los primeros resultados experimentales se obtuvieron utilizando bacterias lácticas antagonistas del desarrollo de otros microorganismos, por mecanismos hasta entonces desconocidos o poco estudiados (Raccach y Baker, 1978). Posteriormente se utilizaron en diversos productos cárnicos las bacterias lácticas como alternativa al empleo de nitratos y nitritos estudiándose su acción antagonista tanto en la síntesis de toxinas botulínicas (Okereke y Montville, 1991; Tanaka y col., 1980), como en la inhibición del desarrollo de microorganismos productores de toxiinfecciones alimentarias (Harding y Shaw, 1990; Nielsen y Zeuthen, 1985) y en la producción de aflatoxinas por mohos toxigénicos (Karunaratne y col., 1990). En los últimos años, se ha determinado la actividad antagonista de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas y de sus propias bacteriocinas en diversos sustratos alimentarios. De esta manera se ha evaluado su potencial tanto en las carnes frescas como en los derivados cánicos (Foegeding y col. 1992; Schillinger y col., 1991). Con el mismo enfoque estos estudios se han extendido a la leche y derivados lácteos (Pucci y col., 1988), y a diversos productos vegetales (Harris y col., 1992).

No obstante, a pesar de los resultados tan esperanzadores obtenidos, existe la convicción expresada por algunos investigadores, de que la actividad antagonista de las bacterias lácticas y de sus bacteriocinas, se está evaluando sin conocer todavía sus características bioquímicas, inmunológicas y genéticas más relevantes (Hernández y col., 1993). De ello se derivan una serie de cuestiones como:

- a) demostrar experimentalmente la síntesis de bacteriocinas en los sustratos alimentarios,
- b) averiguar la existencia de posibles sistemas de regulación de la síntesis de bacteriocinas en dichos sustratos,
- c) conocer su cinética de destrucción por enzimas proteolíticos endógenos de los alimentos,
- d) estudiar la actividad antimicrobiana conjunta de dos o más bacteriocinas para evitar el desarrollo de microorganismos resistentes a cada una de ellas,
- e) profundizar más en las relaciones de estructura/actividad, para construir así péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana, realizar fusiones genéticas de varias bacteriocinas, o aplicar técnicas de ingeniería de proteínas para incrementar su actividad,
- f) mejorar los conocimientos sobre a la inmunidad y resistencia a las bacteriocinas de las bacterias lácticas,
- g) construir vectores genéticos que expresen varias bacteriocinas y que sean fácilmente transmisibles a las bacterias lácticas.

De acuerdo con lo anterior podrian buscarse soluciones a los problemas detectados. Así, por ejemplo, se sabe que la nisina es poco soluble a un pHs próximos a 6, que interacciona con los fosfolípidos, y que no difunde fácilmente, que es inactiva frente a muchos microorganismos alterantes y patógenos y que el microorganismo que la produce *Lact. lactis* ,

no se desarrolla en muchos sustratos alimentarios. Uno de los mayores problemas del posible empleo de la nisina en la carne y derivados cárnicos, es su poca solubilidad al pH de la carne y, su producción in situ, por una cepa que no se desarrolla, ni sintetiza nisina a temperaturas de refrigeración. En el caso de la sakacina A de *L. sake* Lb706, se ha demostrado, que además de poseer un espectro antimicrobiano muy reducido, su actividad es menor en los sustratos cárnicos que en los medios de cultivo y que su actividad decrece con el tiempo (Schillinger y col., 1991). Además, este microorganismo es acidúrico y rebaja mucho el pH final de los sustratos en que se encuentra, lo que puede limitar su utilidad en los productos cárnicos no fermentados. Los microorganismos del género *Carnobacterium*, aunque son menos acidófilos, son heterofermentativos y producen pequeñas concentraciones de CO₂.

II. 8. - TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE INTERÉS EN LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS

La industria alimentaria demanda sistemas cada vez más sensibles y rápidos, para detectar y cuantificar en los alimentos la presencia de contaminantes bióticos o abióticos y la existencia de componentes añadidos intencional o fraudulentamente. Para ello, se han desarrollado técnicas que pueden utilizarse con este fin. Este es el caso de los métodos inmunológicos que emplean reactivos marcados y que han adquirido en los últimos años una importancia considerable como métodos analíticos. Los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) se están empleando en áreas que previamente estaban cubiertas por los métodos radiométricos (RIA) y de inmunofluorescencia (IF).

Conviene señalar que los resultados obtenidos con la inmunofluorescencia son subjetivos, difíciles de cuantificar y además su manejo requiere un personal muy cualificado; por el contrario, el radioinmunoensayo es objetivo y automatizable, pero tiene el inconveniente del posible riesgo de contaminación de los operarios y de los alimentos con materiales

radioactivos, además de la posible contaminación del ambiente al eliminarse los residuos radiactivos. Los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) son objetivos y automatizables, están exentos de riesgos para los operarios y los reactivos utilizados son estables. Estas características, además de la utilización de equipos sencillos y baratos, permiten el desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas en laboratorios con recursos económicos limitados.

II. 8. 1. - Métodos inmunoenzimáticos (ELISA)

Los métodos inmunoenzimáticos, conocidos como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays), se basan (Engvall y Perlman, 1972; Van Weemen y Schuurs, 1972) en que tanto los antígenos como los anticuerpos pueden unirse a un enzima, lo que les confiere actividad inmunológica y enzimática. En estos ensayos el antígeno o el anticuerpo se unen corrientemente a un soporte sólido, lo que facilita la separación de los reactivos libres. Se ha observado que tanto los antígenos como los anticuerpos se adsorben eficazmente a la celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, polivinilo, y polipropileno, empleados en forma de tubos, bolitas, discos o microplacas.

Como se ha mencionado, una parte esencial del método es la conjugación (unión) del anticuerpo o del antígeno con un enzima. Por ello es conveniente que el enzima esté purificado, que sea muy activo, barato, fácil de obtener y que al reaccionar con el sustrato origine un producto fácilmente observable y medible. Aunque pueden emplearse muchos enzimas, los más utilizados para este fin son la peroxidasa de rábano, la β -galactosidasa y la fosfatasa alcalina (Voller y col., 1986).

La elección del sustrato es también importante en las metodologías ELISA. El sustrato debe ser estable y soluble, antes y después de la degradación. El enzima peroxidasa de rábano

utiliza como sustrato el peróxido de hidrógeno, requiriendo la presencia de un donante de hidrógeno que, al oxidarse, origina un compuesto coloreado que puede medirse espectrofotométricamente y cuya concentración es proporcional a la actividad del enzima sobre el sustrato. Los donantes de hidrógeno más empleados son la *o*-fenilendiamina (OPD), el ácido 2,2'-azino-di- (3-etil-benzotiazolina) sulfónico (ABTS), el ácido 5-aminosalicílico y la 3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina, aunque existen muchos más. En el caso de la β -galactosidasa, el sustrato más utilizado es el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) y para la fosfatasa alcalina el *p*-nitrofenil fosfato (PNPP) (Tijssen, 1985).

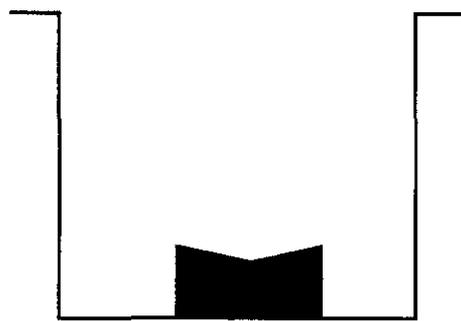
De los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) existen variantes metodológicas distintas para detectar e identificar los antígenos o anticuerpos en las soluciones biológicas complejas. De ellas las más utilizadas son el ELISA indirecto, el competitivo y el sandwich. En la técnica del ELISA indirecto (Figura 2.2), el antígeno se inmoviliza por adsorción pasiva en una superficie inerte; los anticuerpos específicos reconocen al antígeno y el complejo formado se detecta con un segundo anticuerpo marcado con un enzima, que reconoce como antígeno al anterior, o bien con un conjugado de Proteína A-enzima. La reacción se visualiza porque el enzima, al actuar sobre el sustrato, libera un compuesto coloreado.

En la técnica del ELISA competitivo (Figura 2.3), el anticuerpo específico se inmoviliza sobre una superficie inerte, luego se añade un conjugado enzima-antígeno de concentración conocida mezclado con la muestra problema. Utilizando como control otro pocillo, al que no se añade la muestra después de adicionado el sustrato, la diferencia de color entre ambos pocillos es indicativa de la concentración de antígeno en la muestra analizada.

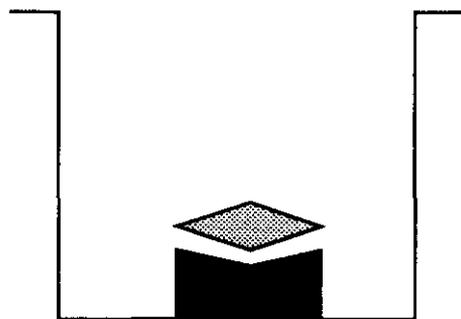
En la técnica del ELISA sandwich (Figura 2.4), el anticuerpo específico (Ac-1) se inmoviliza en una fase sólida y actúa como anticuerpo de captura del antígeno problema. El

producia bacteriocinas.

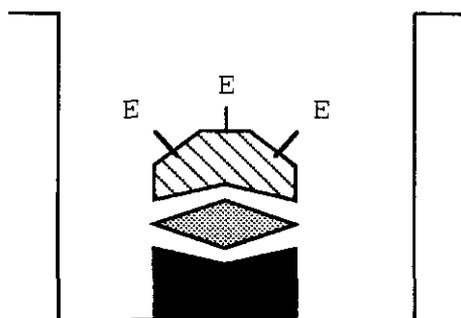
De acuerdo con los resultados obtenidos por el personal de este Departamento, los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) son muy útiles para detectar y cuantificar anticuerpos policlonales de los componentes de los alimentos. Por ello, pensamos que la caracterización inmunológica de las bacteriocinas permitiría conocer la existencia de regiones de homología antigénica con otras producidas por bacterias lácticas distintas, además permitiría detectarlas en los sobrenadantes de los medios de cultivo y en sustratos alimenticios como la carne y diversos derivados cárnicos.



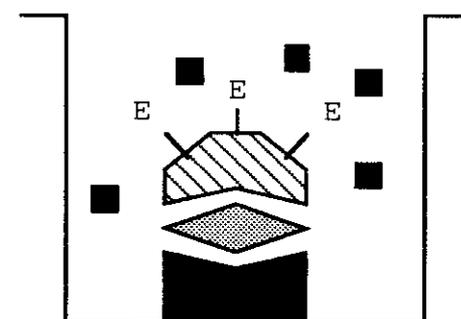
1.- Antígeno adsorbido al pocillo



2.- Anticuerpos específicos que reconocen al antígeno



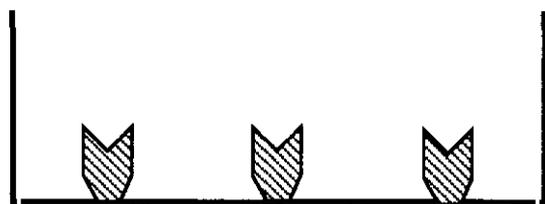
3.- Antiinmunoglobulinas o Proteína A, conjugadas a un enzima y que reconocen el complejo antígeno-anticuerpo



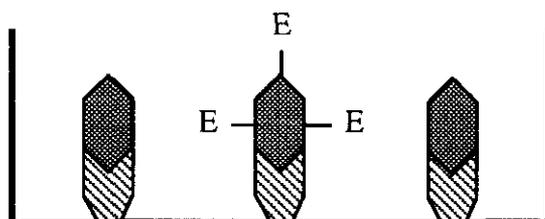
4.- Adición del sustrato enzimático

Figura 2. 2.- Diagrama esquemático de la técnica del ELISA indirecto.

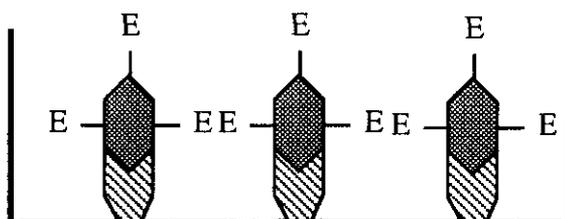
1.- Anticuerpo adsorbido al pocillo



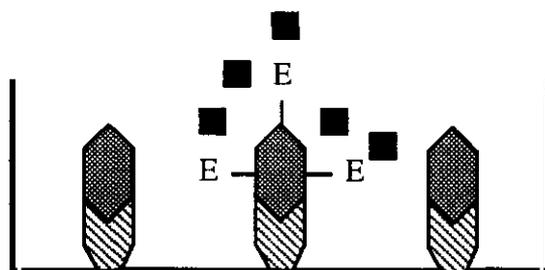
2a.- Adición de la mezcla antígeno-enzima con la muestra problema



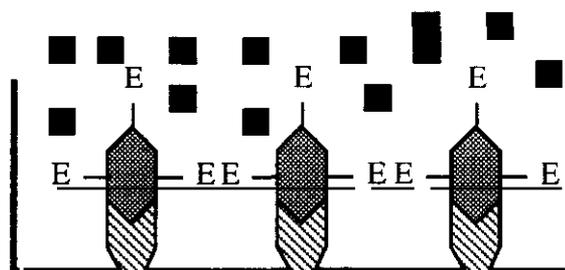
2b.- Adición del conjugado antígeno-enzima



3a.- Adición del sustrato enzimático

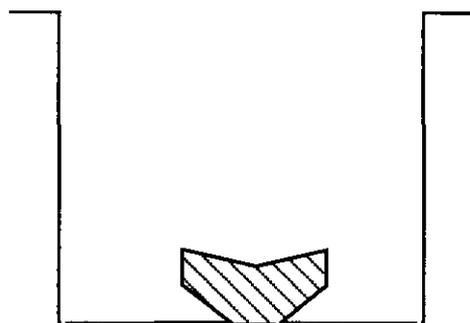


3b.- Adición del sustrato enzimático

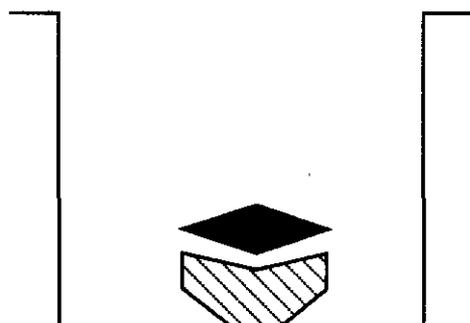


Diferencia de color entre 3a y 3b = Antígeno desconocido

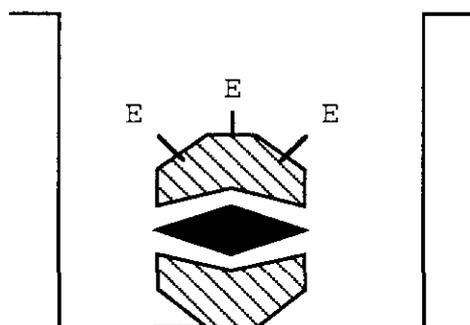
Figura 2. 3.- Diagrama esquemático de la técnica del ELISA competitivo.



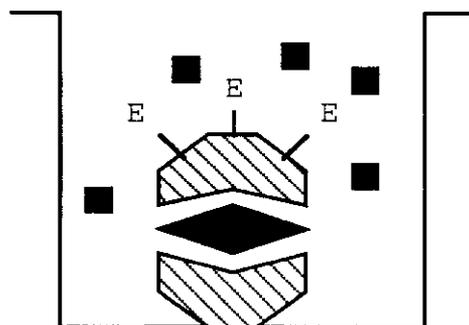
1.- Anticuerpo adsorbido al pocillo



2.- Anticuerpo capturado por un anticuerpo específico



3.- Anticuerpos específicos marcados con un enzima que reconoce al antígeno anclado



4.- Adición del sustrato enzimático

Figura 2. 4. - Diagrama esquemático de la técnica de ELISA sandwich.

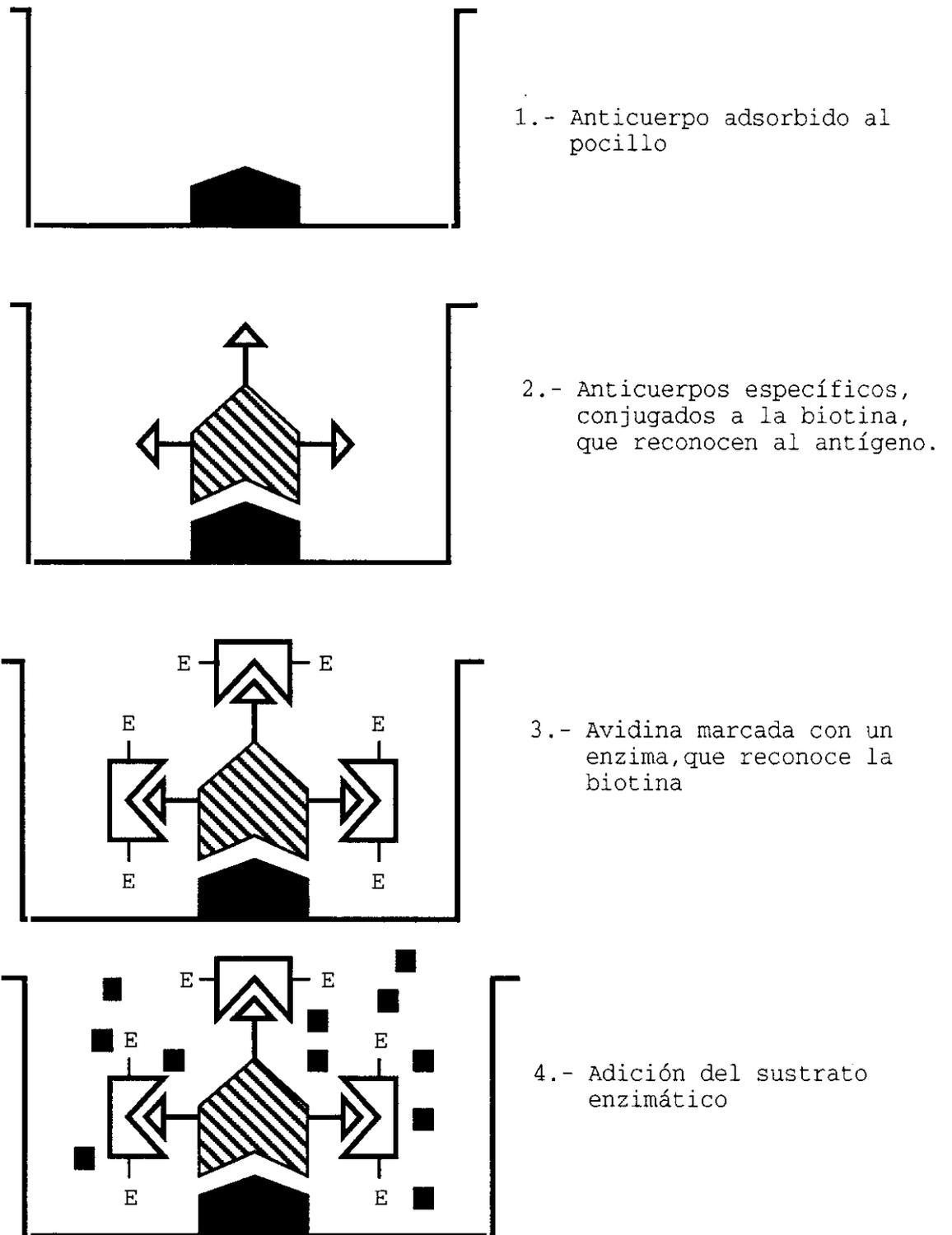


Figura 2. 5. - Diagrama esquemático de la técnica del ELISA indirecto, utilizando anticuerpos biotinizados.

CAPITULO III

MATERIALES

Y

METODOS

III. 1. - MATERIALES

III. 1. 1. - Material biológico

III. 1. 1. 1. - Microorganismos empleados

Las bacterias lácticas utilizadas en la realización de este trabajo se aislaron de embutidos crudos curados, elaborados sin añadirles ningún cultivo iniciador industrial, en la Escuela de la Carne de la Federación Madrileña de la Carne, Madrid. Las cepas se aislaron siguiendo un método aleatorio y la mayor parte se identificaron tentativamente como *Pediococcus* sp. según el esquema de identificación de Schillinger y Lucke (1987b).

La Tabla III.1 muestra los microorganismos utilizados como indicadores para evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas de los embutidos crudos curados, así como el origen de aquéllos. Todos los microorganismos se conservaron liofilizados en un medio de leche descremada al 10% y, a veces, congelados a - 20 °C en caldo nutritivo con un 15% de glicerol. Cada dos meses se revitalizaban mediante dos o tres pases en caldo nutritivo.

III. 1. 1. 2. - Enzimas y proteínas

Los enzimas proteolíticos empleados en la caracterización de la sustancia antimicrobiana producida por *Pediococcus* sp 347 fueron suministrados por "Merck" y "Sigma"⁽¹⁾.

Las proteínas estándar, de peso molecular conocido empleadas en las técnicas electroforéticas, fueron suministradas por "Pharmacia".

(1) La cita de marcas comerciales no significa que el autor las recomiende con preferencia a otras del mercado.

III. 1. 1. 3. - Obtención de los inmunosueros

Los inmunosueros se obtuvieron por inoculación de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347 en conejos machos de raza "New Zealand", de 2,5 - 3,0 Kg de peso vivo, cedidos por el animalario del Departamento de Cirugía Experimental del Hospital Militar Central "Gomez Ulla" de Madrid

III. 1. 1. 4. - Productos y reactivos

Los productos químicos utilizados en las experiencias descritas en este trabajo fueron de calidad reactivo y procedían de las siguientes firmas: "Merck", "Probus", "Sigma", "Fluka" y "Panreac".

Los productos utilizados en las experiencias microbiológicas procedían de las firmas "Difco" y "Oxoid", excepto los componentes minerales, azúcares y colorantes que fueron suministrados por "Merck", "Panreac" y "BDH".

En las técnicas cromatográficas y electroforéticas se emplearon productos suministrados por "Pharmacia" y "Bio-Rad" y los utilizados en los ensayos enzimáticos, inmunológicos e inmunoenzimáticos, lo fueron por "Sigma", "Difco", "Pharmacia" y "Nordik".

III. 1. 2. - Material de laboratorio

En la preparación de los medios de cultivo y soluciones acuosas se ha empleado agua destilada, obtenida con un destilador "Afora" y desmineralizada en un intercambiador "Seta" mod. R600.

Tabla III. 1. - Microorganismos indicadores empleados para evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas aisladas de embutidos crudos curados.

Microorganismo indicador	Cepa n ^o	Origen ^a
<u>Bacterias Gram-positivas</u>		
<i>Bacillus cereus</i>	9139	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i>	OG1	CPB
<i>Bacillus subtilis</i>	BD630	CPB
<i>B. stearothermophilus</i>	49	CECT
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	10018	NCIB
<i>Carnobacterium divergens</i>	Lv13	FRIB
<i>Carnobacterium piscicola</i>	MR371	FRIB
<i>Clostridium botulinum</i>	551	CECT
<i>Clostridium perfringens</i>	376	CECT
<i>Clostridium sporogenes</i>	CS22/10	CPB
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	3,5CT	CPB
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	1754	NCDO
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF1	CPB
<i>Enterococcus faecalis</i> (v. <i>liquefaciens</i>)	184	CECT
<i>Enterococcus faecium</i>	410	CECT
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356	ATCC
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb226	IMTH
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	11842	ATCC
<i>Lactobacillus carnis</i>	Lv61	FRIB
<i>Lactobacillus casei</i>	334	ATCC
<i>Lactobacillus curvatus</i>	2739	NCFB
<i>Lactobacillus farciminis</i>	Lb34	IMTH
<i>Lactobacillus fermentum</i>	9338	ATCC
<i>Lactobacillus fermentum</i>	285	CECT
<i>Lactobacillus helveticus</i>	15009	ATCC
<i>Lactobacillus mesentericus</i>	394	CECT
<i>Lactobacillus mesenteroides</i>	MR364	FRIB
<i>Lactobacillus plantarum</i>	221	CECT
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lb577	IMTH
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MR371	FRIB
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1193	NCDO
<i>Lactobacillus reuteri</i>	20016	DSM
<i>Lactobacillus salivarius</i>	2747	NCFB
<i>Lactobacillus sake</i>	Lb684	IMTH
<i>Lactobacillus sake</i>	2714	NCFB

Tabla III. 1. - (continuación)

Microorganismo indicador	Cepa nº	Origen ^a
<i>Lactococcus cremoris</i>	117	CPB
<i>Leuconostoc cremoris</i>	1275	CPB
<i>Listeria innocua</i>	86/26	CPB
<i>Listeria monocytogenes</i>	5105	NCTC
<i>Listeria monocytogenes</i>	7973	NCTC
<i>Listeria monocytogenes</i>	L15 _{sv} 1/2	FVM
<i>Listeria monocytogenes</i>	L11 _{sv} 4	FVM
<i>Listeria monocytogenes</i>	Scott A	CECT
<i>Micrococcus varians</i>	230	CECT
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	FBB63	CPB
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PC1	CPB
<i>Propionibacterium acidipronic</i>	563	NCDO
<i>Propionibacterium</i> sp.	P4	CPB
<i>Propionibacterium</i> sp.	P6	CPB
<i>Staphylococcus xylosum</i>	237	CECT
<i>Staphylococcus aureus</i>	137	FRI
<i>Staphylococcus aureus</i>	196E	FRI
<i>Staphylococcus aureus</i>	349	FRI
<i>Staphylococcus aureus</i>	361	FRI
<i>Staphylococcus aureus</i>	472	FRI
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Mcl	CPB
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST112	CPB
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST20	CPB

Tabla III. 1. - (continuación)

Microorganismo indicador	Cepa nº	Origen ^a
<u>Bacterias Gram-negativas</u>		
<i>Enterobacter cloacae</i>	194	CECT
<i>Escherichia coli</i>	BW545	MIT
<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno	B41	IEKC
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DC5	FRIB
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DC7	FRIB
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NT19	FRIB
<i>Salmonella thyphi</i>	409	CECT
<i>Salmonella thyphimurium</i>	443	CECT
<i>Salmonella thyphimurium</i>	T91	CENAN
<i>Yersinia enterocolitica</i>	WA	DHHS
<i>Yersinia enterocolitica</i>	E20	NCTC
<i>Yersinia enterocolitica</i>	14405	IPP

Abreviaturas: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Burjasot, Valencia); CENAN, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (Majadahonda, Madrid); CPB, Colección Proyecto Bridge; DHHS, Dept of Health and Human Services (Washington DC, USA); FRI, Food Research Institute (Madison, USA); FRIB, Food Research Institute (Bristol, Gran Bretaña); FVM, Facultad de Veterinaria (Madrid); IEKC, International Escherichia and Klebsiella Centre (Copenhage, Dinamarca); IMTH, Institute fur Mikrobiology, Toxicology and Histology.(Kulmbach, RFA); IPP, Instituto Pasteur (Paris, Francia); MIT, Masachussets Institute of Technology (Boston, USA); NCIB, National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Aberdeen, Gran Bretaña); NCTC, National Collection of type Cultures (Londres, Gran Bretaña).

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplato "Sauter" mod. S-1000 y las de precisión en balanzas analíticas "Sartorius" mod. 2443 y "Microwa" mod. 6620. Para equilibrar las muestras a centrifugar se utilizó una balanza biplato "Cobos" mod 28.

Los ajustes y determinaciones de pH se llevaron a cabo con pH-metros "Crison" mod. Digit 501 y "Radiometer" mod. 28.

Las esterilizaciones de los medios de cultivo y de las soluciones cuya naturaleza así lo permitía se realizaron en autoclaves "Averly" y "Selecta" mod. 437-G. La esterilización del material de vidrio se efectuó por calor seco en una estufa de aire forzado "Heraeus" mod. KFTU-K . La esterilización de otras soluciones se llevaron a cabo por filtración con filtros "Millipore" de 0,22 y 0,45 μm de diámetro de poro.

Las homogenizaciones se realizaron en un homogenizador Stomacher "Colworth" mod. 400.

Las centrifugaciones se efectuaron en una centrífuga refrigerada "Sorvall" mod. RC-5B, equipada con rotores SS-34 y GSA y en la microcentrífuga "Heraeus" Christ, mod. Biofuge, equipada con un rotor tipo 1220.

Las siembras microbianas se efectuaron en una cámara de flujo laminar "Telstar" mod. CE-A. Las incubaciones se efectuaron en estufas "Heraeus" , mods. KB-500 y B6200 y "Selecta", mod. Termotronic 338, termostatadas a la temperatura deseada. Los tratamientos térmicos e incubaciones que requerían un control más preciso de la temperatura se realizaron en baños de agua o de glicerina provistos de termostatos "Selecta", mod. Tectron.

El crecimiento de los cultivos microbianos se estimó por turbidometría, utilizando un colorímetro "Klett-Summerson" mod. 800-3. Los recuentos microbianos se efectuaron en un contador de colonias "WTW" mod. BZG-24. Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio óptico "Nikon", mod. L-Ke, equipado con un dispositivo de contraste de fases.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros "Kontron", mod. Uvikon 820, e "Hitachi", mod. U-2000, registrándose los resultados en una impresora térmica "Kontron", mod. Uvikon LS Thermoprinter 4B.

Las muestras se conservaron en arcones congeladores "Kelvinator", mods. AC-550 y ACK-55 y "Liebherr", mod. GT6102, así como en frigoríficos "Aspes", "Kelvinator", mod. AKR y "Liebherr" y en un armario frigorífico termostatado a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ construido por una firma local.

Las liofilizaciones se efectuaron en un aparato "Terruzzi Melvisa", mod. TP-3.

Las cromatografías de filtración en geles se realizaron utilizando columnas de diferentes dimensiones de las marcas "Pharmacia" y "Wright". Las fracciones cromatográficas se recogieron en colectores de fracciones "LKB-Bromma", mod. 7000 Ultrarac, y 2212 Helirac.

La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico se realizaron en una cubeta de electroforesis "Bio-Rad", mod. Protean II, empleando como fuente de alimentación un aparato "Shandon", mod. SAE 2761.

En los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), se emplearon placas de ELISA marca "Costar" mod. 3590 de 96 pocillos y la lectura de las mismas se efectuó en un lector de placas ELISA "Titertek Multiskan" mod. Plus.

En la determinación de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se empleó un cromatógrafo Beckman mod. 332, dotado de una columna (25 cm x 4,6 mm) de fase reversa Spherisorb ODS-2 (Supelco) y un detector U.V. Beckman mod. 160. El cromatograma se obtuvo en un integrador Hewlet Packard mod. HP-3394A.

Como material general de laboratorio se han utilizado pipetas, micropipetas automáticas "Gilson", mods. P20, P-200, P-1000, agitadores, mecheros de gas, termómetros, etc. El material de vidrio empleado fué siempre del tipo "Pirex".

III. 2. - MÉTODOSIII. 2. 1. - Medios de cultivo para el crecimiento de los microorganismosIII. 2. 1. 1. - Medios de cultivo empleados en el crecimiento de las bacterias
lácticas1. - Medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS, de "Oxoid")

Contiene:	g/l
Peptona	10,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
Dextrosa	20,0
Acetato sódico	5,0
Fosfato dipotásico	2,0
Citrato triamónico	2,0
Sulfato magnésico	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
Tween 80	1ml
pH 6,2	

Preparación

Se suspenden 52 g del medio MRS en 1000 ml de agua destilada calentando la solución hasta su disolución y esterilizándola en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Cuando el medio se depositaba en placas de Petri, a los componentes citados se les añadía 10,0 g de agar

bacteriológico ("Difco") y 7,5 g cuando se elaboraba el agar de MRS semisólido para los experimentos de inhibición.

2 - Medio mínimo-Triptosa (MM-Triptosa)

Contiene :	g/l
Triptosa	15,0
Dextrosa	10,0
Extracto de levadura	5,0
Cloruro sódico	2,0
Citrato amónico	2,0
Fosfato potásico dihidrogenado	1,0
Fosfato dipotásico	1,0
Sulfato magnésico	0,20
Sulfato manganeso	0,05
Sulfato ferroso	0,01
Tween 80	1 ml
pH 6,1	

Una vez disueltos los componentes citados en 1000 ml de agua destilada, la preparación de este medio se continúa siguiendo las instrucciones descritas para el medio MRS (Sección III. 2. 1. 1.). Se empleó este medio por que carece de componentes complejos, lo que facilita la purificación de las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas.

III. 2. 1. 2. - Medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos indicadores distintos de las bacterias lácticas

1. Caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI, "Oxoid")

Contiene:	g/l
Extracto de cerebro	12,5
Extracto de corazón	5,0
Proteasa-peptona	5,0
Cloruro sódico	5,0
Dextrosa	2,0
Fosfato disódico	2,5
pH 7,4	

Preparación

Se suspenden 37 g del producto deshidratado en polvo en un litro de agua destilada. Se continúa como se describe a propósito del medio MRS (Sección III. 2. 1. 1.).

III. 2. 1. 3.- Medio para cultivos mixtos de bacterias lácticas y microorganismos psicrotrofos

1. Caldo con Tween para todos los propósitos (APT, "Difco")

Contiene:	g/l
Triptona	12,5
Dextrosa	10,0

Extracto de levadura	7,5
Citrato sódico	5,0
Cloruro sódico	5,0
Fosfato dipotásico	5,0
Sulfato magnésico	0,8
Cloruro de manganeso	0,14
Sulfato ferroso	0,04
Clorhidrato de tiamina	0,001
Tween 80	0,2
pH	6,7

Preparación

Se suspenden 46,2 g del polvo deshidratado en un litro de agua destilada, suplementando el medio con 10 g de peptona ("Difco") y 8 g de extracto de carne ("Oxoid"). La preparación ulterior del medio es idéntica a la señalada para el medio MRS (Sección III. 2. 1. 1.1). Cuando el medio se depositaba en placas de Petri se les añadían 12 g de agar ("Difco") por litro.

III. 2. 2. - Aislamiento y selección de las bacterias lácticas de los embutidos crudos curados

Para el aislamiento de las bacterias lácticas se recogieron asépticamente 20 g de la porción central de los chorizos, que se homogenizaron durante 10 minutos en 180 ml de un medio que contenía peptona (1 g) y cloruro sódico (8,5 g), en agua destilada. A continuación, se sembraron alícuotas de las muestras homogenizadas en sistema de doble capa, en placas con

MRS-agar.

De las colonias crecidas, se replicaron 800 siguiendo el método aleatorio descrito por Ordóñez y col., (1979) evaluando su actividad antimicrobiana directa frente a *L. fermentum* CECT285. Las colonias seleccionadas de la forma descrita en la sección III.2.3.2.1 por su actividad antimicrobiana directa, se recogieron con un asa de platino y se sembraron en tubos que contenían caldo MRS, manteniendo los tubos durante 16h a 32 °C. A los cultivos obtenidos se les adicionó un 15% de glicerol estéril y se almacenaron en congelación a -20 °C hasta su posterior utilización.

III. 2. 3. - Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas

III. 2. 3. 1. - Soluciones tampón empleadas

1) Tampón de fosfato 4 mM, pH 7,0.

a. Solución de Na_2HPO_4 :

Contiene 0,76 g de Na_2HPO_4 en 1 litro de agua destilada.

b. Solución de NaH_2PO_4 4 mM:

Contiene 0,55 g de NaH_2PO_4 en 1 litro de agua destilada.

Preparación

Se añade la solución (b) a la (a) hasta que su pH alcanza el valor de 7,0.

III. 2. 3. 2. - Prueba directa de antagonismo

III. 2. 3. 2. 1. - Prueba directa de antagonismo por siembra en picadura

Esta técnica se empleó para evaluar la actividad inhibidora de un gran número de bacterias. Las colonias desarrolladas en placas de agar MRS se recogieron con palillos estériles y se replicaron por siembra en picadura en dos placas de agar MRS. En cada placa se depositaron 24 cepas y las placas se incubaron durante 6 horas a 32 °C para permitir a los aislados reiniciar su crecimiento. Después, en una de las placas en las que sembraron por picadura las colonias seleccionadas, se depositó la cepa indicadora de *L. fermentun* CECT 285 en 6 ml del agar MRS (0,8% de agar), a una concentración de aproximadamente 3×10^5 células. Una vez incubadas las placas durante 24 h a 32 °C, se recuperaron al azar, para su posterior estudio, las cepas que exhibían mayores y mejores halos de inhibición.

III. 2. 3. 3. - Detección de la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células

III. 2. 3. 3. 1. - Preparación de los sobrenadantes

Las bacterias lácticas seleccionadas se cultivaron en caldo MRS durante 16-18 h a 32 °C, mientras que los sobrenadantes libres de células se obtuvieron centrifugando los cultivos a 12.000 g durante 10 minutos. El pH de los sobrenadantes se ajustó a 6,2 con NaOH 1 N y, enseguida, se filtraron por un filtro de 0,22 μm de diámetro de poro. Los filtrados se liofilizaron y antes de su utilización se concentraron 20 veces, resuspendiéndose en el tampón de fosfato 4 mM, pH 7,0.

III. 2. 3. 3. 2. - Actividad inhibidora por el método de difusión en agar

Esta técnica consiste en sembrar 2×10^6 ufc/ml del microorganismo indicador en 20 ml del medio de cultivo correspondiente, depositándolo en una placa de petri. Las placas se mantiene a 37 °C durante 1 h y en el agar se hacen pocillos de 6 mm de diámetro, en los que se vierten 50 µl del sobrenadante libre de células. Posteriormente, las placas se incubaron a 4 °C durante 2 h y luego a 32 °C durante 48 h. La actividad inhibidora de los sobrenadantes se cuantificó midiendo las zonas de inhibición alrededor de los pocillos. Para ello se utilizó la expresión: Diámetro del halo de inhibición = (Radio de la zona de inhibición x 2 + diámetro del pocillo (6mm)).

III. 2. 4. - Identificación y caracterización bioquímica de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana

Las bacterias lácticas seleccionadas por su actividad inhibidora demostrada frente a diversos microorganismos indicadores, se sometieron a las pruebas de identificación y caracterización recomendadas por Schillinger y Lucke (1987b).

III. 2. 4. 1. - Morfología y tinción por el método de Gram

Las bacterias lácticas seleccionadas se tiñeron por el método de Gram y se observaron microscópicamente para determinar su morfología, así como sus afinidades tintoriales.

III. 2. 4. 2. - Prueba de la catalasa

La producción de catalasa se evaluó añadiendo una gota de peróxido de hidrógeno (110 vol) a una alícuota del cultivo a analizar. Como control positivo se empleó un cultivo de *Staph. aureus*. La prueba se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno por la catalasa dando agua y oxígeno, manifestándose este último por la aparición de burbujas.

III. 2. 4. 3. - Crecimiento a diversas temperaturas

El crecimiento a diversas temperaturas de las cepas seleccionadas se evaluó depositando alícuotas de cada una de ellos en tubos de ensayo que contenían caldo MRS. Los tubos se incubaron a las temperaturas de 4, 8, 16, 25 y 32 °C durante periodos variables de tiempo. El desarrollo de los cultivos se determinó a intervalos de tiempo regulares midiendo su absorbancia en Unidades Klett.

III. 2. 4. 4. - Tolerancia al cloruro sódico

La tolerancia de las bacterias seleccionadas a la sal se evaluó en caldo MRS suplementado con un 7 y un 10 % de NaCl, respectivamente. El medio, una vez inoculado, se incubó durante 4 días a 32 °C.

III. 2. 4. 5 - Tolerancia al pH de 3,9

El crecimiento de los cultivos a pH 3,9 se evaluó en caldo MRS cuyo pH se había ajustado a 3,9 con HCl 1N. El medio se incubó durante 5 días a 32 °C.

III. 2. 4. 6 - Hidrólisis de la arginina1) Caldo Arginina.

Contiene:	g/l
Peptona	10,0
Extracto de levadura	4,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato sódico	5,0
Citrato sódico	2,0
Sulfato magnésico	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
L - Arginina	3,0
Tween 80	1,0

Preparación

Una vez disueltos los componentes del medio, éste se distribuye en tubos que se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

2.) Reactivo de Nessler

a.) Solución 1.

Contiene:	
Yoduro potásico	7 g
yoduro mercurio	10 g
Agua destilada	40 ml

b.) Solución 2.

Contiene 10 g de NaOH en 50 ml de agua destilada.

Preparación

Una vez preparadas las dos soluciones (y dejada enfriar la solución 2), se mezclan en un matraz aforado de 100 ml y se añade agua destilada hasta enrasar. Se deja que sedimente el precipitado, se decanta el líquido sobrenadante claro, que se guarda, y se desecha el precipitado.

Sembradas las bacterias lácticas de interés en caldo de Arginina, se incuban a 32 °C durante 2 días; a 1 ml de estos cultivos se le añade 1 ml del reactivo de Nessler. La hidrólisis de la arginina, con formación de amoníaco, produce una alcalinidad que se manifiesta por el desarrollo de un color entre anaranjado y marrón.

III. 2. 4. 7. - Producción de gas a partir de glucosa

La producción de CO₂ a partir de la glucosa se evaluó de tres maneras diferentes:

1.) Introduciendo campanas de Durham en tubos con caldo MRS de cuya composición se suprime el citrato. Si las cepas producen gas durante la incubación de los tubos, éste se manifiesta por la presencia de burbujas en la campana.

2.) Colocando en los tubos de caldo MRS tapones de agar (0,75% p/v) y observando si durante la incubación de los tubos, aparecen acúmulos (burbujas) de las que pueden incluso desplazar el tapón de agar de los tubos.

3.) Observando la presencia de burbujas al desarrollarse los cultivos seleccionados en tubos con agar hierro de Klieger ("Difco"); que,

Contiene:	g/l
Peptona	5,0
Proteasa	5,0
Extracto de carne	3,0
Extracto de levadura	3,0
Lactosa	10,0
Dextrosa	1,0
Cloruro sódico	5,0
Tiosulfato sódico	0,3
Sulfato ferroso	0,2
Rojo fenol	0,024
Agar	12,0
pH 7,4 ± 0,2	

Preparación

Se suspenden los ingrediente del medio en agua destilada y se calienta hasta ebulición, distribuyéndolo posteriormente en tubos que se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. A continuación se dejan solidificar en pendiente. La producción de gas se observa por la fomación de burbujas en el medio.

III. 2. 4. 8. - Producción de ácido sulfídrico

III. 2. 4. 8. 1. - Técnica de Shay y Egan (1981)

1. Agar base de acetato de plomo (Difco).

Contiene:	g/l
Peptona	15,0
Proteosa	5,0
Dextrosa	1,0
Acetato de plomo	0,2
Tiosulfato sódico	0,08
Agar	15,0
pH 6,6	

Preparación

Se suspenden 36 g del medio deshidratado, 1 ml de Tween 80 y 0,05 g de sulfato de manganeso en 1 litro de agua destilada. La suspensión se calienta hasta la ebulición y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El medio esterilizado se deja enfriar hasta 45 °C para distribuirlo finalmente en placas.

Si las colonias desarrolladas en las placas incubadas a 32 °C durante 3 días producen ácido sulfídrico, se observa un ennegrecimiento del medio.

III. 2. 4. 8. 2. - Agar hierro de Klieger

Los cultivos seleccionados se inocularon en tubos inclinados de agar hierro de Klieger,

tanto en picadura como en estría. Los tubos se incubaron durante 7 días a 32 °C, manifestándose la producción de ácido sulfhídrico por un ennegrecimiento del medio.

III. 2. 4. 9. - Prueba de Voges-Proskauer

a.) Caldo MR-VP.

Contiene:	g/l
Peptona	7,0
Fosfato dipotásico	5,0
Dextrosa	5,0
pH 7,5	

b.) Solución de α -naftol en etanol.

Contiene:	
α Naftol	6 g
Etanol	100ml

c.) Solución de hidróxido potásico.

Contiene:	
KOH	40 g
Agua destilada	100 ml

Preparación

Una vez disuelto el medio (a) se distribuye en tubos que se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Sembrado el inóculo de la cepa problema e incubados los tubos a

32 °C, a 5 ml de los cultivos se añaden 0,5 ml de la solución (b) y 0,5 de la (c) y se observa el cambio de coloración del medio.. El desarrollo de un color rojo intenso se debe a la producción de acetil metil carbinol a partir de la dextrosa que, en presencia de KOH, reacciona con el α -naftol.

III. 2. 4. 10. - Fermentación de carbohidratos

1) Medio API CHL ("BioMérieux")

Contiene:	g/l
Peptona	10,0
Extracto de levadura	5,0
Tween 80	1,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato sódico	5,0
Citrato diamónico	2,0
Sulfato magnésico	0,20
Sulfato de manganeso	0,05
Bromocresol púrpura	0,17
	pH 6,9 - 7,0

2) Tiras API 50 CH ("BioMérieux")

Cada tira contiene los siguientes carbohidratos: 0. control; 1. glicerol; 2. eritritol; 3. D-arabinosa; 4. L-arabinosa; 5. ribosa; 6. D-xilosa; 7. L-xilosa; 8. adonitol; 9. β - metil D-xilósido; 10. galactosa; 11. glucosa; 12. fructosa; 13. manosa; 14. sorbosa; 15.

ramnosa; 16. dulcitol; 17. inositol; 18. manitol; 19. sorbitol; 20. α - metil D - manósido; 21. α -metil D-glucósido; 22. N-acetil glucosamina; 23. amigdalina; 24. arbutina. 25. esculina; 26. salicina; 27. celobiosa; 28. maltosa; 29. lactosa; 30. melibiosa; 31. sacarosa; 32. trehalosa; 33. inulina; 34. melecitosa; 35. rafinosa; 36. almidón; 37. glucógeno; 38. silitol; 39. gentibiosa; 40. D-turanosa; 41. D-lixosa; 42. D-tagatosa; 43. D-fucosa; 44. L-fucosa; 45. D-arabitol; 46. L-arabitol; 47. gluconato; 48. 2-cetogluconato y 49. 5-cetogluconato.

Procedimiento

Los cultivos seleccionados, desarrollados previamente en caldo MRS, se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos y el sedimento (las células) obtenido se resuspendió en el medio API CHL. El sedimento resuspendido se depositó en microtubos en los que se encuentran los carbohidratos. La zona aeróbica de los microtubos (superficie) se cubrió con aceite de parafina para crear las condiciones de anaerobiosis requeridas. Las tiras con los distintos microtubos se incubaron a 32 °C, realizando dos lecturas de las mismas a las 24 y 48 h, respectivamente. La fermentación de los carbohidratos se manifiesta por un cambio de color del contenido del microtubo, debido a la producción anaeróbica de ácido, que es detectado por el indicador de pH incluido en el medio API CHL.

III. 2. 5. - Espectro antimicrobiano de la sustancia inhibidora producida por las cepas de *Pediococcus* sp. números 209, 211, 241, 346, 347 y 438

El espectro antimicrobiano de la sustancia inhibidora producida por diversas cepas de *Pediococcus* sp., se determinó evaluando la actividad inhibidora de su sobrenadante concentrado libre de células, frente a los microorganismos indicadores citados en la Tabla III.1

y según se describe en la sección III. 2. 3. 3. 1. La actividad inhibidora se determinó midiendo los halos de inhibición alrededor de los pocillos y se expresó de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3. 2.

III. 2. 6. - Crecimiento de *Pediococcus* sp. 347, cinética del desarrollo y producción de la sustancia antimicrobiana a diversas temperaturas

III. 2. 6. 1. - Crecimiento de los cultivos

Alícuotas de 100 µl de un cultivo de *Pediococcus* sp n° 347 se inocularon en tubos con caldo MRS y MM-Triptosa y se incubaron a 4, 8, 16, 25 y 32 °C durante 7 días, 5 días, 30 h, 16 h y 12 h respectivamente. El desarrollo de los cultivos se estimó por turbidimetría y con los datos obtenidos se calcularon los parámetros cinéticos del desarrollo microbiano que se describen en la sección III.2.6.2. En los mismos intervalos se determinó el pH de los cultivos.

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes obtenidos en cada intervalo, se determinó como se indica en la sección III. 2. 3. 3. 2., utilizando *Lactobacillus fermentum* CECT285 como microorganismo indicador .

III. 2. 6. 2. - Parámetros cinéticos del desarrollo microbiano

III. 2. 6. 2. 1. - Velocidad específica de crecimiento (μ)

Se define como el incremento de la masa celular de los cultivos con respecto al tiempo de incubación y se calcula a partir de la ecuación de la recta de regresión de una gráfica que representa la masa celular de los cultivos en función del tiempo de incubación (figura 3.1).

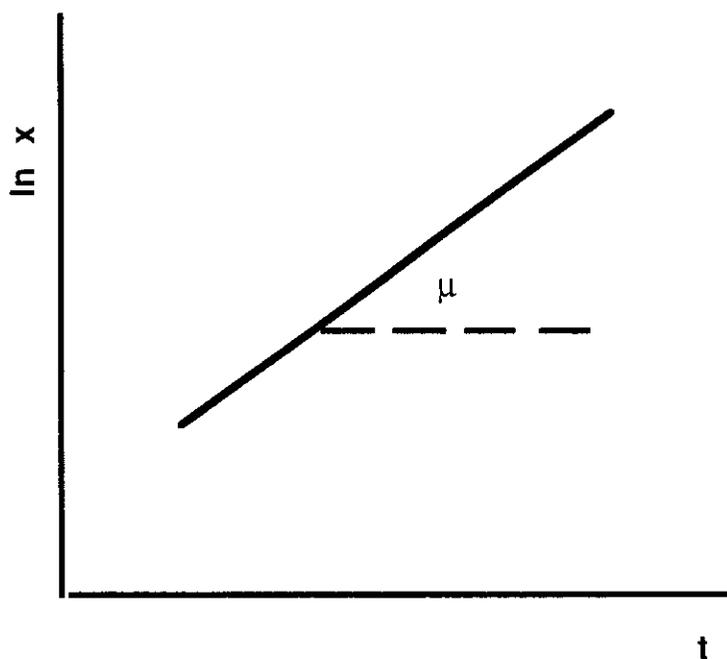


Figura 3. 1.- Representación gráfica teórica del incremento de la masa celular de los cultivos en función del tiempo de incubación.

De la figura 3.1 se deduce que:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

siendo "x" la densidad óptica de los cultivos en unidades Klett, "t" el tiempo de incubación en horas y "μ" la velocidad específica de crecimiento.

Asimismo,

$$\int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{x} = \int_0^t \mu dt;$$

$$\ln \frac{x_2}{x_1} = \mu t; \text{ por tanto, } \mu = \frac{\ln \frac{x_2}{x_1}}{t}$$

III. 2. 6. 2. 2. - Tiempo de duplicación (t_d)

Se define como el tiempo que tardan los cultivos en duplicar su masa celular a una temperatura de incubación determinada. Así, partiendo de la expresión:

$$\ln \frac{X_2}{X_1} = \mu t; \text{ cuando } X_2 = 2X_1; \quad \ln \frac{2X_1}{X_1} = \mu t_d; \quad \ln 2 = \mu t_d; \quad t_d = \frac{0,693}{\mu}$$

III. 2. 6. 2. 3. - Número de generaciones por hora (g/h)

Este término indica el número de generaciones microbianas de los cultivos en una hora a una temperatura determinada, y su valor se corresponde con el inverso del tiempo de duplicación (t_d).

III. 2. 6. 2. 4. - Determinación del peso celular seco

El peso celular seco se determinó por interpolación en una gráfica (figura 3.2) en la que se representa el peso celular seco con respecto a la absorbancia en Unidades Klett.

III. 2. 6. 2. 4. 1. - Elaboración de la recta patrón para la determinación del peso celular seco

Para determinar la recta patrón se prepararon una serie de tubos con medios de cultivos estériles de MRS y MM-Triptosa, que se inocularon con *Pediococcus* sp n° 347 y se incubaron a 32 °C.

La absorbancia de los cultivos se determinó a ciertos intervalos de tiempo al progresar el tiempo de incubación; para ello se tomaban alícuotas de 5 ml de los medios de cultivo a intervalos regulares en los que se determinaron las unidades Klett hasta que éstas se estacionaron (ya no aumentaban más).

Las alícuotas se filtraron por filtros Millipore, de 0,45 µm de diámetro de poro, previamente tarados. Los filtros, en los que habían quedado retenidas las células, se introdujeron en placas de Petri de vidrio y se desecaron durante 10 h a 80 °C. El peso celular seco (ng/ml), correspondiente a cada absorbancia se estableció determinando la diferencia en peso del filtro, con y sin microorganismos, dividida por 5. La absorbancia en Unidades Klett se relacionó con el peso celular seco mediante una recta de regresión (fig. 3.2).

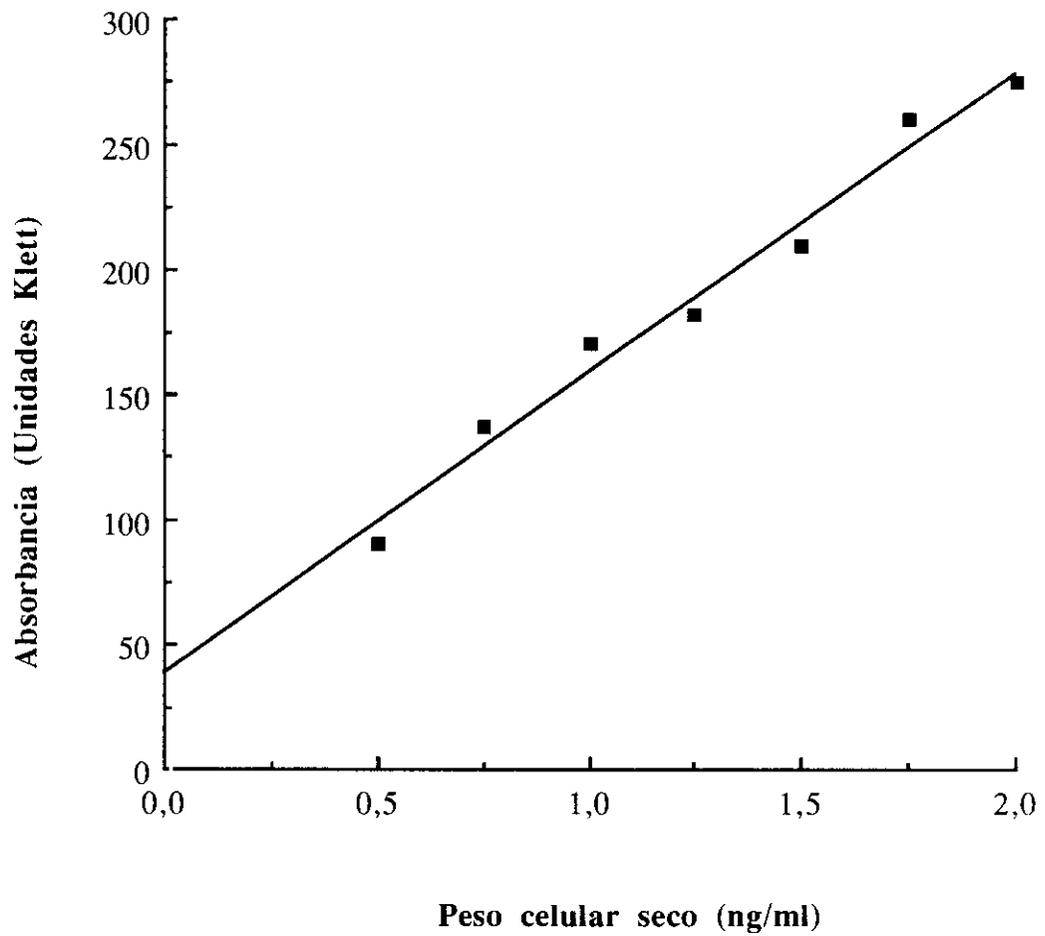


Figura 3. 2.- Recta patrón para la determinación del peso celular seco en virtud de la absorbancia del medio de cultivo.

III. 2. 7. - Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347

III. 2. 7. 1. - Efecto de la composición del medio de cultivo en la actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347

Para estudiar el efecto del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, este se sembró en diversos medios de cultivo que se incubaron durante 16 h a 32 °C. Los medios empleados fueron los siguientes:

- 1.) Medio de APT
- 2.) Medio de APT, suplementado por litro:
 - a) con 10 g de triptosa (APT-Triptosa)
 - b) con 10 g de proteosa-peptona (APT-Proteosa)
 - c) con 10 g de peptona (APT-Peptona)
 - d) con 10 g de extracto de carne (APT-Extracto de carne)
- 3.) Medio BHI
- 4.) Medio BHI, con las suplementaciones descritas:
 - a) BHI-Triptosa
 - b) BHI-Proteosa
 - c) BHI-Peptona
 - d) BHI-Extracto de carne

5.) Medio base, suplementado por litro:

- a) con 15 g de triptosa (MM-Triptosa)
- b) con 15 g de proteosa (MM-Proteosa)
- c) con 15 g de peptona (MM-Peptona)
- d) con 15 g de extracto de carne (MM-Extracto de carne)
- e) con 15 g de caseína (MM-Caseína)
- f) con 15 g de triptona (MM-Triptona)

Terminada la incubación se prepararon los sobrenadantes concentrados libres de células y se determinó su actividad antimicrobiana de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3. 2., utilizando a *L. fermentum* CECT285 como microorganismo indicador.

III. 2. 7. 2. - Efecto de diversos enzimas en la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347

Para determinar la sensibilidad de la actividad inhibidora a los enzimas tripsina, pepsina, papaína, proteasa II, proteasa XIV, α -amilasa, lipasa I y lipasa VII, 60 μ l de los sobrenadantes concentrados libres de células, se depositaron en pocillos de placas de ELISA que contenían 60 μ l de soluciones de los distintos enzimas, de tal manera que la concentración final del enzima en los pocillos fuese de 1 y 5 mg/ml. La actividad antimicrobiana residual de los pocillos se determinó tras 2, 8, y 20 h de incubación de las placas a 37 °C, según el método descrito en la sección III. 2. 3. 3. 2; como microorganismo indicador se utilizó *L. fermentum* CECT285.

III. 2. 7. 3. - Cinética de termodestrucción de la actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347

III. 2. 7. 3. 1. - Tratamiento térmico

Viales de vidrio (10 x 30 mm) herméticamente cerrados con 0,1 ml del sobrenadante concentrado de *Pediococcus* sp. 347, se calentaron a 80, 100, 121, 135 y 150 °C en un baño de glicerina termostataado, durante intervalos de tiempo variables en función de la temperatura de calentamiento. Finalizado el tratamiento térmico las muestras se enfriaron rápidamente en un baño de hielo picado determinandose la actividad antimicrobiana residual de las muestras de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3. 2., empleando como indicador a *L. fermentum* CECT285.

III. 2. 7. 3. 2. - Parámetros cinéticos de termodestrucción

A) Valor "D" o tiempo de reducción decimal

Se define, arbitrariamente, como el tiempo necesario para reducir en un 90 % la actividad inhibidora inicial del sobrenadante concentrado de *Pediococcus* sp 347 a una temperatura determinada, y se corresponde con el tiempo en el que la curva de supervivencia atraviesa un ciclo logarítmico. El término se calcula a partir de la ecuación de la recta de regresión de un gráfica de termodestrucción, que representa el logarítmico del porcentaje de la actividad inhibidora inicial en función del tiempo de calentamiento (figura 3. 3).

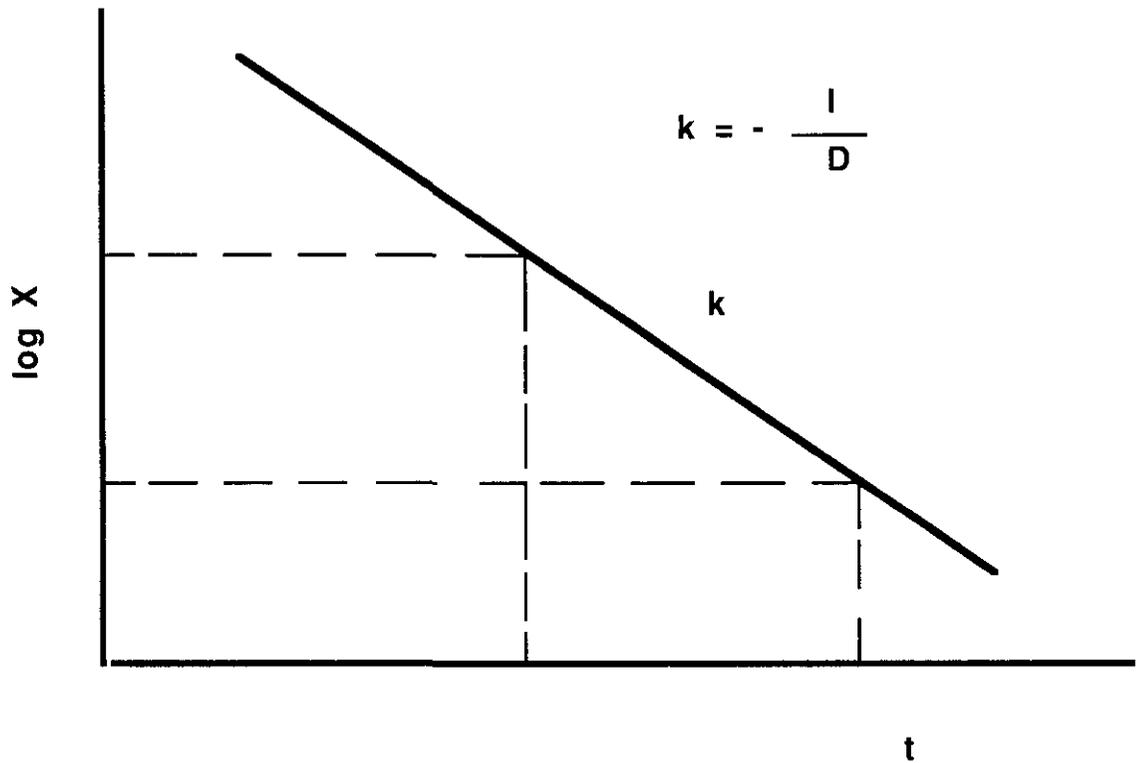


Figura 3. 3. - Representación gráfica teórica de la actividad inhibidora en función de la temperatura de calentamiento.

De la figura 3. 3, se deduce que:

$$\log x = - Kt + C$$

siendo "x" el % de actividad inhibidora residual; "k" la constante de inactivación en min^{-1} y "t" el tiempo de calentamiento de las muestras.

Asimismo:

$$(\log x_2 - \log x_1) = -K (t_2 - t_1)$$

$$K = \frac{\log x_2 - \log x_1}{t_1 - t_2}; \quad \frac{1}{D} = \frac{\log x_2 - \log x_1}{t_1 - t_2}; \quad D = \frac{t_1 - t_2}{\log x_2 - \log x_1}$$

B) Tiempo medio ($t_{1/2}$)

Se define como el tiempo en el que la actividad inhibidora inicial se reduce en un 50 % a una temperatura determinada. El término puede calcularse gráficamente (figura 3. 4), representando la variación de la actividad inhibidora inicial en función del tiempo de calentamiento, o bien matemáticamente, asumiendo que el cambio de la actividad inhibidora con respecto al tiempo es función de la actividad inhibidora inicial (ecuaciones 1 y 2)

$$- \frac{dX}{dt} = kX \quad (1)$$

$$- \frac{dX}{X} = kdt \quad (2);$$

donde "x" representa la actividad inhibidora, "t" el tiempo de calentamiento a una determinada temperatura y "k" la constante de inactivación de la actividad inhibidora en min^{-1} .

Integrando la expresión (2) entre dos valores de x diferentes (x_0 y x) a (t_0 y t) y siendo

x_0 la actividad inhibitora inicial en el tiempo t_0 , resulta:

$$-\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = k \int_{t_0}^t dt; \ln \frac{x_0}{x} = k(t - t_0) \text{ ó } 2,3 \log \frac{x_0}{x} = k(t - t_0)$$

$$\text{Si } x = 50, \quad 2,3 \log \frac{100}{50} = k t_{1/2}; \quad t_{1/2} = \frac{2,3 \log 2}{k}; \quad t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

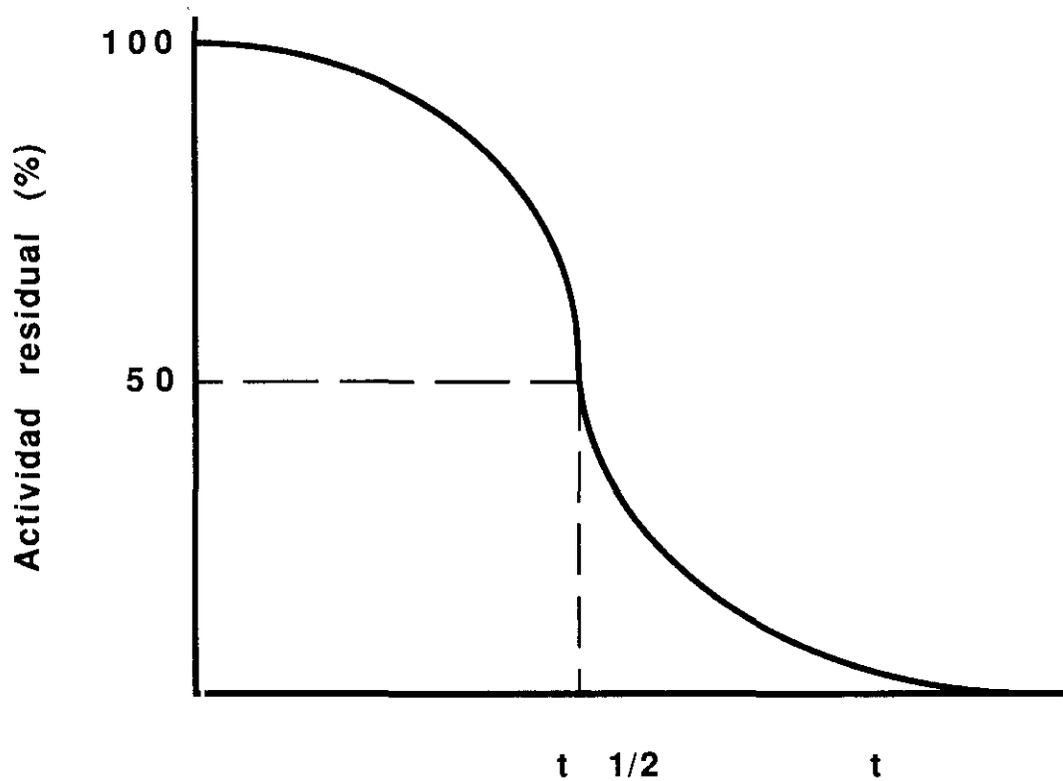


Figura 3. 4.- Representación gráfica teórica de la actividad inhibitora en función del tiempo de calentamiento.

C) Valor "Z"

Se define como la temperatura necesaria para disminuir el valor "D" en un 90 %, y se calcula a partir de la ecuación de la recta de regresión, obtenida al representar gráficamente el logaritmo de los valores "D" en función de la temperatura a la que fueron obtenidos (figura 3.5).

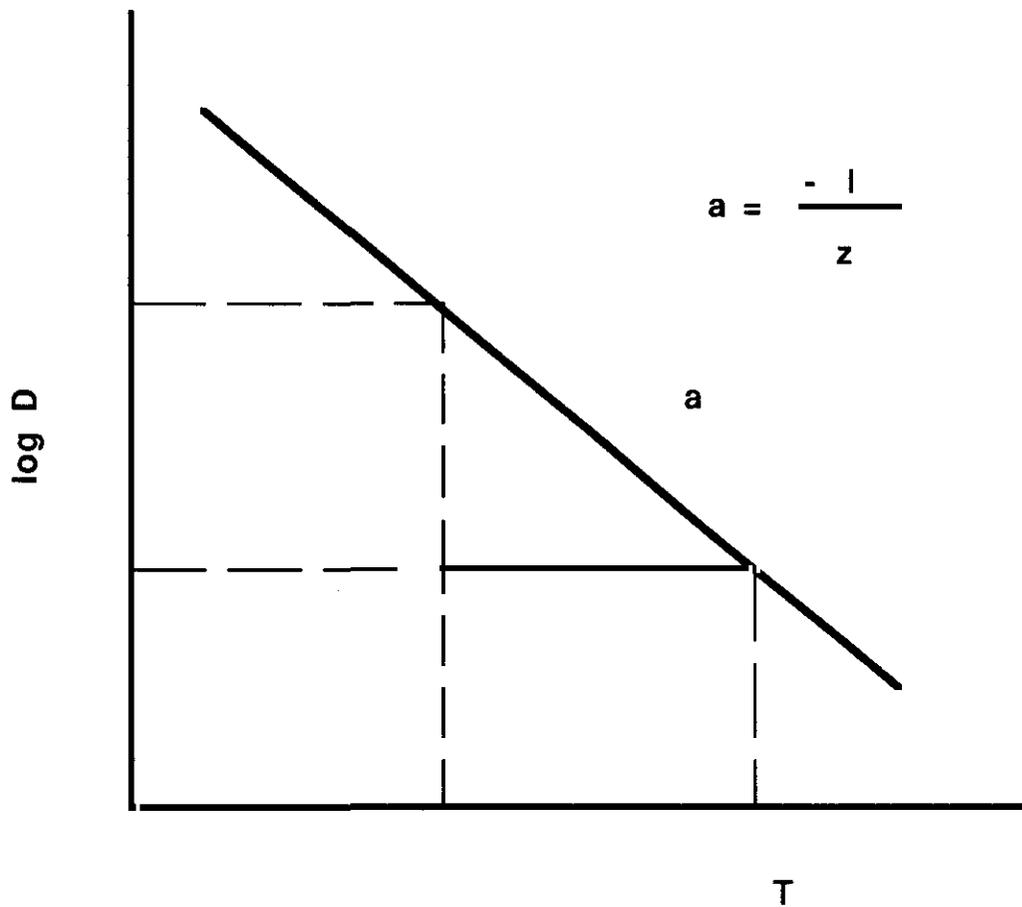


Figura 3. 5. - Representación gráfica teórica de los valores "D" en función de la temperatura.

De la figura 3.5 se deduce que:

$$\log D = a T + C$$

donde "D" es el tiempo de reducción decimal a una determinada temperatura y "T" es la temperatura del tratamiento térmico en °C.

$$\text{Si por definición, } a = -\frac{1}{z}, \quad \log D = -\frac{-1}{z} T + C$$

$$\log D_2 - \log D_1 = -\frac{1}{z} (T_2 - T_1), \quad \log D_2 - \log D_1 = \frac{1}{z} (T_1 - T_2)$$

$$z = \frac{T_1 - T_2}{\log D_2 - \log D_1}$$

III. 2. 7. 4. - Mecanismo de acción de la sustancia inhibidora de *Pediococcus* sp. 347

A 5 ml de medio ATP recién sembrado con *L. fermentum* CECT 285 (5×10^5 ufc/ml) se le añaden 0,5 ml del sobrenadante concentrado de un cultivo de *Pediococcus* sp. 347. Los cultivos se incuban a 32 °C durante 5 h y, a continuación, se depositan alícuotas de dicho cultivo en placas de MRS. Como control se realiza una experiencia similar en la que al cultivo del microorganismo indicador se le añaden 0,5 ml del sobrenadante concentrado de un cultivo de *Pediococcus* sp. 32, microorganismo cuyos sobrenadantes concentrados no mostraron actividad inhibidora detectable alguna.

El mecanismo de acción de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 se consideraría bactericida si se observa una disminución en la viabilidad del microorganismo

indicador y, bacteriostática, cuando el número de ufc/ml del microorganismo indicador se estaciona respecto de su cifra inicial.

III. 2. 8. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347

III. 2. 8. 1. - Cromatografía de filtración en geles

Esta técnica cromatográfica se basa en la separación de las moléculas por su tamaño molecular.

III. 2. 8. 1. 1. - Soluciones tampón empleadas

1.) Tampón de ácido cítrico-fosfato, pH 5,6

(a) Solución de ácido cítrico, 0,1 M.

Contiene 21,01 g de ácido cítrico por litro de agua destilada.

(b) Solución de Na_2HPO_4 , 0,2M.

Contiene 28,4 g de Na_2HPO_4 por litro de agua destilada.

Preparación.

Se mezclan 42 ml de ácido cítrico 0,1 M con 58 ml de Na_2HPO_4 , 0,2 M.

2.) Tampón de ácido cítrico-fosfato, pH 5,6, con urea 0,1 M, 1 M y 6 M

A la solución base (III. 2. 8. 1. 1.), se le añaden respectivamente, 6 g, 60 g o 360 g de urea por litro de solución.

III. 2. 8. 1. 2. - Geles

El Sephadex es un polímero resultante de la formación de enlaces cruzados entre las moléculas de dextrano y de epíclorhidrina. Debido al gran número de grupos hidroxilo de su molécula, este polímero es muy hidrofílico y se hincha fácilmente en el agua y en soluciones electrolíticas. Los tipos de Sephadex difieren en su grado de entrecruzamiento, por lo que se utilizan para alcanzar fraccionamientos con diversos intervalos de tamaño molecular; en el caso de los Sephadex G-150, G-75 y G-50 son, respectivamente, de 5.000 a 300.000 daltons, de 3.000 a 80.000 daltons y de 1.500 a 30.000 daltons.

Los geles se prepararon y activaron según las normas de la casa suministradora ("Pharmacia Fine Chemicals"). Los geles hidratados se conservaron en refrigeración hasta su utilización.

III. 2. 8. 1. 3. - Condiciones de trabajo

El sobrenadante libre de células y liofilizado de *Pediococcus* sp 347, desarrollado en MM-triptosa, se resuspendió en tampón de ácido cítrico-fosfato de pH 5,6 y urea 1 M, mientras que, como tampón de elución, se empleó tampón de ácido cítrico-fosfato de pH 5,6 y urea 0,1 M. La cromatografía se realizó en una cámara termostataada a 0 - 4 °C y el eluato cromatografiado se recogió en un colector de fracciones.

El sobrenadante concentrado de *Pediococcus* sp 347 se resuspendió en tampón de ácido cítrico-fosfato, de pH 5,6 y urea 1 M, hasta una concentración 20 veces mayor que la inicial y 20 ml de esta solución se depositaron en una columna (3,2 x 40 cm) de Sephadex G - 150, previamente equilibrada con tampón de ácido cítrico-fosfato, de pH 5,6 y urea 0,1 M. El contenido proteico del eluato se determinó en alícuotas de 5 ml, mediante lectura espectrofotométrica a 280 nm, mientras que su actividad inhibidora se evaluó de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3. 2. Como microorganismo indicador se utilizó *L. fermentum* CECT285. Las fracciones cromatográficas con actividad antimicrobiana se juntaron, liofilizaron y resuspendieron en el tampón de elución para depositarlas de nuevo en una columna (2,5 x 90 cm) de Sephadex G-75, previamente equilibrada con el tampón de elución. Las fracciones eluidas dotadas de actividad antimicrobiana se manipularon como se ha descrito antes y se depositaron de nuevo en una tercera columna (1,6 x 90 cm) de Sephadex G-50. Las fracciones cromatográficas con actividad antimicrobiana se juntaron, liofilizaron y se mantuvieron en un desecador a 4 °C hasta su utilización posterior.

III. 2. 8. 2. - Determinación de la proteína

Se realizó por la técnica de Lowry, según la modificación de Markwell y col. (1978). La técnica se basa en el desarrollo de color al poner en contacto las proteínas con los reactivos que se detallan más adelante. El desarrollo del color se debe a una combinación de reacciones:

a.) Formación de un complejo entre los enlaces peptídicos de las proteínas con el cobre en un medio alcalino (reacción tipo Biuret).

b.) Reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por la tirosina y el triptófano.

Esta técnica pone de manifiesto los grupos fenoles presentes en las proteínas; por ello

es necesario extrapolar los resultados a una curva patrón construída con anterioridad. Como proteína estándar para construir la curva patrón se empleó la seroalbúmina bovina fracción V de Cohn (figura 3. 6).

Reactivos:

- Solución A: Na_2CO_3 al 2 %, NaOH al 0,4 % y tartrato sódico potásico ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ($4\text{H}_2\text{O}$) al 16 % en agua destilada.
- Solución B: $\text{CuSO}_4(5\text{H}_2\text{O})$ al 4 % en agua destilada.
- Solución C: Se obtiene mezclando 100 volúmenes de la solución A con 1 volumen de la solución B.

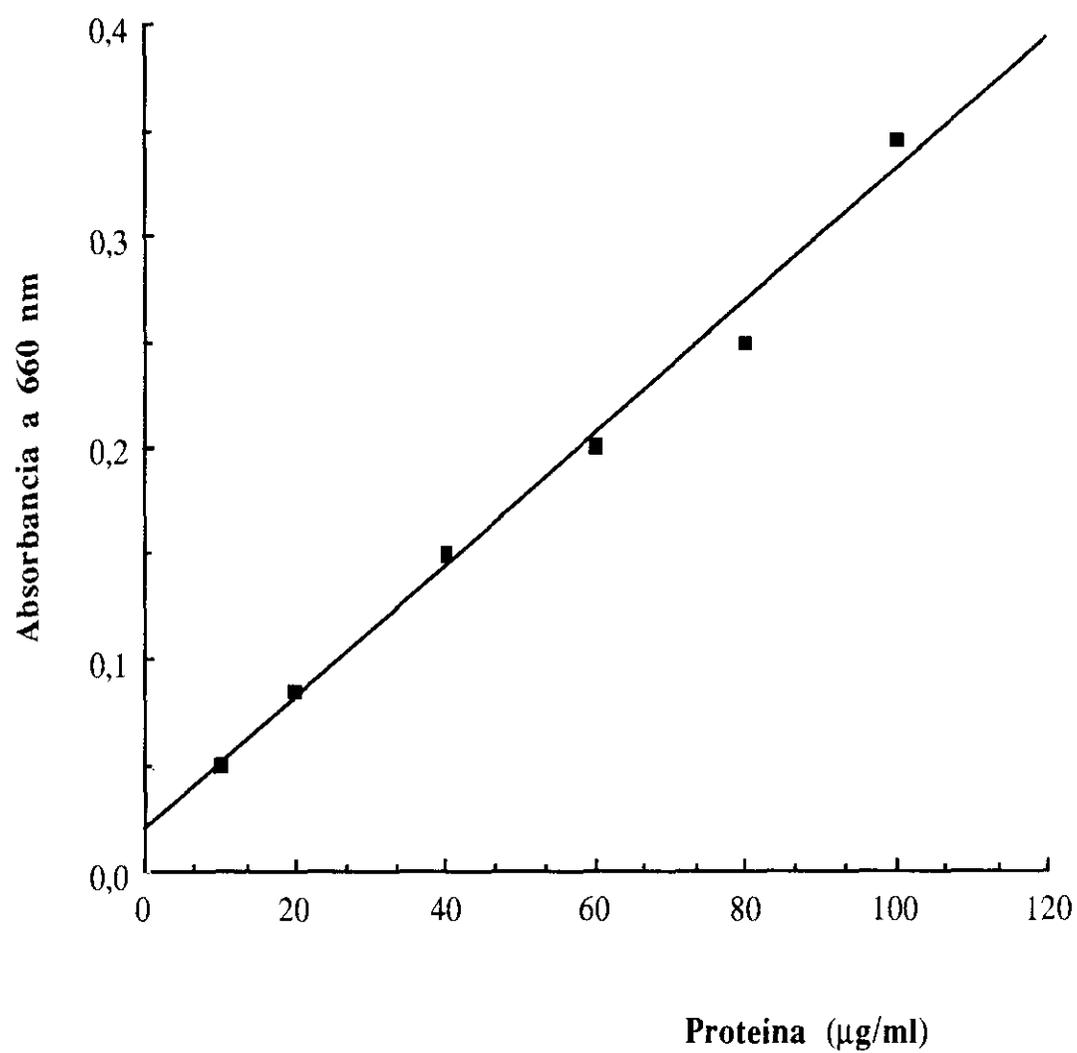


Figura 3. 6. - Recta patrón para la determinación de proteína por el método de Lowry modificado.

- Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada en una proporción 1:1 (v/v).

Procedimiento.

A 1 ml de una muestra que contenga entre 10 y 100 μg de proteína se le añaden 3 ml de la solución C; la mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se adicionan 0,3 ml de la solución D, agitándola inmediatamente y dejándola reaccionar durante 45 minutos, al término de los cuales se mide el incremento de la absorbancia a 660 nm con referencia a un blanco preparado de la misma manera pero con agua destilada.

III. 2. 8. 3. - Determinación del peso molecular de la sustancia inhibidora por cromatografía de filtración en Sephadex G-50

para La determinación del peso molecular de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de la manera descrita en la sección III. 2. 7. 3., se realizó por cromatografía de filtración en Sephadex G-50. Para ello 20 mg de esta sustancia, disueltos en 3 ml de tampón de ácido cítrico-fosfato de pH 5,6 y urea 1M se depositaron en la columna (1,6 x 90 cm) que contenía el Sephadex G-50, determinándose posteriormente la absorbancia a 280 nm y la actividad antimicrobiana de las fracciones eluidas resultantes.

A continuación en la misma columna se depositaron 3 ml de una solución de 5 mg de dextrano azul, 6 mg de α -quimotripsinógeno A (25.000 daltons), 8 mg de RNasa pancreática bovina (13.700 daltons) y 1 mg de vitamina B₁₂ (1.300 daltons), disueltos en el mismo tampón en el que lo fué la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp.

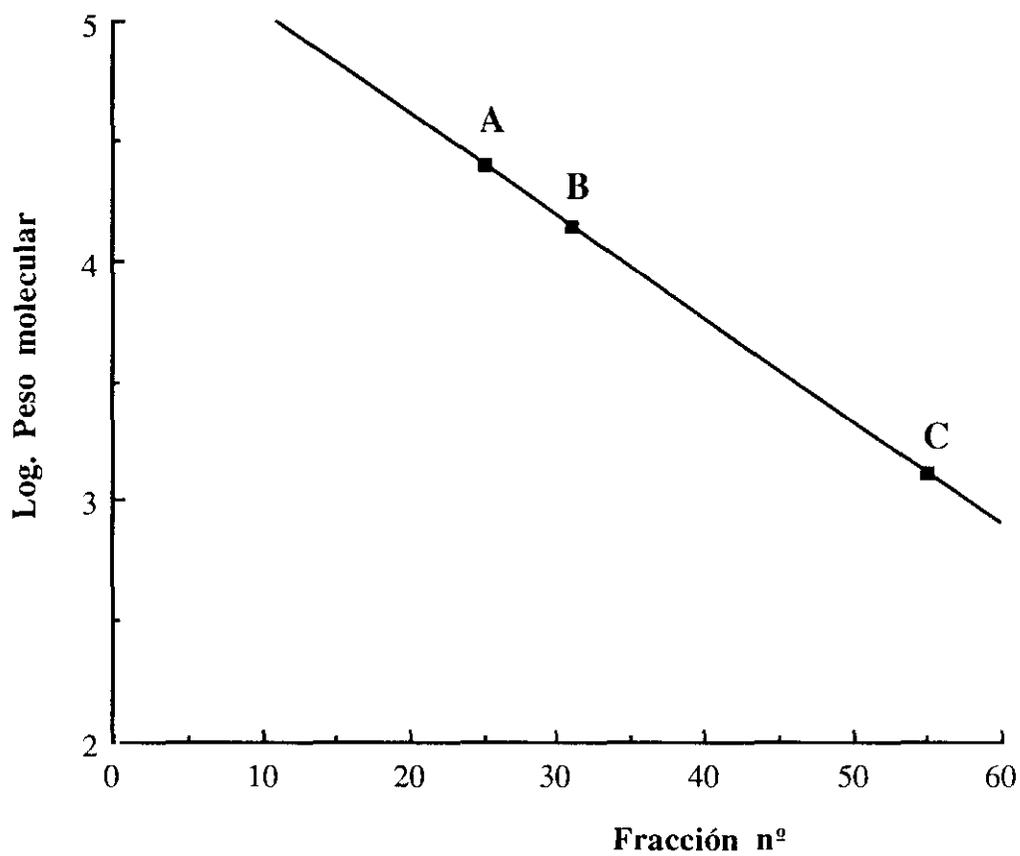


Figura 3. 7. - Recta patrón para la determinación de pesos moleculares por cromatografía de filtración en Sephadex G-50. (A) α -quimotripsinógeno, (B) RNAsa pancreática bovina, (C) vitamina B₁₂.

347. La absorbancia de las fracciones eluidas se determinó a 280 nm, mientras el peso molecular de la sustancia problema se determinó por interpolación en una gráfica (figura 3. 7), en la que se representaba el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas estándar en función de la fracción cromatográfica en la que se encontraban.

III. 2. 8. 4. - Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Esta técnica permite separar mezclas complejas de polipéptidos en función de su tamaño molecular. La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se realizó según las técnicas de Swank y Munkres (1971) y de Laemli (1970). El dodecil sulfato sódico es un detergente que con otros agentes, como el mercaptoetanol y el calor, interviene en la formación de subunidades proteicas y además proporciona a las cadenas polipeptídicas una densidad de carga similar. De esta forma cuando el complejo SDS-proteína se somete a electroforesis en un gel que contiene SDS, su velocidad de migración viene determinada principalmente por la masa de la partícula SDS-polipéptido según el principio de exclusión molecular. El campo eléctrico, en este caso, sólo suministra la fuerza impulsora.

III. 2. 8. 4. 1. - Técnica de Swank y Munkres (1971)III. 2. 8. 4. 1. 1. - Tampones, geles y soluciones empleadas1.) Tampón para solubilizar las muestras

Contiene:

Urea	4,8	g
β -mercaptoetanol	10,5	ml
Dodecil sulfato sódico	0,25	g

Completar con ácido ortofosfórico 0,01 M hasta 10 ml.

2.) Tampón de ácido fosfórico 1 M-SDS, pH 6,8

Contiene:

Acido ortofosfórico (85%)	33,7	ml
Dodecil sulfato sódico	5,0	g
Completar con agua destilada hasta	500	ml.

El pH se ajusta a 6,8 con Tris.

3.) Solución de acrilamida-bisacrilamida

Contiene:

Acrilamida	18,75	g
N,N'-metilén-bisacrilamida	1,87	g
Completar con agua destilada hasta	50	ml.

4.) Gel de separación

contiene:

Solución de acrilamida-bisacrilamida	9,99	ml
Tampón de ácido fosfórico 1 M-SDS	3	ml
Urea	14,4	g
Agua destilada	29,0	ml
Temed(N,N,N',N', tetrametilén-etilen-diamina)	9	ml
Persulfato amónico (6 %)	0,1	ml

6.) Tampón de electroforesis

Contiene:

Tampón de ácido fosfórico 1 M-SDS	0,225
Agua destilada	2,225

7.) Solución de fijación

Contiene isopropanol: ácido acético:agua destilada (2,5:10:6,5 v/v).

8.) Solución de tinción

Consiste en una solución de azul brillante de Coomassie al 2 % en ácido acético al 7 %.

9.) Solución de lavado

Es una solución al 7 % de ácido acético en agua destilada.

III. 2. 8. 4. 1. 2. - Preparación de las muestras

Las muestras solubilizadas en el tampón de solubilización, con 50, 100 y 200 μg de la sustancia antimicrobiana, parcialmente purificada, se mantuvieron durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo antes de depositar 30 μl de cada solución en el gel de concentración.

III. 2. 8. 4. 1. 3. - Preparación de los geles

Los geles se prepararon de la manera descrita por Swank y Munkres (1971). El gel consta de dos porciones: fase inferior (gel de separación) y superior (gel de concentración). Los geles se prepararon como se describe en las secciones III. 2. 8. 1. 4 y III. 2. 8. 1. 5. Para evitar en los geles la presencia de burbujas de aire la mezcla se desgasificó por sonicación en un baño, durante 5 minutos, antes de añadirle el TEMED y el persulfato amónico. Los receptáculos de formación de los geles se llenaron primero con los componentes del gel de separación hasta unos 3 cm de su extremo superior; en su superficie y, para que no se formasen meniscos, se depositó un pequeño volumen de una solución saturada de butanol. La mezcla se mantuvo durante 1 h a 37 °C y una vez polimerizada, se retiró el butanol y se lavó abundantemente con agua destilada. A continuación, se depositó el gel de concentración y se introdujo el peine que forma los pocillos donde se depositarán las muestras. La última solución se polimeriza durante 30 minutos a 37 °C, quedando el gel listo para realizar la electroforesis.

III. 2. 8. 4. 1. 4. - Electroforesis

La electroforesis se realizó pasando por el gel una corriente de 18-20 mA, y evitando las temperaturas inferiores a 16 °C para minimizar el riesgo de precipitación de la urea. Finalizada la electroforesis, el gel se extrajo de los vidrios de soporte.

III. 2. 8. 4. 1. 5. - Tinción de los geles

Terminada la electroforesis, los geles se introdujeron en una cubeta con la solución de fijación y se mantuvieron fijándose durante, aproximadamente 8 h, cambiando la solución de fijación 2 ó 3 veces. A continuación se introdujeron en otra cubeta con la solución de tinción donde se mantuvieron durante 2 h a temperatura ambiente. La eliminación del colorante no fijado se realizó con la solución de lavado.

III. 2. 8. 4. 1. 6. - Determinación del peso molecular (Swank y Munkres 1971)

El peso molecular de la sustancia inhibidora parcialmente purificada se determinó por interpolación en una gráfica en la que se representa el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar frente a su distancia de migración en el gel (figura 3.8). Las proteínas utilizadas en la confección de la recta patrón procedían de un "kit" comercial que contenía las siguientes proteínas estándar de alto peso molecular: α -lactoalbúmina (14,2 KD), proteína inhibidora de la tripsina (20,1 KD), tripsinógeno (24 KD), anhidrasa carbónica (29 KD), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (36 KD), ovoalbúmina (45 KD) y seroalbúmina bovina (66 KD).

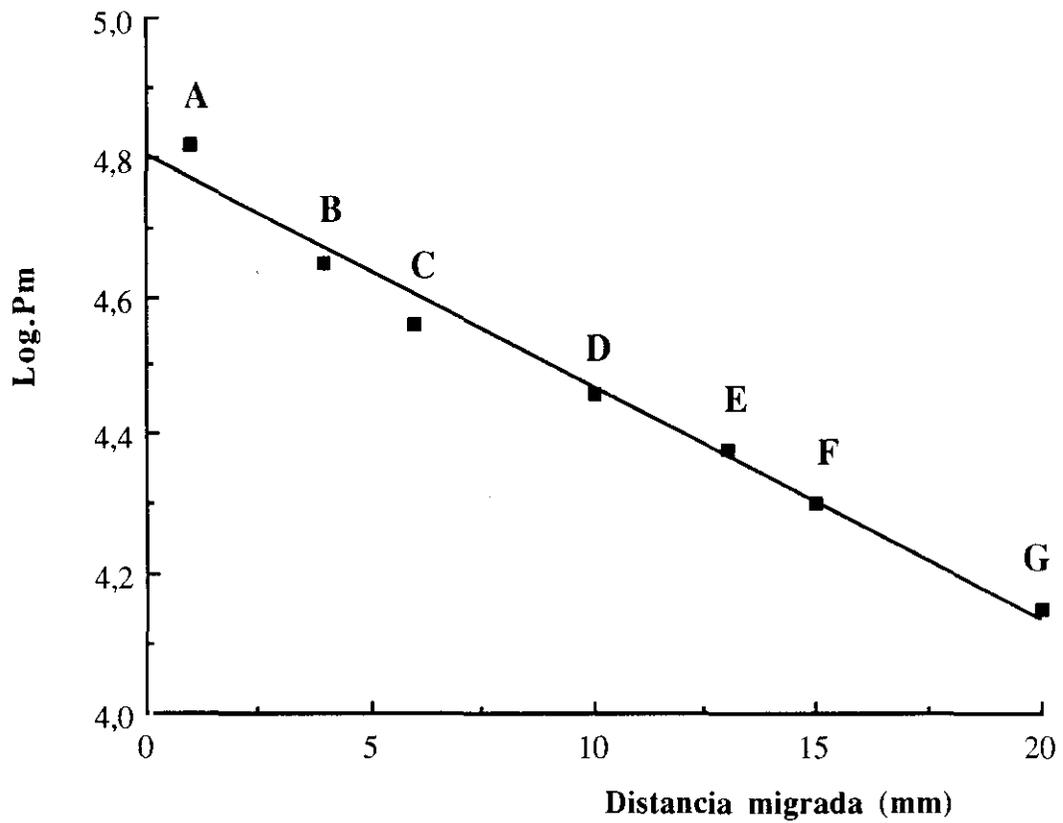


Figura 3. 8. - Recta patrón para la determinación del peso molecular por la técnica Swank y Munkres (1971). Patrones de alto peso molecular; (A) Seroalbúmina bovina, (B) Ovoalbúmina, (C) Gliceraldehido-3-fosfato, (D) Anhidrasa Carbónica, (E) Tripsinógeno, (F) Inhibidor de la Tripsina y (G) α -Lactoalbúmina

III. 2. 8. 4. 2. - Técnica de Laemli (1970)III. 2. 8. 4. 2. 1. - Tampones, geles y soluciones empleadas1. - Tampón para solubilizar las muestras

Contiene:

Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	1,0	ml
Glicerol	0,8	ml
Dodcil sulfato sódico (10 %)	1,6	m
β -mercaptoetanol	0,4	ml
Azul de bromofenol (0,05 %)	0,2	ml
Agua destilada	4,0	ml

2.) Solución de acrilamida-bisacrilamida

Contiene:

Acrilamida	14,6	g
N,N'-metilén-bisacrilamida	0,4	g
Completar con agua destilada hasta	50,0	ml

3.) Gel de separación

Contiene:

Solución de acrilamida-bisacrilamida	20,0	ml
Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	7,5	ml

Agua destilada	1,9	ml
Dodecil sulfato sódico (10 %)	0,3	ml
Persulfato amónico (10 %)	0,15	ml
Temed	15,0	μl

4.) Gel de concentración

Contiene:

Solución de acrilamida-bisacrilamida	1,3	ml
Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	2,5	ml
Agua destilada	6,1	ml
SDS (10 %)	0,1	ml
Persulfato amónico (10 %)	50,0	μl
Temed	15,0	μl

5.) Tampón de electroforesis

Contiene:

Tris base	6,6	g
Glicina	28,8	g
Dodecil sulfato sódico	2,0	g
Agua destilada	2,2	l

6.) Solución de fijación

Contiene etanol:ácido acético:agua destilada (10:5:85 v/v).

III. 2. 8. 4. 2. 2. - Preparación de las muestras

Las muestras solubilizadas en el tampón de solubilización con 5, 10 y 15 µg de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada, se mantuvieron durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, antes de depositar 10 µl de cada solución en el gel de concentración.

III. 2. 8. 4. 2. 3. - Preparación de los geles y electroforesis

Tanto la preparación de los geles como la electroforesis correspondiente se realizó, esencialmente de la manera descrita en las secciones III. 2. 8. 1. 3. y III. 2. 8. 1. 4.

III. 2. 8. 4. 2. 4. - Tinción de los geles

Los geles se tiñeron con el reactivo de plata distribuido comercialmente por la casa Bio-Rad. Este reactivo, elaborado según el método de Merrill (1981), es unas 10-50 veces más sensible que el azul brillante de Coomassie para visualizar las proteínas en los geles de poliacrilamida con SDS. La tinción se realizó siguiendo estrictamente las instrucciones recomendadas por la casa suministradora.

III. 2. 8. 4. 2. 5. - Determinación del peso molecular (Laemli, 1970).

El peso molecular de la sustancia inhibidora parcialmente purificada se determinó interpolando en una gráfica los pesos moleculares de las proteínas estándar frente a la distancia recorrida en su migración en el gel. Las proteínas estándar utilizadas en la confección de la recta patrón procedían de un "kit" comercial que contenía las proteínas de alto peso molecular descritas en la sección III. 2. 8. 4. 1. 6.

III. 2. 9. - Purificación a homogeneidad de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347

III. 2. 9. 1. - Obtención del sobrenadante libre de células

Los sobrenadantes libres de células de los cultivos de *Pediococcus* sp nº 347 se obtuvieron de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3. 1., sin ajustar su pH a 6,2 ni medir su absorbancia a 280 nm.

III. 2. 9. 2. - Precipitación con sulfato amónico

A cada litro de sobrenadante se le añaden, lentamente y con agitación 400 g de sulfato amónico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dejando estar la solución 15 minutos. Después, se deja a 4 °C durante 10 minutos y, a continuación, se centrifuga a 8000 rpm otros 20 minutos. Más tarde se recuperan el precipitado y la película flotante, procurando tomar la mínima cantidad de líquido ya que las sales pueden interferir en la retención de las proteínas de interés en la columna de intercambio catiónico. Los precipitados se resuspenden en 200 ml de tampón de fosfato de sodio 20mM ($\text{Na}_2\text{HP}/\text{NaH}_2\text{P}$), pH 5,8. Esta solución constituye la fracción I y de ella se retira una alícuota para determinar su actividad inhibidora así como su absorbancia a 280 nm.

III. 2. 9. 3. - Cromatografía de intercambio catiónico

La cromatografía de intercambio iónico (aniónico o cationico), permite la separación de moléculas cargadas eléctricamente, mediante su adsorción reversible en una matriz cromatográfica de carga eléctrica neta. La separación se consigue debido a las diferentes afinidades de las moléculas por el intercambiador iónico, lo que se controla variando la fuerza

iónica y el pH. El intercambiador iónico es una matriz de compuestos inorgánicos, resinas sintéticas, polisacáridos, etc., a la que se une covalentemente grupos cargados eléctricamente. Estos grupos proporcionan iones que serán reemplazados por otros de la misma carga sin que la matriz resulte alterada. Dependiendo de la carga de los radicales unidos a la resina y de los iones resultantes se tendrá un intercambiador aniónico (resina cargada positivamente) o catiónico (resina cargada negativamente).

Esta técnica es muy útil en los estadios iniciales de purificación de proteínas y permite una elevada resolución de proteínas de puntos isoeléctricos próximos.

III. 2. 9. 3. 1. - Reactivos y tampónes empleados

1.) Tampón de fosfato de sodio 20 mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), pH 5,8

(a). Solución de Na_2HPO_4 , 20mM.

Se prepara una solución 0,5 M, que contiene 70,98 g de Na_2HPO_4 por litro. 40 ml de esta solución se mezclan con 960 ml de agua destilada para tener una solución 20 mM (pH final 9,0).

(b). Solución de NaH_2PO_4 20 mM.

Se prepara una solución 0,5 M, que contiene 68,99 g de NaH_2PO_4 por litro. 40 ml de esta solución se mezclan con 960 ml de agua destilada para tener la solución 20 mM (pH aprox. 4,0)

Preparación.

Para preparar el tampón de fosfato de sodio 20 mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) de pH 5,8, se va añadiendo la solución (a) a la (b) hasta alcanzar dicho pH final.

2.) Gel

El gel S-Sepharose Fast-flow (Pharmacia), es un fuerte intercambiador catiónico que activa en un rango de pH amplio; consiste en una matriz de Sepharosa a la que se han unido covalentemente radicales de sulfopropilo, rodeados de iones móviles de Na^+ , para dar lugar a la "forma sódica" de la resina.

III. 2. 9. 3. 2. - Condiciones de trabajo

La cromatografía se realizó a temperatura ambiente y las fracciones resultantes se recogieron en un erlenmeyer. Los 200 ml de la fracción I, obtenida según lo descrito en la sección III.2.8.6.2., se pasaron lentamente por una columna (3,0 x 2,5 cm) que contiene el gel de S-Sepharose Fast Flow, previamente equilibrada con 50 ml de tampón fosfato sódico. A continuación la columna se lavó con 50 ml del mismo tampón y se eluyó con 50 ml de una solución 1 M NaCl en el mismo buffer. El eluato resultante (fracción II), se leyó espectrofotométricamente a 280 nm para determinar su contenido proteico y se evaluó su actividad inhibidora. Enseguida, se eluyó la sustancia inhibidora de *Pediococcus* sp, nº 347 con 50 ml de NaCl 1 M en tampón fosfato sódico volviendo a evaluar la actividad inhibidora y la absorbancia de este eluato (fracción II).

III. 2. 9. 4. - Cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrofóbica es una técnica de reparto en la que las proteínas se separan en una matriz sin carga, con grupos hidrófobos basándose en sus interacciones hidrofóbicas. La separación proteica depende de la interacción de los tres componentes del sistema: la matriz hidrofóbica, el agua del solvente y el soluto hidrofobo. Por tanto, la fuerza de la interacción entre soluto y matriz depende de las hidrofobicidades de las proteínas de la muestra y de la matriz (que depende del tipo y número de grupos hidrófobos que contenga), y de las interacciones con y entre las moléculas del agua. Cualquier perturbación, como cambio de temperatura, pH, fuerza iónica etc, que afecte a uno o más de estos tres componentes, influirá en la distribución de las proteínas del soluto entre la matriz y el solvente. Esto permite una gran flexibilidad de diseños experimentales de condiciones de elución, lo que confiere a la cromatografía de interacción hidrofóbica una gran versatilidad.

III. 2. 9. 4. 1. - Reactivos y tampones empleados

1) Tampón de fosfato sódico 20 mM($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) de pH 5,8

Se prepara de la manera descrita en la sección III.2.8.6.1.

2) Solución al 10 % de sulfato amónico tampón en 20 mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) de pH 5,8

Contiene 100 g de sulfato amónico en un litro de tampón 20 mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) de pH 5,8.

3) Solución de etanol al 70 % en tampón 20 mM (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) pH 5,8.

4) Gel

Se utilizó el gel Octyl Sepharose CL-4B de Pharmacia.

III. 2. 9. 4. 2. - Condiciones de trabajo

A la fracción II se le añade sulfato amónico (NH₄)SO₄ hasta una concentración final de un 10 % peso/volumen y, la muestra así preparada, se deposita cuidadosamente en una columna (2,0 x 20 cm) que contiene el gel "Octyl Sepharose CL-4B, previamente equilibrada con 5 ml de una solución al 10 % de sulfato amonio en tampón de fosfato sódico. A continuación, la columna se lava con 10 ml de solución al 10 % de sulfato amónico y la proteína adsorbida se eluye con 10 ml de etanol al 70 % (v/v) en agua destilada, recogiendo el eluato (Fracción III), cuya absorbancia a 280 nm y actividad inhibidora se determinan de la manera descrita.

III. 2. 9. 5. - Cromatografía de Fase Reversa (CFR)

La Cromatografía de Fase Reversa es un sistema de separación de moléculas orgánicas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos etc, basado en las diferencias de hidrofobicidad que poseen estas biomoléculas. Esta técnica posee características interesantes como versatilidad, alta resolución y recuperación, reproductibilidad y, sobre todo, biocompatibilidad. Esto último, significa que la actividad biológica de las moléculas se mantiene inalterada durante su separación. Por ello es particularmente útil en el análisis y purificación de las bacteriocinas, cuya pérdida de actividad biológica debe ser mínima o nula.

Además, es un sistema recomendado como final de un protocolo de separación, que vaga precedido de técnicas de filtración en geles, cromatografía de intercambio iónico y, en nuestro caso, de cromatografía de interacción hidrofóbica.

La Cromatografía de Fase Reversa utiliza medios desarrollados y optimizados como selectivos para proteínas y péptidos; dichos medios se empacan previamente en columnas pequeñas (5x10 mm) con gradientes de alta resolución y velocidad. Las moléculas de las muestras son firmemente adsorbidas en la matriz de la columna y, posteriormente eluidas con un solvente orgánico. Este medio posee una matriz base de sílica, estabilidad a pH 2-8, con partículas de 5 μm de tamaño con 100 Å de diámetro, y está específicamente indicada para biomoléculas de un peso molecular de hasta 6000 daltons.

III. 2. 9. 5. 1. - Reactivos y tampones empleados

1.) Tampón A

Solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético (Merck) en agua destilada.

2.) Tampón B

Solución al 0,1 % de en agua destilada.

III. 2. 9. 5. 2. - Condiciones de trabajo

A la fracción III se le añadió 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA) y se filtró por un filtro Millipore de 0,22 μm de diámetro de poro. Posteriormente la mezcla se resuspendió en ácido trifluoroacético al 0,1 % de hasta alcanzar un volumen de 50 ml y esta solución se pasó

por una columna de fase reversa PepRPC HR 5/5 (Pharmacia), previamente equilibrada con el mismo tampón e integrada en un sistema de Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC). Las proteínas adsorbidas a la columna se eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 100 % de 2-propanol que contenía 0,1 % de ácido trifluoroacético. Posteriormente, la fracción con actividad inhibidora se sometió a una segunda purificación en la misma columna, obteniéndose así la bacteriocina purificada (fracción IV).

Las actividades inhibidoras del sobrenadante libre de células, así como de las fracciones resultantes de la purificación, se cuantificaron mediante ensayos en placas de cultivo (Geis y col., 1983), empleando *P. pentosaceus* FBB63 como microorganismo indicador.

III. 2. 9. 6. - Detección y cuantificación de la actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347 en placas

La actividad inhibidora de las fracciones resultantes de la purificación de la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347, se determinó y cuantificó mediante un ensayo en placa empleando *P. pentosaceus* FBB 63 como el microorganismo indicador .

III. 2. 9. 6. 1. - Técnica

Un cultivo del microorganismo indicador, se diluye hasta una concentración de 1/20 en medio MRS. Asimismo, 100 µl de los eluatos procedentes de la purificación de la bacteriocina se diluyen de forma progresiva en los pocillos de la placa microtituladora hasta concentraciones de 1/2, 1/4, 1/8. etc. A continuación el volumen de los pocillos se completa hasta 200 µl con 100 µl de la dilución del microorganismo indicador y las placas se incuban a 32 °C durante 6 horas. La cuantificación de la inhibición del crecimiento del microorganismo indicador se realiza mediante la lectura espectrofotométrica de las placas a 600 nm con un lector Titertek

Multiskan Plus.

Una unidad de bacteriocina (UB) se define como la concentración de bacteriocina que inhibe el crecimiento del microorganismo indicador en un 50 %.

III. 2. 10. - Determinación de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

Los aminoácidos presentes en la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347, se determinaron por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

III. 2. 10. 1. - Digestión ácida de la muestra problema

A 10 mg de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada (sección II. 2. 8. 1), se le añadieron 5 ml de HCl 6N y se calentaron a baño maria con glicerina a 120 °C durante 24 h, para que la muestra experimentara una hidrólisis ácida. Después de enfriar el hidrolizado a temperatura ambiente, se filtró por un filtro Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro. A continuación se liofilizó y se resuspendió en 750 µl de una solución de HCl 0,2N. Enseguida se le añadieron 0,1 ml de una solución de norleucina en HCl 0,2N que contenía 10 mg/ml . La norleucina, de la que carecen normalmente las muestras a analizar, se utilizó como estándar interno.

III. 2. 10. 2. - Preparación de los patrones

10 mg de cada uno de los aminoácidos patrón y de norleucina se disolvieron por

separado en 10 ml de una solución de HCl 0,2N. La digestión ácida de los aminoácidos patrón, se realizó siguiendo la técnica descrita anteriormente (III.2.10.1). Los aminoácidos patrón empleados procedían de un "kit" comercial de Sigma.

III. 2. 10. 3. - Marcado y derivatización de los aminoácidos

Para detectar los aminoácidos presentes en las muestras antes descritas, los libres se conjugaron con fenilisotiocianato (PITC), siguiendo el método descrito por Yang y Sepulveda (1985), con algunas modificaciones.

De las muestras citadas se tomaron alícuotas de 20 μ l que se depositaron en tubos de ensayo que contenían 200 μ l de una solución marcadora compuesta de 7 partes de alcohol etílico, 2 partes de trietilamina y una parte de PITC. Los tubos se mantuvieron 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la reacción de conjugación o marcado. Transcurrido este tiempo, se evaporó a sequedad el contenido de los tubos con ayuda de una corriente de N₂ lo que a 50-52 °C requería unos 30 minutos. Las muestras resultantes, se resuspendieron en 500 μ l de tampón fosfato 0,5 M de pH 7,4, con un 5 % de acetonitrilo y se filtraron por un filtro Millipore de 0,45 μ m de diámetro de poro. Las muestras así preparadas se mantuvieron en refrigeración durante un tiempo no superior a 6 h hasta su análisis por HPLC.

III. 2. 10. 4. - Desarrollo cromatográfico

Los aminoácidos marcados se separaron en una columna de fase reversa SUPELCO, termostataada de 25 x 4,6 cm, 5 μ m con relleno de Organoclorasilano de tamaño de partícula, . Los aminoácidos se eluyeron de la columna utilizando un gradiente de las siguientes disoluciones:

Disolución A: tampón acetato sódico 0,03 M de pH 6,8 y 0,05 % de trietilamina.

Disolución B: Acetonitrilo al 90 % en agua de calidad HPLC.

En la Tabla III.2, se muestra el gradiente utilizado. El desarrollo cromatográfico se realizó a una temperatura constante de 35 °C, para lo que la columna se introdujo en un baño de agua termotestado a dicha temperatura. La detección de los aminoácidos se realizó en un detector de ultravioleta visible a 254 nm.

III. 2. 10. 5. - Identificación y cuantificación de los aminoácidos

La identificación de los aminoácidos se realizó con los patrones descritos, mientras su cuantificación se basó en las gráficas patrones elaboradas teniendo en cuenta las siguientes relaciones: concentración aminoácido problema/concentración norleucina y área aminoácido problema/ área norleucina.

Tabla III. 2. - Condiciones de la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para la determinación de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% solución B	Duración (min)
0,0	1,0	4,0	0,0
0,5	1,0	4,0	5,0
5,5	1,0	4,5	9,5
15,0	1,0	10,0	7,0
22,0	1,0	19,0	10,0
32,0	1,0	27,0	5,0
37,0	1,5	99,0	5,0
52,0	1,5	99,0	5,0
57,0	1,0	3,2	5,0

III. 2. 11. - Concentración inhibidora mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 en diversos microorganismos indicadores

Para determinar la concentración inhibidora mínima (CIM), 5 mg de la proteína purificada, disueltos en 1 ml de tampón fosfato 4 mM de pH 7,0 se diluyeron 2, 4, 8 y 16 veces. De cada dilución (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) se tomaron alícuotas de 30 µl cuya actividad antimicrobiana se evaluó según la técnica descrita en la sección III. 2. 3. 3. 2. Como microorganismos indicadores se emplearon *L. fermentum* CECT285, *Carn. divergens* LV13, *List. monocytogenes* 7973, LI5 sv 1/2 y Scott A, *Staph. aureus* FRI 137, FRI 349 y FRI 362, *Cl. botulinum* 551 y *Cl. perfringens* 376.

La concentración inhibidora mínima se define como la concentración mínima de proteína que produce un halo de inhibición en el medio sólido de crecimiento, en el que se desarrolla el microorganismo indicador. En este ensayo, únicamente se consideraron como halos de inhibición los que tenían un radio mayor de 1 mm.

III. 2. 12. - Caracterización inmunológica parcial de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347

III. 2. 12. 1. - Obtención de los extractos antigénicos

Como extractos antigénicos se emplearon los de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, obtenidos de la manera descrita en la sección III. 2. 8. 1. Para inmunizar los conejos, se les inyectaron de 1 a 4 mg de la sustancia antimicrobiana emulsionada en 0,5 ml de Adjuvante Completo o Incompleto de Freund (Difco) y en 1 ml de agua destilada.

III. 2. 12 .2. - Determinación de la proteína

Para determinar el contenido proteico de los extractos antigénicos, de los inmunoseros y de otros reactivos, se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu, descrita por Lowry y col. (1951), realizada de la manera descrita en la sección III. 2. 8. 2.

III. 2. 12. 3. - Obtención de los inmunoseros

Los inmunoseros frente a la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp, 347 se obtuvieron en 2 conejos machos de raza Nueva Zelanda de 2,5 kg de peso vivo aproximadamente.

III .2. 12. 3. 1. - Pauta de inmunización

Los conejos, se inocularon por vía subcutánea a ambos lados de la columna vertebral, comenzando en la proximidad de la zona cervical. La zona se depiló y desinfectó perfectamente antes de las inyecciones. Como inóculo se emplearon 1-4 mg del antígeno emulsionados en una mezcla de 0,5 ml del Adyuvante Completo o Incompleto de Freund (Difco) y 1 ml de agua destilada estéril; las inyecciones se realizaron durante 77 días a intervalos de 7 días (Tabla III.3).

Antes de la primera inoculación se realizó una sangría parcial inicial (S_0) para comprobar la ausencia de reactividad de los animales frente a la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 . Asimismo a los 21, 42 y a los 70 días de la inmunización se realizaron, respectivamente, las sangrias parciales S1, S2 y S3 con el fin de verificar la efectividad de las inoculaciones. Con este fin los animales se colocaban en una caja de sujeción que solo dejaba libre la cabeza. La sangre se obtenía de la vena marginal de la oreja, que previamente se

friccionaba con algodón empapado en xilol, para producir una vasodilatación que favoreciera la sangría. A continuación se efectuaba la punción con una aguja hipodérmica, o bien se seccionaba cuidadosamente el vaso sanguíneo elegido con un bisturí, recogiénose de 5 a 10 ml de sangre. La sangre extraída se centrifugaba a 2000 g durante 10 minutos. El coágulo se desprendía de las paredes laterales con una espátula o aguja y el sobrenadante, que cuando fué necesario se centrifugó de nuevo en como queda dicho, se extrajo con ayuda de una jeringa y se distribuyó en viales de 2 ml, junto con unas gotas de azida de sodio al 0,01 % que actuaba como agente conservador. Los viales, perfectamente cerrados, se conservaron a -20 °C hasta el momento de su empleo.

III. 2. 12. 3. 2. - Sangría final

Colocado el animal en una mesa de Palmer en posición de decúbito supino e inmovilizado por las 4 extremidades, se anestesiaba por vía intramuscular con Ketolar (Clorhidrato de Ketamina) a la dosis de 10 mg/Kg de peso.

Después de depilar y desinfectar perfectamente la zona inferior del cuello, con el material quirúrgico apropiado se practicaban las incisiones cutáneas siguientes:

1. Longitudinal a lo largo de la línea media ventral
2. Transversal a nivel de la segunda vertebra cervical
3. Transversal a nivel de la sexta vertebra cervical

A continuación, se disecan los músculos ventrales del cuello visibles en esta área: *Ms. cleidomastoideus* (parte del *Ms. cleidocephalicus* y éste a su vez del *Ms. brachiocephalicus*), *Ms. sternomastoideus* (parte del *Ms. sternocephalicus*), *Ms. sternohyoideus* y *Ms. sternothyroideus* y *Ms. sternothyroideus*.

Tabla III. 3. - Pauta de inmunización de los conejos, por inoculación subcutánea de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347.

Días	Extracto antigénico parcialmente purificado (mg)	Adyuvante Completo de Freund (ml)	Adyuvante Incompleto de Freund (ml)	Sangría
0	1	0,5	----	S ₀
7	1	----	0,5	----
14	1	----	0,5	----
21	1	----	0,5	S ₁
28	2	----	0,5	----
35	2	----	0,5	----
42	2	----	0,5	S ₂
49	3	----	0,5	----
56	3	----	0,5	----
63	3	----	0,5	----
70	3	----	0,5	S ₃
77	4	----	0,5	S _f

So = Sangría inicial

S1 = sangría parcial día 21

S2 = sangría parcial día 42

S3 = sangría parcial día 70

Sf = sangría final día 77

Por el borde lateral del *Ms. sternothyroideus* se disecó en profundidad, hasta llegar al paquete vásculonervioso situado a uno y otro lado de la tráquea. (*A. carotis comunis*, *V. jugularis* y *Truncus vago-simpaticus*). Se disecó la *A. carotis comunis* y con una pinza tipo "mosquito" se fijó el *N. vagus*, que continuó unido al tronco vascular.

De este modo, al efectuar la sección de la arteria se puede dirigir el flujo sanguíneo a un tubo o recipiente donde se recoge la sangre.

Cuando disminuye el flujo, se recomienda aplicar un masaje cardiaco con el fin de conseguir el mayor volúmen de sangre posible. De cada animal se recogieron de 120 a 150 ml de sangre. La sangre extraída se vertió lentamente, en un tubo, a fin de evitar en lo posible su hemolisis y se manipuló de la manera descrita en el apartado anterior.

III. 2. 12. 4. - Técnicas inmunológicas

III. 2. 12. 4. 1. - Inmunodifusión clásica en geles de agarosa, según la técnica de Ouchterlony, modificada por Chordi y Kagan (1964)

Es una técnica fácil de realizar, que permite identificar los componentes de una mezcla antigénica compleja y compararlos con los antígenos de referencia. La difusión de una sustancia en un medio líquido, es un proceso por el que la sustancia se transporta de una parte del fluido a otra, en función del movimiento de sus moléculas. El soporte utilizado es un gel de agarosa, cuyo tamaño de poro es suficientemente grande para impedir que la sustancia que difunde interaccione física o químicamente con el agente gelificante. Cuando el antígeno y el anticuerpo se encuentran, forman agregados que exceden del diámetro del poro, lo que impide que difunda el complejo antígeno-anticuerpo.

III. 2. 12. 4. 1. 1. - Preparación del gel de agarosa

La composición del gel por 100 ml es la siguiente: 1 g de agarosa, 0,85 g de NaCl y 0.01 g de azida sódica. Una vez disueltos los componentes, se calienta la solución al baño maría, a 80-90 °C, durante 30 minutos.

III. 2. 12. 4. 1. 2. - Preparación de las placas de inmunodifusión

Se utilizaron portaobjetos de vidrio de 7,5 x 5 cm, que se situaron sobre una mesa niveladora, depositando sobre cada uno de ellos 6 ml de una solución de agarosa caliente. Finalizada la gelificación y con ayuda de un molde construido para tal fin, se realizaron en la agarosa cortes circulares para disponer de pocillos cuyas características se indican más abajo. Los discos de agarosa, una vez cortados, se desprendían de los portaobjetos con un vástago metálico.

La disposición y el tamaño de los pocillos, fué la siguiente: uno central, de 12 mm de diámetro y seis periféricos, rodeándolo en roseta, de 6 mm de diámetro. La distancia entre el pocillo central y los periféricos fué de 7 mm.

Con la ayuda de una micropipeta automática, en cada pocillo periférico se depositaron 50 µl de la solución antigénica a analizar, mientras el pocillo central se llenó con 150 µl del inmunosuero correspondiente. Previamente al llenado de los pocillos, se depositó en cada uno de ellos una gotita de agarosa caliente para evitar que las distintas soluciones difundieran entre la capa de gel y la superficie de la lámina de vidrio.

Los portaobjetos así preparados, se depositaron en un portaplacas que se introdujo en una cubeta que contenía 10 ml de una solución de azida de sodio al 1 %, para inhibir el

crecimiento bacteriano y para mantener un grado de humedad que evitase la evaporación del contenido de los pocillos. La cubeta, una vez cerrada, se mantuvo a 37 °C durante 24 horas. Finalizada la incubación, los portaobjetos se lavaron durante 48 horas en una solución de NaCl al 0,85 %, secándose a continuación, primero con una tira de papel de filtro Whatman nº 1 colocado encima de la agarosa y, después, en una estufa a 37 °C . Cuando se seca el gel, el papel se desprende con facilidad de la superficie de la placa. Una vez secos, los portaobjetos se tiñeron durante dos horas en una solución que contenía 90 partes de metanol, 10 de ácido acético y 1g de negro amida 10B (Merck).

A continuación, los portaobjetos se lavaron durante 30 minutos en una solución de ácido acético al 5 %. Finalmente, se eliminó el ácido acético, lavando varias veces con agua destilada y posteriormente se secaron a 37 °C en estufa.

III. 2. 12. 4. 2. - Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)

III. 2. 12. 4. 2. 1. - Técnica del ELISA indirecto

En este trabajo se han utilizado dos procedimientos diferentes de ELISA indirecto. El primero fué un ELISA indirecto clásico, empleando un conjugado comercial de anticuerpos anti-especie de conejo conjugados al enzima peroxidasa de rábano. En el segundo, se utilizó un sistema de amplificación biotina-avidina.

III. 2. 12. 4. 2. 2. - Técnica del ELISA indirecto clásico

En esta técnica los antígenos se inmovilizan, mediante adsorción pasiva, en una superficie inerte; los anticuerpos específicos reconocen a los antígenos correspondientes y el complejo formado lo detecta un segundo anticuerpo marcado con un enzima, que reconoce

como antígenos a los anticuerpos anteriores. La reacción es visible porque al actuar el enzima sobre el sustrato se libera un compuesto coloreado.

a) Obtención de los extractos antigénicos

Como antígenos se emplearon la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347 (sección III.2.7.2.), los sobrenadantes libres de células de *Pediococcus* sp. 347 y los sobrenadantes de una bacteria láctica que carecía de actividad inhibidora frente a los microorganismos indicadores. También se utilizaron los sobrenadantes libres de células de distintas bacterias lácticas con actividad inhibidora frente a diversos microorganismos indicadores. Todos los microorganismos citados se desarrollaron en medios líquidos MRS y MM-triptosa.

b) Anticuerpos

Se utilizó el inmunosuero total procedente de la inmunización de conejos con la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347.

c) Conjugado

El conjugado utilizado fué uno de anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidas en cerdo y marcadas con peroxidasa de rábano (Nordic).

d) Tampones y reactivos1. - Tampón PBS de pH 7,2

NaCl	8,0	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
Na ₂ HPO ₄	2,9	g
KCl	0,2	g
Agua destilada hasta	1	L

2. - Tampón PBST

Se prepara como el PBS y se le añade un 5 % de Tween 20.

3. Tampón de ácido cítrico-fosfato de pH 3,9

a) Preparar una solución de ácido cítrico monohidratado 0,1M, disolviendo 21,01 g en 1.000 ml de agua destilada.

b) Preparar una solución de Na₂HPO₄ 0,2 M, disolviendo 28,4 g en 1.000 ml de agua destilada.

c) Mezclar las dos soluciones hasta obtener un pH de 3,9.

4. - Sustrato

Preparar una solución de 15 mg/ml de ácido 2-2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina sulfónico (ABTS, Sigma) en agua destilada y, después, preparar una mezcla de la siguiente composición:

- Solución de ABTS (15 mg/ml)	0,4	ml
- Tampón cítrico-fosfato, pH 3,9	10,0	ml
- H ₂ O ₂ (30 % en volumen)	20,0	μl

5. - Solución de frenado

Fluoruro sódico (NaF) al 2 % en agua destilada.

6. Solución de tapizado

Gelatina al 1 % en tampón PBS.

e) - Metodología del ELISA indirecto clásico

Los pocillos de una placa de ELISA (Costar 3590) se llenaron con 100 μl del antígeno correspondiente, diluido en tampón PBS, de pH 7,2 (cuando el antígeno era un cultivo libre de células se depositaban directamente 100 μl de dicho cultivo en cada pocillo); la placa se incubó durante una hora a 37 °C, tras lo cual se lavó 5 veces con PBST para eliminar el exceso de antígeno no adsorbido en los pocillos. Una vez seca la placa y, para tapizar las zonas del pocillo en las que no se hubiera adsorbido el antígeno, se añadieron a cada pocillo 200 μl de gelatina al 1 % en PBS y la placa se incubó durante una hora a 37 °C. Tras lavar la placa otras

cinco veces con PBST, se añadieron a los pocillos 100 μ l del suero de conejo diluido en PBST; la placa se incubó en un agitador de placas de ELISA durante una hora a temperatura ambiente. Terminada la incubación, se lavó de nuevo cinco veces con PBST para eliminar los complejos antígeno-anticuerpo formados en la neutralización así como los restos de anticuerpo que no reaccionaron. Seguidamente se adicionaron a los pocillos 100 μ l del conjugado anti-conejo diluido en PBST y, de nuevo, se mantuvo la placa en el agitador de placas ELISA, durante una hora a temperatura ambiente. Tras lavar la placa cinco veces con agua destilada para eliminar los restos de conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 150 μ l del sustrato y se mantuvo la placa en el agitador durante 45 minutos a temperatura ambiente, antes de parar la reacción al adicionar a cada pocillo 50 μ l de NaF al 2 %. El color verde de los pocillos se cuantificó midiendo su absorbancia a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

En la prueba descrita siempre se realizaban, además, los siguientes controles:

- Control del anticuerpo: Antígeno + Gelatina + Conjugado + Sustrato.
- Control del antígeno: Gelatina + Anticuerpo + Conjugado + Sustrato.
- Control del conjugado: Conjugado + sustrato.

Si en alguno de los controles se alcanzaba una A_{405} mayor de 0,150 el experimento se consideraba nulo.

III. 2. 12. 4. 2. 3. - Técnica del ELISA indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina

La diferencia con la técnica anterior se basa en que los anticuerpos obtenidos por inmunización de los conejos se conjugan con la biotina, y la detección del complejo antígeno-anticuerpo/biotina se realiza con un conjugado de avidina o estrepto-avidina marcada con peroxidasa de rábano.

En los últimos años, se ha visto que el complejo avidina-biotina es un mediador muy útil y versátil en una gran variedad de aplicaciones analíticas, incluidas las técnicas inmunoenzimáticas. El hecho de que en poco tiempo se haya generalizado su uso en campos muy diversos, se debe a la elevada afinidad (10^{15} M^{-1}) de la avidina por la biotina y a la gran estabilidad de esta interacción no covalente.

Utilizando las propiedades del complejo biotina-avidina, se pueden amplificar las reacciones inmunoenzimáticas (ELISA). En este caso, los anticuerpos específicos de la reacción se conjugan con la biotina (biotinización) y se detectan con un conjugado de avidina-enzima, en lugar de hacerlo con las anti-inmunoglobulinas de la especie de la que procede el anticuerpo unido al enzima.

III. 2. 12. 4. 2. 3. 1. - Biotinización de los anticuerpos

Los inmunosueros procedentes de la inmunización de los conejos, deben sufrir un tratamiento previo antes de conjugarse a la biotina.

a.) Obtención de los anticuerpos a partir del inmunosuero

1) Tampones y reactivos

a) Solución saturada de sulfato amónico

Se obtiene disolviendo lentamente 76,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 100 ml de agua destilada, hasta que la solución precipita. Momentos antes de su empleo, esta solución se filtra por papel de filtro Whatman nº 1 y su pH se ajusta a 7,4 con NaOH 1N.

b) Tampón de PBS de pH 7,4

Obtenido tal y como se describe en la sección III. 2. 12. 3. 3. d.) 1.)

Procedimiento

25 ml del suero de los conejos inmunizados se centrifugan a 3.000 g durante 10 minutos. Al sobrenadante obtenido se le añade un volumen igual de solución saturada de sulfato amónico y se deja reposar a 4 °C durante 12 h. Pasado este tiempo, se realiza una segunda centrifugación a 3.000 g durante 30 minutos y el precipitado obtenido tras la eliminación del sobrenadante se diluye en 12,5 ml de tampón PBS. Los anticuerpos así obtenidos se dializan frente a PBS y se liofilizan antes de conjugarlos con la biotina.

b.) Conjugación de los anticuerpos purificados con la biotina

Los anticuerpos precipitados se conjugan con el éster biotin amidocaproato-N-hidroxi-succinimida (Sigma), siguiendo la técnica de Bonnard y col. (1984), con ligeras modificaciones. Se procedió como sigue:

1. Preparar una solución del reactivo de biotina (1mg/ml de dimetilsulfóxido).
2. Utilizando como diluyente tampón PBS de pH de 7,2, se prepara una solución del anticuerpo precipitado (con una concentración de, al menos, 1-3 mg/ml).
3. Añadir la solución de biotina a la del anticuerpo, en una relación molar biotina/anticuerpo de 50/1.
4. Incubar la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente.
5. La biotina que no reacciona se elimina diálizando la mezcla frente al tampón PBS (16 h a 4 °C).
6. Los anticuerpos conjugados se conservan a -20 °C en alícuotas de 0,1 ml hasta el momento de su utilización.

III. 2. 12. 4. 2. 3. 2. - Metodología del ELISA indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina

La técnica sigue los mismos pasos y tiempos de incubación que los descritos en el ELISA indirecto clásico (sección III.2.11.4.6.1), salvo que el conjugado empleado es el comercial de Streptavidina/peroxidasa (Sigma).

III. 2. 12. 5. - Detección inmunológica de sustancias antimicrobianas en los sobrenadantes libres de células de diversas bacterias lácticas de origen cárnico

Para diferenciar la sustancia responsable de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, de las producidas por otras bacterias de origen cárnico, se utilizó el método del Elisa indirecto descrito en la sección III.2.12.4.2.3.2. Como extractos antigénicos se utilizaron los sobrenadantes libres de células de diversas bacterias lácticas de origen cárnico que producían sustancias antimicrobianas y que habían sido aisladas en nuestro laboratorio.

III. 2. 12. 6. - Detección de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 en diferentes extractos cárnicos

III. 2. 12. 6. 1. - Obtención de los extractos cárnicos

Se prepararon tres extractos antigénicos que denominamos: ECA (extracto cárnico de aves), ECB (extracto cárnico de bovino) y ECC (extracto cárnico de cerdo).

La carne necesaria para la preparación del extracto antigénico ECA, procedía de los músculos que integran la pechuga: *Ms. pectoralis major* y *pectoralis minor*. En el caso del extracto antigénico ECB, se utilizaron filetes de babilla, integrados por los músculos de la región femoral anterior: *Ms. rectus femoris*, *Ms. vastus medialis* y *Ms. vastus lateralis*. El extracto antigénico de carne de cerdo ECC se elaboró con parte del *Ms. gluteus superficialis* y *Ms. biceps femoris*.

Las distintas piezas de carne se trasladaron rápidamente, en condiciones de refrigeración, al laboratorio donde se procedió a disecar los músculos, procurando eliminar los

tendones, las aponeurosis y la grasa visible.

En todos los casos, se trocearon 500 g de los músculos correspondientes en fragmentos cuadrados de unos 8 mm de lado que a continuación se homogeneizaron en una solución de NaCl al 0,85% (100 g de carne/300 ml de solución salina). Concluida esta operación, los extractos se agitaron una hora a 4 °C y después se dejaron estar 24 horas a la misma temperatura. Las muestras refrigeradas se centrifugaron a 1500 g durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se filtró por papel Whatman nº 1 y las muestras, una vez liofilizadas, se colocaron en un desecador de vidrio que se mantuvo en una cámara frigorífica a 4 ± 1 °C.

El contenido proteico de los extractos antigénicos se determinó con la técnica de Folin-Ciocalteu según Lowry y col., (1951), descrita en la sección III.2.12.2.

III. 2. 12. 6. 2. - Neutralización de los anticuerpos anti-P347

La neutralización o bloqueo es un procedimiento sencillo para eliminar las reacciones cruzadas de los anticuerpos con otros extractos antigénicos. Con el fin de neutralizar la actividad de los inmunoseros frente a las proteínas musculares solubles de diversas especies animales, los inmunoseros se incubaron con los extractos antigénicos que originaban estas reacciones cruzadas. Para ello los inmunoseros, convenientemente diluídos en tampón PBST (PBS, pH 7,2, con un 0,5 % de Tween 20), se incubaron con una cantidad adecuada (determinada experimentalmente), de extractos antigénicos liofilizados frente a los que producían reacciones cruzadas, primero a 37 °C durante 2 h y, luego a 4 °C durante 16 h.

La neutralización de los anticuerpos anti-P347 se realizó diluyéndolos en tampón PBST que contenía una mezcla de proteínas musculares solubles de aves, bovinos y cerdos a una

concentración de 1,0 mg/ml o bien a concentraciones 10, 30, 50, 70 y 100 veces menores (dilución 1:10, 1:30, 1:50, 1:70 y 1:100). Una vez agitada enérgicamente la mezcla, se mantiene 16 horas a 4 °C, tras lo cual puede usarse en el ELISA indirecto.

CAPITULO IV

RESULTADOS

IV. - RESULTADOS

IV. 1. - Aislamiento y selección de bacterias lácticas

Alícuotas de los homogenizados de los embutidos crudos curados, obtenidos de la manera descrita en la sección III.2.2, se sembraron en placas de Petri que contenían los medios MRS o PCA y se incubaron durante 3 días a 32 °C. Los recuentos obtenidos, tanto de microorganismos totales como de bacterias lácticas, se resumen en la Tabla IV.1. De ellos se deduce que prácticamente la totalidad de la flora bacteriana de los embutidos analizados se encuentra constituida por bacterias lácticas. De las placas de MRS se seleccionaron al azar 956 colonias, que se conservaron en congelación a - 18 °C hasta su empleo en posteriores estudios.

IV. 2. - Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas

IV. 2. 1. - Actividad inhibidora directa

La actividad inhibidora directa de las 956 bacterias lácticas seleccionadas, se evaluó de la manera descrita en la sección III.2.3.2, utilizando *L. fermentum* CECT285 como microorganismo indicador. De ellas 780 mostraron halos de inhibición definidos y de bordes nítidos frente al microorganismo indicador lo que representa el 82 % del total de las bacterias lácticas seleccionadas.

De estas 780 cepas, se seleccionaron las 54 que mostraron una mayor acción antimicrobiana, lo que se manifestaba por la presencia de una halo de inhibición de gran tamaño, de bordes nítidos y sin que en su interior se observaron colonias resistentes del microorganismo indicador (Figura 4.1).

TABLA IV. 1. - Recuentos bacterianos en placas de PCA y MRS, inoculadas con homogenizados de los embutidos crudos curados ^a

	Medio de cultivo	
	PCA	MRS
<u>Muestra 1:</u>		
Microorganismos totales	3,2 x 10 ⁸	—
Bacterias lácticas	—	1,8 x 10 ⁸
<u>Muestra 2:</u>		
Microorganismos totales	2,3 x 10 ⁹	—
Bacterias lácticas	—	1,9 x 10 ⁹

^a. Recuentos expresados en ufc/ml

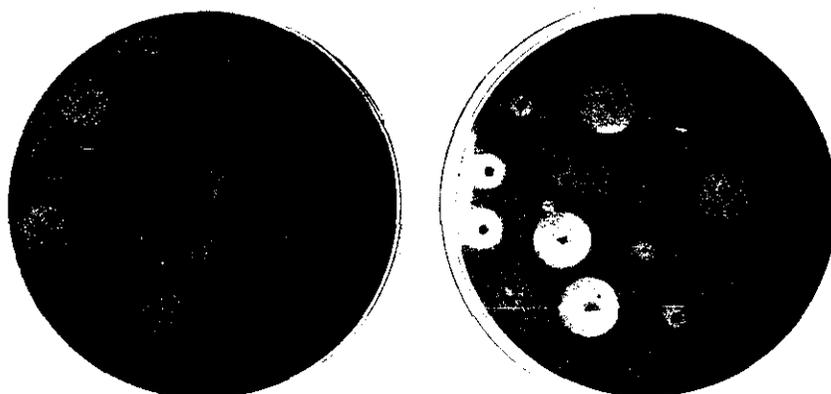


Figura IV.1 - Actividad inhibidora directa de las bacterias lácticas aisladas de embutidos crudos curados, frente a *Lactobacillus fermentum* CECT285.

IV. 2. 2.- Actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células

Los sobrenadantes concentrados libres de células de las 54 cepas de bacterias lácticas seleccionadas, se obtuvieron de la manera descrita en la sección III.2.3.3.1. La actividad inhibidora de los sobrenadantes se evaluó frente a *L. fermentum* CECT285, *Staphylococcus aureus* y frente a varias cepas de *Listerias monocytogenes*, de acuerdo con la metodología descrita en la sección III.2.3.3.2. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 4.2. a 4.7. Ya que todas las cepas analizadas tenían una actividad inhibidora similar se seleccionaron al azar 6 cepas con las que se realizaron otras experiencias. Las cepas seleccionadas fueron las 9, 11, 24, 26, 31, y 48, que corresponden a las cepas 209, 211, 241, 346, 347 y 438 aisladas inicialmente.

IV. 3. - Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas seleccionadas

Las bacterias lácticas seleccionadas se sometieron a la mayoría de las pruebas recomendadas por Schillinger y Lücke (1987b), para la identificación rápida de las bacterias lácticas aisladas de la carne y productos cárnicos; dichas pruebas son las reseñadas en la sección III.2.4.

IV. 3. 1. - Morfología y tinción por el método de Gram

Los resultados de la tinción de las muestras con el método de Gram se muestran en la Tabla IV.2. Al microscopio se observó la presencia de cocos Gram-positivos, relativamente pequeños, que formaban pares y a veces se agrupaban de cuatro en cuatro como racimos de uva.

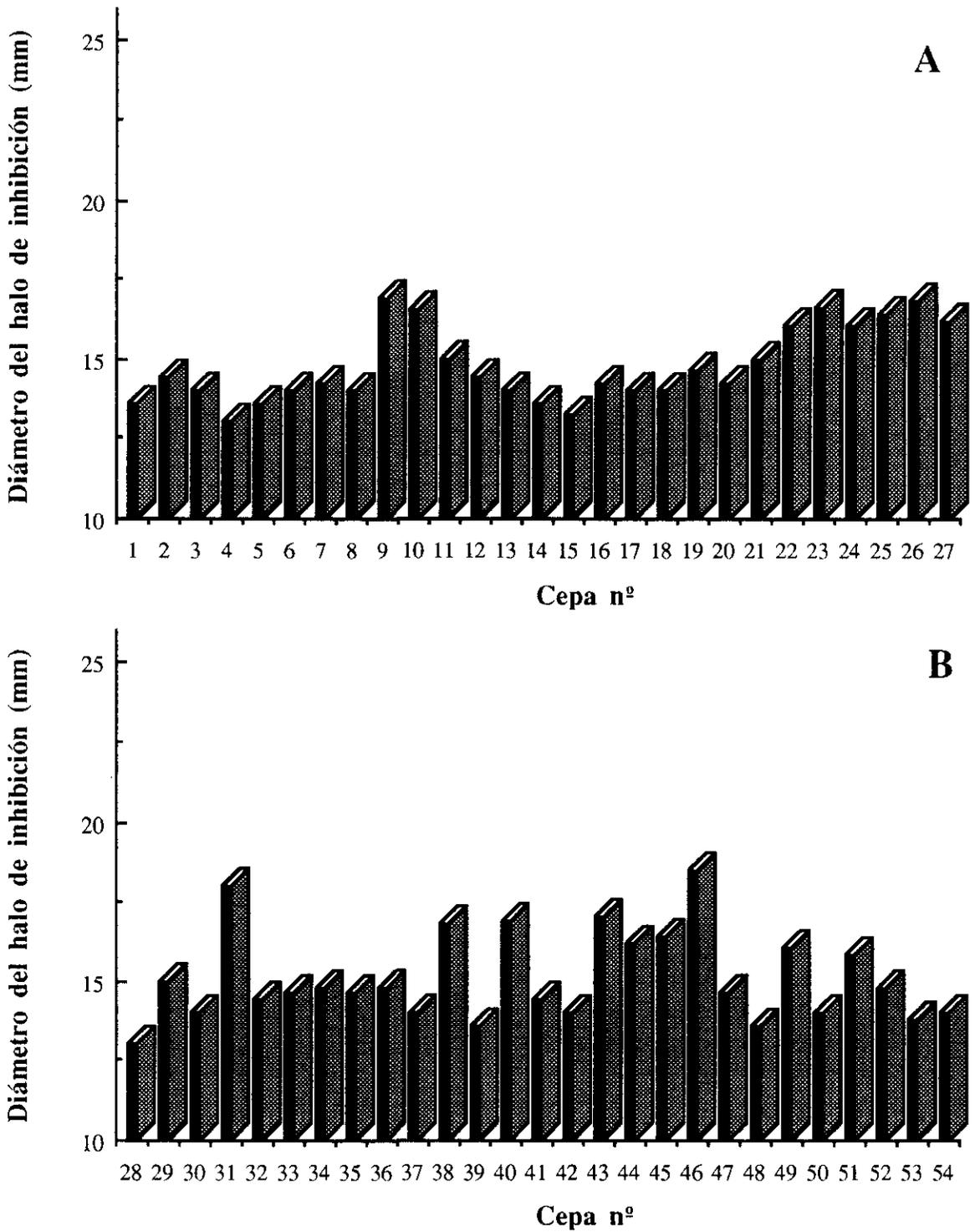


Figura 4.2 . - Actividad inhibidora frente a *Lactobacillus fermentum* CECT285, de los sobrenadantes concentrados libres de células de las 54 bacterias lácticas seleccionadas.

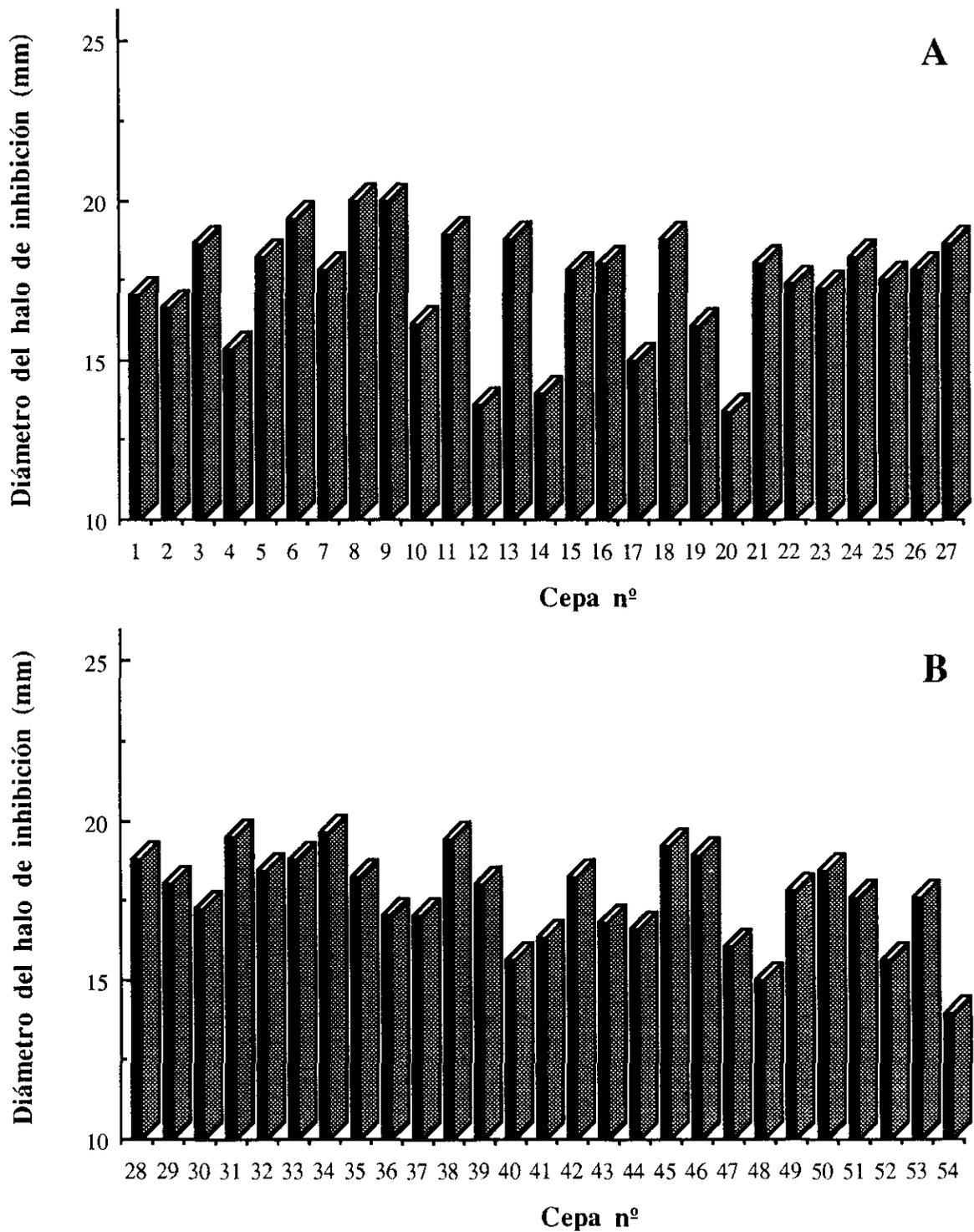


Figura 4.3. - Actividad inhibidora frente a *Listeria monocytogenes* NCTC5105, de los sobrenadantes concentrados libres de células de las 54 bacterias lácticas seleccionadas.

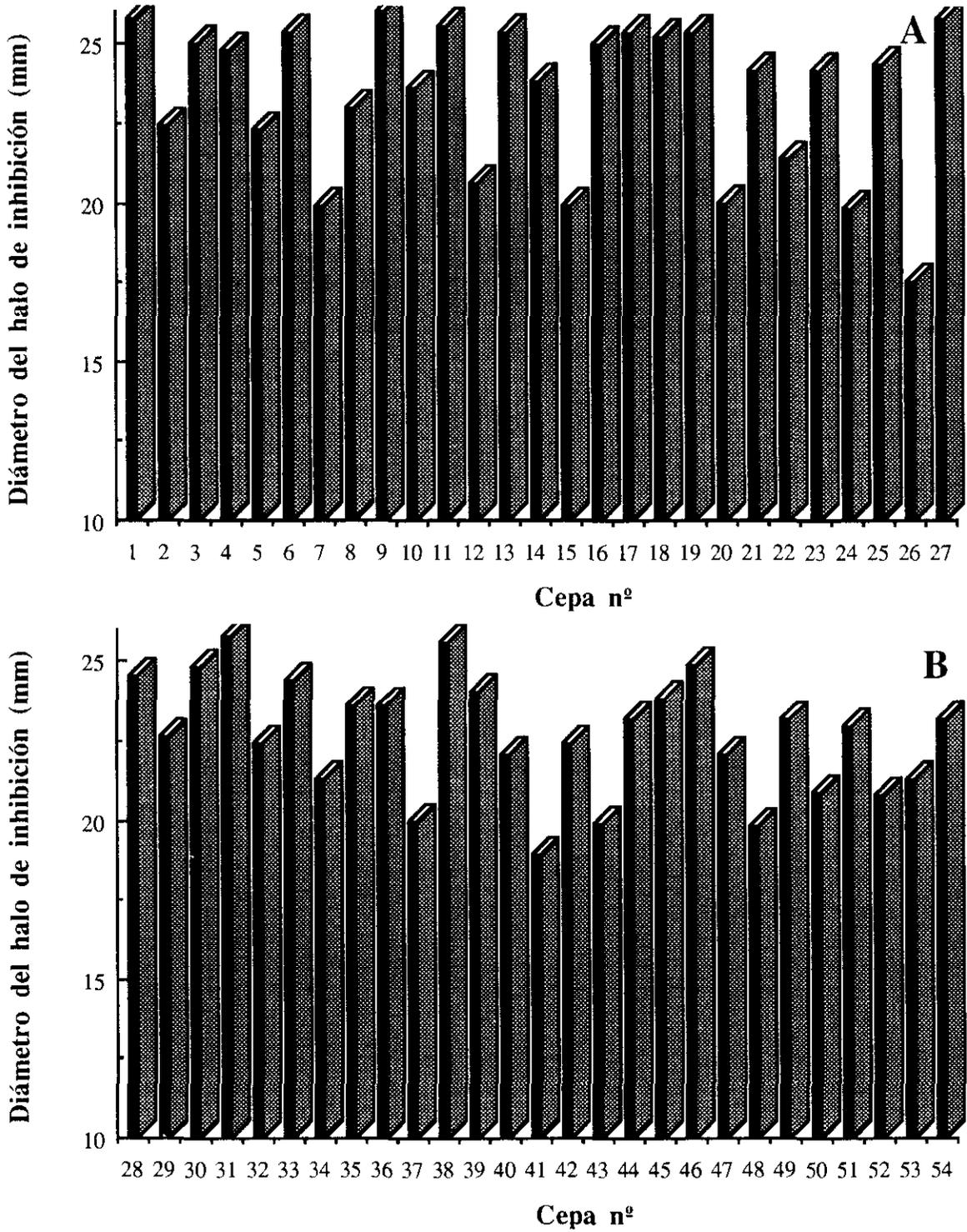


Figura 4. 4. - Actividad inhibidora frente a *Listeria monocytogenes* NCTC7973 de los sobrenadantes concentrados libres de células de las 54 bacterias lácticas

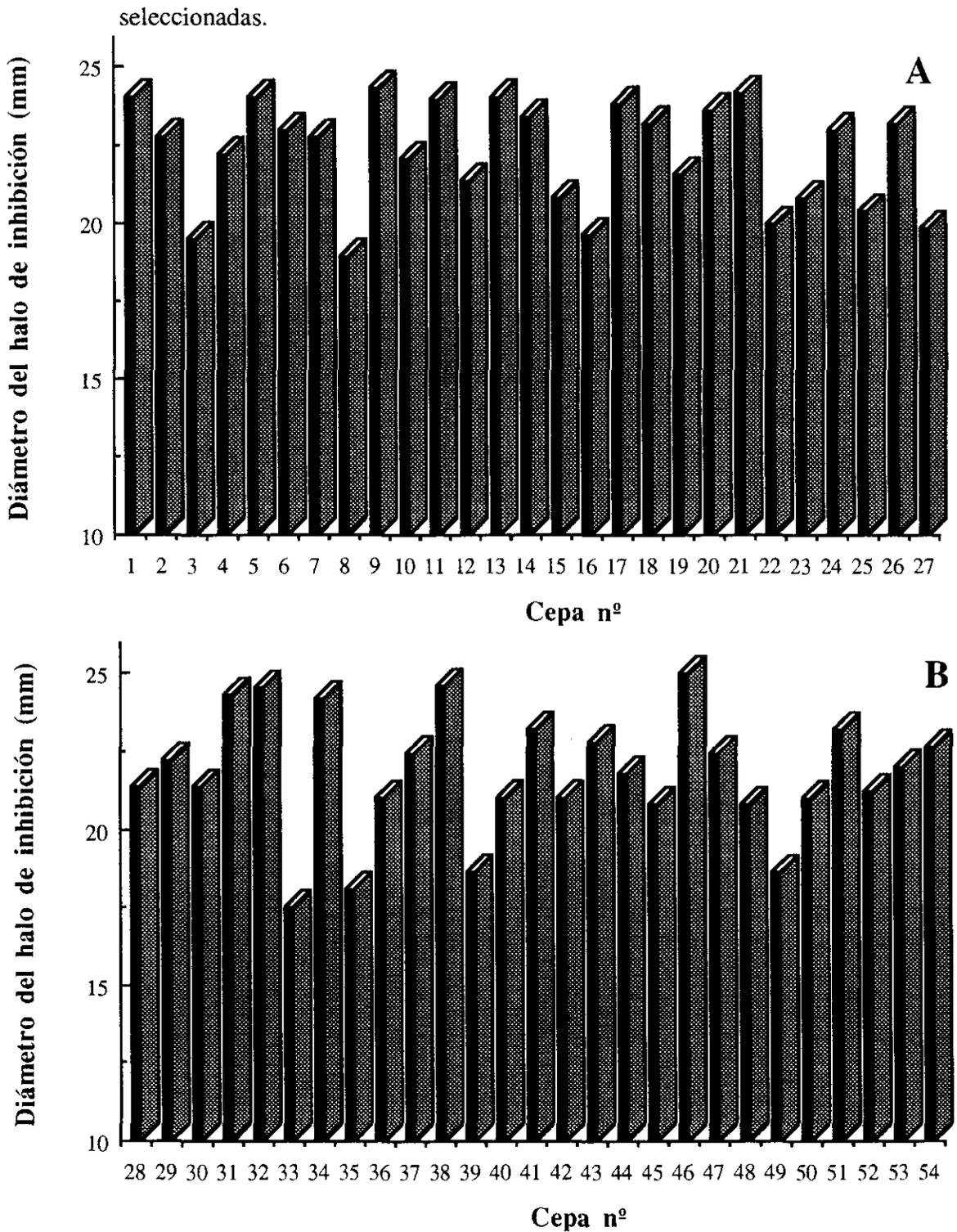


Figura 4. 5 . - Actividad inhibidora frente a *Listeria monocytogenes* NCTC5sv1/2, de los sobrenadantes concentrados libres de células de las 54 bacterias lácticas seleccionadas.

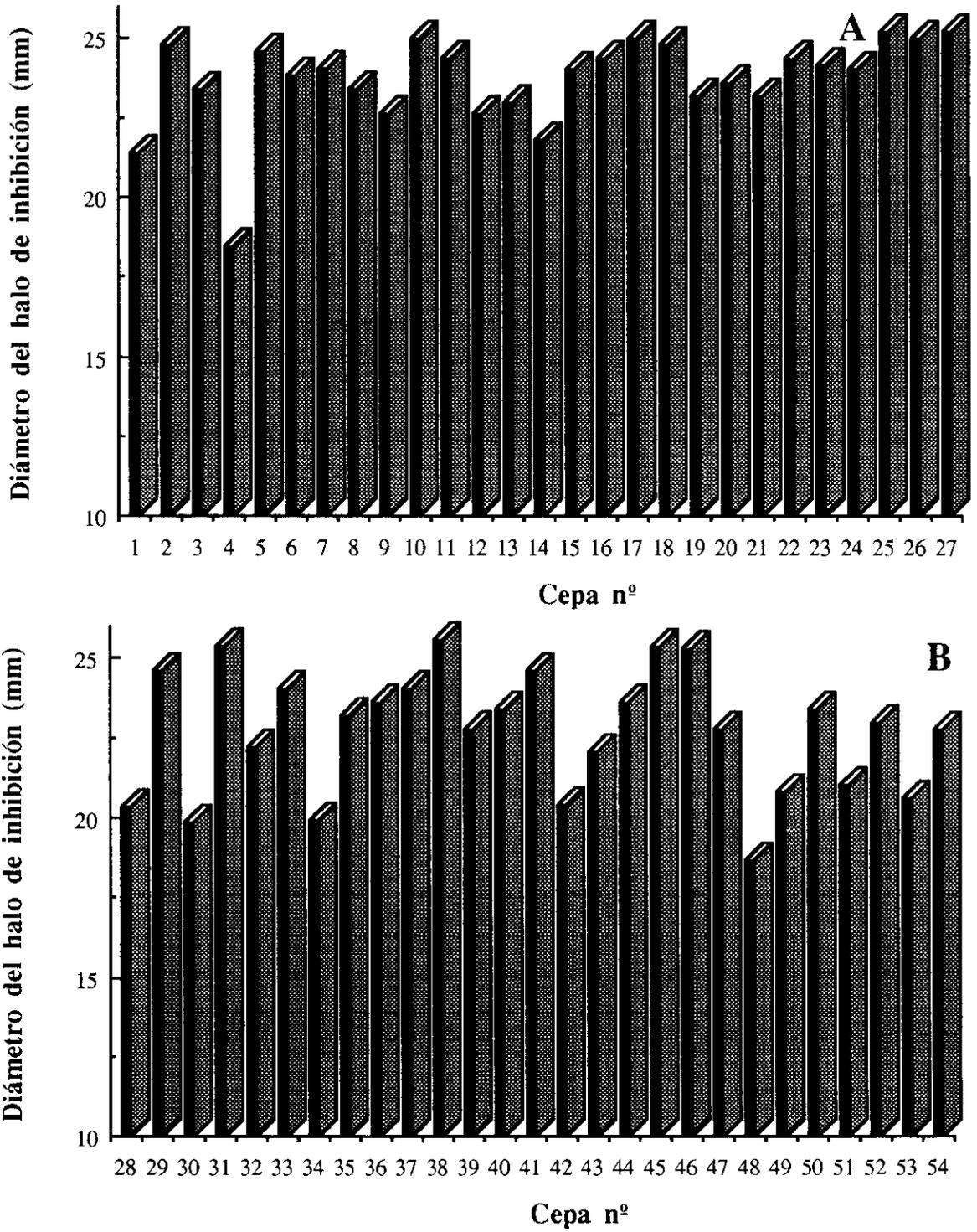


Figura 4. 6. - Actividad inhibidora frente a *Listeria monocytogenes* Scott A, de los sobrenadantes concentrados libres de células de las 54 bacterias lácticas seleccionadas.

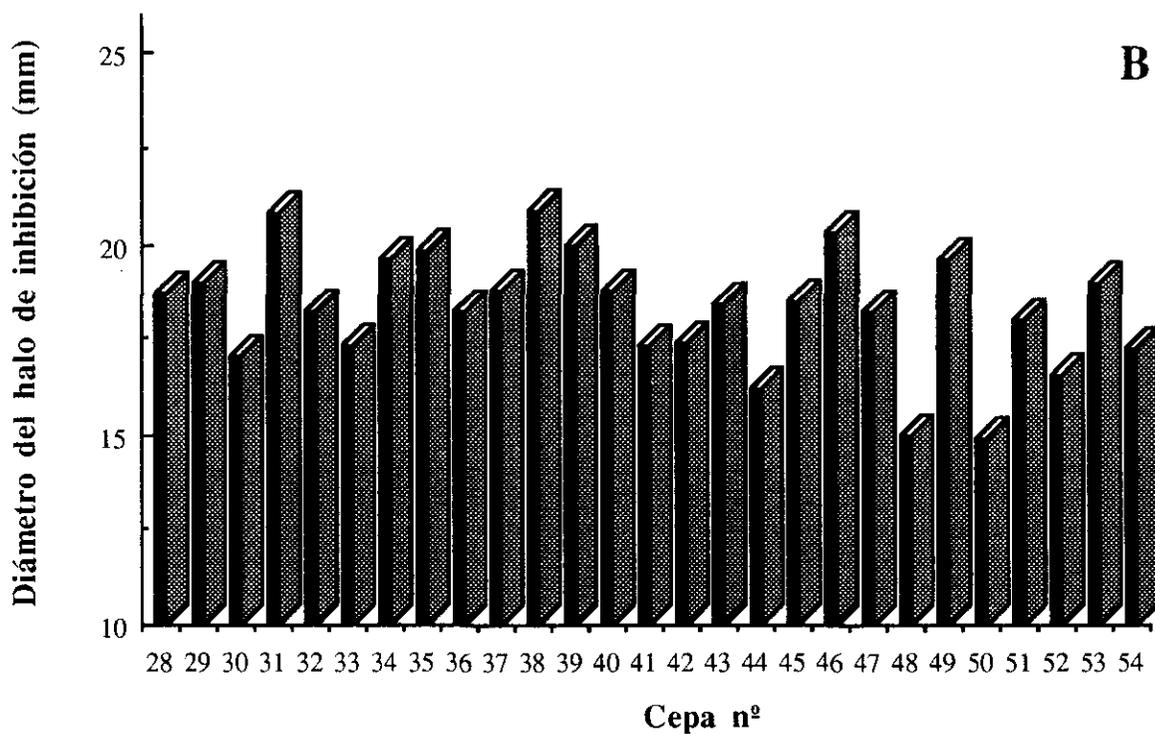
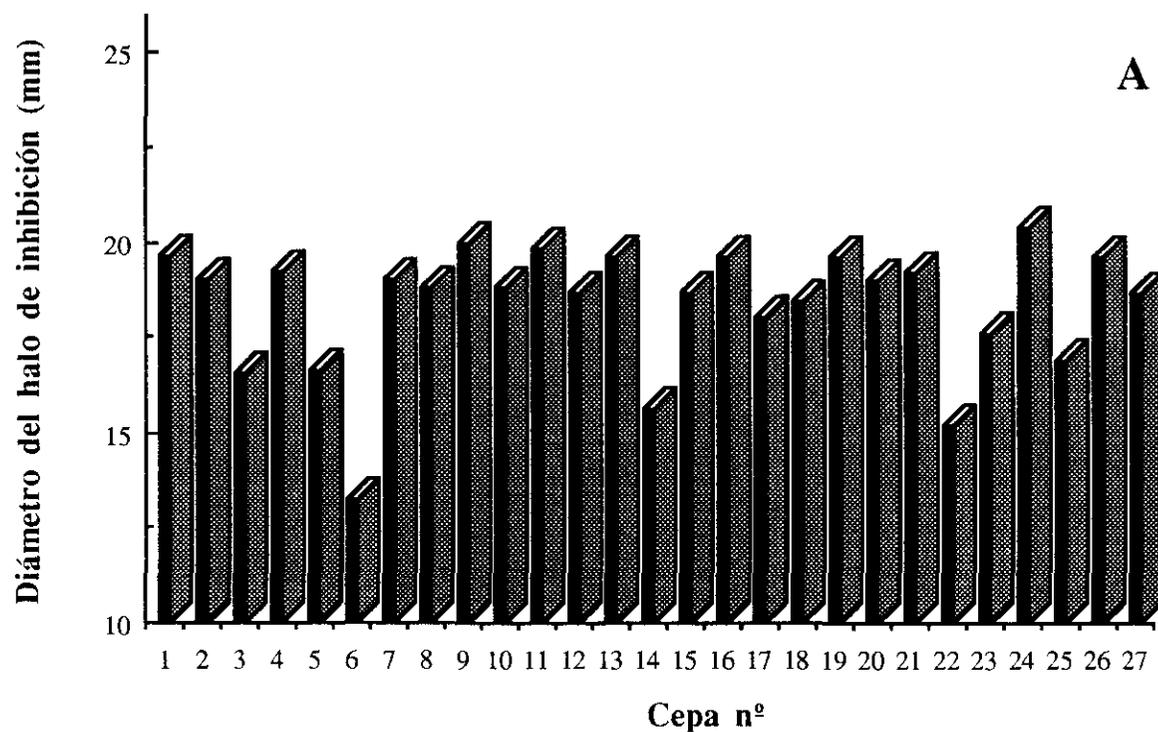


Figura 4.7. - Actividad inhibidora frente a *Staphylococcus aureus* FRI137, de los sobrenadantes concentrados libres de células de las 54 bacterias lácticas seleccionadas.

IV. 3. 2. - Prueba de la catalasa

Todas las cepas analizadas fueron negativas a la prueba de la catalasa (Tabla IV.2).

IV. 3. 3. - Crecimiento a diversas temperaturas

En la Tabla IV.2 se muestra el desarrollo de las bacterias lácticas seleccionadas a 4, 8, 15 y 45 °C. Todas las cepas crecieron bien a 15 y 45 °C, a 8 °C lo hicieron débilmente y ninguna cepa lo hizo a 4 °C.

IV. 3. 4. - Tolerancia al cloruro sódico

La prueba se realizó de la manera descrita en la sección III.2.4.4. Los resultados indican que todas las cepas crecen bien tanto con un 7 %, como con un 10 % de NaCl (Tabla IV-2).

IV. 3. 5. - Tolerancia al pH 3,9

Como se observa en la Tabla IV-2, todas las cepas se desarrollaron en medio MRS ajustado con HCl 1 N a un pH de 3,9.

IV.3. 6. - Hidrólisis de la arginina

La Tabla IV.2 indica que todas las cepas hidrólizan la arginina. Esta reacción es negativa cuando no hay modificación del color del medio y positiva cuando adquiere una tonalidad marrón oscura.

Tabla IV. 2. - Características morfológicas y bioquímicas de las bacterias lácticas seleccionadas

Característica	Cepa nº					
	209	211	241	346	347	438
Morfología	cocos	cocos	cocos	cocos	cocos	cocos
Tinción de Gram	+	+	+	+	+	+
Catalasa	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis Arginina	+	+	+	+	+	+
Producción CO ₂	-	-	-	-	-	-
Producción H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-
<u>Crecimiento:</u>						
7 % NaCl	+	+	+	+	+	+
10 % NaCl	+	+	+	+	+	+
4 °C	-	-	-	-	-	-
8 °C	d	d	d	d	d	d
15 °C	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	+	+	+
pH 3,9	+	+	+	+	+	+

d= Crecimiento débil

IV. 3. 7. - Producción de gas

En la Tabla IV-2 se observa que ninguna de las cepas analizadas produjo CO₂ a partir de los carbohidratos utilizados. Los análisis se realizaron según la metodología descrita en la sección III.2.4.7.

IV. 3. 8. - Producción de sulfídrico

Esta prueba realizada según la metodología descrita en la sección III.2.4.8, fue siempre negativa (Tabla IV-2).

IV. 3. 9. - Producción de acetoina

La capacidad de producir acetoina se estimó de la manera descrita en la sección II.2.4.6. De los resultados de la Tabla IV-2 se deduce que ninguna de las cepas analizadas produce acetoina.

IV. 3. 10. - Utilización de los hidratos de carbono

La capacidad de las cepas seleccionadas de utilizar diversos carbohidratos se evaluó según el procedimiento descrito en la sección III.2.4.10. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.3. De ellos se deduce que:

a) Todas las cepas analizadas utilizan los siguientes carbohidratos: L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, N-acetilglucosamina, gentibiosa, sacarosa, amigdalina, arbutina, esculina, salicina y celobiosa.

b) Ningunas de las cepas utilizó los siguientes carbohidratos: eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, adonitol, β - metil D-xilósido, L-sorbosa, ramnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α - metil D-manósido, α - metil D-glucósido, maltosa, lactosa, melibiosa, trealosa, inulina, melecitosa, D-rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, D-turonosa, D-xilosa, D-tagatosa, D-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2-cetogluconato y 5-cetogluconato.

Dados los resultados de las pruebas descritas y el esquema de identificación de Schillinger y Lücke (1987b), así como las características descritas por Garvie (1986), se deduce que todas las bacterias lácticas seleccionadas pertenecen al género *Pediococcus*.

Tabla IV. 3. - Utilización de carbohidratos por las bacterias lácticas seleccionadas

Carbohidrato	Cepa nº					
	209	211	241	346	347	438
Glicerol	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-
D-Arabinosa	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	+	+	+	+	+	+
Ribosa	+	+	+	+	+	+
D-Xilosa	+	+	+	+	+	+
L-Xilosa	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
β -Metil-D-xilósido	-	-	-	-	-	-
Galctosa	+	+	\pm	+	+	+
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+
D-Fructosa	+	+	+	+	+	+
D-Manosa	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
Sorbosa	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
α -Metil D-Manósido	-	-	-	-	-	-
α -Metil D-Glucósido	-	-	-	-	-	-
N-acetilglucosamina	+	+	+	+	+	+
Amigadalina	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+

Tabla IV. 3. - Continuación

Carbhidrato	Cepa nº					
	209	211	241	346	347	438
Salicina	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-
Melecitosa	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-
Glucógeno	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-
β -Gentibiosa	-	-	-	-	-	-
D-Turanosa	-	-	-	-	-	-
D-Lixosa	-	-	-	-	-	-
D-Tagatosa	-	-	-	-	-	-
D-Fucosa	-	-	-	-	-	-
L-Fucosa	-	-	-	-	-	-
D-Arabitól	-	-	-	-	-	-
L-Arabitól	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-
2-cetogluconato	-	-	-	-	-	-
5-cetogluconato	-	-	-	-	-	-

IV. 4. - Espectro antimicrobiano de la sustancia inhibidora exocelular de *Pediococcus* sp. 209, 211, 241, 346, 347 y 438

Una vez caracterizadas bioquímicamente las seis bacterias lácticas de interés, se analizó la actividad inhibidora de sus sobrenadantes simples (S) y de los concentrados libres de células (Sc), frente a un mayor número de microorganismos taxonómicamente relacionados, así como frente a otras bacterias Gram-negativas y frente a diversos microorganismos alterantes o patógenos de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Listeria* y *Staphilococcus*.

La actividad inhibidora de los sobrenadantes se evaluó según la metodología descrita en la sección III.2.3.3. y los resultados se reflejan en la Tabla IV.4.

De los resultados obtenidos se desprende que :

1) La actividad inhibidora de los sobrenadantes simples (S) y de los concentrados (Sc) de los pediococos seleccionados parecen diferentes entre si, debido a variaciones en su espectro antimicrobiano.

2) Las cepas no sólo producen sustancias (s) específicas, sino que su actividad depende, además del microorganismo indicador empleado, también de la cepa de *Pediococcus* sp. utilizada.

3) Los sobrenadantes de *Pediococcus* sp. 347 poseen un espectro antimicrobiano mayor que el resto de las cepas evaluadas tanto frente a diversos microorganismos taxonómicamente relacionados, como también frente a bacterias Gram-positivas de los géneros *Clostridium*, *Listeria*, *Propionibacterium* y *Staphilococcus*, de gran interés higiénico-sanitario

Tabla IV. 4.- Espectro antimicrobiano de los *Pediococcus* sp. seleccionados^(b).

Microorganismo	Origen ^(a)	<i>Pediococcus</i> sp. n ^o											
		209		211		241		346		347		438	
		S	Sc	S	Sc	S	Sc	S	Sc	S	Sc	S	Sc
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC4356	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	ATCC11842	11,0	15,3	9,6	16,4	10,6	19,1	0	19,2	13,0	14,6	0	12,6
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus curvatus</i>	NCFB2739	0	0	0	11,6	0	0	0	0	13,6	20,4	15,0	20,2
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC9338	0	12,0	0	9,0	0	9,7	0	13,0	0	11,0	0	14,0
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ATCC15009	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NCDO1193	0	0	0	0	0	0	0	0	8,4	14,4	8,5	15,6
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM20016	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus sake</i>	NCFB2714	0	0	15,4	20,1	9,6	17,0	10,8	16,0	31,0	38,6	31,0	33,6
<i>Lactobacillus salivarius</i>	NCFB2747	0	0	0	0	0	0	0	0	9,8	14,2	9,2	13,0
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	FBB63	0	0	0	16,4	0	10,0	0	11,0	31,0	33,6	29,4	33,8
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	PC1	0	0	0	0	0	0	0	13,5	0	0	0	0
<i>Leuconostoc cremoris</i>	DB1275	0	0	0	13,4	0	8,2	0	0	0	0	0	0
<i>Lactococcus cremoris</i>	CNRC117	0	0	16,2	21,2	0	0	0	7,8	27,6	31,8	28,2	31,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF	0	8,5	0	10,2	0	0	0	8,5	19,6	25,0	20,8	23,4

Tabla IV. 5.- (continuación)

Microorganismo	Origen ^(a)	<i>Pediococcus</i> sp. n ^o											
		209		211		241		346		347		438	
		S	Sc	S	Sc	S	Sc	S	Sc	S	Sc	S	Sc
<i>Staphylococcus carnosus</i>	MC1	0	8,7	0	0	0	11,5	0	10,1	15,4	18,4	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	FRI137	0	0	0	24,4	0	11,0	0	0	16,4	17,6	15,4	17,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	FRI196E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	FRI349	0	8,7	0	8,0	0	10,8	0	10,0	16,4	18,6	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	FRI472	0	0	0	0	0	11,1	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	FRI361	0	9,0	0	0	0	0	0	12,4	15,4	17,6	15,0	20,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC7973	0	0	0	8,0	0	13,3	0	9,1	15,6	18,6	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	LI5sv1/2	0	0	0	7,6	0	12,0	0	9,0	16,6	18,8	0	18,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC5105	0	8,4	0	0	0	0	0	9,6	16,4	18,6	16,0	19,2
<i>Listeria monocytogenes</i>	LIsv4	0	8,3	0	7,4	0	12,1	0	0	16,4	19,4	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	ScottA	0	0	0	0	0	0	0	10,5	17,2	18,8	10,8	18,6
<i>Listeria innocua</i>	BL86/26	0	10,0	0	0	0	11,4	0	9,0	15,2	18,2	15,4	17,8
<i>Clostridium sporogenes</i>	C22/10	0	0	0	0	0	0	0	0	7,2	10,4	7,2	11,0
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	3,5CT	0	0	0	0	9,1	20,8	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	NCDO1754	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT376	7,5	11,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium botulinum</i>	CECT551	0	0	0	0	0	11,3	0	0	7,8	12,8	0	0

(a).- Abreviaturas como en Tabla III.1
S.- Sobrenadante libre de células

(b).- Actividad inhibidora expresada como diámetro del halo de inhibición en mm.
Sc.- Sobrenadante libre de células concentrados 20 veces

y tecnológico en la industria alimentaria. Por ello, fué este microorganismo el seleccionado para la realización de estudios posteriores.

4) Ninguno de los sobrenadantes de las bacterias lácticas seleccionadas inhibió a las bacterias Gram-negativas analizadas entre las que se incluían *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolitica*.

IV. 5. - Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347

IV. 5. - Parámetros cinéticos del desarrollo y actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347 a diversas temperaturas

IV. 5. 1. 1. - Crecimiento y actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347

En las Figuras 4.8 a 4.11 se muestran los parámetros cinéticos del crecimiento y la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 desarrollado en MRS y MM-Triptosa a 8, 16, 25 y 32 °C. De los resultados obtenidos se deduce que:

1.) *Pediococcus* sp.347 muestra crecimiento cuantificable a 8, 16, 25 y 32 °C, siendo mayor su velocidad de crecimiento a 25 y 32 °C.

2.) A las temperaturas empleadas la actividad antimicrobiana frente a *L. fermentum* CECT285 es escasa poco después de iniciarse la fase de crecimiento logarítmica. La actividad antimicrobiana de esta cepa constituye una propiedad ligada al desarrollo celular, siendo detectable y cuantificable durante su crecimiento en un medio base o mínimo, suplementado con triptosa.

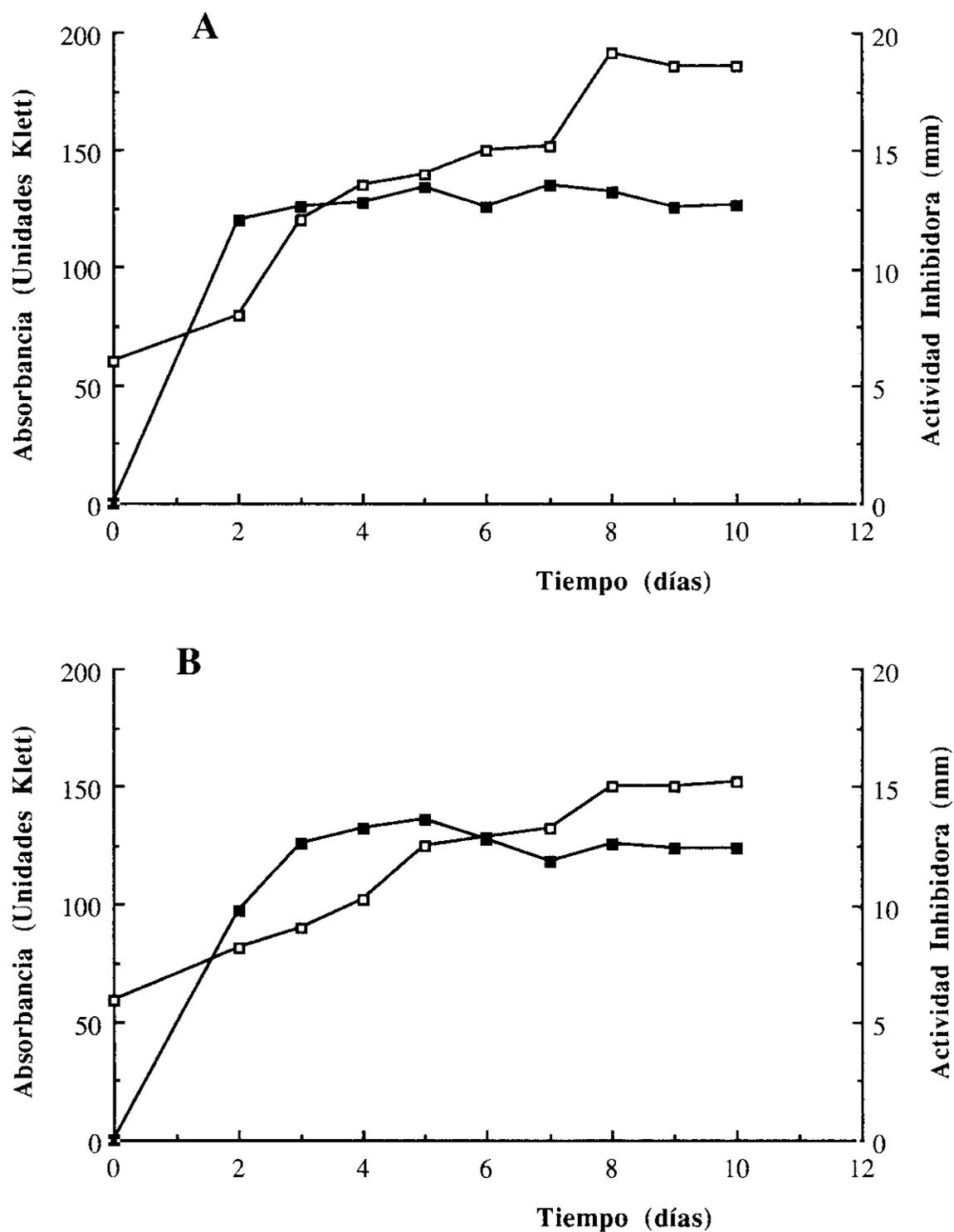


Figura 4. 8. - Crecimiento de *Pediococcus* sp. 347 (□) y actividad antimicrobiana (■), al desarrollarse a 8 °C en MRS (A) y MM-triptosa (B).

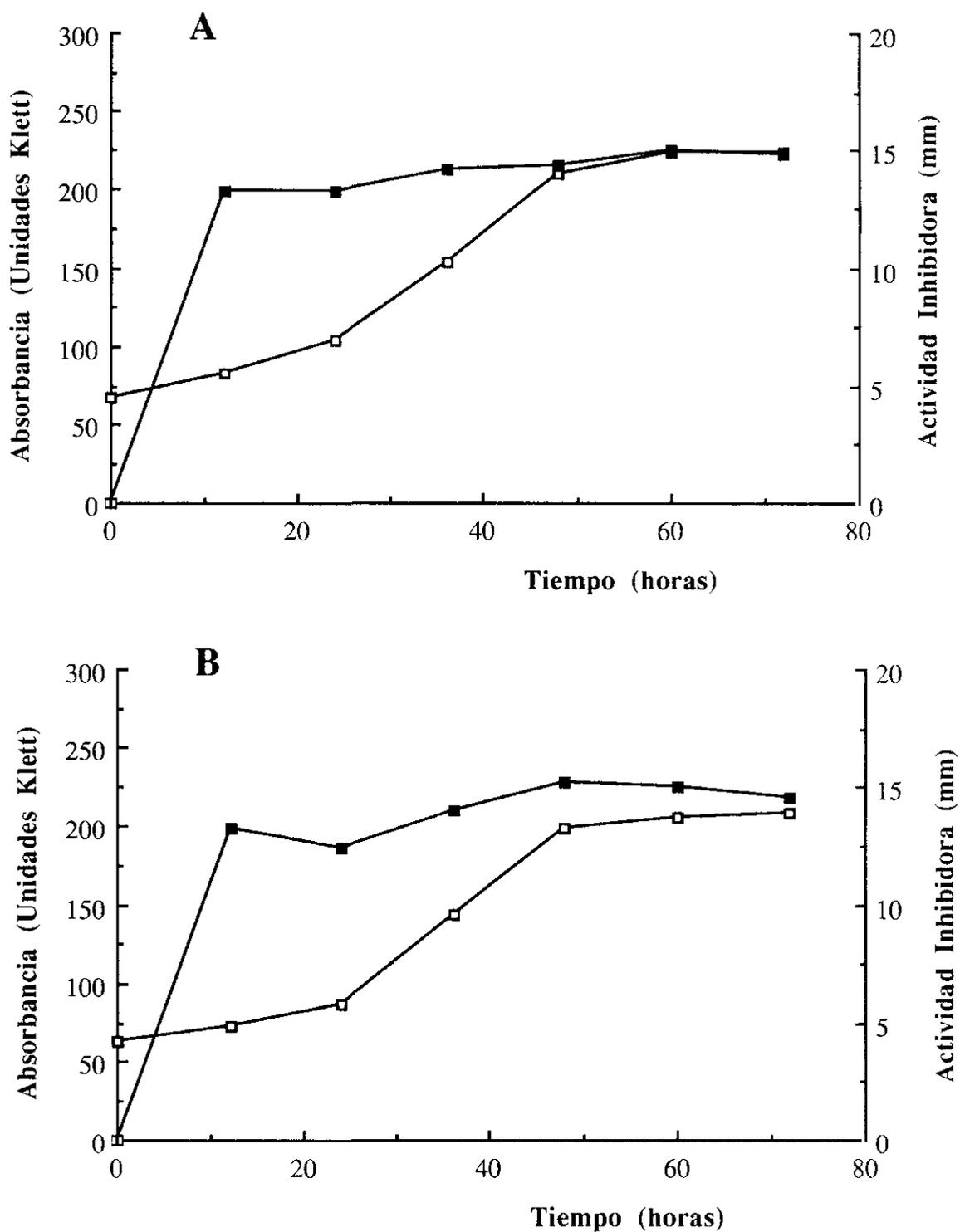


Figura 4.9. - Crecimiento de *Pediococcus* sp. 347 (□) y actividad antimicrobiana (■), al desarrollarse a 16 °C en MRS (A) y MM-triptosa (B).

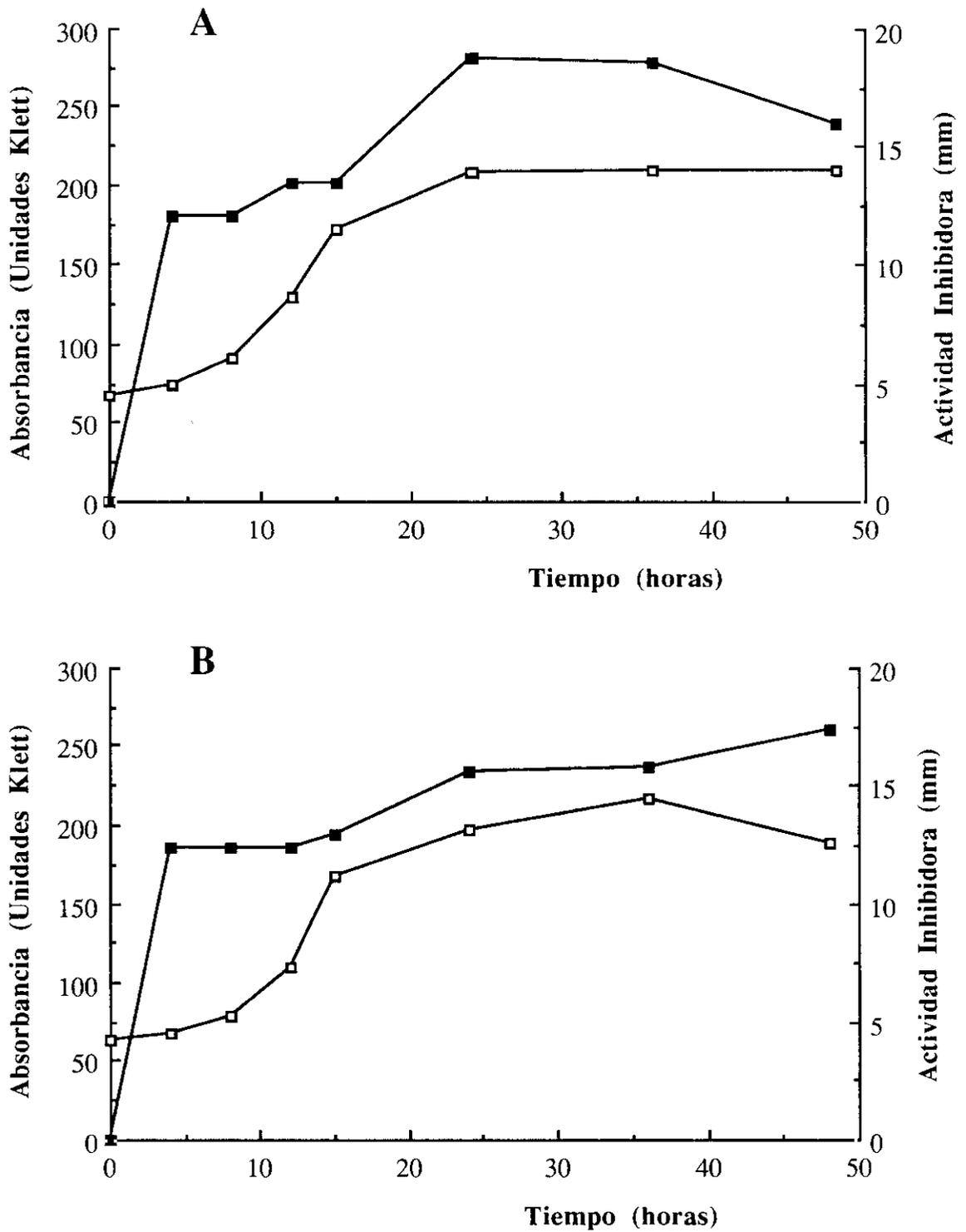


Figura 4.10. - Crecimiento de *Pediococcus* sp. 347 (□) y actividad antimicrobiana (■), al desarrollarse a 25 °C en MRS (A) y MM-triptosa(B).

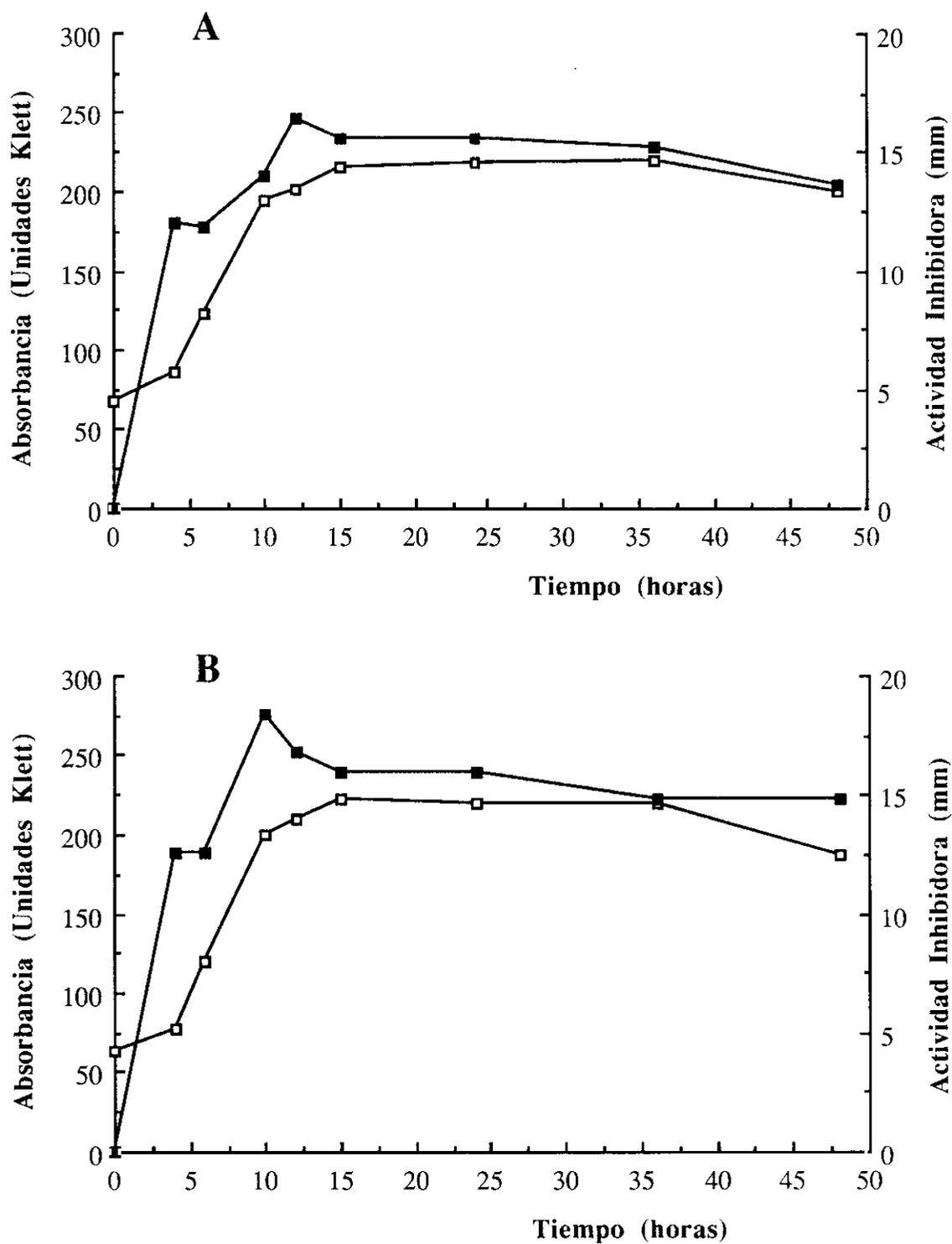


Figura 4. 11. - Crecimiento de *Pediococcus* sp. 347 (□) y actividad antimicrobiana (■), al desarrollarse a 25 °C en MRS (A) y MM-triptosa(B).

3.) La actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, tanto en medio MRS como en MM-Triptosa fue máxima a 32 °C. La actividad máxima a esta temperatura se detecta a las 16 horas de crecimiento e incluso se mantiene a un nivel elevado tras 48 h de incubación.

IV. 5. 1. 2. - Parámetros cinéticos del crecimiento bacteriano

En la Tabla IV.5 se muestran los parámetros cinéticos del crecimiento de *Pediococcus* sp. 347 en MRS y MM-Triptosa a diferentes temperaturas.

Como puede observarse, la velocidad específica de crecimiento y el número de generaciones por hora aumentaron a medida que se elevaba la temperatura, siendo máximas a 25-32 °C. Por ello, el tiempo de duplicación fue inversamente proporcional, disminuyendo significativamente cuando se aumentaba la temperatura de incubación.

El peso celular seco fue ligeramente mayor a las temperaturas de 25-32 °C tanto en medio MRS como en MM-Triptosa. El pH final fue más bajo a las temperaturas óptimas de crecimiento si bien fue parecido en ambos medios. La actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, fue menor a 8-16 °C que a 25-32 °C, tanto en MRS como en MM-Triptosa.

IV. 5. 2. - Efecto de diversos enzimas en la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de *Pediococcus* sp. 347

El efecto de diversos enzimas proteolíticos en la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células de *Pediococcus* sp. 347 previamente concentrados, se evaluó de la manera descrita en la sección III.2.7.2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV-6, de la que se deduce que:

Tabla IV. 5. - Parámetros cinéticos de crecimiento, pH final y actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347, cultivado en los medios MRS y MM-triptosa a diferentes temperaturas

Parámetro (a)	Medio	Temperatura de incubación (°C)				
		4	8	16	25	32
μ	MRS	0,005	0,026	0,054		0,109
	MM-triptosa	0,004	0,024	0,058		0,119
td	MRS	144	26,25	12,95		6,36
	MM-triptosa	165	28,52	11,93		5,83
g/h	MRS	0,006	0,038	0,077		0,157
	MM-triptosa	0,006	0,035	0,075		0,145
pcs	MRS	0,95	1,06	1,04		1,05
	MM-triptosa	0,88	1,04	1,03		1,03
pH	MRS	4,9	4,6	4,3		3,9
	MM-triptosa	4,7	4,3	4,2		4,0
AI	MRS	13,2	15,0	18,6		15,6
	MM-triptosa	12,6	15,0	15,8		16,0

(a) μ , velocidad específica de crecimiento (h^{-1}); td, tiempo de duplicación (h), g/h, generaciones/hora; pcs, peso celular seco (ng/ml); pH, pH final; AI, actividad inhibidora del sobrenadante (mm).

1.) La actividad antimicrobiana cesó completamente tras su tratamiento con los enzimas proteolíticos, siendo muy sensible a las proteasas II y XIV.

2.) La sustancia inhibidora es insensible a la alfa-amilasa y a las lipasas I y VII, lo que sugiere que en su actividad no están involucrados ni lípidos ni carbohidratos.

3.) Los resultados obtenidos indican que la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 es de naturaleza proteica.

IV. 5. 3. - Termorresistencia de la actividad inhibidora de los sobrenadantes de *Pediococcus* sp. 347, concentrados

En la Figura 4.12, se muestra la cinética de termodestrucción de la actividad inhibidora exocelular de *Pediococcus* sp. 347 a 80, 100, 121, 135 y 150 °C. Esta prueba se realizó de la manera descrita en la sección III.2.7.3. De los resultados obtenidos se deduce que:

a) A temperatura menores de 100 °C, la actividad antimicrobiana permanece prácticamente constante durante el tratamiento térmico. Asimismo, la actividad inhibidora conservó más del 80 % de su poder tras su tratamiento a 100 °C durante 20 minutos.

b) A temperaturas de 100 °C o mayores, la disminución de la actividad inhibidora por efecto del calor se ajusta a ecuaciones de primer orden.

c) Los parámetros cinéticos de termodestrucción de la actividad antimicrobiana, (valores "D", " $t_{1/2}$ " y "Z") se calcularon a partir de los resultados experimentales de la inactivación térmica, de la manera descrita en la sección III. 2. 7. 3. 2 de este trabajo.

Tabla IV .6. - Efecto de diversos enzimas en la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp.
347

Enzima	Concentración Final (mg/ml)	Actividad residual (%) ^a		
		Tiempo de incubación (h)		
		2	8	20
Tripsina	1	80	66	26
	5	0	0	0
Pepsina	1	44	36	13
	5	0	0	0
Papaina	1	100	100	51
	5	0	0	0
Proteasa II	1	0	0	0
	5	0	0	0
Proteasa XIV	1	0	0	0
	5	0	0	0
Lipasa I	1	100	100	100
	5	100	100	100
Lipasa VII	1	100	100	100
	5	100	100	100
α -amilasa	1	100	100	100
	5	100	100	100

a. La actividad inhibidora residual se obtiene al dividir la actividad inhibidora de las muestras tratadas con el enzima por la actividad inhibidora de la muestra control, multiplicada por 100.

Los valores "D" a 80, 100, 121, 135 y 150 °C fueron, respectivamente, de 2013, 101, 17,6, 7,8 y 4,5 minutos, y los de " $t_{1/2}$ " a las mismas temperaturas de 1395, 70,0, 12,2, 5,4 y 3,2 minutos. El valor "Z", calculado de la ecuación de la recta de regresión obtenida al representar gráficamente el logaritmo de los valores "D" en función de la temperatura, fué de 26,8 °C.

IV. 5. 4. - Determinación de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 en diversos medios de cultivo

El medio MRS, que se emplea generalmente para el desarrollo de las bacterias lácticas, es muy rico en sustancias proteicas lo que dificultaría la purificación de las sustancias proteicas antimicrobianas. Por ello, la actividad antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347 se determinó en diversos medios de cultivo, empleando como microorganismo indicador *Lactobacillus fermentum* CECT285, de acuerdo con la metodología descrita en la sección III.2.7.1.

Los resultados obtenidos, que se muestran en la Tabla IV.7, indican que el medio BHI, suplementado o no, no permite mantener la actividad exocelular de la cepa estudiada, lo que sugiere que en la síntesis de sustancias antimicrobianas por las bacterias lácticas hay involucrados mecanismos de regulación. Sin embargo, dicha actividad es cuantificable cuando el microorganismo se desarrolla tanto en medio base MM como en APT, suplementados o no.

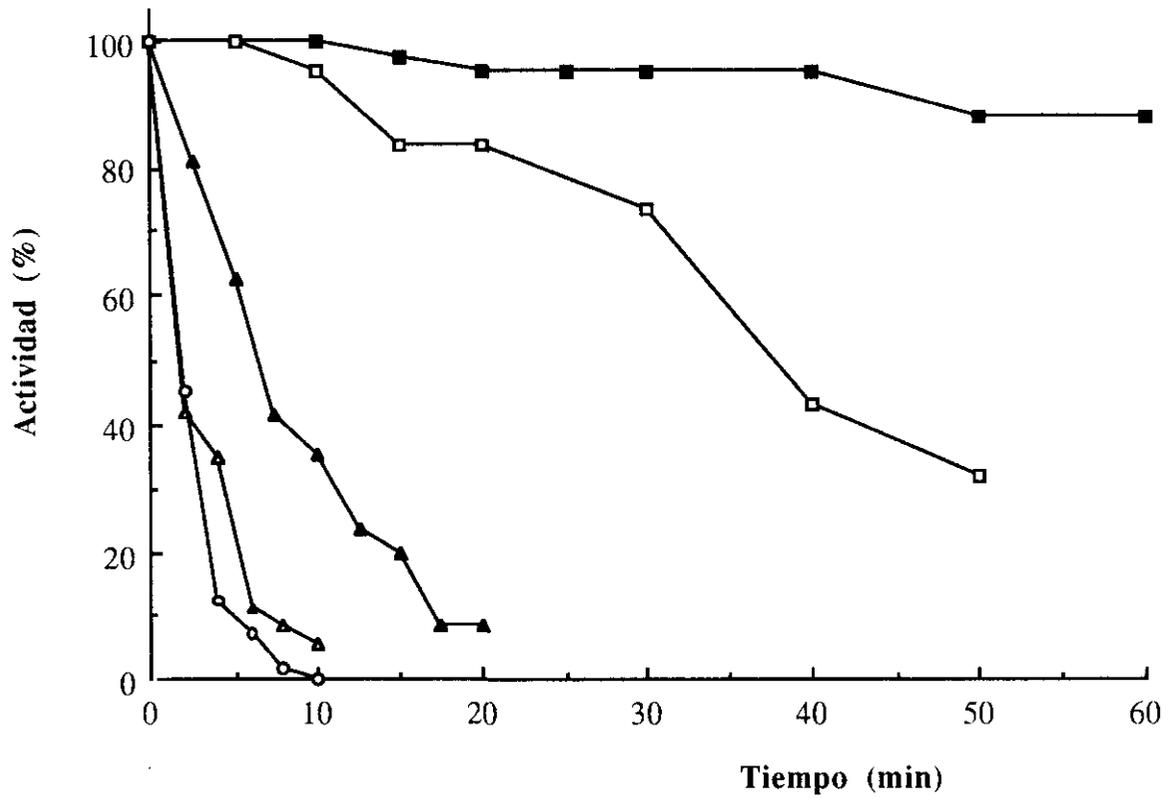


Figura IV. 12. - Termorresistencia de la actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347, tras su calentamiento a 80 (■), 100 (□), 121 (▲), 135 (△) y 150 °C (○).

Tabla IV. 7. - Actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, desarrollado a 32 °C en diversos medios de cultivo

Medio de cultivo	Actividad inhibidora ^a
MRS	++
APT	++
APT + Triptosa	++
APT + Proteosa peptona	++
APT + Extracto de carne	++
APT + Peptona	++
BHI	-
BHI + Triptosa	-
BHI + Proteosa peptona	-
BHI + Extracto de carne	-
BHI + Peptona	-
MM	
MM + Triptosa	++
MM + Proteosa peptona	+
MM + Extracto de carne	++
MM + Peptona	+
MM + Triptona	++
MM + Casitona	+

^a Símbolos para el ensayo de difusión en agar: ++, Diámetro de inhibición grande (15-21 mm); +, Diámetro de inhibición pequeño (<15 mm); -, Sin inhibición.

IV. 5. 5. - Mecanismo de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347

Cuando a los medios MRS, APT y BHI que contienen unas 5×10^5 ufc/ml de diversos microorganismos indicadores (sección III.2.10), se les adicionan 0,5 ml de los sobrenadantes concentrados libres de células de *Pediococcus* sp. 347, se detiene el crecimiento de las bacterias sensibles (Tabla IV-8) pero no disminuye el número de ufc/ml. Sin embargo, la adición de 0,5 ml de un cultivo de *Pediococcus* sp. 347 carente de actividad inhibidora (Bac⁻), no afecta al crecimiento de los microorganismos indicadores. Los resultados obtenidos indican que posiblemente la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 es de tipo bacteriostático.

Tabla IV. 8. - Efecto de los sobrenadantes concentrados libres de células de *Pediococcus* sp. 347 y 23, antagonistas (Bac⁺) y no antagonistas (Bac⁻) respectivamente, en el desarrollo de algunos microorganismos indicadores a 32 °C.

Microorganismo ^a			log ufc/ml			
			0h	4h	8h	16h
<i>Lactobacillus fermentum</i>	285	Bac ⁺	5,3	5,3	5,4	5,5
		Bac ⁻	5,5	6,8	8,7	9,8
<i>Lactobacillus curvatus</i>	726	Bac ⁺	5,6	5,6	5,7	6,1
		Bac ⁻	5,6	6,9	8,5	9,8
<i>Carnobacterium divergens</i>	LV13	Bac ⁺	5,7	5,7	5,3	5,4
		Bac ⁻	5,6	6,9	8,7	9,5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	395	Bac ⁺	5,7	5,8	5,9	6,4
		Bac ⁻	5,7	6,9	8,9	9,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	LI5 sv 1/2	Bac ⁺	5,8	5,7	5,9	6,2
		Bac ⁻	5,8	6,9	8,9	9,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	Scott A	Bac ⁺	5,8	5,7	5,9	6,1
		Bac ⁻	5,8	6,9	8,8	9,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	T91	Bac ⁺	5,5	6,9	8,8	9,5
		Bac ⁻	5,4	6,8	8,7	9,4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	E20	Bac ⁺	5,7	6,1	6,9	8,2
		Bac ⁻	5,8	6,3	7,1	8,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	137	Bac ⁺	5,3	5,1	5,6	6,3
		Bac ⁻	5,2	6,9	8,9	9,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	371	Bac ⁺	5,2	5,3	5,3	6,5
		Bac ⁻	5,3	6,7	8,7	9,8

^a Para conocer la procedencia de los microorganismos ver tabla III. 1.

IV.6. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347

Una vez determinada la naturaleza proteica de la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347, así como su producción en el medio de cultivo semisintético MM-Triptosa, se procedió a su purificación parcial por cromatografía de filtración en geles. Esta técnica se basa en la separación de las moléculas proteicas en función de su tamaño molecular, y se lleva a cabo de la manera descrita en la sección III.2.8.

IV. 6. 1. - Cromatografía de filtración en geles de Sephadex G-150, G-75 y G-50

El sobrenadante concentrado libre de células de *Pediococcus* sp. 347, obtenido de la manera descrita en la sección III.2.3.3.1, se depositó en una columna de Sephadex G-150. El resultado de su purificación se refleja en la Figura 4.13, en la que se muestran la actividad inhibidora y la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas. Como puede observarse, la actividad inhibidora eluye con el frente cromatográfico, se mantiene durante la purificación y se detecta, incluso, durante la elución de los componentes de bajo peso molecular del medio de cultivo. De acuerdo con este resultado, puede decirse que la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347, se encuentra naturalmente formando agregados de un tamaño molecular variable.

Con el objeto de resolver los agregados proteicos que forman la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347, las fracciones cromatográficas números 34 a 86, eluidas de la columna de Sephadex G-150, se concentraron por liofilización y se resuspendieron en tampón de ácido cítrico-fosfato, de pH 5,6 que contiene una concentración de urea 6 M. La muestra se depositó en una columna de Sephadex G-75, eluyéndose con el tampón de elución con una concentración de urea 0,1 M. Los resultados mostrados en la

Figura 4.14, indican una resolución parcial de los agregados proteicos, lo que permite una mayor separación de la actividad antimicrobiana de los componentes del medio de cultivo. Así mismo, las fracciones cromatográficas 14 a 40 se trataron como se ha descrito y la muestra, concentrada por liofilización y sometida a la acción de altas concentraciones de urea, se muestran finalmente en una columna de Sephadex G-50. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 4.15. La actividad inhibidora eluye antes que la mayor parte de los componentes del medio de cultivo, lo que indica que aunque la purificación sea parcial, permite la separación de la mayor parte de la actividad inhibidora de los componentes proteicos del medio de cultivo.

En la Tabla IV-9, se muestran los datos más interesantes de la purificación de la actividad antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347. La purificación fue de 1,2-veces con un rendimiento del 0,34 %. Estos resultados indican que la liofilización y la cromatografía de filtración en gel, no constituyen un método adecuado de purificación de la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347.

IV. 6. 2. - Determinación del peso molecular por cromatografía de filtración en Sephadex G-50

El peso molecular de la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347, purificada como queda dicho, se determinó primero por cromatografía de filtración en un gel de Sephadex G-50. La cromatografía se realizó de la manera descrita en la sección III. 2. 8. 3 y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.10. Para ello, 20 mg de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada se disolvieron en 3 ml de tampón de ácido cítrico-fosfato de pH 5,6 con urea 6 M; a continuación se depositaron en una columna (1,6 x 90 cm) de Sephadex G-50. Una vez determinadas la absorbancia a 280 nm y la actividad inhibidora de las fracciones eluidas, el peso molecular de la sustancia inhibidora se determinó

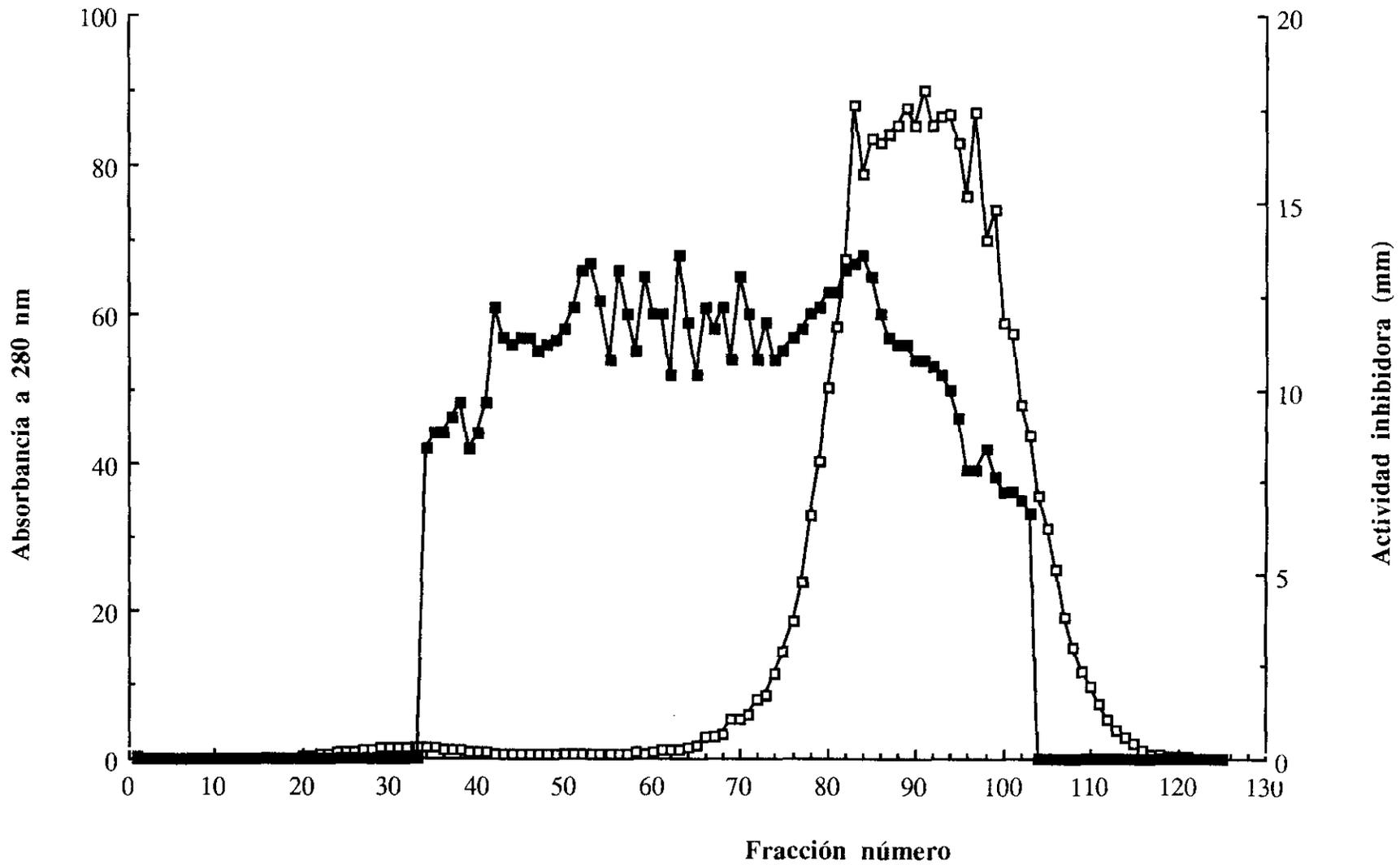


Figura 4. 13.- Purificación parcial de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. n° 347 en Sephadex G-150 fino. (■) absorbancia a 280 nm, (□) actividad inhibidora.

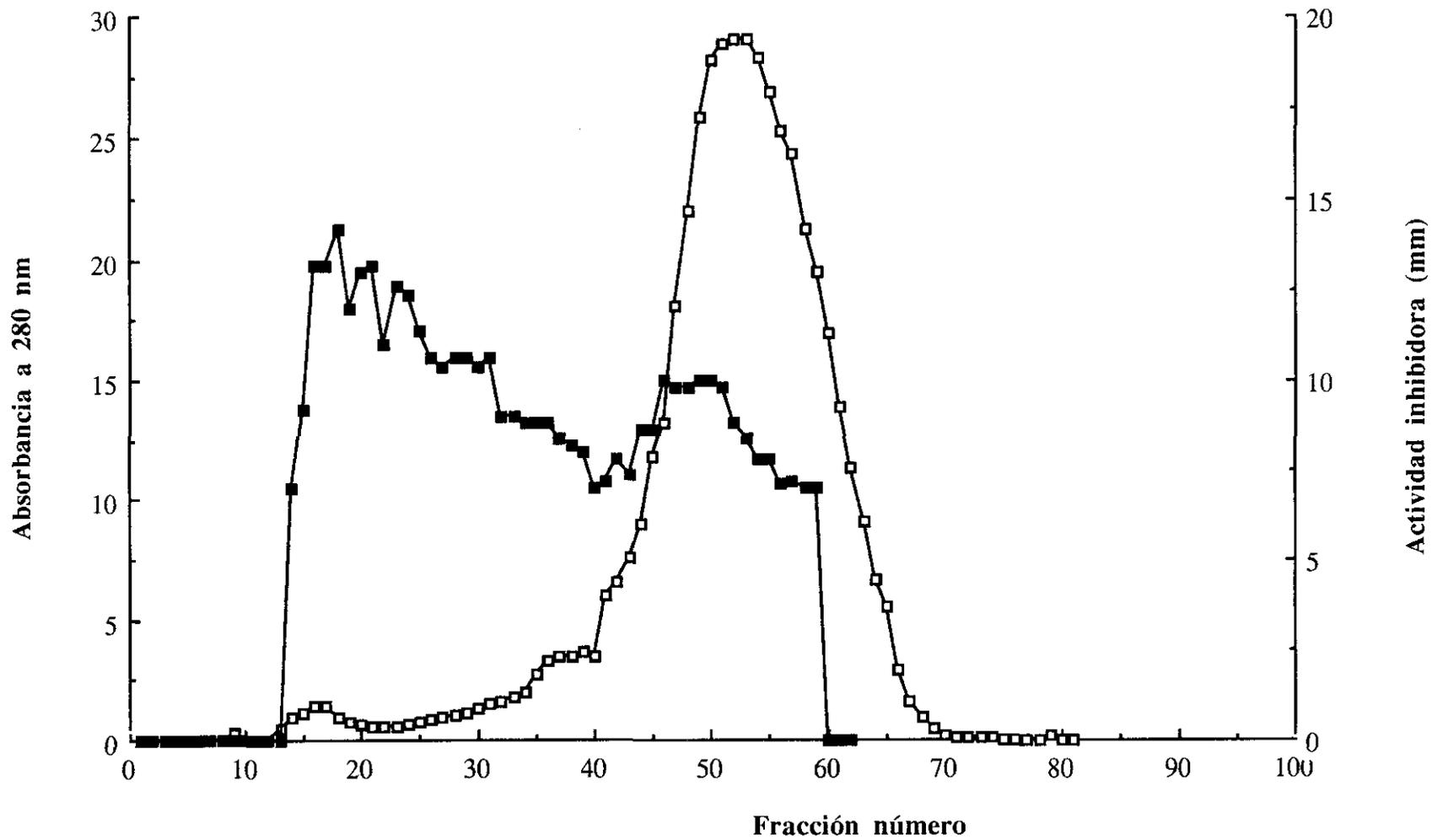


Figura 4. 14.- Purificación parcial de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. n° 347 en Sephadex G-75.
(■) absorbancia a 280 nm, (□) actividad inhibidora.

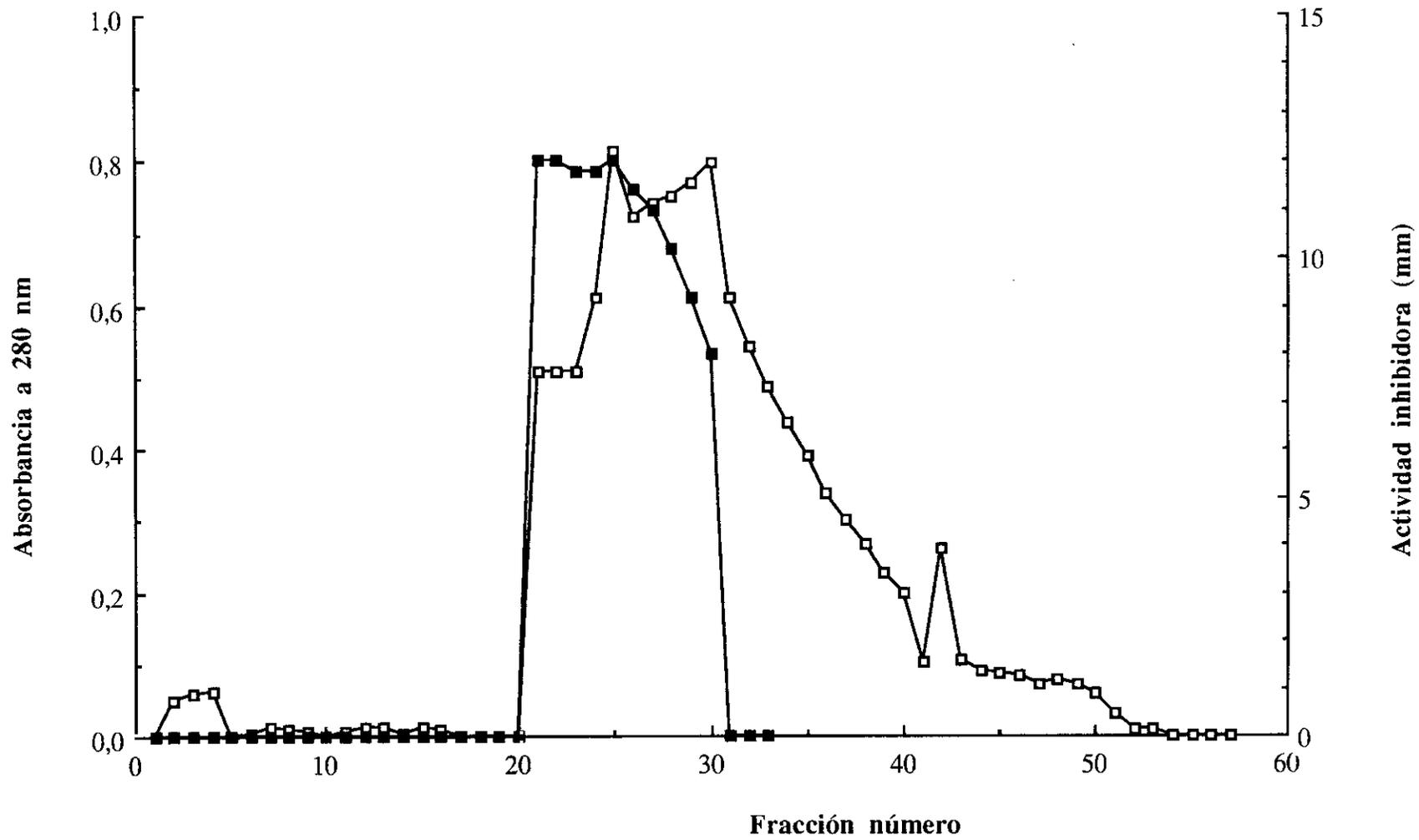


Figura 4. 15.- Purificación parcial de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. n° 347 en Sephadex G-50.
(■) absorbancia a 280 nm, (□) actividad inhibidora.

Tabla IV. 9. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347

	Volumen (ml)	Actividad Inhibidora (cm ² /ml)	Actividad Inhibidora Total (cm ²)	Proteína Total (mg/ml)	Actividad Inhibidora Específica (cm ² /ml)	Actividad Recuperada (%)	Purifica- ción (veces)
Sobrenadante del cultivo libre de células	470	38,9	18.302	6.956,0	2,63	100,0	1,00
Sephadex G-150	7	166,8	1.168	898,1	1,30	6,4	0,49
Sephadex G-75	4	46,0	184	158,8	1,16	1,0	0,44
Sephadex G-50	3	21,0	63	19,8	3,15	0,3	1,19

La purificación se calcula como la Actividad inhibidora específica de la fracción X/Actividad inhibidora específica de la fracción I.

La recuperación se calcula como la Actividad inhibidora de la fracción X/Actividad inhibidora de la fracción I, multiplicado por 100.

por interpolación en una gráfica que representaba la elución de las proteínas estándar de masa molecular conocida en función del logaritmo de su peso molecular (Figura 3.7). El peso molecular de la sustancia antimicrobiana purificada fue de 31.189 daltons.

Tabla IV. 10. - Determinación del peso molecular de la actividad antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347, por cromatografía de filtración en Sephadex G-50

Compuesto	Fracción de elución (nº)	Logaritmo del peso molecular	Peso molecular (Daltons)
α -quimiotripsinógeno	28	4,40	25.000
RNAsa pancreática	34	4,14	13.700
Actividad antimicrobiana	26	4,49	31.189
Vitamina B ₁₂	57	3,13	1.355

IV. 7. - Determinación del peso molecular de la actividad antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347 por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Para confirmar el peso molecular de la sustancia antimicrobiana, determinado por cromatografía de filtración en geles, la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347 obtenida de la manera descrita en la sección III.2.3.3.1, se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico y urea, según la técnica de Swank y Munkres (1971) y, en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), según la técnica de Laemli (1970), ambas se describen en la sección III.2.9. La primera utiliza geles que contienen una concentración alta de poliacrilamida (20 %) y urea (8 M) con el objeto de resolver las cadenas polipeptídicas de bajo peso molecular, mientras la segunda, que utiliza geles que no contienen urea, se utiliza mucho en la separación electroforética de proteínas de un tamaño molecular medio o elevado. Ambas técnicas se utilizan en la separación electroforética de cadenas polipeptídicas y, por lo tanto, en la visualización de la homogeneidad de las proteínas purificadas, así como en la determinación de su peso molecular.

IV. 7. 1. - Electroforesis según la técnica de Swank y Munkres(1971)

La sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347 se sometió a análisis electroforético en geles de SDS-poliacrilamida-urea, según la técnica descrita en la sección III. 2. 9. 1. La representación gráfica de la localización en el gel de las proteínas estandar de alto peso molecular, en función del logaritmo de sus pesos moleculares, permite determinar el peso molecular de una proteína problema interpolando en la gráfica su distancia de migración en el gel. Para ello, se depositaron en geles que contenían un 20 % de poliacrilamida y urea 8 M, muestras con 50 y 100 µg de la sustancia antimicrobiana, disueltas en el tampón de solubilización.

Sin embargo, una vez teñidos los geles se apreció la formación de una mancha difusa que se extendía por los lugares en los que se había depositado la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada. Considerando que la ausencia de bandas proteicas nítidas en los geles podía deberse a la poca eficacia separadora del gel y que la actividad se manifestaba como un agregado proteico, se recurrió a la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS según la técnica de Laemli (1970).

IV. 7. 2. - Electroforesis en geles de 18 % poliacrilamida con SDS según la técnica de LAEMLI (1970)

Aunque esta técnica electroforética es menos resolutiva para péptidos de bajo peso molecular que la de Swank y Munkres (1971), al utilizar el método de tinción de Merril y col., (1981) a base de nitrato de plata, se facilita la identificación de las proteínas en el gel. La tinción de las proteínas en los geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico, es 10-50 veces más sensible que la del azul brillante de Coomassie, utilizada en la técnica de Swank y Munkres (1971).

De acuerdo con la técnica, descrita en la sección III.2.8.4.2., se depositaron en geles que contenían 18 % de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico 20, 40 y 80 μg de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada. Realizada la cromatografía se observó la existencia de una mancha proteica difusa, en los geles teñidos con el reactivo de plata; cuando se evaluó la actividad inhibidora de los diversos fragmentos frente a *L. fermentum* CECT285, en un gel similar, los resultados obtenidos sugieron la presencia de agregados moleculares de la sustancia inhibidora de elevado peso molecular; los mas pequeños poseen un tamaño molecular de unos 3.000 daltons (Figura 4.17).

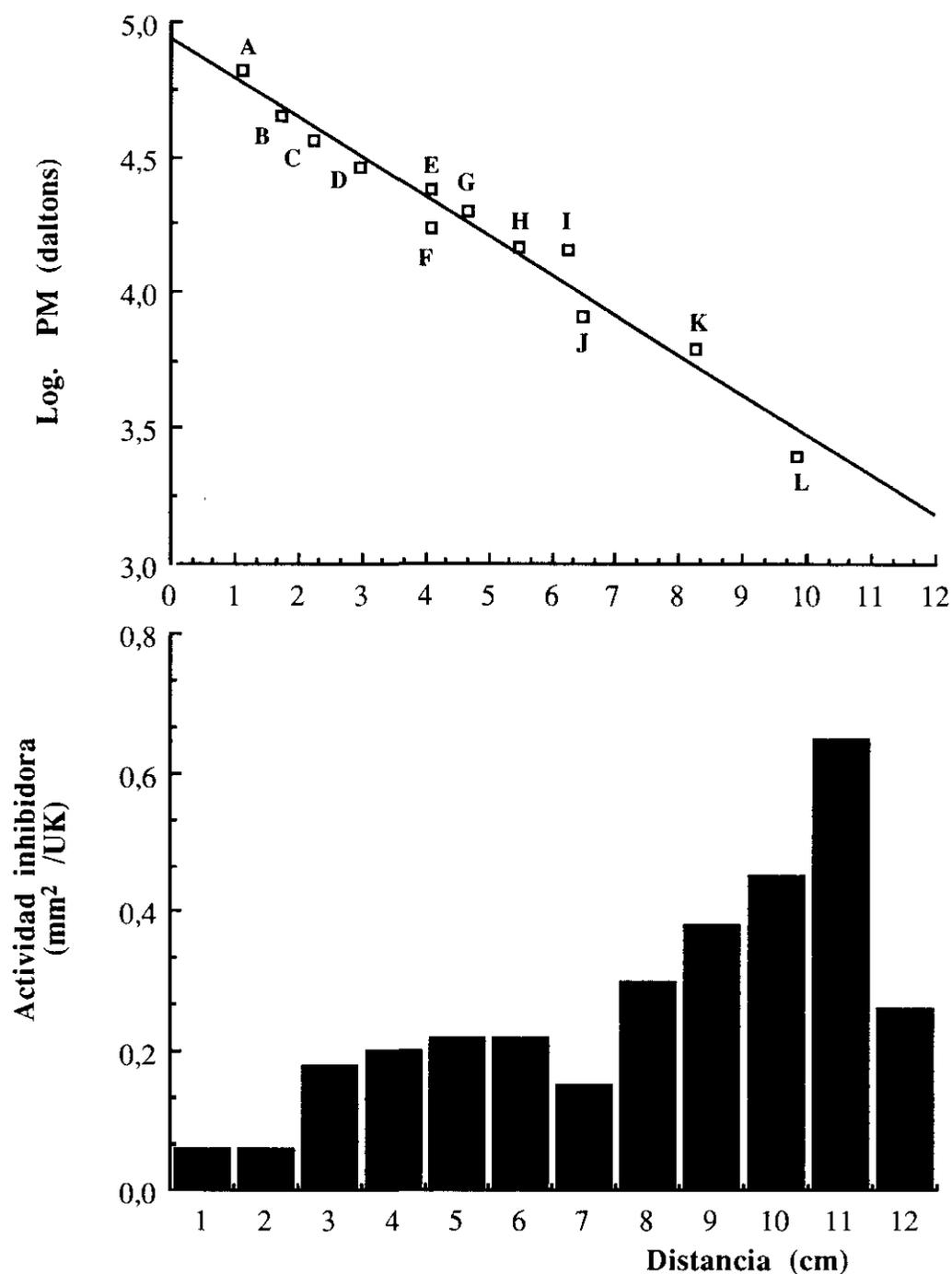


Figura IV. 17.- Actividad antimicrobiana de las fracciones eluidas de un gel de electroforesis con un 18 % de poliacrilamida, frente a *L. fermentum* CECT285. Distancia recorrida desde el inicio hasta el final del gel. Marcadores proteicos: A (66 KDa), B (45 KDa), C (36 KDa), D (29 KDa), E (24 KDa), F (20,1 KDa), G (14,2 KDa), suministrados por BIO-RAD y Pharmacia.

IV. 8. - Determinación de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347

En la Tabla IV-12 se muestran los resultados de la cromatografía del hidrolizado ácido de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada comparados con los correspondientes de los aminoácidos patrón. Los cromatogramas se obtuvieron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), realizada de la manera descrita en la sección III.2.10.

De los resultados obtenidos puede deducirse que:

1) El número probable de residuos aminoácidos de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347, es de unos 48 aminoácidos. La sustancia inhibidora posee 14 aminoácidos diferentes, de los que 13 se identificaron como alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, tirosina y valina; la hidroxiprolina eluyó entre el ácido glutámico y la asparagina. Además, en los cromatogramas se apreció otro pico delante de la prolina que no pudo identificarse. La sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, posee al parecer solamente un residuo de metionina y otro de tirosina.

2) La sustancia antimicrobiana posee 5 de los 8 aminoácidos hidrófobos (alanina, isoleucina, metionina, prolina y valina), que suponen cerca del 35 % de su molécula. Estos aminoácidos son menos solubles en agua que los polares. El miembro menos hidrofóbico de este grupo es la alanina, que se encuentra en el límite entre los aminoácidos apolares y polares con el grupo R neutro. Por otro lado y debido a la hidrólisis ácida a la que se somete esta sustancia para su análisis, no se detectó el triptófano, aunque no se descarta su presencia.

Tabla IV. 11. - Composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347.

Aminoácido	Contenido (nmol)	Residuos por molécula (probable)
Alanina	15,14	7
Acido aspártico	6,84	3-4
Acido glutámico	10,35	5
Glicina	12,98	7
Histidina	34,19	2
Hidroxiprolina	12,16	6
Isoleucina	3,99	2
Lisina	3,82	2
Metionina	2,15	1
Prolina	18,87	4
Serina	6,42	3
Treonina	4,94	2-3
Tirosina	1,83	1
Valina	6,63	3

3) El número de aminoácidos por molécula de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 indica que posee un pequeño tamaño molecular, lo que no se corresponde ni con el peso molecular aparente obtenido por cromatografía de filtración en Sephadex G-50, ni con el obtenido por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.

IV. 9. - Concentración inhibidora mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347

La concentración inhibidora mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347 frente a diversos microorganismos, se determinó de la manera descrita en la sección III.2.10. Los resultados se muestran en la Tabla IV.12. Como puede observarse, *Cl.. perfringens* 376 y *Staph. aureus* FRI349 fueron resistentes a su actividad. Por otro lado, la CIM de esta sustancia en los otros microorganismos evaluados, osciló de 0,6 a 2,5 mg/ml, siendo *List. monocytogenes* LI5sv1/2 la más sensible a esta sustancia antimicrobiana.

Tabla IV. 12. - Concentración Inhibidora mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, en diversos microorganismos indicadores

Microorganismo indicador	Concentración inhibidora mínima (mg/ml)
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT285	1,3
<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	2,3
<i>Clostridium botulinium</i> 551	2,3
<i>Clostridium perfringenes</i>	ND
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC7973	1,2
<i>Listeria monocytogenes</i> LI5sv1/2	0,6
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	2,5
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI137	2,3
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI349	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI362	2,5

ND: Actividad inhibidora no detectable

IV. 10. - Purificación a homogenidad de la sustancia antimicrobiana producida por *Pediococcus* sp. 347

Ya que la purificación parcial de la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347 por liofilización y cromatografía en geles de Sephadex, no dió los resultados esperados, se intentó su purificación a homogenidad siguiendo un protocolo de purificación exitoso con otras bacteriocinas y consistente en la precipitación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes con sulfato amónico, su adsorción posterior a matrices de intercambio catiónico y de interacción hidrofóbica y su purificación final por cromatografía de fase reversa empleando un sistema de cromatografía líquida rápida (FPLC).

La Tabla IV.13 indica que tras la precipitación con sulfato de amonio y la concentración del sobrenadante libre de células de *Pediococcus* sp. 347, la actividad inhibidora específica de la sustancia antimicrobiana se incrementó 22 veces. En esta fase (fracción I), la recuperación de la actividad inhibidora total expresada en unidades de bacteriocina (UB), fue del 91 %.

La actividad inhibidora específica aumentó más de 400 veces tras la resolución de la fracción I por cromatografía de intercambio catiónico, técnica realizada de la manera descrita en la sección III.2.8.6.3. Sin embargo, la recuperación de la actividad inhibidora total (UB) fue menor tras su elución (fracción II) con NaCl 1 M en tampón de fosfato sódico (Tabla IV-13).

En la Tabla IV.13 se muestran la purificación y recuperación de la actividad antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347, cuando se deposita la fracción II en una columna que contiene gel de Octil Sepharosa CL-4B, así como la recuperación de la actividad adsorbida por elución con una disolución de etanol 70 % (fracción III). La actividad inhibidora específica aumentó unas 13.000 veces, mientras que la recuperación fue superior al 50 %.

Cuando la fracción III se depositó en una columna de fase reversa, la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 dió lugar a dos picos (1 y 2) que aparecieron cuando el eluyente poseía, respectivamente, un 29 y 57 % de propanol (Figura 4.18 y Tabla IV.13). De esta manera, en la fracción IV-2 la actividad inhibidora específica aumentó 9.120 veces, mientras que la recuperación fue del 3 % (Tabla IV-13), por su parte la fracción IV-1, aunque purificada de nuevo por la misma columna (Fig. 4.18 (bis)) mostró una purificación de unas 37.000 veces con una recuperación del 17 % de la actividad inhibidora inicial.

El aumento en la actividad inhibidora específica de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, una vez purificada por cromatografía de fase reversa, puede ser consecuencia de la conversión de la sustancia antimicrobiana en una molécula más hidrofóbica debido a encontrarse en un medio con propanol. En esta fase y de acuerdo con el cromatograma obtenido (Figura 4.18(bis)), parece que la sustancia inhibidora de *Pediococcus* sp. 347 está purificada a homogeneidad. Por otra parte, la fracción IV.2 no se volvió a pasar por la columna de fase reversa dado que eluye como un pico definido e independiente más lejano; también parece purificada a homogeneidad.

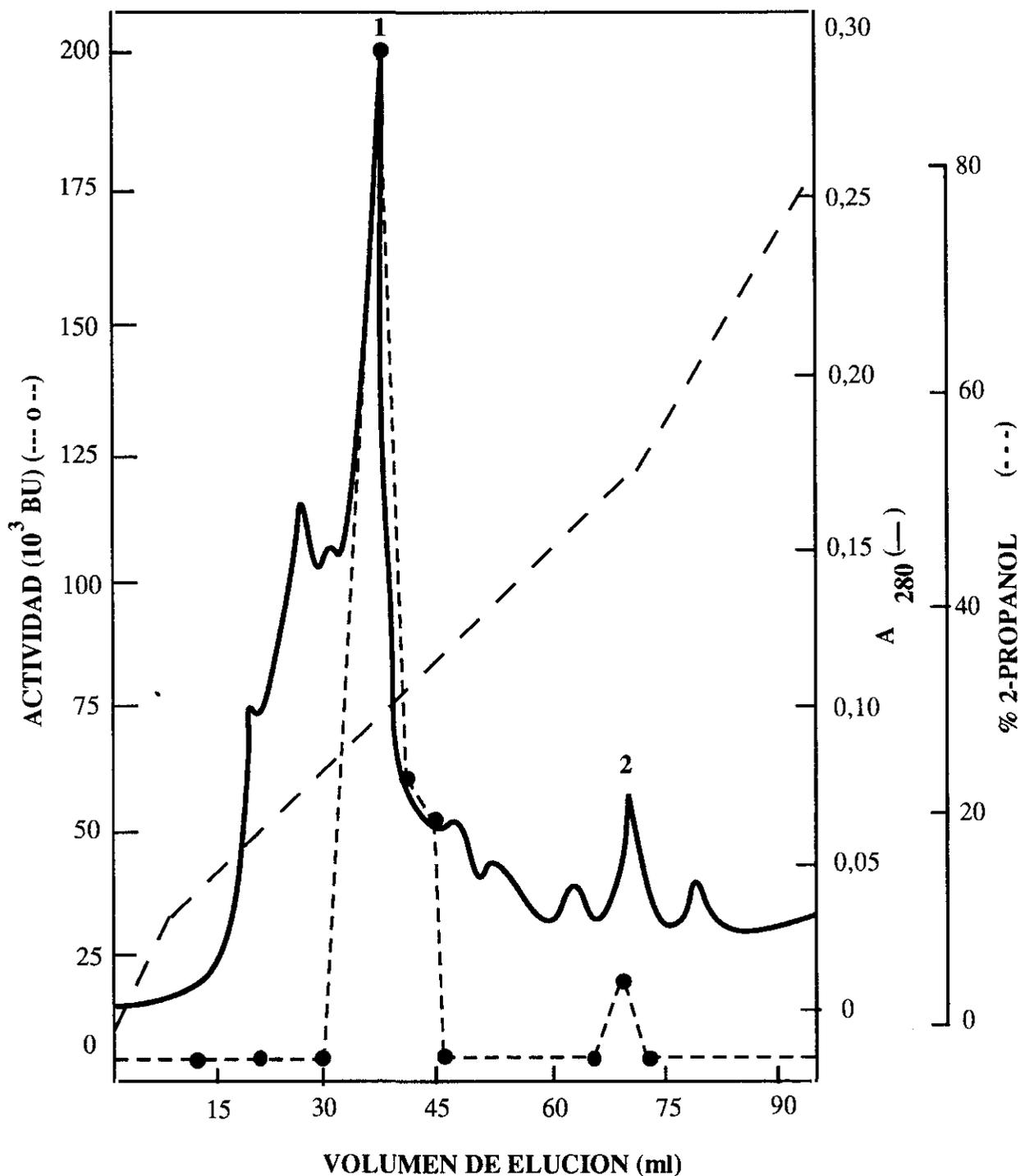


Figura 4. 18.- Purificación de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 por cromatografía de fase reversa de la fracción III. (-o-) Acitividad inhbidora. (—) Absorbancia a 280 nm. (----). Gradiente de 2-Propanol.

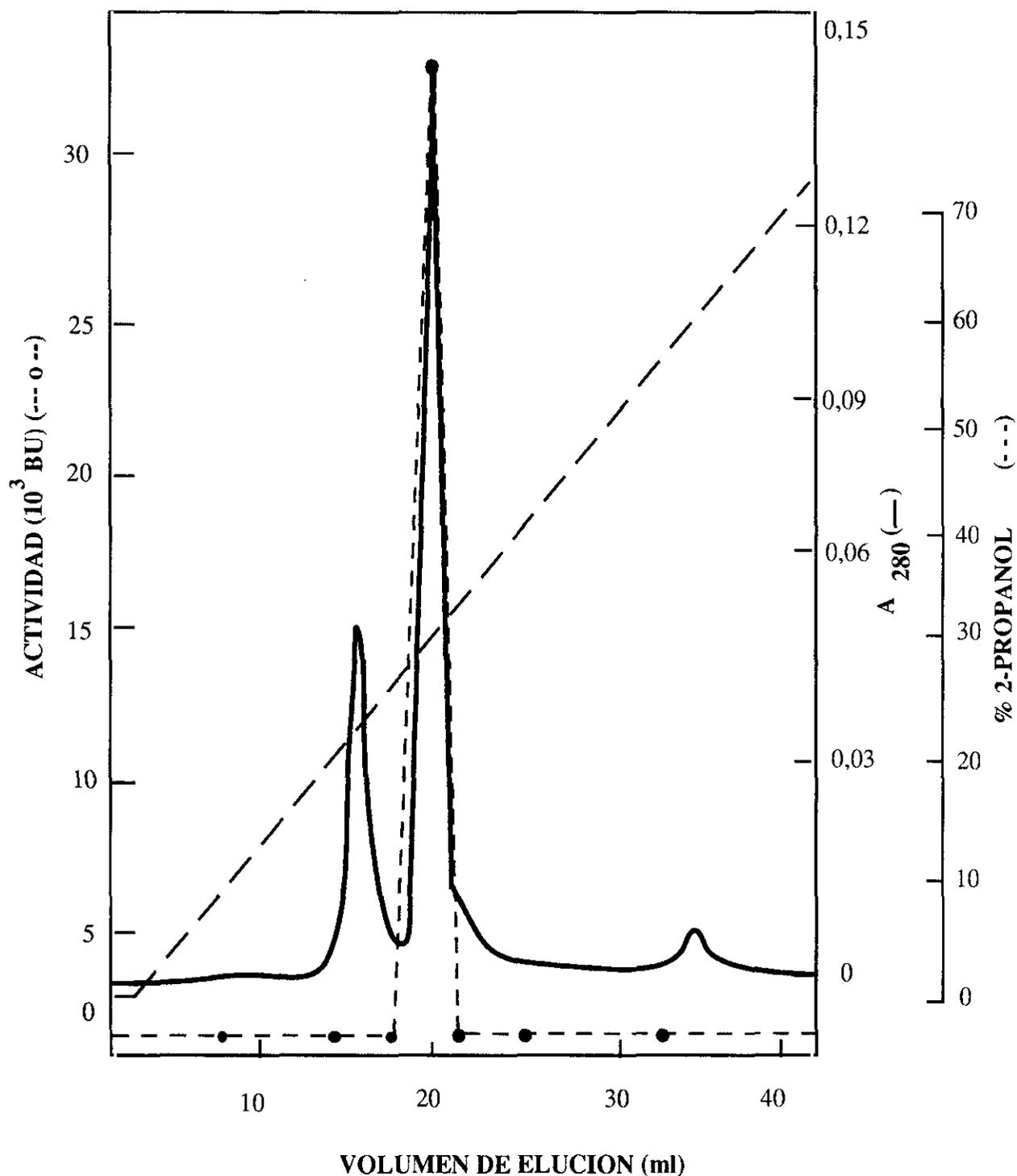


Figura 4. 18 (bis) - Purificación de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 por cromatografía de fase reversa del pico 1 de la fracción III. (---o---) Actividad inhibidora. (—) Absorbancia a 280 nm. (----). Gradiente de 2-Propanol.

Tabla IV.13.- Purificación a homogeneidad de la actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347.

	Vol. (ml)	Actividad Inhibidora Total (UB)	Proteína Total (A ₂₈₀)	Actividad Inhibidora Específica (UB/A ₂₈₀)	Recuperación (%)	Purificación (veces)
Sobrenadante	1000	375.000	27.600	13	100	1
Precipitación con sulfato amónico (Fracción I)	200	341.000	1.200	284	91	22
Intercambio catiónico (Fracción II)	60	70.500	12,3	5.732	19	441
Octil-Sepharosa (Fracción III)	10	192.000	1,17	164.102	52	12.623
Cromatografía de fase reversa (Fracción IV-1)	1	62.255	0,13	478.885	17	36.837
Cromatografía de fase reversa (Fracción IV-2)	1,25	10.752	0,09	119.467	3	9.190

- IV. 11. - Caracterización inmunológica parcial de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347
- IV. 11. - Análisis por inmunodifusión en geles de agarosa de los inmunosueros obtenidos de conejos, frente a la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347,

Antes de inocular los conejos con la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347, obtenida de la manera descrita en la sección III.2.8 de este trabajo, se comprobó por inmunodifusión en geles de agarosa (sección III.2.12.4.1) que la sangre de los conejos a inmunizar no poseía anticuerpos frente a los extractos antigénicos utilizados como inmunógenos, ni frente a los utilizados como controles experimentales. En consecuencia, todos los animales se consideraron aptos para iniciar su inmunización.

Durante el proceso de inmunización se realizaron tres sangrías parciales para comprobar si los animales de cada lote producían anticuerpos frente a las proteínas inoculadas, así como para determinar la ausencia de reacciones cruzadas con otros extractos antigénicos.

En la sangría parcial número 1, efectuada a los 21 días de la primera inoculación antigénica, ya se detectaron reacciones de precipitación antígeno-anticuerpo al enfrentar el inmunosuero con sus respectivos extractos antigénicos (S347 y Sc347), mientras que no se observaron líneas de precipitación frente a los extractos antigénicos del sobrenadante y del sobrenadante concentrado de *L. sake* 148. En la segunda sangría parcial, efectuada a los 42 días de la primera inoculación antigénica, se apreció (Tabla IV.14) una mayor visibilidad de la banda de precipitación frente a los extractos antigénicos homólogos (SP347 Y ScP347). En la tercera sangría parcial, efectuada a los 63 días de la primera inoculación antigénica, no se observó ningún incremento de la reacción de precipitación antígeno-anticuerpo frente a los

extractos antigénicos homólogos (SP347 y ScP347).

La inmunización se dió por finalizada a los 70 días de su inicio, momento en el que se sacrificaron los conejos. El análisis de los inmunosueros obtenidos en las diversas sangrías y frente a los distintos extractos antigénicos, se muestra en la Tabla IV.14 y Figura 4.20. De los datos obtenidos se deduce que:

a) Cuando el inmunosero anti-P347 se enfrenta a los extractos antigénicos correspondientes, se produce una banda de precipitación antígeno-anticuerpo que es visible en las placas de inmunodifusión a partir de la sangría 2.

b) El inmunosero anti-P347 no produjo bandas de precipitación frente a los extractos antigénicos del sobrenadante simples y del sobrenadante concentrado 20 veces de *L. sake* 148 desarrollado en un medio mínimo.

Tabla IV.14 - Reacciones de precipitación observadas al enfrentar los inmunosueros anti-P347 con diversos extractos antigénicos por inmunodifusión en geles de agarosa

Extracto antigénico	Sangría				
	So	S1	S2	S3	SF
S347	-	+	++	++	++
Sc347	-	+	++	++	++
SMM	-	-	-	-	-
S148	-	-	-	-	-
Sc148	-	-	-	-	-

- Los términos So, S1, S2, S3 y SF, se refieren a la sangría inicial, primera, segunda, tercera y final.
- Los extractos antigénicos son:
 - . S347 = Sobrenadante de *Pediococcus* sp. 347 en MM-Triptosa
 - . Sc347 = Sobrenadante concentrado de *Pediococcus* sp. en MM-Triptosa
 - . SMM = Medio mínimo MM-Triptosa
 - . S148 = Sobrenadante de *L. sake* 148 en MM-Triptosa
 - . Sc148 = Sobrenadante concentrado de *L. sake* 148 en MM-Triptosa

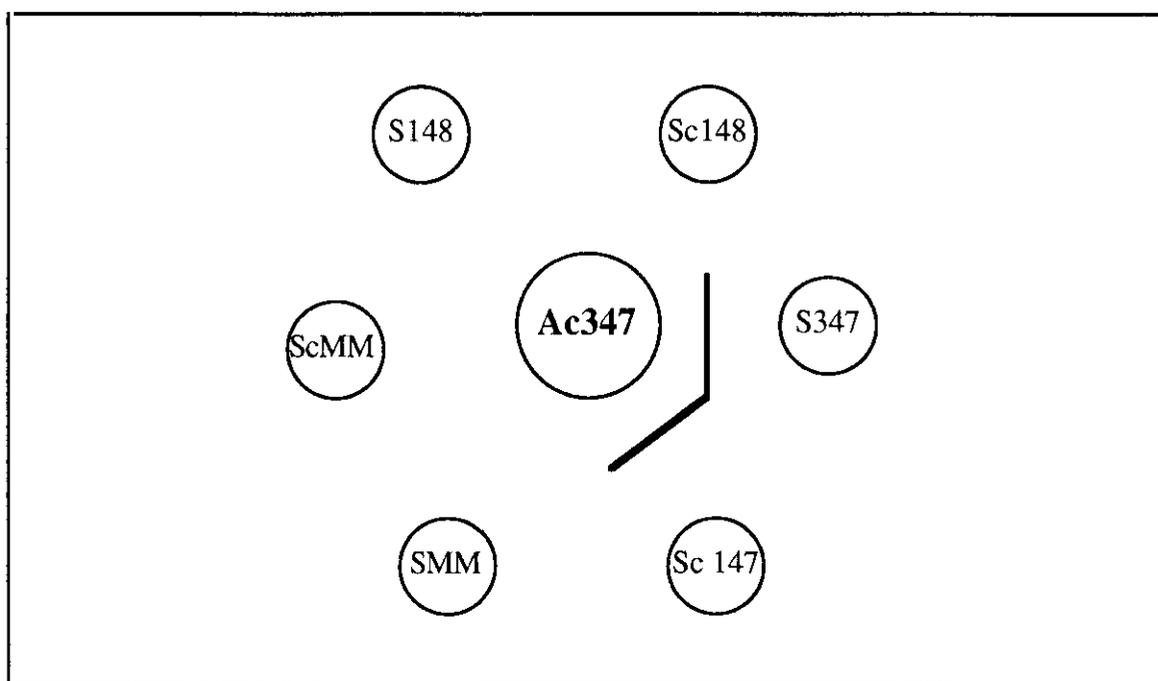


Figura 4. 20. - Líneas de precipitación detectadas cuando el inmunosuero anti-P347, obtenido de conejos, se analiza por inmunodifusión en geles de agarosa, frente a los extractos antigénicos de *Pediococcus* sp. 347 desarrollado en MM-Triptosa (S347) o de *L. sake* 148 en el mismo medio (S148), así como frente al medio MM-Triptosa normal (SMM) o concentrado (ScMM) o frente a los sobrenadantes concentrados de *Pediococcus* sp. 347 (Sc347) o de *L. sake* 148 (Sc148).

IV. 11. 2. - Detección de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347, por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)

IV. 11. 2. 1. - Detección por el ELISA indirecto clásico

El inmunosuero anti-P347, obtenido de la manera descrita en la sección III.2.12.3., se utilizó en el ELISA indirecto clásico, para detectar y cuantificar la producción de anticuerpos frente a la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347.

En este ELISA, además del inmunosuero anti-P347 se utilizaron los siguientes antígenos para poner a punto el ensayo:

- a) la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347 (P347);
- b) los medios MM-triptosa (SMM) y MRS (SMRS),
- c) el sobrenadante libre de células de los cultivos de *Pediococcus* sp. 23 (P23), que es una cepa sin actividad antimicrobiana,
- d) el sobrenadante de *L. sake* 148 (S148), un lactobacilo aislado en nuestro departamento, que produce una bacteriocina muy activa frente a diversos microorganismos indicadores.

IV. 11. 2. 1. 1. - Evaluación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo

Las concentraciones idóneas de los reactivos del ensayo se determinaron según el protocolo descrito en la sección III.2.12.4.3 de esta memoria. Como conjugado se empleó uno comercial, obtenido de cerdos frente a las IgG de conejos y marcado con el enzima peroxidasa de rábano (Sigma). Las indicaciones del fabricante, junto con los datos de algunas experiencias

preliminares, permitieron determinar la dilución 1/3000, como la más adecuada para su utilización en el ensayo.

Una vez ajustada la concentración del conjugado, se procedió a determinar la más adecuada para los extractos antigénicos. Para ello, se eligió una concentración inicial de 10 µg/pocillo, resultante de una dilución de 1 mg de proteína de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347 en 10 ml de tampón PBS. Los extractos antigénicos control, también se utilizaron a la concentración de 1 mg de proteína por 10 ml de tampón PBS.

IV. 11. 2. 1. 2. - Evaluación de la respuesta inmunológica de los conejos frente al extracto antigénico P347

De acuerdo con la pauta de inmunización de los conejos, se realizaron varias sangrías parciales para comprobar si los animales producían anticuerpos frente al extracto antigénico inoculado, así como para determinar la ausencia de reacciones cruzadas frente a los diversos extractos antigénicos.

En la sangría parcial número 1, efectuada a los 21 días de la primera inoculación antigénica, ya se detectó la existencia de una reacción antígeno-anticuerpo positiva al enfrentar el inmunosuero anti-P347 con su respectivo extracto antigénico. Por otro lado, no se observaron importantes reacciones cruzadas con los extractos antigénicos controles. Los resultados obtenidos (Tabla IV.15) permiten establecer que el inmunosuero anti-P347, diluido de 1/1280 a 1/5000 veces discrimina la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347 del resto de los extractos antigénicos utilizados.

En la Figura 4.21, se muestra la evolución de la inmunización de los conejos

con la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, mediante la técnica del ELISA indirecto clásico descrita en la sección III.2.12.4.4.2. En ella se aprecia un incremento significativo de la respuesta inmunológica de los conejos a dicha sustancia durante su inmunización. Dicha respuesta inmunológica aumentó significativamente en la sangría parcial nº 1 y se incrementó solo ligeramente hasta la sangría final realizada a los 70 días de la inoculación inicial.

La Fig. 4.22 muestra el comportamiento de los inmunoseros anti-P347 frente a diversos extractos antigénicos; como se aprecia no hay reacciones cruzadas frente a los extractos antigénicos utilizados.

Tabla IV. 15. - ELISA indirecto de la sangría parcial nº 1, en la que el inmunosuero anti-P347 se enfrenta a diversos extractos antigénicos. Dilución del conjugado 1/3000.

Dilución inmunosuero	Extractos antigénicos (10 µg/pocillo)				
	S347	S23	SMM	SMRS	Control (no antígeno)
anti-P347					
1/20	2,535 ^a	0,696	0,727	0,132	0,132
1/40	2,477	0,677	0,653	0,113	0,113
1/80	2,579	0,562	0,441	0,115	0,115
1/160	2,577	0,447	0,370	0,163	0,163
1/320	2,525	0,345	0,282	0,138	0,138
1/640	2,501	0,236	0,333	0,132	0,132
1/1280	2,488	0,184	0,272	0,063	0,063
1/2560	2,440	0,149	0,246	0,121	0,121
1/5000	1,573	0,140	0,101	0,114	0,114
1/10.000	1,210	0,119	0,099	0,103	0,103
1/20.000	0,770	0,110	0,105	0,114	0,114
1/40.000	0,419	0,107	0,113	0,102	0,102
1/80.000	0,258	0,107	0,116	0,097	0,097
1/160.000	0,207	0,101	0,102	0,099	0,099
1/320.000	0,162	0,101	0,105	0,103	0,103
1/640.000	0,139	0,098	0,099	0,103	0,103

a. Absorbancia de los pocillos a 405 nm.

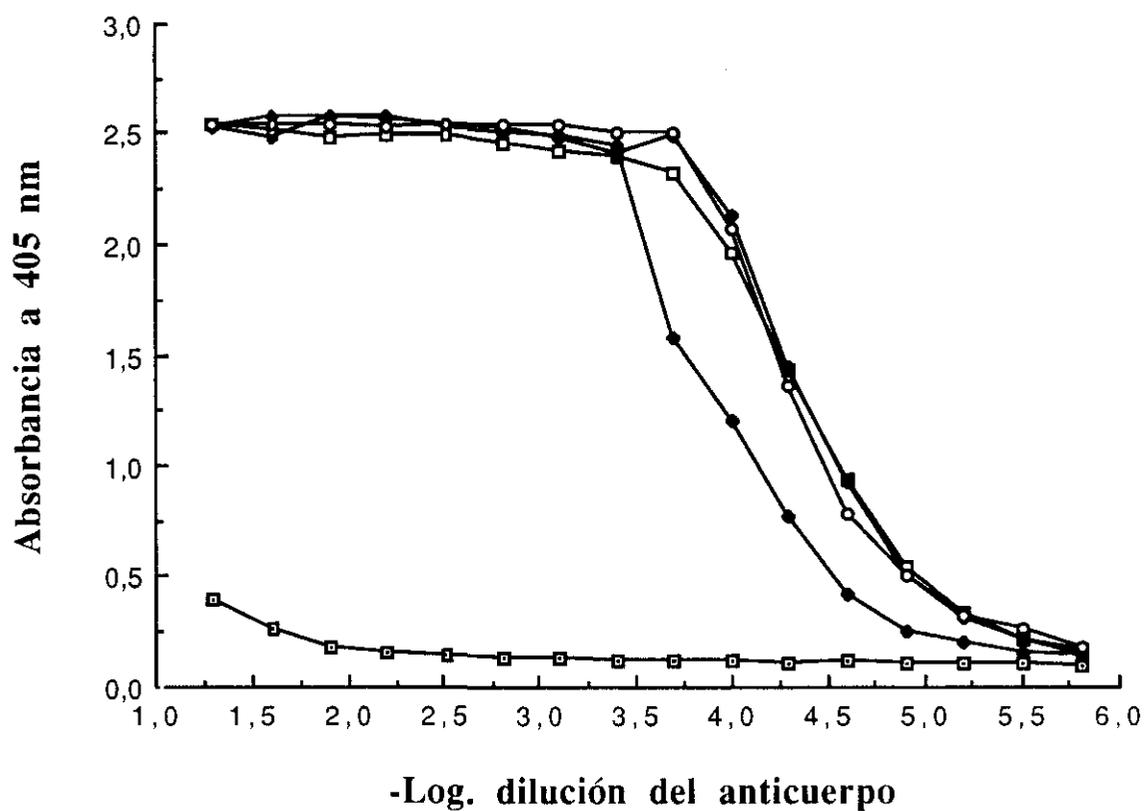


Figura 4. 21. - Evolución de la inmunización de los conejos con la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, mediante un ELISA indirecto clásico a los 0 (□), 21 (■), 42 (□), 63 (■) y 70 (○) días de su inoculación. Dilución del conjugado 1/3000. Concentración del antígeno 10 µg/pocillo.

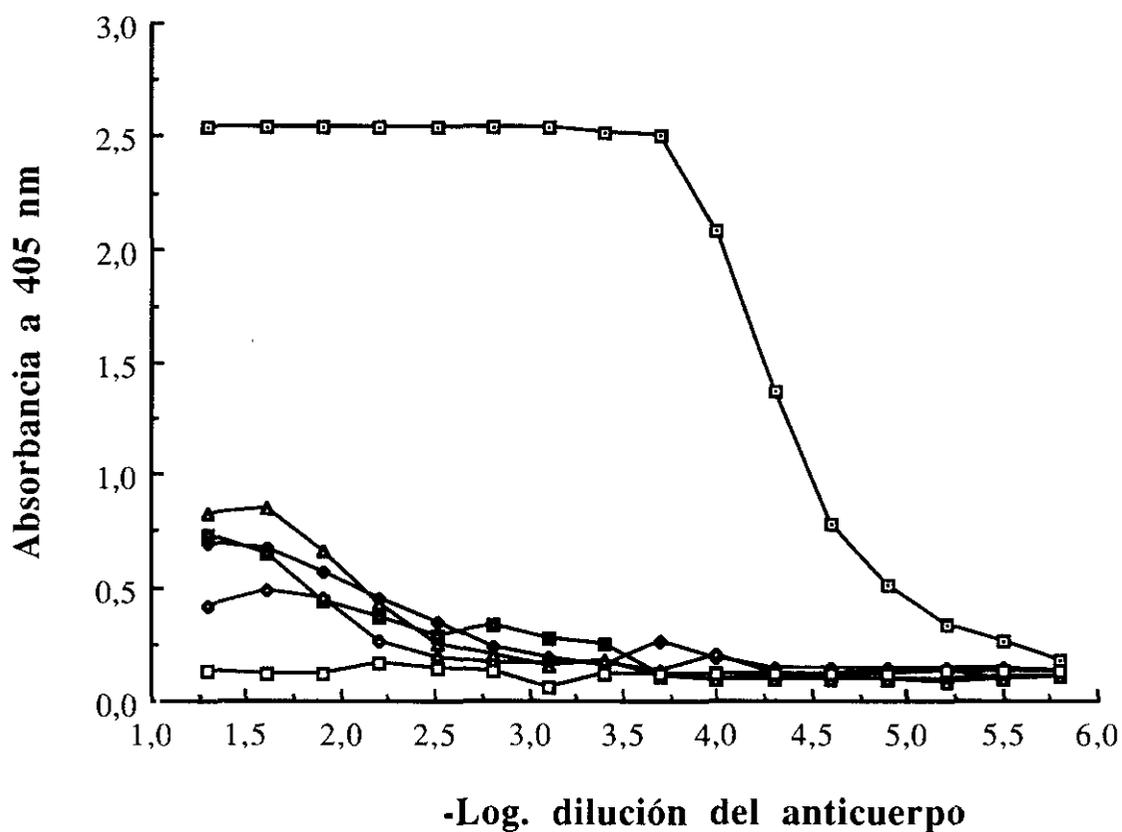


Figura 4.22 - ELISA indirecto del inmunosuero anti-P347 frente a la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 (□); sobrenadante libre de células de *L. sake* 148 (■); sobrenadante libre de células de *Pediococcus* sp. 23 (Δ); medio de cultivo MM-Triptosa (▲); medio de cultivo MRS (◆) y control de los pocillos sin antígeno (□). El resto de los parámetros como en la figura 4.21.

IV. 11. 2. 2. - Detección de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347, mediante la técnica del ELISA indirecto con el sistema de amplificación biotina-avidina

Como inmunosuero se han utilizado los anticuerpos anti-P347, obtenidos de conejos y conjugados a la biotina (sección III.2.12.4.4.3.1).

IV. 11. 2. 2. 1 - Evaluación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo

Las indicaciones del suministrador, además de los datos de algunos ensayos preliminares, mostraron que el conjugado (Extravidina/peroxidasa) proporcionaba los mejores resultados a la dilución 1/3000, eligiéndose ésta como dilución de trabajo.

Los resultados de las Figuras 4.23 y 4.24, muestran que los anticuerpos anti-P347 a la concentración de 10 mg/ml y biotinizados discriminan adecuadamente la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347 a las diluciones de 1/750, 1/1000 y 1/2000.

IV. 11. 2. 2. 2. - Detección de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, en medio MM-triptosa

Los resultados de la Figura 4.25 indican que el inmunosuero anti-P347 biotinizado y a una dilución 1/2000, discrimina la sustancia antimicrobiana de interés en el sobrenadante libre de células de *Pediococcus* sp. 347 en el medio MM-Triptosa frente al sobrenadante libre de células de *Pediococcus* sp. 23 en el mismo medio, frente al medio MM-triptosa, al medio MRS y frente al tampón PBS. El resultado obtenido indica que el inmunosuero anti-P347 detecta la sustancia antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347 en el sobrenadante libre

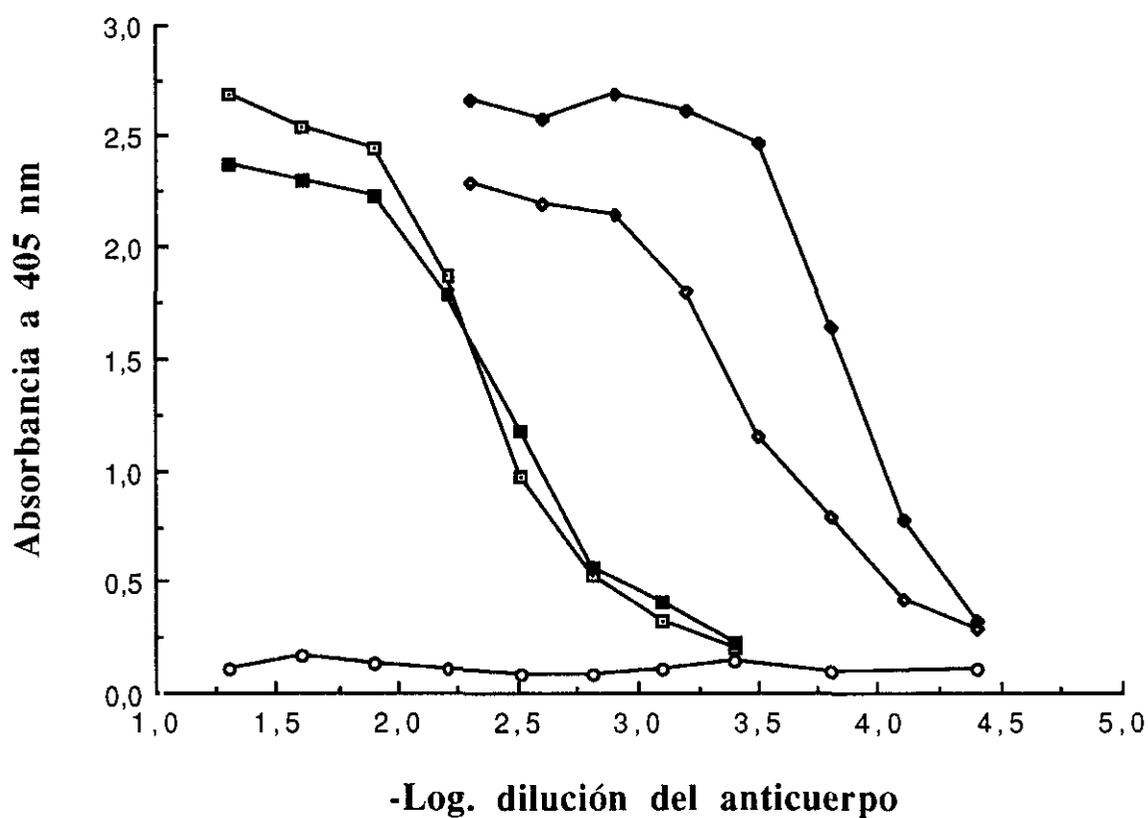


Figura 4. 23. - ELISA indirecto del inmunosuero anti-P347 a la concentración de 1 (■) y 10 mg/ml (□), sin biotinar y biotinado 1 (◆) y 10 mg/ml (◇) frente a la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347. Control tampón PBS (○). Dilución del conjugado 1/3000. Concentración del antígeno 10 µg/pocillo.

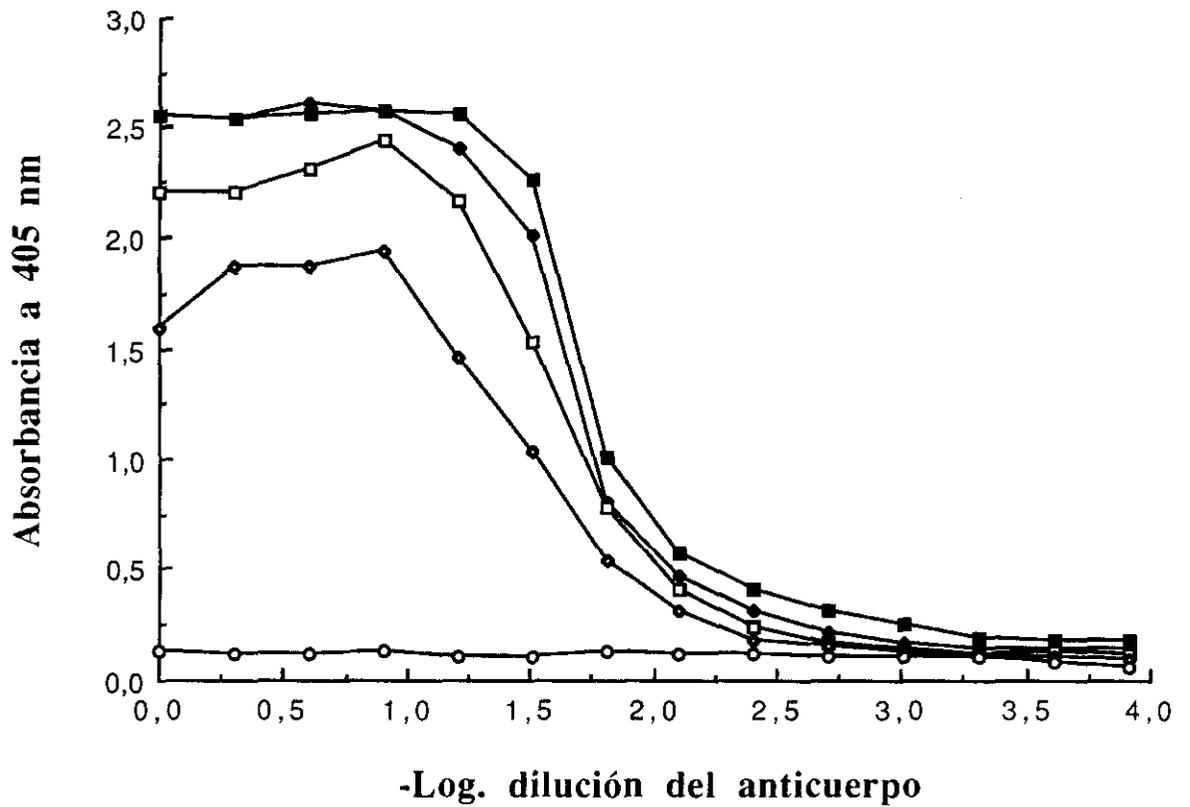


Figura 4. 24. - ELISA indirecto del inmunosuero anti-P347 a la concentración de 10 mg/ml y conjugado a la biotina, frente a la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347. Inmunosuero diluido 1/750 (■), 1/1000 (▲), 1/2000 (□) y 1/3000 veces (▼). Controles de los pocillos sin antígeno (○).

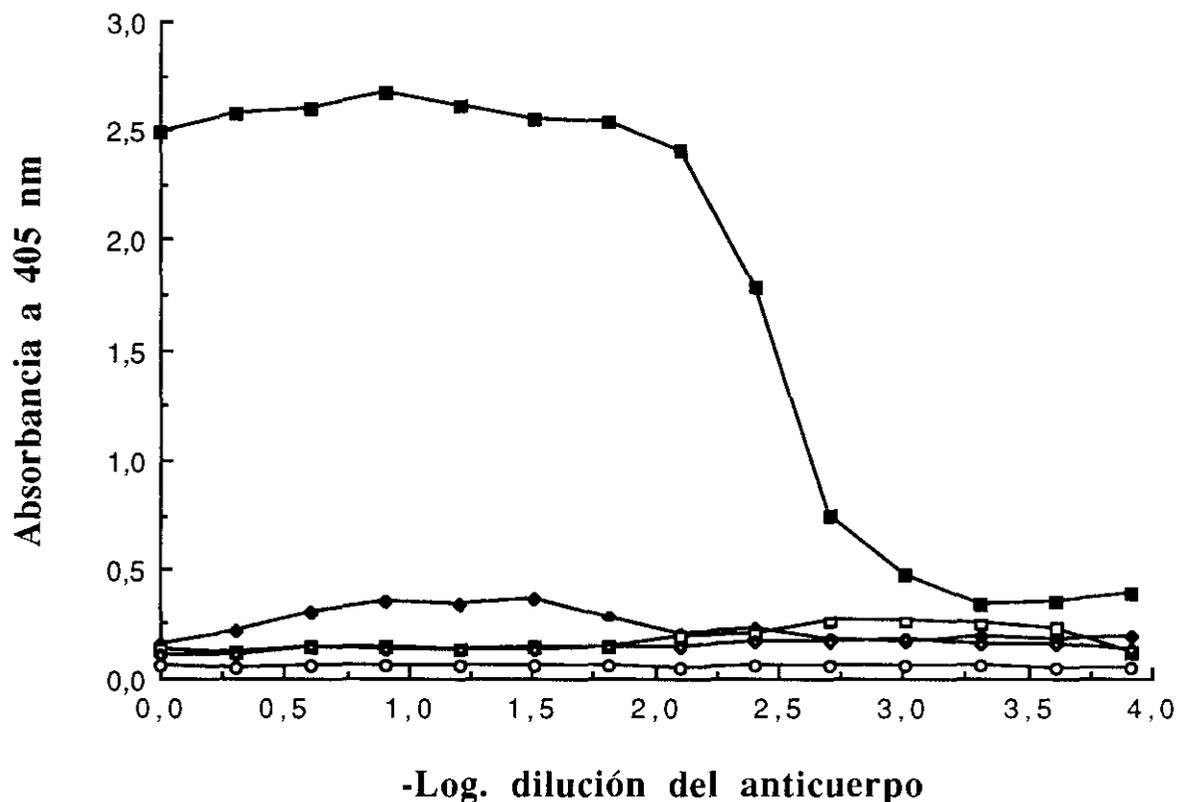


Figura 4. 25. - ELISA indirecto del inmunosuero anti-P347 frente al sobrenadante libre de células de un cultivo de *Pediococcus* sp. 347 en medio MM-Triptosa (■). Como controles se utilizaron el sobrenadante de un cultivo de *Pediococcus* sp. 23 en el mismo medio (◆), medio MM-Triptosa (▣), medio MRS (▢) y tampón PBS (○). Anticuerpo biotinizado (10 mg/ml) y diluído 1/1000. Conjugado diluído 1/3000.

de células de un cultivo de este microorganismo en medio MM-triptosa

IV. 11. 2. 2. 3. - ELISA indirecto de los sobrenadantes libres de células de diversas bacterias lácticas de origen cárnico, frente al inmunosuero anti-P347

El inmunosuero y conjugado utilizados fueron los descritos en el apartado anterior. Como antígenos se emplearon los sobrenadantes libres de células de un número de pediococos y lactobacilos de origen cárnico, obtenidos de la manera descrita en la sección III.2.3.3.2.1 de este trabajo, y desarrollados en medio MM-Triptosa.

Las concentraciones idóneas de los extractos antigénicos fueron iguales que las descritas en la sección anterior. Asimismo, la dilución más apropiada del conjugado comercial de estreptovidina-peroxidasa de rábano fue también de 1/3000 y la del anticuerpo biotinizado de 1/1000. Como control positivo se utilizó el sobrenadante libre de células de *Pediococcus* sp. 347 en medio MM-triptosa y como control negativo el sobrenadante de *Pediococcus* sp. 23 en el mismo medio de cultivo.

En la Tabla IV.16 y Figuras 4.26 y 4.27 , se reflejan los resultados obtenidos. De ellos, se deduce que el inmunosuero anti-P347 reconoce antígenos afines en los sobrenadantes libres de células de otros pediococos dotados de actividad antimicrobiana y crecidos en medio MM-Triptosa. No obstante, dicho inmunosuero no reconoció antígenos afines en el sobrenadante de *Pediococcus* sp. 211, que también manifiesta fuerte actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos indicadores. Estos resultados posiblemente indican que la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 y las de los otros pediococos probados, exceptuando la de *Pediococcus* sp. 211, serían similares antigénicamente, por lo que incluso bioquímicamente podrían ser iguales o similares. En este sentido, se puede pensar que la sustancia inhibidora de *Pediococcus* sp. 211 pueda ser diferente de las demás.

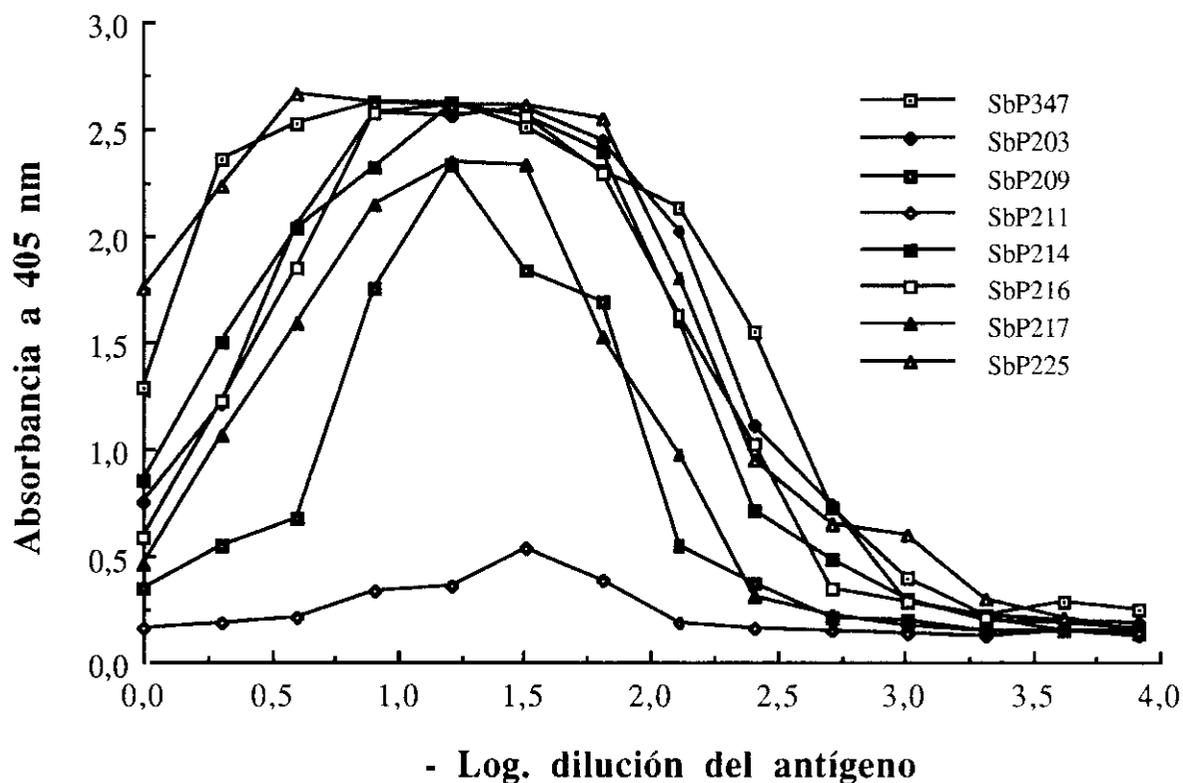


Figura 4. 26. - ELISA indirecto del inmunosuero anti-P347 frente a los sobrenadantes libres de células de *Pediococcus* sp. 347 (□), 203 (◆), 209 (■), 211(◇), 214 (■), 216 (□), 217 (▲) y 225 (▲). Conjugado diluído 1/3000.

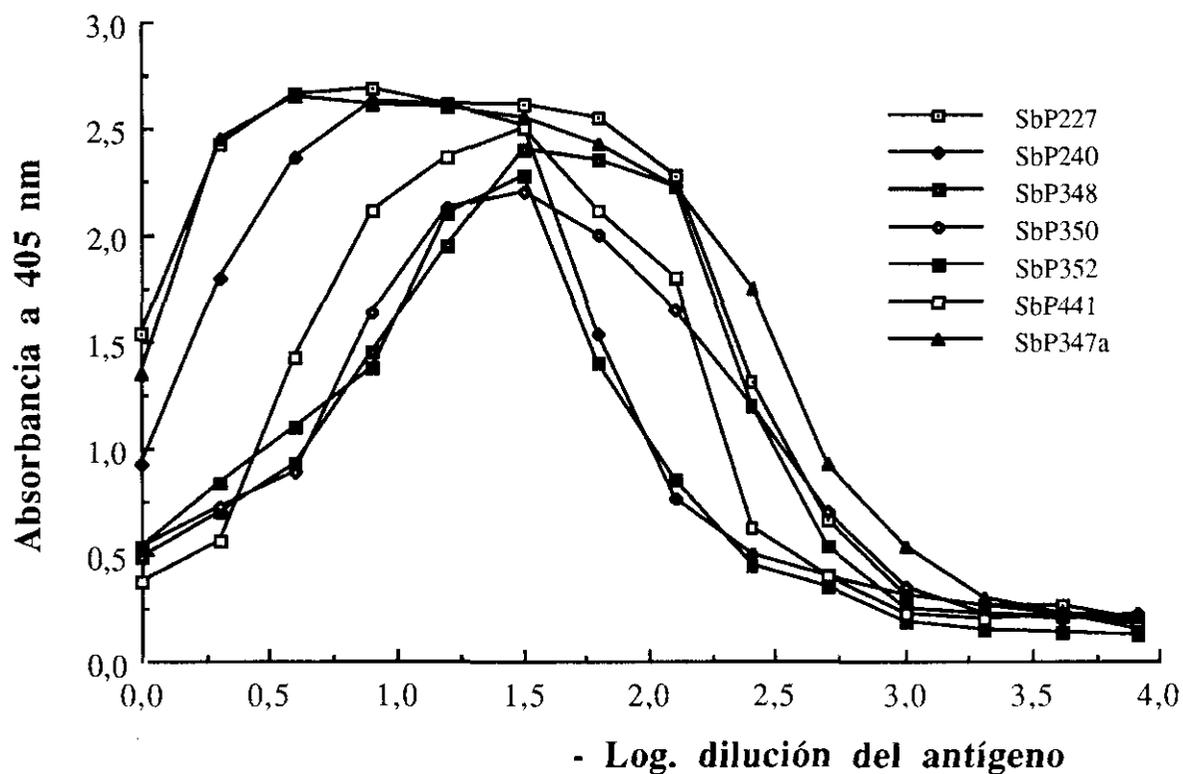


Figura 4. 27. - ELISA indirecto del inmunosuero anti-P347 frente a los sobrenadantes libres de células de *Pediococcus* sp. 227 (□), 240 (◆), 348 (■), 390 (◇), 352 (■) y 441 (□). Conjugado diluído 1/3000.

Por otra parte, cuando los sobrenadantes libres de células de varias cepas de *Lactobacillus sake* crecidas en medio MM-Triptosa y con gran actividad antimicrobiana se enfrentaban al inmunosuero anti-P347, no se producía una reacción antígeno-anticuerpo (Figuras 4.28 y 4.29). De los resultados obtenidos se deduce que la sustancia responsable de la actividad antimicrobiana es antigénicamente diferente en los dos géneros bacterianos analizados.

Estos resultados sugieren que es posible identificar, mediante métodos inmunológicos distintas sustancias antimicrobianas producidas por bacterias lácticas de origen cárnico.

IV. 11. 2. 2. 4. - Detección de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 en extractos cárnicos

Para detectar la presencia de la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347, en una mezcla cárnica experimental de ave/bóvino/cerdo, preparada de la manera descrita en la sección III.2.12.6.1., se ha utilizado la técnica del ELISA indirecto. En esta técnica, tanto el inmunosuero anti-P347 como el conjugado comercial se han utilizado a las concentraciones descritas en las secciones anteriores. Los extractos antigénicos empleados fueron:

- a) bacteriocina P347 parcialmente purificada (control positivo)
- b) extracto de la mezcla cárnica experimental
- c) extracto de la mezcla cárnica + 0,1 mg/ml de bacteriocina P347
- d) extracto de la mezcla cárnica + 0,5 mg/ml de bacteriocina P347,
- e) extracto de la mezcla cárnica con 1,0 mg/ml de bacteriocina P347. Como control negativo se utilizó el tampón PBS.

Los resultados de la Figura 4.30 indican que el inmunosuero anti-P347 reconoce antígenos afines en los extractos de la mezcla cárnica utilizados, con o sin adición de

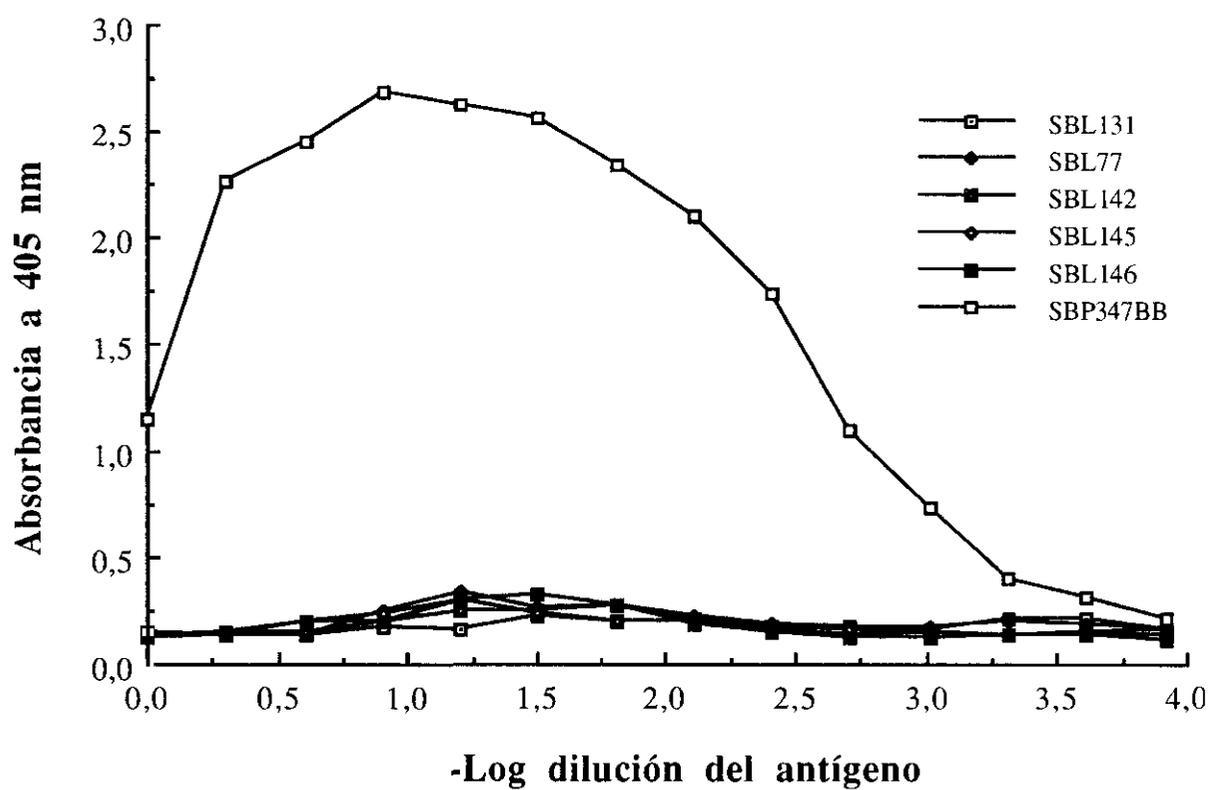


Figura 4. 28. - ELISA indirecto del inmunosuero anti-P347 frente a los sobrenadantes libres de células de *Pediococcus* sp. 347 (□) y *Lactobacillus sake* 77 (◆), 131 (◻), 142 (◼), 145 (◇) y 146 (■). Conjugado diluído 1/3000.

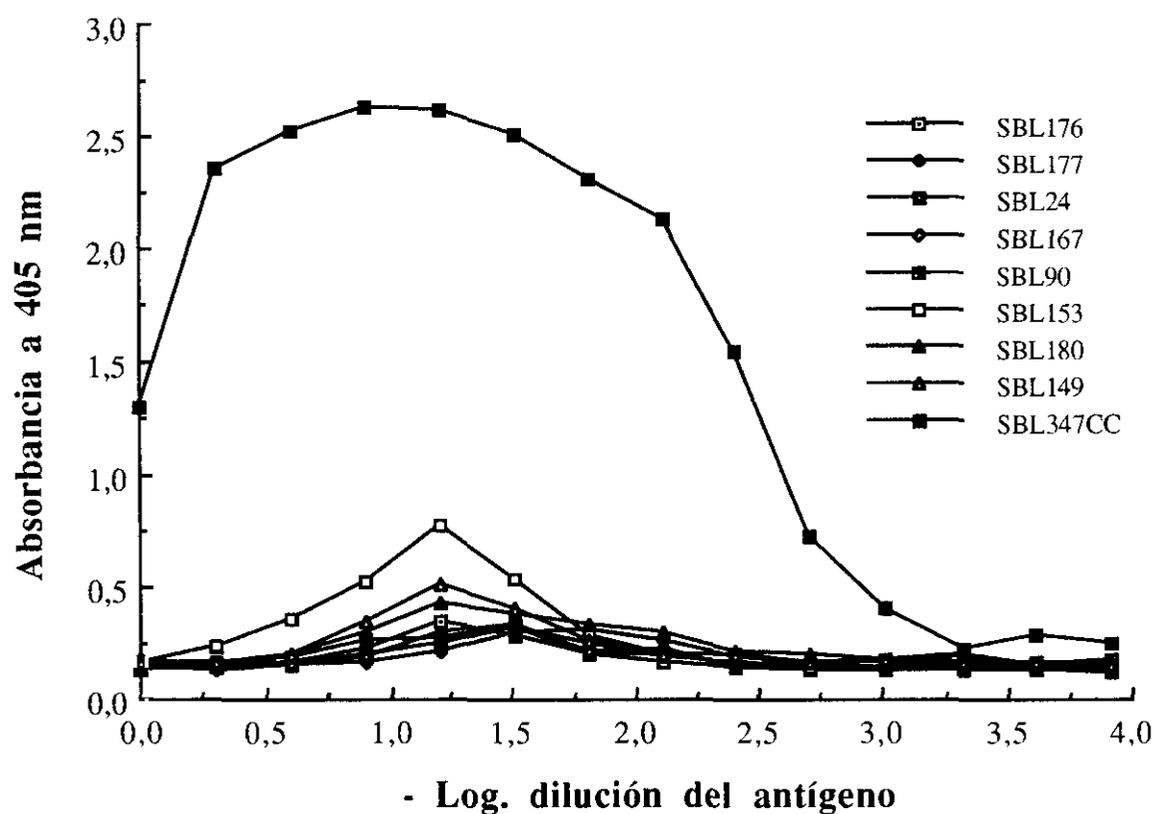


Figura 4. 29. - ELISA indirecto del inmunosuero anti P347 frente a los sobrenadantes libres de células de *Pediococcus* sp. 347 (■) y *Lactobacillus sake* 24 (■), 90 (■), 149 (▲), 153 (□), 167 (◆), 176 (□), 177 (◆) y 190 (▲) Conjugado diluído 1/3000.

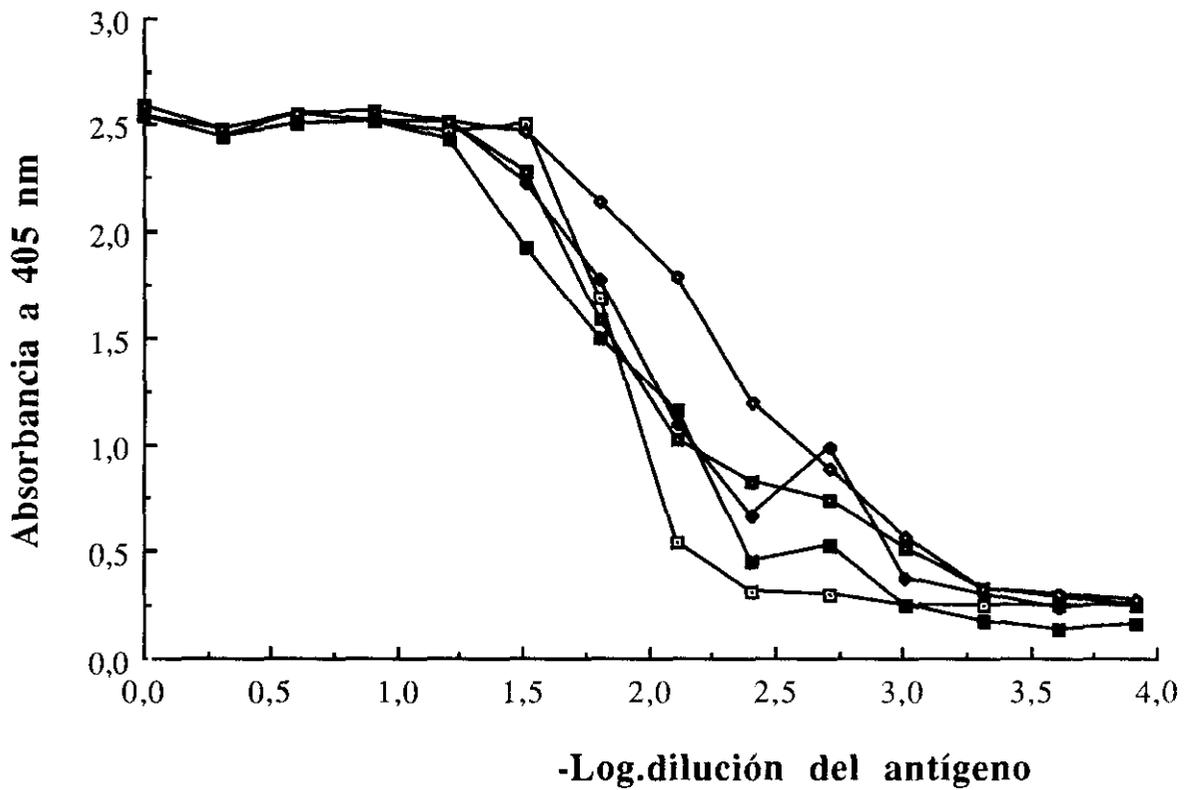


Figura 4.30 - Detección de la bacteriocina P347 en una mezcla cárnica experimental de ave/bóvino/cerdo, mediante un ELISA indirecto empleando como antígenos la mezcla cárnica con 0,1 mg/ml (◆), 0,5 mg/ml (■) y 1,0 mg/ml (◇) de la bacteriocina P347. Como controles se utilizaron la mezcla cárnica sin bacteriocina (▲) y la bacteriocina P347 (■). Inmunosuero anti-P347 conjugado a la biotina y diluído al 1/1000. Dilución del conjugado 1/3000

bacteriocina P347, lo que sugiere que algunas inmunoglobulinas del inmunosuero reconocen como antígenos afines a las proteínas musculares solubles de ave, bóvido y cerdo presentes en la mezcla cárnica.

Para determinar la interacción del inmunosuero anti-P347 con cada uno de los extractos cárnicos, se realizó un ELISA indirecto en el que el inmunosuero descrito se enfrentaba a los distintos extractos cárnicos. Los resultados de la Figura 4.31, indican que el inmunosuero anti-P347 reconoce a cada uno de los extractos cárnicos utilizados, así como a su mezcla. De aquí la necesidad de neutralizar los anticuerpos del inmunosuero anti-P347 que reconocían como afines a las proteínas musculares solubles de ave, bovino y cerdo. La neutralización de los anticuerpos del inmunosuero anti-P347 se realizó de la manera descrita en la sección III.2.12.6.2.

En la figura 4.32 se presentan los resultados obtenidos al neutralizar el inmunosuero anti-P347 con diferentes diluciones de los extractos cárnicos. Como puede verse la dilución 1:10 fue la más eficaz por lo que se utilizó en las experiencias posteriores.

IV.11.3. - Detección de bacteriocina P347 en extractos cárnicos con inmunosuero anti-P347 neutralizado

El inmunosuero anti-P347 neutralizado de la manera descrita en la sección anterior se enfrentó a los siguientes extractos antigénicos:

- a) bacteriocina P347 disuelta en tampón PBS
- b) extracto cárnico de ave
- c) extracto cárnico de bóvino
- d) extracto cárnico de cerdo

e) mezcla de los extractos cárnicos citados.

Los resultados del ELISA indirecto realizado con los componentes descritos (Figura 4.33) , demostraron que el inmunosuero perdía su capacidad de reconocer los antígenos afines en los diversos extractos cárnicos y en su mezcla. Asimismo, demostraron que el inmunosuero anti-P347 reconocía, cada vez mejor, la presencia en los extractos cárnicos de bacteriocina P347 a concentraciones distintas; esto indica el gran valor potencial de un inmunosuero de estas características para detectar y cuantificar la presencia de bacteriocinas lácticas de origen cárnico en la carne y, quizás también, en diversos derivados cárnicos.

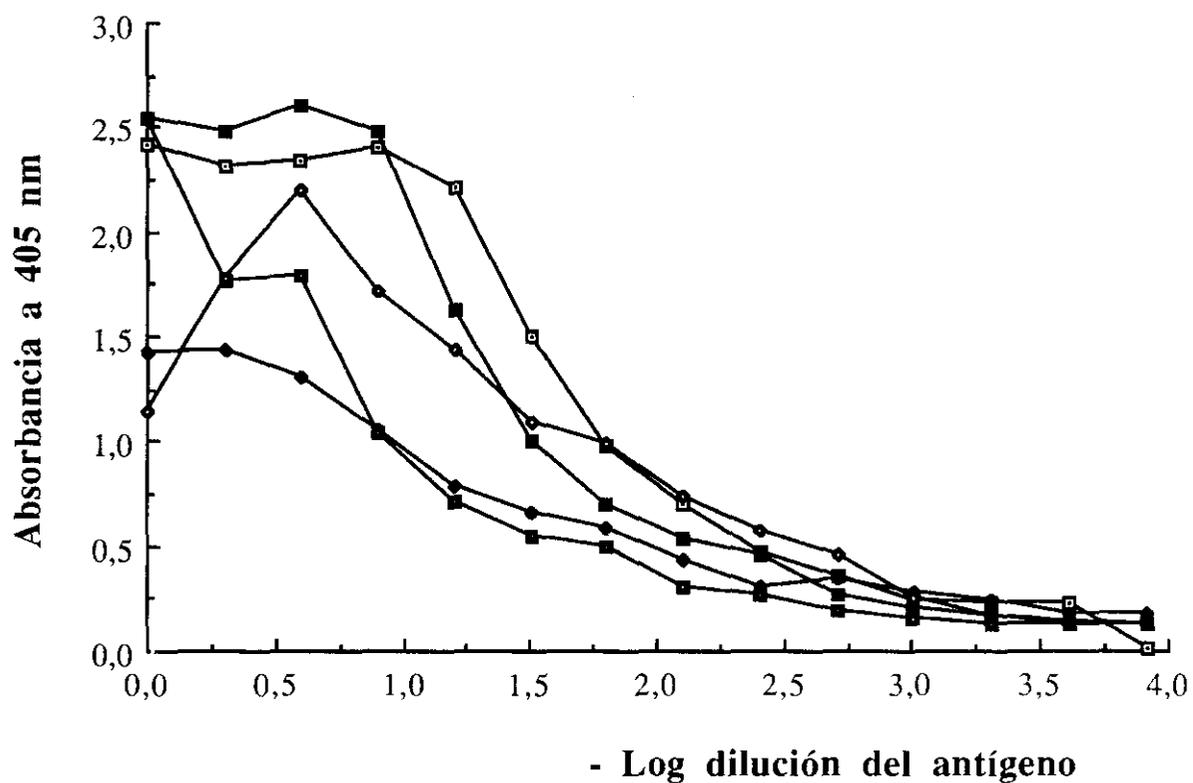


Figura 4. 31. - ELISA indirecto del inmunosuero anti-P347 frente a la bacteriocina P347 (○) y frente a extractos cárnicos experimentales de ave (◆), bovinos (■), cerdo (◇) y a de su mezcla (■). Dilución del conjugado 1/3000.

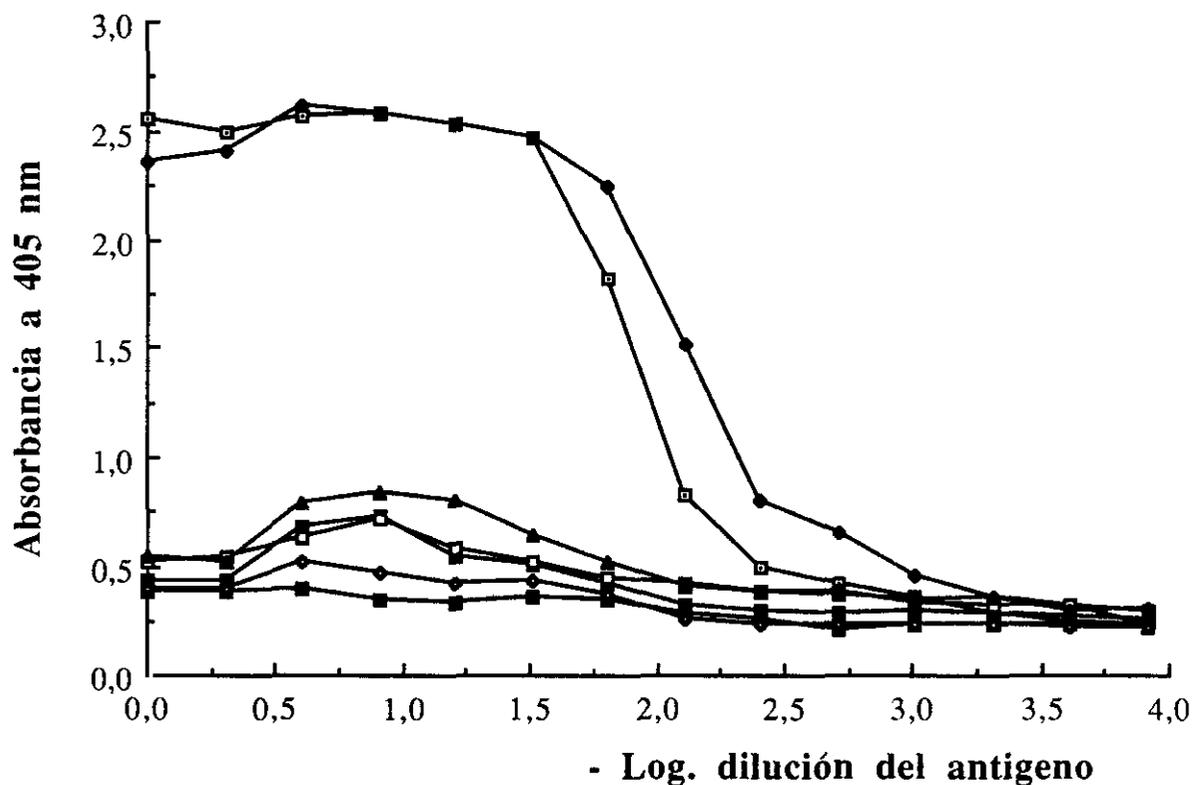


Figura 4. 32. - Poder neutralizante del inmunosuero anti-P347 con los extractos cárnicos de interés a la dilución 1/10 (■), 1/30 (◆), 1/50 (■), 1/70 (□) y 1/100(▲). Bacteriocina P347 en tampón PBS (□) y en el extracto cárnico de un mezcla de ave/bovino/cerdo(◆).

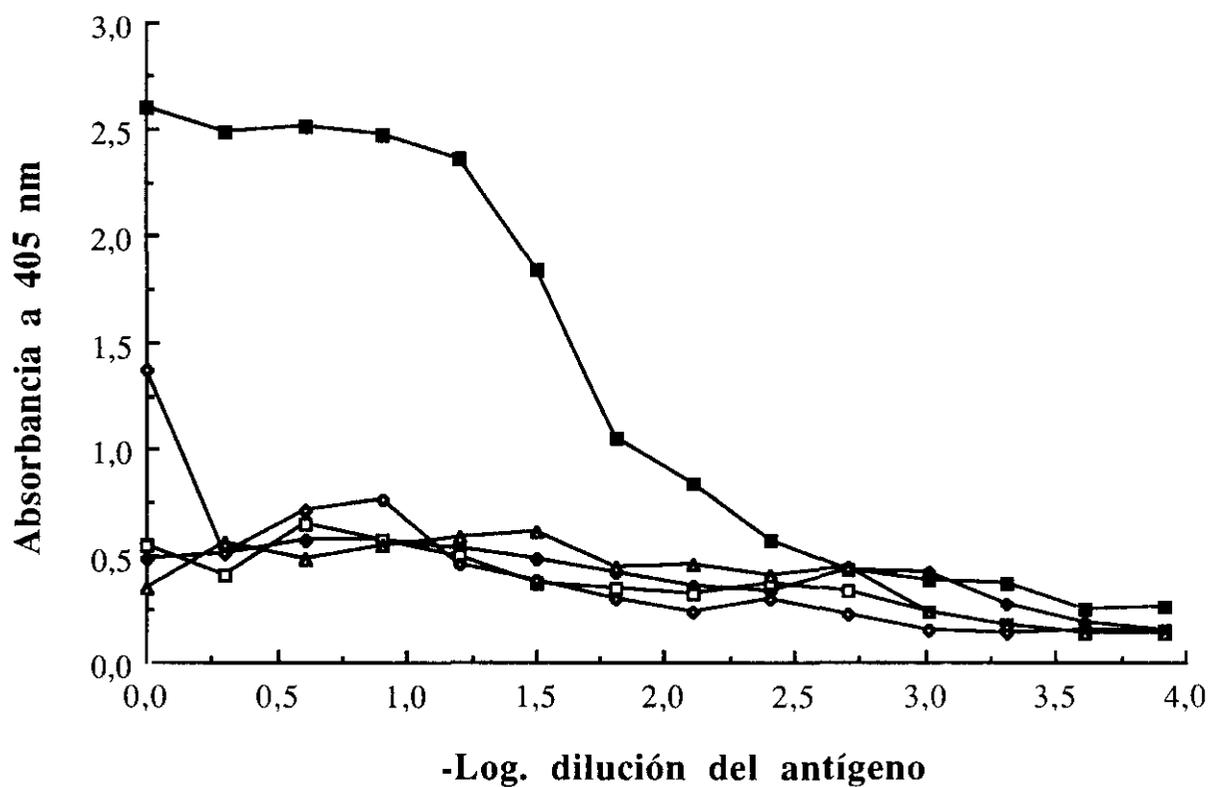


Figura 4. 33. - Capacidad del inmunosuero anti-P347 neutralizado para discriminar mediante un ELISA indirecto, la bacteriocina P347 (■) y los extractos cárnicos experimentales de ave (◆), bovino (▲), cerdo (□) y de su mezcla (◇). Dilución del conjugado 1/3000.

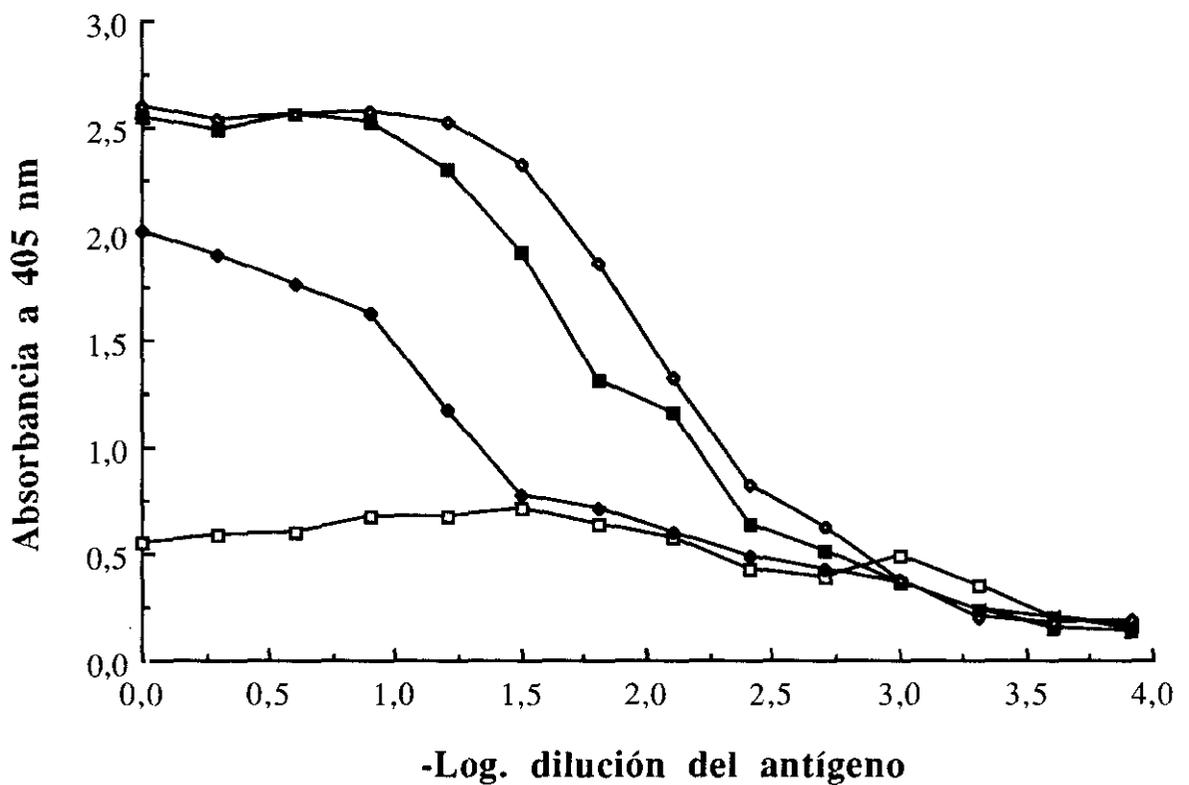


Figura 4. 34 - Detección de la bacteriocina P347 a concentraciones de 0,0 (□), 0,1 (■), 0,5 (●) y 1,0 mg/ml (◆) en una mezcla cárnica experimental de ave/bovino y cerdo, mediante un ELISA indirecto con el inmunosuero anti-P347 conjugado a la biotina, diluído al 1/1000 y neutralizado. Dilución del conjugado 1/3000.

CAPITULO V
DISCUSION

V - DISCUSION

V.1. - Aislamiento de bacterias lácticas de embutidos crudos curados

En la realización de este trabajo, que pretende el aislamiento y caracterización parcial de bacterias lácticas que mejoren la calidad higiénica de la carne y de los productos cárnicos, se procedió inicialmente al aislamiento de estas bacterias de embutidos crudos curados. La elección de este producto como fuente de los microorganismos de interés, se debe a que sus bacterias lácticas están mejor adaptadas a las condiciones de la carne y productos cárnicos que las aisladas de otras fuentes como la leche y sus derivados o los vegetales (Schillinger y Lücke, 1989).

Las bacterias lácticas predominan en la mayoría de los productos cárnicos y en las carnes envasadas a vacío, donde constituyen entre el 75 y el 95 % de su población bacteriana total (Mol y col., 1971; Kitchell y Shaw, 1975; Reuter, 1975; Hitchener y col., 1982; Shaw y Harding, 1975; Korkeala y Märkelä, 1989). Varios investigadores (Lücke, 1986; Holley y col., 1988) han observado en los embutidos crudos curados un predominio significativo de las bacterias lácticas, lo que coincide, con los resultados de este trabajo (Tabla IV.1). Se confirma así que la mayor parte de la microflora de este tipo de embutido está constituida por bacterias lácticas. Asimismo estas bacterias constituyen en muchos productos cárnicos el componente principal de su microflora, debido a que su desarrollo implica la supresión del de otros grupos microbianos por mecanismos de antagonismo microbiano no bien estudiados (Reuter, 1981).

V. 2. - Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas

V. 2. 1. - Pruebas directas y diferidas de antagonismo microbiano

El antagonismo microbiano puede evidenciarse de diversas maneras. En los estudios preliminares, las pruebas de antagonismo se realizan generalmente utilizando medios de cultivo sólidos e implican la detección de la inhibición del crecimiento que ejerce el microorganismo analizado (activo) en el microorganismo indicador (pasivo) (Tagg y col., 1976). Las dos pruebas empleadas con este propósito son la directa o simultánea y la indirecta o diferida. La densidad y el número de unidades formadoras de colonias del microorganismo indicador son importantes para establecer la sensibilidad del método (Kuttner, 1966).

En la prueba directa el microorganismo a evaluar y la cepa indicadora se desarrollan al mismo tiempo. Una de las pruebas directas más sencillas es la "prueba de la gota", utilizada originalmente por Gratia (1946), y cuyo empleo está muy difundido (Geis y col., 1983; Daeschel y Klaenhammer, 1985; Gonzalez y Kunka, 1987; Raccach y col., 1989; Spelhaug y Harlander, 1989; Daeschel y col., 1990; Ahn y Stiles, 1990a). Para ello, una gota del cultivo del microorganismo problema se deposita en un medio de cultivo sólido previamente inoculado con el microorganismo indicador. Una de las variantes de este procedimiento, emplea pocillos excavados en el medio sólido, que se rellenan con una cantidad conocida del cultivo del microorganismo problema (Sabine, 1963; Tagg y Mcgiver, 1971; Tagg y col., 1976; Silva y col., 1987; Harris y col., 1989; Rodriguez y col., 1989). Otra modificación de gran utilidad, consiste en sembrar por picadura los microorganismos a estudiar en placas cuya superficie se ha sembrado previamente con el microorganismo indicador (Deklerk, 1967; Gagliano y Hinsdill, 1970; Davey y Richardson, 1981; Barefoot y Klaenhammer, 1983).

Fredericq (1948) fue el primero en utilizar las pruebas de antagonismo diferidas. En este

caso, el microorganismo problema se siembra e incuba en un medio sólido durante un cierto tiempo, transcurrido el cual, se cubre con otra capa de medio que contiene el microorganismo indicador. Las pruebas diferidas son, a menudo, más sensibles que las directas (Tagg y col., 1976).

Como en la prueba directa, una de las variantes de las diferidas que más se emplea es la de la "gota" (Andersson y col., 1988; Harris y col., 1989; Schillinger y Lücke, 1989; Spelhaug y Harlander, 1989; Ahn y Stiles, 1990a). En esta prueba y para resaltar la acción de las sustancias inhibidoras difusibles de los cultivos, se inactivan por el calor las células del microorganismo productor (Geis y col., 1983; Ahn y Stiles, 1990a) o, mejor aun, con vapores de cloroformo (Kekéssy y Piquet, 1970; Davey y Richardson, 1981; Geis y col., 1983; Ahn y Stiles, 1990a). No obstante, esto conlleva algunos inconvenientes, como el que algunos agentes inhibidores se inactivan al exponerse a los vapores de cloroformo. Brock y Davie (1963) demostraron la sensibilidad al cloroformo de una sustancia inhibidora producida por *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes*. Los vapores de cloroformo también impiden el empleo de placas de Petri de plástico y el cloroformo residual de los medios de cultivo puede originar resultados erróneos (Kekéssy y Piquet, 1970).

Otra alternativa, cuando se sospecha de la existencia de sustancias antagonistas difusibles, consiste en sembrar el cultivo indicador en una cara del medio de cultivo sólido y el cultivo a evaluar en la opuesta, ya sea empleando el sistema de gotas (Kekéssy y Piquet, 1970) o de pocillos (Tagg y McGiven, 1971; Barefoot y Klaenhammer, 1983; Spelhaug y Harlander, 1983). Una ventaja de este método es que así se excluye la actividad inhibidora debida a bacteriófagos (Tagg y col., 1976). Tanto en las pruebas de antagonismo directo como diferido, es recomendable colocar los cultivos de los microorganismos a analizar en los pocillos abiertos en los medios sólidos lo que permite que si se deposita siempre el mismo número de microorganismos, pueden establecerse comparaciones entre los diámetros de las zonas de

inhibición resultantes. Otra ventaja de este método es que aumenta su sensibilidad, puesto que entre el microorganismo estudiado y las cepas indicadoras únicamente se interpone una capa fina de agar; lo que, además, excluye la inhibición debida a bacteriófagos, que son microorganismos no difusibles (Tagg y McGiven, 1971). Por todo ello, se ha elegido este método para realizar las pruebas de antagonismo, tanto directo como diferido, de las bacterias lácticas aisladas y seleccionadas de los embutidos crudos curados.

De las 956 bacterias lácticas seleccionadas por su actividad inhibidora directa frente al microorganismo indicador *L. fermentum* CECT285, 780 colonias mostraron halos de inhibición definidos y de bordes nitidos frente a dicho microorganismo, lo que representa el 82 % del total de las bacterias lácticas seleccionadas. De las cepas activas se seleccionaron las 54 que mostraron un mayor actividad antimicrobiana, con el objeto de conocer la actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes libres de células.

Los resultados de los investigadores que han estudiado la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas de diversos orígenes son bastantes heterogéneos; así, Barefoot y Klaenhammer (1983) vieron que de 52 cepas de *L. acidophilus*, el 63 % inhibían el desarrollo de diversas cepas de *L. leichmann*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* y *Lact. lactis*, porcentaje idéntico al obtenido por Raccach y col., (1989) con 11 cepas de *Lactobacillus* y de *Streptococcus* sp., empleando como indicadores diversas cepas de 6 especies distintas de bacterias lácticas y 4 de *List. monocytogenes*. De otra parte, de las 79 cepas de *Lactobacillus* sp. examinadas por Rammelsberg y Radler (1990) únicamente el 15 % inhibieron una, al menos, de las 9 cepas indicadoras de *L. brevis*, *P. damnosus* y *Leuc. aenus*. El porcentaje de cepas inhibidoras registrado por Davey y Richardson (1981) fue aún menor, ya que sólo el 7 % de las 150 cepas de *Lact. lactis* subsp. *cremoris* analizadas, inhibían el desarrollo de varias cepas de *Lact. lactis* subsp. *cremoris* y *Lact. lactis* subsp. *lactis*.

Lo anteriormente expuesto da una idea de la variabilidad de los estudios de actividad inhibidora de las bacterias lácticas, lo que se agrava por la escasa uniformidad de las condiciones de trabajo y por la diversidad de microorganismos indicadores empleados. No obstante, los trabajos citados coinciden en que las bacterias lácticas analizadas son especialmente activas frente a otras bacterias lácticas y nunca, o de forma excepcional, frente a las bacterias Gram-negativas.

IV. 2. 2. - Actividad inhibidora de los sobrenadantes libres de células de las cepas seleccionadas

Los sobrenadantes libres de células de las 54 bacterias lácticas seleccionadas, presentaban actividad inhibidora exocelular y difusible frente a los 5 microorganismos indicadores empleados (Figuras 4.2 a 4.7). La sensibilidad de los microorganismos indicadores a la actividad inhibidora de las bacterias lácticas analizadas varía, algo bastante común en las bacterias lácticas (Schillinger y Lücke, 1989; Daeshel y col., 1990).

Cuando se emplean cultivos en las pruebas de antagonismo microbiano, no es fácil identificar la causa de dicho antagonismo (Tagg y col., 1976). En la identificación de las bacterias lácticas productoras de sustancias antagonistas difusibles es importante excluir de los ensayos, no solamente a los microorganismos productores de tales sustancias, sino también a otros metabolitos con actividad inhibidora.

Las sustancias que en la pruebas de antagonismo bacteriano poseen un actividad inhibidora similar a las bacteriocinas, pueden neutralizarse o eliminarse utilizando sobrenadantes libres de células, neutralizados o dializados. Los sobrenadantes se obtienen por centrifugación de los cultivos y filtración por filtros de 0,22 ó 0,45 μm de diámetro de poro. La neutralización de la actividad antagonista de los ácidos orgánicos puede realizarse ajustando

el pH de los sobrenadantes a un valor próximo a la neutralidad (pH 6,9-7,0) (Geis y col., 1983; Barefoot y Klaenhammer, 1984; Rodriguez y col., 1989; Nielsen y col., 1990; Mortvedt y Nes, 1990), o dializando los sobrenadantes por membranas que permiten la difusión de sustancias de un tamaño molecular menor de 6.000 daltons. La diálisis puede ir precedida de una precipitación de los sobrenadantes con sulfato amónico (Bhunia y col., 1987; Gonzalez y Kunka, 1987; Ray y col., 1989b). El precipitado, constituido fundamentalmente por proteínas, se reconstituye y dializa. No obstante, la mayoría de los autores prescinden de esta precipitación (Anderson, 1986; Anderson y col., 1988; Harris y col., 1989; Schillinger y Lücke, 1989; Daeschel y col., 1990; Ahn y Stiles, 1990b).

La actividad del peróxido de hidrógeno de los sobrenadantes puede evitarse incubando los cultivos en anaerobiosis, o tratando con catalasa los sobrenadantes libres de células (Barefoot y Klaenhammer, 1983; Muriana y Klaenhammer, 1987; Ferreira y Gilliland, 1988; Schillinger y Lücke, 1989; Rodriguez y col., 1989; Carminati y col., 1989; Ahn y Stiles, 1990a). Geis y col., (1993), añaden la catalasa directamente al medio de cultivo del microorganismo indicador. Los sobrenadantes libres de células también pueden concentrarse con el fin de aumentar su actividad inhibidora. Entre los sistemas de concentración más empleados destacan la evaporación a vacío en rotavapores (Geis y col., 1983; Silva y col., 1987) y la liofilización (Rodriguez y col., 1989).

La actividad inhibidora de los sobrenadantes puede detectarse con cualquiera de las variantes de antagonismo directo e indirecto citadas siendo muy corrientes los métodos "de la gota" (Geis y col., 1983; Ray y col., 1989a; Carminati y col., 1989; Ahn y Stiles, 1990a) y la colocación de los sobrenadantes en pocillos abiertos en las placas (Joerger y Klaenhammer, 1986; Ahn y Stiles, 1990a). Otro método muy empleado para investigar bacterias lácticas bacteriocinogénicas, consiste en colocar los sobrenadantes en papeles de filtro estériles. Los discos de papel de filtro, impregnados con el sobrenadante de interés, se depositan en placas

de agar sembradas con el microorganismo indicador (Shahani y col., 1976; Ferreira y Gilliland, 1988) o bien se deposita en los filtros una cantidad determinada de los sobrenadantes (Abdel-Bar y col., 1987; Bhunia y col., 1987; Bhunia y col., 1988; Rodriguez y col., 1989). La segunda opción ha sido la utilizada en este trabajo, para comparar la actividad inhibidora de los diversos sobrenadantes analizados.

Ya se ha dicho que las 54 cepas estudiadas mostraban una actividad inhibidora similar en los 5 microorganismos indicadores empleados, de ellas se seleccionaron al azar 6 cepas, cuya actividad antimicrobiana se estudió frente a un número mayor de microorganismos indicadores. Los sobrenadantes concentrados libres de células de las bacterias lácticas seleccionadas, mostraron una actividad variable dependiendo de la cepa y del indicador empleado (Tabla IV.4). Como puede observarse, el sobrenadante y el sobrenadante concentrado de *Pediococcus* sp. 347, poseían una importante actividad inhibidora frente a varias cepas de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* y *Staph. aureus*, microorganismos productores de toxiinfecciones alimentarias y, por lo tanto, de gran interés en la industria agroalimentaria.

La sensibilidad de las listerias a las bacteriocinas producidas por especies del género *Pediococcus* es bastante común, a juzgar por los numerosos trabajos publicados que confirman la actividad antimicrobiana de diversas especies de pediococos frente a *Listerias monocytogenes* (Foegeding y col., 1992; Christensen y Hunkins, 1992; Berry y col., 1992; Yousef y col., 1991; Nielsen y col., 1990 y Pucci y col., 1988).

Asimismo, la actividad inhibidora de los sobrenadantes de cultivos de bacterias lácticas frente a otras bacterias lácticas, muy relacionadas con ellas taxonómicamente, es un hecho ampliamente documentado (Geis y col., 1983; Barefoot y klaenhammer, 1984; Joerger y Klaenhammer, 1986; Andersson, 1986; Gonzalez y Kunka, 1987; Bhunia y col., 1987;

Schillinger y Lücke, 1989; Harris y col., 1989; Mortvedt y Nes, 1990; Ahn y Stiles, 1990a). Por otra parte, las bacteriocinas producidas por pediococos, al parecer poseen un amplio espectro antimicrobiano en el que se incluyen especies de microorganismos Gram-positivos no pertenecientes distintos de las bacterias lácticas (Dashel y Klaenhammer, 1985; Bhunia y col., 1988; Hoover y col., 1988 y Schved y col., 1993). En general, la actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347, fue mayor que la descrita para compuestos antimicrobianos similares de otras cepas de *Pediococcus* (Gonzalez y Kunka, 1984; Hoover y col., 1988; Daeshel y Klaenhammer, 1985; Graham y Mckay, 1985 y Schved y col., 1993, entre otros). Asimismo, Harris y col., (1989), han observado que la actividad antimicrobiana de los pediococos es muy heterogénea y depende de cada cepa en particular. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo.

V. 2. 3. - Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas

Los resultados obtenidos indican que la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes concentrados no puede atribuirse, en ningún caso, al peróxido de hidrógeno. La capacidad de algunas bacterias lácticas de producir peróxido de hidrógeno es una propiedad indeseable, especialmente si existe mucho oxígeno en las mezclas cárnicas, si se emplea mucha grasa o si la actividad de los enzimas que degradan el peróxido de hidrógeno es pequeña (Schillinger y Lücke, 1987a). En estos casos, la presencia de microorganismos productores de peróxido de hidrógeno en la carne y productos cárnicos produce alteraciones de su color o un enranciamiento precoz.

Las bacterias lácticas difieren en su capacidad de producir y degradar el peróxido de hidrógeno. Hastings y Hölzapfel (1987) observaron que un 50 % de las cepas de *L. sake* de origen cárnico producían peróxido de hidrógeno y, de ellas, la mayoría lo hacía muy

débilmente. El no haber realizado una buena selección de las bacterias lácticas autóctonas explica, además de otras razones, que *L. plantarum*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, sean los microorganismos iniciadores más empleados en la elaboración de productos cárnicos (Lücke y Hechelmann, 1987).

V. 3. - Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana

Las bacterias lácticas y, en particular, los pediococos aislados de la carne y de los productos cárnicos, no pueden clasificarse adecuadamente siguiendo los sistemas generalmente en uso que se basan en las propiedades de estos microorganismos procedentes de otras fuentes (Orla Jensen, 1919; Rogosa, 1970; Sharpe, 1979b).

Se han realizado diversos intentos de identificar y clasificar las bacterias lácticas de origen cárnico (Reuter, 1975; Kitchell y Shaw, 1975; Hitchener y col., 1982). Todos ellos se basan en reacciones bioquímicas variables que, al no emplear métodos numéricos en el establecimiento de los grupos, han llevado a la creación de agrupaciones innecesariamente complicadas y arbitrarias (Shaw y Harding, 1984). No obstante, en 1987, Shillinger y Lücke elaboraron un esquema de identificación rápida de las bacterias lácticas de origen cárnico, basado en sus características morfológicas y fisiológicas, la mayor parte de las cuales son fácilmente determinables. Este esquema, que se muestra en la Figura 5.1, lo utilizamos inicialmente en la identificación y clasificación de nuestros aislados. En las Tablas IV.2 y IV.3 se muestran las características morfológicas y bioquímicas más significativas de nuestros aislados. De ellas se deduce que nuestras cepas son cocos homofermentativos que se desarrollan a 15 y 45 °C, pero no a 4 °C; no fermentan la maltosa, pero si la ribosa y xilosa,

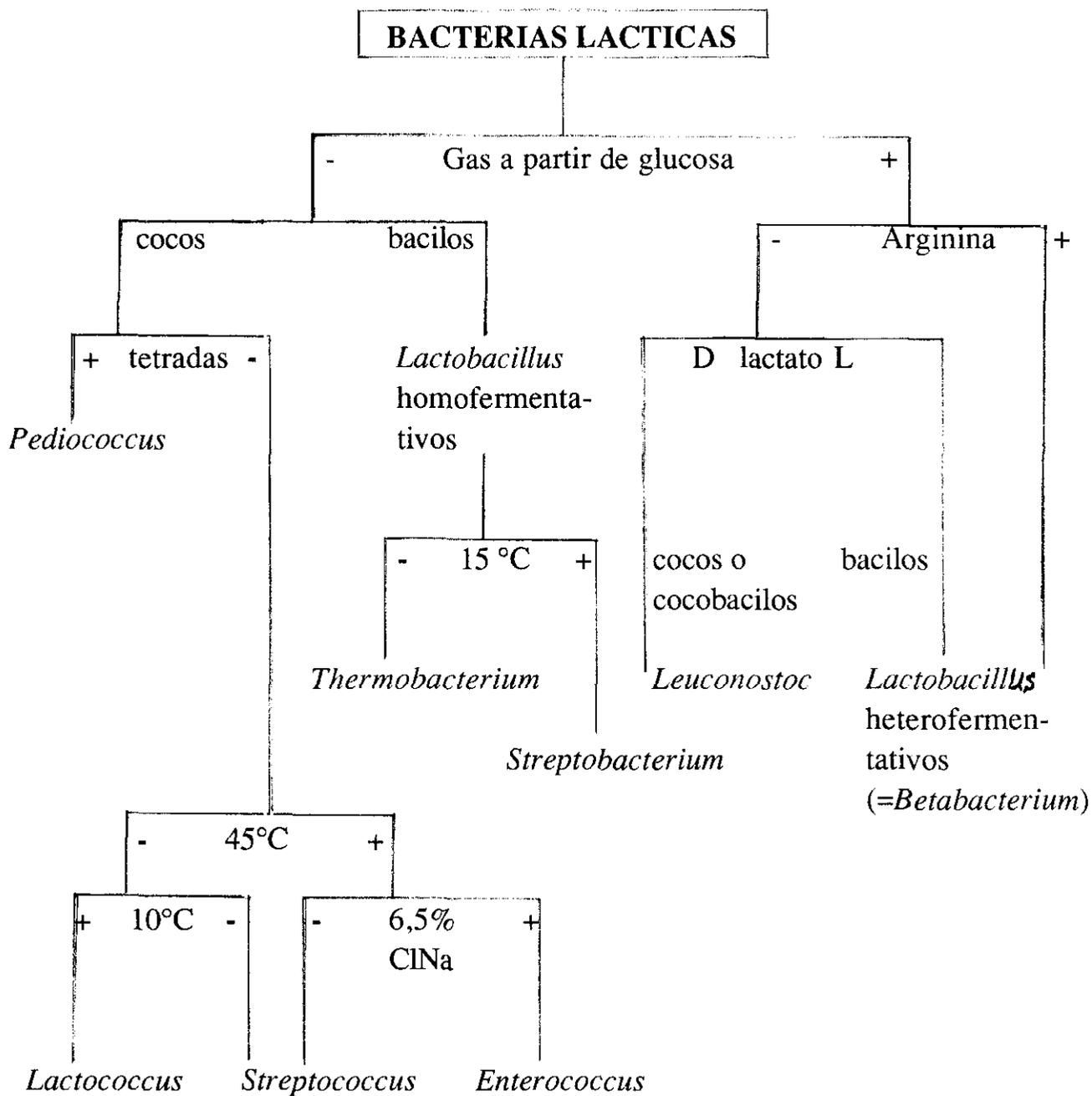


Figura 5. 1.- Esquema de identificación rápida de bacterias lácticas de origen cárnico.

Fuente: Schillinger y Lücke (1987b).

arabinosa; pueden por lo tanto adscribirse al género *Pediococcus*.

Todas las cepas analizadas crecieron a concentración de cloruro sódico del 7 % y del 10 %, y a pH 3,9. Conviene destacar que los pediococos son más acidificantes y acidotolerantes que las demás bacterias lácticas (Reuter, 1981). Además, hidrolizaron la arginina originando amoníaco de este aminoácido (Tabla IV.4²). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Dolezil y Kirsop, (1977). Sin embargo, Kandler y Weiss (1986) y Reuter (1981), creen que la capacidad de hidrolizar la arginina varía mucho entre las bacterias lácticas. De hecho, este fenómeno es común en las diversas especies del género *Pediococcus* (Sharpe, 1979b).

La capacidad de las bacterias lácticas de producir ácido sulfhídrico es una característica perjudicial, ya que si prolifera en los alimentos origina su deterioro (Egan y col., 1989). Ninguna de las cepas aisladas produjo ácido sulfhídrico en ninguno de los diversos medios en los que se estudió esta propiedad (Tabla IV.4). No obstante, Schillinger y Lücke (1987b), observaron que el 50 % de las bacterias lácticas que estudiaron producían ácido sulfhídrico.

Todas las características determinadas, coinciden con las señaladas por Garvie (1986) para *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*. Este autor señala que las propiedades fisiológicas, morfológicas y culturales no son realmente suficientes para la diferenciación de estas dos especies. Por otra parte, Back y Stackebrandt, (1978), Dellagio y col., (1981), realizando pruebas de hibridización DNA/DNA describieron a *P. acidilactici* como una especie distinta, mientras que los estudios realizados con aldolasas solamente sugieren que *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* son especies taxonómicamente relacionadas. Garvie (1986), afirma que es muy difícil diferenciar estos microorganismos y que los estudios de sus propiedades deben ser utilizados globalmente para ambas especies. Este autor indica que para la diferenciación clara entre ambas especies se necesitan realizar estudios de hibridación del DNA, de movilidad electroforética y perfiles proteínicos totales.

De acuerdo con lo descrito, identificamos tentativamente las cepas analizadas como *Pediococcus* sp., dado que los estudios realizados en este trabajo, no nos han permitido incluirlas en una u otra de las dos especies citadas anteriormente.

Todos nuestros aislados se identificaron como pertenecientes al género *Pediococcus*, lo que no es sorprendente, toda vez que estos microorganismos llegan a la mezcla cárnica durante la elaboración artesanal de los embutidos crudos curados. Niven y col., (1955) también detectaron la presencia de *Pediococcus cerevisiae* en varios productos cárnicos, e igualmente Santiago, (1971) que aisló y identificó este microorganismo de muestras de Salami italiano. Bhunia y col., (1988), han aislado una cepa de *Pediococcus acidilactici* de embutidos crudos curados, a la que denominaron *P. acidilactici* H. Esta cepa produce una sustancia exocelular de gran actividad inhibidora frente a diversos microorganismos indicadores.

La morfología, el caracter homofermentativo y la producción de ácido láctico ópticamente inactivo, son los elementos utilizados pra diferenciar los pediococos de los micrococos. Además, los primeros crecen en medios de cultivo sencillos, no utilizan amoniaco como única fuente de nitrógeno, no reducen los nitratos a nitritos y no licúan la gelatina (Pederson y col., 1954; Günther y White, 1961). Los micrococos suelen crecer bien en ausencia de azúcares, son frecuentemente pigmentados y no producen mucho ácido láctico (Garvie, 1986).

Las especies del género *Pediococcus* se utilizan mucho en la elaboración de productos cárnicos (Diebel y col., 1961; Smith y Palumbo 1983) y de vegetales fermentados (Pederson, 1949). Algunos investigadores han descrito cepas de *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus cerevisiae*, que producen sustancias antimicrobianas (Fleming y col., 1975; Dasechel y Klaenhammer, 1985; Graham y McKay, 1985; Gonzalez y Kunka 1987; Hoover y col., 1988). Tales estudios indican que estas bacterias poseen actividad

antimicrobiana frente a diversos microorganismos taxonómicamente relacionados con ellas, así como frente a bacterias patógenas de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. De los resultados de la Tabla IV.6, se deduce que la actividad antimicrobiana de las 6 cepas de *Pediococcus* sp. seleccionadas, es similar a la descrita por otros investigadores. No obstante, se conoce todavía muy poco sobre la naturaleza química y física de las sustancias antimicrobianas producidas por estas bacterias (Bhunja y col., 1988).

V. 4. - Parámetros cinéticos del desarrollo y actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347 a diversas temperaturas

Los parámetros cinéticos del desarrollo de *Pediococcus* sp. 347 a 8, 16, 25 y 32 °C, tanto en el medio complejo MRS como en el medio mínimo MM con triptosa (tabla IV.5), coinciden con los obtenidos por otros investigadores con cepas de *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, así como con las de otras bacterias lácticas de origen cárnico (Deibel y Niven, 1960; Santiago, 1971; Bhunja y col., 1988; Rodríguez y Col., 1991; Piard y Desmazeaud, 1992).

La producción de bacteriocinas por las bacterias lácticas, puede ocurrir tanto durante la fase logarítmica de crecimiento bacteriano como en la estacionaria (Daschel y col., 1990; Piard y Desmazeaud, 1992). La actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, se detectaba y cuantificaba al poco tiempo de iniciarse su crecimiento a todas las temperaturas ensayadas (Fig. 4.8 a 4.11) e, incluso se mantuvo a un nivel elevado tras 48 horas de incubación. Estos resultados coinciden con los observados por Bhunja y col., (1988) y Biswas y col., (1991), lo que nos hace pensar que la producción de sustancias inhibidoras es una propiedad asociada al desarrollo bacteriano.

La temperatura óptima de crecimiento de las distintas bacterias lácticas constituye un

parámetro de gran importancia tecnológica para la elección de cultivos iniciadores. Se sabe que las temperaturas óptimas de crecimiento de *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* varían entre 25 - 40 °C (Garvie, 1986) incluso desarrollándose a temperaturas superiores a 40 °C. Biswas y col., (1991), observaron que *P. acidilactici* H produjo un 60 % de la Pediocina AcH tras 8 horas de incubación a 37 °C, mientras el 40 % restante se produjo durante la fase estacionaria del crecimiento. En la producción total de pediocina AcH un pH final bajo, y un buen desarrollo celular son parámetros de gran interés (Hoover y col., 1988; Daeschel, 1989; Piard y Desmazeaud, 1992).

La producción de bacteriocina en la fase inicial del crecimiento bacteriano podría favorecer el predominio de la cepa productora (Ahn y Stiles, 1990a). La detección de actividad inhibidora al comienzo del crecimiento indica que no es un metabolito secundario. La disminución de esta actividad durante la fase estacionaria (Figuras 4.8 a 4.11) podría deberse a la acción de enzimas proteolíticos endo o exocelulares, a que la sustancia antimicrobiana se descompone en otros metabolitos o a su inestabilidad ante el aumento de la acidez del medio de crecimiento.

El aumento de la actividad inhibidora al hacerlo la temperatura de crecimiento se debe, al parecer, a un mayor desarrollo celular, ya que la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 aumenta a medida que la temperatura se aproxima a la óptima de crecimiento. La máxima producción de actividad antagonista a temperaturas altas, permite la utilización de *Pediococcus* sp. 347 en la elaboración de embutidos crudos curados al dificultar el desarrollo de los microorganismos alterantes y patógenos que accidentalmente pudieran encontrarse en la masa cárnica inicial.

V. 5. - Caracterización bioquímica parcial de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347

V. 5. 1. - Determinación de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 en diversos medios de cultivo

Algunos investigadores han señalado que los componentes del medio de cultivo podrían ser críticos en la producción de ciertas bacteriocinas (Tagg y col., 1976). A pesar de ello, hay pocos trabajos que estudien el efecto de los distintos nutrientes en la producción de compuestos antimicrobianos por las bacterias lácticas (Reddy y Ranganathan, 1983; Batish y Grover, 1990) y, en especial, por los pediococos (Biswas y col., 1991). Otros investigadores, se han preocupado de conocer las mejores condiciones de cultivo para una máxima producción de la actividad inhibidora (Jimenez-Diaz y col., 1990; Piard y col., 1990; Hurst, 1981). De lo expuesto se desprende que la producción de bacteriocinas podría incrementarse suplementando los medios de cultivo con determinados nutrientes controlando el desarrollo bacteriano a un pH determinado o eligiendo un medio de cultivo adaptado a la cepa productora (Hurst, 1981; Piard y Desmazeaud, 1992).

De los resultados de este trabajo (tabla IV.5), debe destacarse la falta de actividad antimicrobiana cuando *Pediococcus* sp. 347 se desarrollaba en medio BHI, suplementado o no, con hidrolizados de proteínas lácteas (caseínas) o cárnicas (peptona o extracto de carne). Este medio es un caldo de cultivo complejo de cuya composición forman parte hidrolizados de cerebro y corazón bovinos. Esta incapacidad de expresar la actividad inhibidora en el medio BHI suplementado o no, podría justificarse por la ausencia o exceso de algún nutriente o por la existencia de mecanismos reguladores de origen genético, estimulados o reprimidos por uno o más de los componentes de dicho medio. De acuerdo con nuestros resultados opinamos que sería muy conveniente estudiar más profundamente estos posibles mecanismos reguladores,

con el fin de conocer la posible inhibición o represión de la actividad antagonista de *Pediococcus* sp. 347 por determinados nutrientes.

IV. 5. 2. - Efecto de diversos enzimas en la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de *Pediococcus* sp. 347

En la Tabla IV.6 se observa el efecto de diversos enzimas en la actividad inhibidora del sobrenadante concentrado libre de células de *Pediococcus* sp. 347. Los enzimas proteolíticos utilizados anulan su actividad antimicrobiana lo que indica que la sustancia antagonista producida por este microorganismo posee una estructura proteica biológicamente activa. De acuerdo con su definición, las bacteriocinas son inactivadas, por lo menos, por proteasas de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina), gástrico (pepsina) o de otros orígenes (Tagg y col., 1976; Piard y Desmazeaud, 1992).

Según los resultados de este trabajo la sensibilidad de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 a los enzimas proteolíticos, es igual a la observada por otros investigadores con bacteriocinas producidas por pediococos (Daeshel y Klaenhammer, 1985; Ray y col., 1992; Pucci y col., 1988; Bhunia y col., 1988). Por otra parte la estabilidad de la actividad inhibidora frente a los enzimas lipolíticos y sacarolíticos, probablemente indica que no hay componentes lipídicos ni hidrocarbonados en su estructura proteica, por lo menos en las regiones de la molécula que comprenden su grupo activo. Algunas bacteriocinas son sensibles a las lipasas, amilasas y fosfolipasas, lo que demuestra la gran heterogeneidad de las bacteriocinas y la influencia que en su estructura y actividad ejercen los compuestos no proteicos (Jimenez y col., 1990; Lewus y col., 1992; Upreti y Hinsdill, 1973; West y Warner, 1988).

La gran sensibilidad de la actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347 a los enzimas

proteolíticos, hace pensar en su seguridad sanitaria en los alimentos que ingieren las personas, y también en su posible inactivación por los enzimas proteolíticos potencialmente presentes en los propios alimentos.

IV. 5. 3. - Termorresistencia y mecanismo de acción de la actividad inhibidora de *Pediococcus* sp. 347

La Figura 4.12, permite determinar los parámetros cinéticos de termodestrucción, y deducir la elevada resistencia al calor de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347. Los resultados obtenidos indican que la estabilidad al calor de la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347 es similar a la de otras bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, como por ejemplo pediocina PA-1 (Gonzalez y Kunka, 1987), pediocina A (Daeschel y Klaenhammer, 1984), pediocina AcH (Bhunja y col., 1988), pediocina SJ-1 (Schved y col., 1993), lactocina B (Barefoot y Klaenhammers, 1984), lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975), nisina (Bailey y Hurst, 1971; Hurst, 1967) y diplococina (Davey y Richardson, 1981).

La termoresistencia es una característica muy extendida entre las bacteriocinas; depende de su grado de purificación y de otros factores como el pH, fuerza iónica y presencia de moléculas termoprotectoras (Tagg y col., 1976). Generalmente, las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son termoresistentes, lo que les permite mantener su actividad antimicrobiana tras someterlas a temperaturas similares a las de pasterización y esterilización de la leche (Piard y Desmazeaud, 1992). Esto sugiere que su actividad recae en estructuras pequeñas y poco complejas probablemente sin una estructura terciaria. Aunque sea menos corriente la existencia de bacteriocinas termolábiles, conviene destacar que entre ellas se encuentran la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986), la caseicina 80 (Rammelsberg y Radler, 1990), la sintetizada por *L. delbruecki* subsp. *lactis* (Toba y col., 1991) y la propionicina PLG-1 (Lyon y Glatz, 1991).

V. 6. - Caracterización bioquímica parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347

Para iniciar la purificación de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 (Tabla IV.8), se empleó el medio semidefinido de MM-triptosa, que permite la síntesis de tal actividad; su empleo se debe a que el medio complejo MRS es poco indicado, ya que sus sobrenadantes, contienen una concentración elevada de proteínas y péptidos (Barefoot y Klaenhammer, 1984).

Debido a la heterogeneidad de las bacteriocinas, es difícil generalizar y establecer un método de purificación unificado, por lo que los protocolos se han diseñado empíricamente para cada una de ellas. Por ello, la purificación de la actividad antimicrobiana exocelular de *Pediococcus* sp. 347, se realizó inicialmente concentrando el sobrenadante libre de células por liofilización y posteriormente, separando las proteínas por cromatografía de filtración en geles de Sephadex. La urea (a una concentración 6 M) se utilizó como agente disociante de los posibles agregados proteicos, que puede se formar la sustancia antimicrobiana (Bhunja y col., 1988) consigo misma, o con otros componentes del medio de cultivo. Los resultados obtenidos indicaron que la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, en su estado crudo (nativo) se presenta en forma de monómeros y de agregados (Figuras 4.13 a 4.15). Los agregados moleculares de las bacteriocinas, constituidos por moléculas activas de elevado peso molecular, se han observado también en otras bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, como la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986), la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991) y la pediocina SJ-1 (Schved y col., 1993).

La purificación se tradujo asimismo, en un aumento muy pequeño de la actividad inhibidora específica (1,2 veces) y en una recuperación mínima de la actividad inhibidora original (0,3 %) (Tabla IV.9). Estos resultados coinciden con los encontrados por Barefoot y

Klaenhammer (1984) y Joerger y Klaenhammer (1986), quienes solo lograron recuperar el 0,4 % de la actividad inhibidora inicial de la lactacina B y el 4 % de la helveticina J. Rammelsherg y Radler (1980), han señalado que las bacteriocinas son, a veces, bastante resistentes a su purificación por la técnicas estandar de separación de proteínas y que la pérdida de actividad constituye un problema corriente en la purificación de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas (Tagg y col., 1976).

El peso molecular aparente de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347 determinado por filtración en geles de Sephadex G-50, fue de 31.189 daltons (tabla IV.10). Por otra parte, cuando dicha bacteriocina se sometió a electroforesis en geles con un 18 % de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), se apreció una mancha difusa tras la tinción de los geles con un reactivo de plata (Figura 4.17). La electroforesis en un gel similar de los diversos fragmentos de la sustancia antimicrobiana frente a *L. fermentum* CECT285, sugiere la presencia de agregados moleculares de elevado peso molecular; los agregados menores presentaran una masa molecular de unos 3.000 daltons. Los resultados obtenidos coinciden con los de Muriana y Klaenhammmmer (1991) y Rodrigues y Col., (1991), que afirman que algunas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas forman agregados de elevado peso molecular.

Los pesos moleculares de otras bacteriocinas de las bacterias lácticas son lactacina B, 6-6,5 KDa (Barefoot y Klaenhammer, 1984), pediocina PA-1, 16,5 KDa (Gonzalez y Kunka, 1987), pediocina AcH, 2-7 KDa (Bhunia y col., 1988), lactocina F, 2-5 KDa (Muriana y Klaenhammer, 1991), lactocina 481, 1-7 KDa (Piard y col., 1992) y pediocina SJ-1, 4 KDa (Schved, 1993).

La utilización de la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, con o sin urea, para determinar el peso molecular de las bacteriocinas ha llevado a resultados similares a los

observados en este trabajo. Muriana y Klaenhammer (1991), no observaron la presencia de bandas proteicas definidas cuando los geles se teñían con azul brillante de coomasie. Davey y Richardson (1981) y Stoffels y col., (1992), al intentar determinar el peso molecular de la diplococina y de la carnocina UI49 observaron una banda difusa asociada al frente electroforético. Cuando Barefoot y Klaenhammer (1984), utilizaron la tinción con nitrato de plata para determinar el peso molecular de la lactocina B observaron, igual que nosotros, una banda de tinción difusa (agregados) asociada al frente electroforético.

La dificultad de determinar el peso molecular de las bacteriocinas por técnicas electroforéticas, se atribuye a que las condiciones creadas durante la electroforesis originan la hidrólisis espontánea de las moléculas proteicas (Muriana y Klaenhammer, (1991), a pesar de que la cantidad de proteína depositada en los geles es lo suficientemente grande para poder detectarse con el nitrato de plata, cuyo límite de detección es de 1 nanogramo de proteína (Merrill y col., 1981).

Como ya se ha dicho, aunque es difícil generalizar y establecer un método unificado de purificación de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, en este trabajo también se ha seguido el proceso utilizado por Nieto y col. (1992) en la purificación de la pediocina PA-1 de *P. acidilactici* PAC 1, debido a que es más eficaz que el seguido por otros investigadores en la purificación de bacteriocinas del género *Pediococcus*. La purificación se basa en: 1) concentrar los sobrenadantes libres de células con sulfato amonio, 2) en la cromatografía de intercambio iónico, 3) en la cromatografía de interacción hidrofóbica y 4) en la cromatografía de fase reversa. Los resultados obtenidos (Tabla IV.13) indican que la actividad inhibidora se eluyó en dos picos cromatográficos diferenciados (Figura 4.18). Esto sugiere que la sustancia inhibidora de *Pediococcus* sp. 347 forma agregados proteicos difíciles de separar, o bien que la actividad antimicrobiana se debe a dos moléculas diferentes. En cualquier caso, el comportamiento de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, en comparación con

el de la pediocina PA-1 (Nieto y col., 1992), indica que se trata de moléculas distintas.

El aumento de la actividad inhibidora tras la adsorción de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 en una columna de Octyl- Sepharosa (fracción III, Tabla I) y en la de fase reversa (fracción IV, Tabla IV), tal vez se debe a la activación de la bacteriocina por un medio más hidrofóbo que el proporcionado por el etanol y propanol. El análisis del cromatograma resultante de la elución de la actividad antimicrobiana por la columna de fase reversa (Figura 4.18(bis)) sugiere que la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 se ha purificado a homogeneidad.

La Tabla IV.1 permite comparar la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, con la de otras bacteriocinas de parecido peso molecular. En ella se observa que la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347 es una molécula con 14 aminoácidos distintos, tanto alifáticos como aromáticos y constituida por 41(44) residuos aminoacídicos no modificados. Este péptido no contiene arginina, asparagina, cisteína, glutamina, isoleucina, ni prolina. Además, aunque las pediocinas PA-1 de *P. acidilactici* PAC-1,0 descritas por Nieto y col., (1992) y por Henderson y col., (1992), son comparables en su tamaño y en número de residuos aminoacídicos, no muestran una homología significativa con la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347. De acuerdo con Nieto y col. (1992), la pediocina de *P. acidilactici* PAC-1,0 posee 44 aminoácidos no modificados y un tamaño molecular de 4.640 daltons, con una zona N-terminal similar a las de la sakacina P, leucocina A y curvaticina A; con las 2 últimas bacteriocinas posee 16 y 13 aminoácidos en común, respectivamente,. Asimismo, Marugg y col., han descrito 4 genes involucrado en la síntesis y expresión de la pediocina PA-1 en *P. acidilactici* PAC 1,0, de los que uno es estructural, otro parece estar implicado en el transporte de la pediocina al exterior de las células, habiendo otros 2 genes de cuyas proteínas no se conoce su funcionalidad.

TABLA V.I - COMPOSICION Y RESIDUOS DE AMINOACIDOS DE DIVERSAS BACTERIOCINAS

Aminoácido	Bacteriocina de <i>Pediococcus</i> sp. 347	Pediocina PA 1 (a)	Pediocina PA 1 (b)	Leucocina Sakacina P (c)	Curvacina UAL (d)	A (e)
Alanina	6	4	4	6	3	3
Arginina	—	—	—	—	1	—
Asparagina	—	4	4	6	4	4
Ac. Aspártico	2	1	1	1	—	—
Cisteina	—	3	4	2	2	2
Glutamina	—	1	1	—	1	1
Ac. Glutámico	2	—	—	—	—	1
Glicina	2	8	8	9	8	6
Histidina	3	3	3	2	2	—
Isoleucina	—	2	2	2	—	2
Leucina	1	—	—	—	1	—
Lisina	4	4	4	2	2	2
Metionina	1	1	1	—	—	—
Fenilalanina	2(3)	—	—	—	2	—
Serina	2(3)	2	2	1	3	3
Treonina	4	4	4	3	1	1
Triptofano	—	1	2	3	2	1
Tirosina	2(3)	2	2	2	2	2
Valina	2	2	2	2	3	2
No Identificado	1	2	—	—	—	—
Σ residuos	41(43)	44	44	41	37	30
P. Molecular (da)	≈3000	4640	4629	ND	3930	ND

(a) Nieto y col., 1992

(b) Henderson y col., 1992

(c) y (e) Tichaczky y col., 1992

(d) Hastings y col., 1991

Actualmente son pocos los estudios sobre la composición y secuencia aminoácidica de bacteriocinas de *Pediococcus*, si se exceptúan los de las pediocina PA-1 y AcH. *P. pentosaceus* FB61 y *P. pentosaceus* FB63 producen respectivamente, las pediocinas A y Bac, que solo se diferencian en su localización genética en la célula productora (Graham y Mackay, 1985; Daschel y Klaenhammer, 1985). Bhunia y col. (1988), comprobaron que *P. acidilactici* H producía pediocina AcH, cuyo peso molecular aparente es de 2.700 Da. Más tarde, Motlagh y col., (1992) vieron que esta bacteriocina consistía en un prepeptido de 62 aminoácidos, de los que 44 forman la parte activa de la molécula. Sus resultados asimismo, indican que la secuencia de nucleótidos del gen estructural de la pediocina AcH es igual al de la pediocina PA-1, al igual que la secuenciación parcial de los primeros 23 aminoácidos de las pediocinas AcH y PA-1.

No solo es importante conocer los aminoácidos que conforman la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347, sino también su secuencia en la estructura proteíca. Ello facilitaría la localización de los determinante genéticos de esta bacteriocina, así como su clonación, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en vectores genéticos de interés. La caracterización completa de la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347 y el estudio genético de los mecanismos responsables de su síntesis, permitirán conocer la relación existente entre su estructura y mecanismo de acción, sus relaciones estructurales con bacteriocinas producidas por otras bacterias lácticas y, por último, la biología molecular de la producción de bacteriocinas en el género *Pediococcus*.

V.7. - Mecanismo de acción de la bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347

Tagg y col., (1976) han descrito las bacteriocinas como proteínas o complejos proteícos producidos por bacterias, que actúan como bactericidas en especies bacterianas relacionadas filogenéticamente con la cepa productora. Estas características se cumplen

parcialmente en la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, pues esta sustancia, además de bacteriostática posee un amplio espectro de acción.

La naturaleza proteica es una característica común de todas las bacteriocinas lácticas descritas hasta ahora. Por otra parte, su limitado espectro de acción fue cuestionado inicialmente por Klaenhammer (1988), quien propuso que de las bacteriocinas de las bacterias lácticas se clasificasen en dos grupos: el primero constituido por sustancias con un espectro de acción limitado a otras bacterias lácticas relacionadas con la cepa productora; a este grupo, que es muy numeroso, pertenecen entre otras, la lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1983), lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991), lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975), helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1985), sakacina A (Schillinger y Lücke, 1989), y lactocina S (Mortved y Ness, 1990). El segundo grupo, estaría formado por sustancias con un espectro de acción más amplio en el que, además de las bacterias lácticas, se incluirían otros microorganismos Gram-positivos como *Staph. aureus*, *List. monocytogens*, *Cl. botulinium* y *Cl. perfringens*. En este grupo se incluyen todas las bacteriocinas del género *Pediococcus* descritas hasta la fecha, la nisina y la bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347.

La acción bactericida de las bacteriocinas se produce en dos etapas (Tagg y col., 1976). En la primera, la bacteriocina se adsorbe a receptores específicos y no específicos de la membrana celular de los microorganismos sensibles. En este momento, las bacteriocinas son sensibles a las proteasas. En la segunda etapa, que es irreversible, se producen cambios patológicos que provocan la ruptura de la membrana y la muerte celular. Este proceso, se ha descrito y analizado en bacterias sensibles a la nisina (Hurst, 1981), plantaricina SIK-83 (Anderson y col., 1988) y lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991). Sin embargo, se ha comprobado que algunas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas se adsorben inespecíficamente en las bacterias Gram-positivas, independientemente de que estas células sean sensibles o resistentes a dicha bacteriocina (Upreti y Hinsdill, 1975; Davey, 1981; Zajdel y

col., 1985; Bhunia y col., 1991). Por otra parte, en las bacterias Gram-negativas, la adsorción de las bacteriocinas a los microorganismos analizados no se ha detectado todavía, contrariamente a lo demostrado para la nisina (Anderson y col., 1988) y para la pediocina AcH (Bhunia y col., 1991). Estos resultados sugieren que: 1) la actividad de las bacteriocinas no depende de su adsorción específica a la superficie de las células sensibles o 2) que la resistencia de las bacterias a las bacteriocinas se debe a la producción de un enzima involucrado en su inmunidad más que a alteraciones de los receptores celulares (Konisky, 1982; Piard y Desmazeud, 1992). No obstante, la tendencia de las bacteriocinas lácticas a adsorberse inespecíficamente a la membrana celular, podría deberse a la hidrofobicidad natural de las bacteriocinas, mas que a la existencia de receptores celulares específicos.

Zajdel y col. (1985) han demostrado que la acción inhibidora de la lactostrepcina 5, se realiza a través de receptores proteícos de la membrana celular. Muriana y Klaenhammer (1991), observaron por el contrario, que la lactacina F es muy bactericida al actuar sobre el protoplasma de las bacterias sensibles y no sobre la membrana celular que se mantiene intacta. Este fenómeno sugiere que la pared celular se encuentra involucrada en la inmunidad de las bacterias a las bacteriocinas. Por otro lado, Bhunia y col. (1991) han comprobado que los receptores de la pediocina AcH no están constituído por proteínas, lípidos o carbohidratos; han visto que la pediocina AcH ejerce su actividad en varias etapas : (1) se une a receptores inespecíficos de la pared celular, posiblemente a través del ácido lipoteicoico presente en la pared de las bacterias Gram-positivas pero ausente de las Gram-negativas; (2) cuando se saturan estos receptores, la bacteriocina se une a receptores específicos, originando alteraciones funcionales en la membrana que (3), provocan la pérdida de iones de potasio y la entrada en la célula de moléculas de pequeño tamaño, perdiendo la bacteria su capacidad de multiplicarse; (4) solo en algunas cepas, especialmente sensibles, la pared celular pierde su integridad estructural y el microorganismo se lisa; (5) la resistencia mostrada por otras bacterias Gram-positivas, podría deberse a la ausencia de receptores o a la inaccesibilidad de

las bacteriocinas a los receptores específicos; (6) en las bacterias Gram-negativas, no se observó la existencia de receptores específicos o inespecíficos de la pediocina AcH.

De un modo general puede afirmarse que las bacteriocinas de las bacterias lácticas, poseen un efecto bactericida con lisis celular (Anderson y col., 1988; Pucci y col., 1988; Bhunia y col., 1991), o sin lisis celular (Kozak y col., 1978; Davey, 1981; Barefoot y Klaenhammer, 1983; Piard y col., 1990). Esta acción es rápida, pues la población microbiana disminuye sensiblemente después de algunos minutos del contacto de la célula sensible con la bacteriocina (Barefoot y Klaenhammer, 1983; Zajdel y col., 1985; Piard y col., 1990) y, su efecto letal es mayor, en la fase exponencial, del crecimiento bacteriano que en la estacionaria (Davey, 1981; Zajdel y col., 1985).

El efecto bacteriostático de la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347 contrasta con el bactericida de la pediocina PA-1 (Gonzalez y Kunka, 1987; Pucci y col., 1988), de la pediocina AcH (Bhunias y col., 1991), pediocina A (Rueckert, 1979) y de la pediocina SJ-1 (Schved y col., 1993). Este resultado refuerza la hipótesis, apuntada al analizar el espectro de acción, de que las bacteriocinas producidas por distintas cepas de una misma especie no tienen porqué ser idénticas.

Sin embargo, esta acción bacteriostática no es única dentro de las bacterias lácticas, ya que este carácter además de presente en la lactocina 27, también se ha descrito en bacteriocinas producidas por lactobacilos de origen cárnico *L. sake* (Schillinger y Lücke, 1989; Ahn y Stiles, 1990a; Rodriguez y col., 1991; Sobrino, 1993) y *Leuc. gelidum* (Hastings y Stiles, 1991). Por otra parte, el efecto bactericida atribuido a la pediocina AcH, podría no ser tan evidente si se observan detenidamente los resultados de Bhunia y col., (1988). Según dichos investigadores, la adición de pediocina AcH a un cultivo de *L. plantarum* WSO-30 en crecimiento (con una población inicial de 3×10^7 ufc/ml) originó una disminución del recuento

de microorganismos viables efectuado una hora después de dicha adición de solo 0,8 unidades logarítmicas. En los recuentos realizados después de transcurridas 3, 5, 7 y 11 horas, se observa una recuperación, mientras posteriormente se mantienen los valores obtenidos al inicio de la experiencia (3×10^7 ufc/ml). Mientras tanto, el cultivo control continúa su crecimiento normal hasta alcanzar valores celulares de 2×10^9 ufc/ml. Hasting y Stiles (1991) obtuvieron resultados semejantes, a pesar de lo cual, adjudicaron a la bacteriocina de *Leuc. gelidum* UAL 187 un mecanismo de acción bacteriostático. Bhunia y col., (1991) señalan, que el microorganismo indicador es incapaz de multiplicarse; la ruptura de la pared celular y la muerte bacteriana, sería un destino reservado únicamente a cepas de microorganismos especialmente sensibles.

De acuerdo con lo descrito es difícil aceptar que no fuera especialmente sensible alguna de las cepas que empleamos como microorganismos indicadores (Tabla III.1) y que la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347 ejerciera una acción bactericida en otras cepas sensibles; por ello, creemos que la sustancia inhibidora ejerce una acción bacteriostática deteniendo el crecimiento de los microorganismos sensibles, al disminuir su vitalidad y no su viabilidad.

La única bacteriocina de las bacterias lácticas, de la que se conoce con exactitud la forma en que ejerce su acción bacteriostática, es la lactocina 27, que detiene la síntesis proteica sin afectar la del ADN o ARN y sin modificar los niveles de APT (Upreti y Hinsdill, 1975). Este mecanismo de acción, diferente del atribuido a otras bacteriocinas, es uno de los motivos que hace que cada vez se emplee más el término de "sustancias similares a bacteriocinas" para referirse a las sustancias antimicrobianas que, como la lactocina 27 y otras bacteriocinas como la de *Pediococcus* sp. 347, difieren en alguna de las propiedades atribuidas a las bacteriocinas clásicas (Klaenhammer, 1988). En la Tabla V.2 se señalan algunas propiedades de las bacteriocinas mejor conocidas, lo que permite comparar las coincidencias y diferencias de nuestra bacteriocina parcialmente caracterizada con las caracterizadas por otros investigadores.

Tabla V.2.- Características de algunas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas

Cepa productora	Nombre	Composición (a)	Pm (Da)	Termorre-sistencia(b)	Activa entre pH	Modo de acción
<i>L. fermentum</i> 466		Lipoglicoproteína	ND	+	ND	ND
<i>L. helveticus</i> LP27	Lactocin 27	Glicoproteína	12400	+	ND	Bacteriostático
<i>L. helveticus</i> 481	Helveticina J	Proteína (333)	37000	-	ND	Bactericida
<i>L. acidophilus</i> N2	Lactacina B	Proteína	6500	+	ND	Bactericida
<i>L. acidophilus</i> 88	Lactacina F	Proteína (56)	2500	+	2-12	Bactericida
<i>L. plantarum</i> C-11	Plantaricina A	Proteína	>8000	+	4-6,5	Bactericida
<i>L. sake</i> Lb706	Sakacina A	Proteína	ND	+	ND	Bactericida
<i>L. sake</i> L45	Lactocina S	Proteína (33)	>13700	+	ND	ND
<i>L. sake</i> 148		Péptido (31-36)	4647	+	2,6-12	Bacteriostático
<i>L. brevis</i> B37	Brevicina 37	Proteína	>50000	+	1-12	ND
<i>L. casei</i> B80	Caseicina 80	Proteína	>50000	-	3-9	ND
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisina	Péptido (34)-lantibiótico	3500	+	2,5-7	Bactericida
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Diplococina	Péptido-lantibiótico	5300	-	ND	ND
<i>S. cremoris</i> , <i>L. lactis</i>	Lactostrepcinas	Proteínas	>10000	+	4,6-7	Bactericida
<i>P. cerevisae</i>		Proteína	ND	+	ND	ND
<i>P. pentosaceus</i>	Pediocina A	Proteína	ND	+	ND	Bactericida
<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Pediocina PA-1	Proteína	16500	+	ND	Bactericida
<i>P. acidilactici</i> H	Pediocina AcH	Proteína	2700	+	2-9	Bactericida
<i>P. acidilactici</i> SJ	Pediocina SJ-1	Glicoproteína	4000	+	3-7	Bactericida
<i>C. piscicola</i> Lv17		Proteína	>8000	+	2-11	Bactericida
<i>Carnobacterium</i> sp.	Carnocina UI49	Péptido (32-35)-lantibiótico	4500-5000	+	<8	Bactericida
<i>Leu. gelidum</i>	Leucocin UAL187	Proteína (37)	>3930	+	4-6,5	Bacteriostático

(a) Entre paréntesis, número de aminoácidos; (b) Resistencia a tratamientos de, al menos, 96 °C, 30 min. ND; No Determinado

El efecto bacteriostático de la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347 y de otras ya mencionadas, permitiría explicar porqué *List. monocytogenes* persiste pero no se desarrolla en la carne fresca de bovino y en la carne y productos cárnicos de ave en presencia de una flora láctica competitiva (Buchanan y col. 1989; Jonhson y col. 1988). Esto también explicaría el que Shelef (1989) haya observado que *List. monocytogenes* no se desarrolla durante la maduración de embutidos elaborados con carne de bovino.

La concentración inhibidora mínima de la sustancia antagonista parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347, evaluada en diversos microorganismos (IV.12), oscila entre 0,6 y 2,5 mg/ml, siendo las cepas de *Staph. aureus* FRI362 y *List. monocytogenes* Scott A las más resistentes a su actividad inhibidora. Los resultados obtenidos sugieren, una vez más, la posible utilidad de las bacterias lácticas y de sus bacteriocinas como factores de seguridad en la carne y productos cárnicos.

V. 8. - Propiedades antigénicas de la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347

El conocimiento de las propiedades inmunológicas de las bacteriocinas es interesante por varios motivos. Primero, para confirmar su seguridad para el consumidor, esto es, que no le provoque reacciones alérgicas o indeseables, mientras que la obtención de anticuerpos frente a las bacteriocinas puede permitir su detección y cuantificación en la carne y productos cárnicos. Asimismo, la obtención de anticuerpos específicos facilitaría la purificación a homogeneidad de la sustancia antimicrobiana por cromatografía de afinidad, lo que permitiría su purificación en un solo paso, evitando la utilización de otros procedimientos de separación proteica menos eficaces.

Posiblemente, las bacteriocinas de las bacterias lácticas no son perjudiciales para la salud de los consumidores, ya que su naturaleza proteica, su pequeño tamaño y su sensibilidad

a los enzimas proteolíticos hacen pensar que su uso *per os*, con los alimentos, carecerá de peligros para la salud humana. El ejemplo más significativo es la nisina, la única bacteriocina autorizada en muchos países para su uso en alimentos de consumo humano, de la que se ha demostrado que no origina reacciones tóxicas en el consumidor (Hurst, 1981). Igualmente, la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347 carece al parecer de propiedades alérgicas, ya que su inoculación a los animales de experimentación no les produce reacciones visibles, alérgicas o tóxicas.

Por otra parte, las características inmunológicas de las bacteriocinas no se conocen bien, aunque se ha demostrado que algunas bacteriocinas de bacterias Gram-negativas (Gagliano y Hinsdill, 1970; Tubhlewicz, 1970; Tagg y col., 1976) y de bacterias Gram-positivas como *Staph. aureus* (Gagliano y Hinsdill, 1970) y *Cl. perfringens* tipo A (Tubylewicz 1970), poseen propiedades antigénicas.

Bhunia y col., (1990) han evaluado la antigenicidad de la pediocina AcH de *P. acidilactici* H, llegando a la conclusión de que la inoculación de esta sustancia en ratones y conejos no genera anticuerpos neutralizantes. La explicación de ese fracaso inmunógeno habría que buscarla, según estos autores, en el pequeño tamaño molecular de dicha bacteriocina (2700 Da), que la haría comportarse como un hapteno, o bien en que las técnicas de inmunización o los adyuvantes empleados no fueron los adecuados, o también en que el número de animales de experimentación utilizados fue insuficiente. Sin embargo, Bhunia y col., (1990), utilizando un ELISA indirecto observaron una respuesta inmunológica frente a la pediocina AcH parcialmente purificada; tal respuesta la atribuyeron a las proteínas de alto peso molecular, sin actividad antimicrobiana, presentes en la muestra inoculada.

De los resultados de este trabajo se deduce que la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347 es inmunógena, ya que el título de los inmunoseros de las

sangrías parciales es significativamente superior al de la anterior (Figura 4. 21). Esto también se evidencia, cuando se detecta y cuantifica en el medio de MM-triptosa la bacteriocina parcialmente purificada .

Los anticuerpos generados frente a la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347, han permitido reconocer antígenos afines en los sobrenadantes libres de células de otros pediococos con actividad antimicrobiana, pero no de lactobacilos con la misma propiedad, lo que sugiere que las sustancias antimicrobianas producidas por los pediococos estudiados podrían ser bioquímicamente iguales o similares a la de *Pediococcus* sp. 347. Asimismo, la detección de esta bacteriocina en extractos cárnicos, con el inmunosuero anti-P347 biotinizado y neutralizado, indica el potencial de un inmunosuero de estas características para detectar y cuantificar la presencia de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas de origen cárnico en este alimento y, quizás también en diversos derivados cárnicos.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

1) El análisis microbiológico de los embutidos crudos curados analizados, ha revelado que prácticamente la totalidad de su flora bacteriana está constituida por bacterias lácticas. Las 54 bacterias lácticas seleccionadas en primer lugar, manifestaron una actividad inhibidora directa, variable y cuantificable, frente a diversos microorganismos indicadores. Las 6 cepas seleccionadas más tarde se identificaron como pertenecientes al género *Pediococcus*.

2) El espectro antimicrobiano de las cepas seleccionadas, sugiere que las sustancias inhibidoras son distintas o que poseen mecanismos de acción diferentes, ya que la sensibilidad de los microorganismos indicadores empleados varia dependiendo de la cepa de *Pediococcus* sp. elegida.

3) Todas las cepas de *Pediococcus* sp. seleccionadas se desarrollaron y acidificaron los medios de cultivo a 8, 15, 20 y 32 °C. Ninguna de ellas produjo niveles detectables de diacetilo o de acetoína. *Pediococcus* sp. 347 origina una sustancia antimicrobiana exocelular, cuya producción depende del medio de cultivo, se detecta al poco tiempo de iniciarse el crecimiento microbiano y alcanza sus niveles óptimos a las 16 horas de incubación a 32 °C. La sustancia antimicrobiana fué activa frente a bacterias patógenas Gram-positivas de gran interés en la industria alimentaria.

4) Cuando la sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347, se purifica por liofilización y cromatografía de filtración en geles, aumenta muy poco su actividad inhibidora específica (1,2 veces), siendo muy pequeña la recuperación de la actividad inhibidora original (0,3 %).

5) Cuando la fracción activa de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada por cromatografía de filtración en geles, se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico, se observó que la sustancia inhibidora se distribuía en los geles como

agregados moleculares de elevado peso molecular, los agregados menores tienen un tamaño molecular de unos 3.000 daltons.

6) La sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Pediococcus* sp. 347 tiene naturaleza proteica, es estable a valores amplios de pH, resistente al calor y bacteriostática frente a los microorganismos sensibles, características que comparte con otras bacteriocinas lácticas. La sustancia parcialmente purificada posee 14 aminoácidos diferentes, siendo el número más probable de residuos aminoácido el de 48.

7) La sustancia antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 es bacteriostática, ya que detiene el crecimiento de los microorganismos sensibles, pero no su viabilidad. La concentración inhibidora mínima varía entre 0,6 y 2,5 mg/ml, dependiendo de los microorganismos ensayados.

8) La purificación de la bacteriocina de *Pediococcus* sp. 347 tras su concentración con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de fase reversa originó dos fracciones cromatográficas activas, una cuya actividad específica aumentaba unas 37.000 veces y su recuperación un 17 % y, otra, purificada unas 10.000 veces y con una recuperación del 3 %.

9) La inoculación de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada por cromatografía de filtración en geles, a los animales de experimentación (conejos), indujo una respuesta inmunógena activa, lo que permitió su detección y cuantificación en el medio de MM-Triptosa y el reconocimiento de antígenos afines en los sobrenadantes libres de células de otros pediococos con actividad antimicrobiana. Además, la detección inmunológica de la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* sp. 347 en los extractos cárnicos, demuestra el valor potencial de las técnicas inmunológicas para detectar y cuantificar la presencia de bacteriocinas

en la carne y derivados cárnicos.

CAPITULO VII
TRABAJO FUTURO

Además de producir ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, las bacterias lácticas poseen la capacidad de sintetizar proteínas o péptidos antimicrobianos. De los resultados de este trabajo, se deduce que *Pediococcus* sp. 347, puede ser de utilidad como un factor adicional en el control higiénico-sanitario de la carne y productos cárnicos. En este sentido, en la actualidad se está realizando un gran esfuerzo para conocer la organización genética y modo de acción de diversas bacteriocinas, lo que conlleva el aislamiento de nuevas bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, cuya caracterización bioquímica y genética es muy importante en la comprensión de la relación estructura/función de estas sustancias.

Sin embargo, antes de utilizarse en la industria alimentaria, las sustancias antimicrobianas deben responder a un número de requerimientos: 1) espectro antimicrobiano conocido y específico frente a la flora alterante y patógena naturalmente presente en los alimentos, 2) propiedades físico-químicas adecuadas para resistir tratamientos por el calor y cambios de pH, 3) poseer un pequeño tamaño molecular que permita una rápida difusión en sistemas semi-sólidos, así como de naturaleza proteica degradable por enzimas proteolíticas y carecer de actividad tóxica o alergénica y 4) ser detectables y cuantificables en los alimentos por métodos analíticos específicos, sencillos y rápidos.

En el caso que nos ocupa, sería interesante determinar la secuencia aminoacídica de la bacteriocina o bacteriocinas de *Pediococcus* sp. 347, ya que el conocimiento de su estructura proteica permitiría determinar su posible mecanismo de acción, la localización de los determinantes genéticos responsables de su síntesis y regulación y, por último, permitiría comparar las relaciones existentes entre estructura-actividad. Además, su caracterización genética permitiría evaluar su propagación directa por plásmidos conjugantes o por su clonación en vectores genéticos adecuados, transmisibles por electroporación a otras bacterias lácticas de interés, lo que permitiría posteriormente su evaluación como antagonistas microbianos o "factores de seguridad" en diversos substratos alimenticios.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

- ABDEL-BAR, N., HARRIS, N. D. y RILL, R. L. (1987). Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Food Sci.**, 52: 411-415.
- AHMED, A. H., MOUSTAFA, M. K. y EL-BASSIONY, T. W. (1986). Growth and survival of *Yersinia enterocolitica* in yogurt. **J. Food Prot.**, 49: 983-985.
- AHN, C. y STILES, M. E. (1990a). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. **J. Appl. Bacteriol.**, 69: 302-310.
- AHN, C. y STILES, M. E. (1990b). Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56, : 2503-2510.
- ANDERSSON, R. (1986). Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of Gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. **Int. J. Food Microbiol.**, 3: 149-160.
- ANDERSSON, R. E., DAESCHEL, M. A. y HASSAN, H. M. (1988). Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **Biochemie.** 70: 381-390.
- ANONIMO (1980). A survey of nitrosamines in sausages and dry-cured meat products. **Food Technol.**, 34: 45-51, 53 y 102.
- BACK, W. y STACKEBRANDT, E., (1978). Study of homology ADN/ADN in the genus *Pediococcus* **Arch. Microbiol.** 118: 79-85.
- BACUS, J. N. (1979). Reduces nitrosamines. **Food Eng.**, 51: 24.
- BACUS, J. N. y BROWN, W. L. (1981). Use of microbial cultures: meat products. **Food Technol.**, 35: 74-78.
- BAILEY, F. J. y HURST, A. (1971). Preparation of a highly active form of nisin from *Streptococcus lactist*, **Can. J. Microbiol.**, 17: 61-67.
- BAIRD-PARKER, A. C. (1980). Organic acids. En : "**Microbial Ecology of Foods**",

- vol. 1 pp.126-135. CMSF. Academic Press, New York.
- BANKS, T. G., BOARD, R. G. y SPARKS, N. H. C. (1986). Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 8: 103-114.
- BARAN, W.L. y STEVENSON, K.E. (1975). Survival of selected pathogens during processing of a fermented turkey sausage. **J. Food Sci.**, 40: 618-620.
- BARBER, L. E. y DEIBEL, R. H. (1972). Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausages. **Appl. Microbiol.**, 24: 891-898.
- BAREFOOT, S. F. y KLAENHAMMER, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 45: 1808-1815.
- BAREFOOT, S. F. y KLAENHAMMER, T. R. (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 26, 3: 328-334.
- BARROW, G. I. (1963). The nature of inhibitory activity by *Staphylococcus aureus* type 71. **J. Gen. Microbiol.**, 32: 255-261.
- BATISH, V. K., LAL, R. y GROVER, S. (1990). Studies on environmental and antinutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus*. **Food Microbiol.**, 7: 199-206.
- BERRY, E. D., HUTKINS, W. R., y MANDIGO, R. W. (1991). The use of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* to control postprocessing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters. **J. Food Prot.**, 54: 681-686.
- BHUNIA, A. K., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamida gel electrophoresis. **J. Industrial Microbiol.**, 2: 319-322.

- BHUNIA, A. K., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **J. Appl. Bacteriol.**, 65: 261-268.
- BHUNIA, A. K., JOHNSON, M. C., RAY, B. y BELDEN, E. L. (1990). Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H. **J. Appl. Bacteriol.**, 69: 211-215.
- BHUNIA, A. K., JOHNSON, M. C., RAY, B. y KALCHAYANAND, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH form *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. **J. Appl. Bacteriol.**, 70: 25-33.
- BHUNIA, A. K., JOHNSON, M. C., (1992). Monoclonal antibody-colony immunoblot method specific for isolation of *Pediococcus acidilactici* from foods and correlation with Pediocin (bacteriocin) production. **Appl. Env. Microbiol.**, 58(7): 2315-2320.
- BISWAS, S. R., RAY, P., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 1265-1267.
- BLACKWELL, B., MARLEY, E. PRICE, J. y TAYLOR, O. (1967). Hypertensive interactions between monoamine oxidase inhibitors and foodstuffs. **Br. J. Psychiatry**, 113: 349-365.
- BONNARD, C., PAPERMASTER, D. S. y KRAEHENBUHL, J. P. (1984). The streptavidin-biotin bridge technique: Application in light and electron microscope immunocytochemistry. En: "**Immunolabelling for Electron Microscopy**", pp. 95-109. J. M. Polak e I. M. Varndell (eds). Elsevier Science Publishers, London.
- BROCK, T. D. y DAVIE, J. M. (1963). Probable identity of a group D hemolysin with a bacteriocin. **J. Bacteriol.**, 86: 708-712.
- BUCHANAN, R. L. y GIBSONS, N. E. (1974). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8th ed. The Willians and Wilkins Co., Baltimore.
- BUCHANAN, R. L., STAHL, H. G. y WHITING, R. C. (1989). Effects and interactions

- of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite in the growth of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, 52: 844-855.
- BUYZE, G., van DEN HAMER, J. A. y DE HAAN, P. G. (1957). Correlation between hexose-monophosphate shunt, glycolytic system and fermentation type in lactobacilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, 23: 345-350.
- CARR, J. G., (1973). Lacties of the word unite. **Proc. 4th Long Ashton Symposium Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food**. Bristol Inglaterra pp. 369-380.
- CARMINATI, D. GIRAFFA, G. y BOSSI, M. (1989). Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, 52: 614-617.
- CASTRO, G. A., COTTER, M. V., FERGUSOM, J. D. y GORDON, W. (1973). Trichinosis: physiologic factors possibly altering the course of infection. **J. Parasitol.**, 59: 268-276.
- CHAN, W. C., BYCROFY, B. W., LIAN, L. Y., ROBERTS, G. C. K. (1989). Isolation and characterization of two degradation products derived from the peptide antibiotic nisin. **FEBS Lett.**, 252: 29-36.
- CHARMAIGNE, D. H. y SHAW, B. G. (1990). Antimicrobial activity of *Leuconostoc gelidum* against closely related species and *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Bacteriol.**, 69: 648-654.
- CHILDERS, A. B., TERRELL, R. N., CRAIG, T. M., KAYFUS, T. J. y SMITY, G. C. (1982). Effect of sodium chloride concentrations, water activity, fermentation method, and dry time on the viability of *Trichinella spiralis* in Genoa salami. **J. Food Prot.**, 45: 816-819.
- CHRISTENSEN, D. P. Y HUTKINS, R. W. (1992). Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **Appl. Env. Microbiol.**, 58: 3312-3315.
- CHRISTIANSEN, L. N., TOMPKIN, R. B., SHAPARIS, A. B., JOHNSTON, R. W. y KAUTTER, D. A. (1975). Effect of sodium nitrite and nitrate on *Clostridium botulinum*

- growth and toxin production in summer style sausage. **J. Food Sci.**, 40: 488-490.
- CINTAS, L. M., HOLO, H., SLETTEN, K., HERNÁNDEZ, P. E. y NES, I. F. (Comunicación personal).
- CLARKE, D. J., ROBSON, R. M. y MORRIS, J. G. (1975). Purification of two *Clostridium* bacteriocins by procedures appropriate to hydrophobic proteins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 7: 256-264.
- CLIVER, D. O. (1973). Cheddar cheese as a vehicle for viruses. **J. Dairy Sci.**, 56: 1329-1331.
- CLIVER, D. O. (1976). Viruses. En "**Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects**", pp. 257-270. M. P. Difiguereido y D. F. Splittstoessen (eds.). AVI Publishing Co., Westport.
- COALLIER-ASCAH, J. y IDZIAK, E. S. (1985). Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxins. **App. Microbiol.**, 49: 163-167.
- COLLINS, M. D., FARROW, J. A. E., PHILLIPS, B. A., FERUSU, S. y JONES, D. (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. **Int. J. System. Bacteriol.**, 34: 310-316.
- DABA, H. PANDIAN, S., GOSSELIN, J. F., SIMARD, R. E., HUANG, J. y LACROIX, C. (1991). Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 3450-3455.
- DACRE, J. C. y SHARPE, M. E. (1956). Catalase production by lactobacilli. **Nature**, 178: 700.
- DAESCHEL, M. A. y KLAENHAMMER, T. R. (1985). Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. **Appl. Environ. Microbiol.**, 50: 1538-1541.
- DAESCHEL, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food

- preservatives. **Food Technol.**, 43: 164-167.
- DAESCHEL, M. A., MCKENNEY, M. C. y McDONALD, L. C. (1990). Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. **Food Microbiol.**, 7: 91-98.
- DAHIYA, R. S. y SPECK, M. L. (1968). Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effects on *Staphylococcus aureus*. **J. Dairy Sci.**, 51: 1568-1572.
- DAJONI, A. S. y WANNAMAKER, W. (1969). Demonstration of a bactericidal substance against beta-hemolytic streptococci in supernatant fluids of staphylococcal cultures. **J. Bacteriol.**, 97: 985-991.
- DAJONI, A. S. y TAUBE, Z. (1974). Plasmid mediated production of staphylococcin in bacteriophage type 71 *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 5: 594-598.
- DAJONI, A. S., M. C. TOM, y LAW, D. J. (1976). Viridins, bacteriocins of alpha-hemolytic streptococci: isolation, characterization, and partial purification. **Antimicrob. Agents Chemother.** 9: 81-88.
- DALY, C., SANDINE, W. E. y ELLIKER, P. R. (1972). Interaction of food starter cultures and food-borne pathogens. **J. Milk Food Technol.**, 35: 349-357.
- DAVEY, G. P. (1981). Mode of action of diplococcin a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. **J. Dairy Sci. Technol.**, 16: 187-190.
- DAVEY, G. P. y RICHARDSON, B. C. (1981). Purification and some properties of diplococcin in *Streptococcus cremoris* 346. **Appl. Environ. Microbiol.**, 41: 84-89.
- DAVEY, G. P. (1984). Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 48: 309-316.
- DEIBEL, R. H. y NIVEN, C. F. Jr. (1958). Microbiology of meat curing. I. The occurrence and significance of a motile microorganism of the genus *Lactobacillus* in ham curing brines. **Appl. Microbiol.**, 6: 323-327.

- DEIBEL, R. H., y EVANS, J. B., (1960). Modified benzidine test for the detection of cytochrome-containing respiratory systems in microorganisms. **J. Bacteriol.**, 79: 356-360.
- DEIBEL, R. H. y NIVEN, C. F. Jr. (1960). Comparative study of *Gaffkya homari*, *Aerococcus viridans*, tetrad-forming cocci from meat curing brines, and the genus *Pediococcus*. **J. Bacteriol.**, 79: 175 - 180.
- DEIBEL, R. H., NIVEN, C. F., y WILSON, G. D. (1961). Some microbiological and related technological aspects in the manufacture of fermented sausages. **Appl. Microb.**, 9: 156-161.
- DE KLERK, H. C. (1967). Bacteriocinogeny in *Lactobacillus fermenti*. **Nature**. London 214: 609.
- DELVES-BROUGHTON, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. **Food Technol.** 45(11): 100-113.
- DEMPSTER, J. F. (1972). Some characteristics of microorganisms isolated from vacuum-packed bacon. **Ir. J. Agric. Res.**, 11: 351-361.
- DETHMERS, S. R., ROCK, H., FAZIO, T. y JOHNSTON, R. W. (1975). Effect of added sodium nitrite and sodium nitrate on sensory quality and nitrosamine formation in Thuringer sausage. **J. Food Sci.**, 40: 491-495.
- DODD, H. M., HORN, H. y GASSON, M. J. (1990). Analysis of the genetic determinant for the production of the peptide antibiotic nisin. **J. Gen. Microbiol.**, 136: 555-566.
- DOLEZIL, L. y KIRSOP, B. H. (1977). The use of the API Lactobacillus system for the characterization of pediococci. **J. Appl. Bacteriol.**, 42: 213-217.
- EGAN, A.F.(1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. **Antonie van Leeuwenhoek**, 49: 327-336.
- EGAN, A. F., SHAY, B. J. y ROGERS, P. J. (1989). Factors affecting the production of hydrogen sulphide by *Lactobacillus sake* L13 growing on vacuum-packaged beef. **J.**

- Appl. Bacteriol.**, 67: 255-262.
- EITENMILLER, R. R., KOEHLER, P. E. y REAGAN, J. O. (1978). Tyramine in fermented sausages: factors affecting formation of tyramine and tyrosine decarboxylase. **J. Food Sci.**, 43: 689-693.
- EL-GENDY, M. y MARTH, E. H. (1980). Growth of toxigenic and non-toxigenic aspergilli and penicillia at different temperatures and in the presence of lactic acid bacteria. **Arch. für Lebensmittelhygiene**, 31: 192-195.
- ELLIKER, P. R., SANDINE, W. A., HAUSER, B. A. y MOSELEY, W. K. (1964). Influence of culturing cottage cheese dressing with different organisms on flavor and keeping quality. **J. Dairy Sci.**, 47: 680-684.
- ELLISON, J. S., y KAUTER, J. A. (1970). Purification and some properties of two biotocins. **J. Bacteriol.**, 104: 19-26.
- ENGVALL, E. y PERLMANN, P. (1972). Quantitation of specific antibodies by enzyme linked anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. **Journal of Immunology**, 109: 129-135.
- EVERSON, C. W., DANNER, W. E., y HAMMES, P. A. (1970). Bacterial starter cultures in sausages products. **J. Agr. Food. Chem.**, 18: 57-71.
- FELTON, E. A., EVANS, J. B. y NIVEN, C. F. R. Jr. (1953). Production of catalase by the pediococci. **J. Bacteriol.**, 65: 481-482.
- FERREIRA, C. L. y GILLILAND, S. E. (1988). Bacteriocin involved in premature death of *Lactobacillus acidophilus* NCFM during growth at pH 6. **J. Dairy Sci.**, 71: 306-315.
- FLEMING, H. P., ETCHELLES, J. L. y COSTILOW, R. N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. **Appl. Microbiol.**, 30: 1040-1042.
- FOEGEDING, R. M., THOMAS, A. B., PILKINGTON, D. H. y KLAENHAMMER, T. R. (1992). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by *in-situ* produced bacteriocin during dry fermented sausage production. **Appl. Environm. Microbiol.**, 58:

884-890.

FRANK, J. F., MARTH, E. H. y OLSON, N. F. (1978). Behaviour of enteropathogenic *Escherichia coli* during manufacture of brick cheese. **J. Food Prot.**, 41: 111-115.

FRANK, J. F. y MARTH, E. H. (1977). Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk. **J. Food Prot.**, 40: 749-753.

FRIEND, B. A., FIEDLIER, J. M. y SHAHANI, K. M. (1983). Influence of culture selection on the flavor, antimicrobial activity, β -galactosidase and B-vitamins of yogurt. **Milchwissensch.**, 38: 133-136.

GAGLIANO, V. J. y HINS DILL, R. D. (1970). Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. **J. Bacteriol.**, 104: 117-125.

GARVIE, E. I. (1986). Genus *Pediococcus*. En: "**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**", vol. 2., pp. 1075-1079. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.). Williams & Wilkins Co., Baltimore.

GEIS, A., SINGH, J. y TEUBER, M. (1983) Potential of lactic *Streptococci* to produce bacteriocin. **Appl. Environ. Microbiol.**, 45, 3: 205-211.

GENIGEORGIS. C., SAVOUKIDIS, M. y MARTIN, S. (1971). Initiation of staphylococcal growth in processed meats environments. **Appl. Microbiol.**, 21: 940-942.

GIBBS, P. A. (1987). Novel uses for lactic acid fermentation. **J. Appl. Bacteriol.** (Symp. Suplem.): 515-585.

GILLILAND, S. E. y SPECK, M. L. (1972). Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. **J. Milk Food Technol.**, 35: 307-310.

GILLILAND, S. E. y SPECK, M. L. (1975). Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in nonfermented foods. **J. Food Sci.**, 40: 903-905.

GILLILAND, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. **FEMS**

Microbiol. Rev., 87: 175-188.

GOEPFERT, J. M. y HICKS, R. (1969). Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, 97: 956-958.

GOEPFERT, J. M. y CHUNG, K. C. (1970). Behavior of *Salmonella* during the manufacture and storage of a fermented sausage product. **J. Milk Food Technol.**, 33: 185-191.

GONZALEZ, C. F. y KUNKA, B. S. (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acililactici*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 53: 2534-2538.

GRAHAM, D. C. y McKAY, L. L. (1985). Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisae* and *Pediococcus pentosaceus*. **Appl. Environm. Microbiol.**, 50: 532-534.

GRAY, J. I. y RANDALL, C. J. (1979). The nitrite and N-nitrosamine problem in meats: an update. **J. Food Prot.**, 42: 168-179.

GRAU, F. H. (1980). Inhibition of the anaerobic growth of *Brochothrix thermosphacta* by lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, 40: 433-436.

GROSS, E., y MORELL, J. C. (1971). The structure of nisin. **J. Am. Chem. Soc.**, 93: 4634-4635.

GUNTHER, H. L. y WHITE, H. R. (1961). The cultural and physiological characters of the pediococci. **J. Gen Microbiol.**, 26: 185-197.

HALE, E. M. y HINS DILL, R. D. (1973). Characterization of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* strain 462. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 4: 634-640.

HAMMES, W. P., BANTLEON, A. y MIN, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. **FEMS Microbiol. Rev.**, 87: 165-174.

HARDING, C. D. y SHAW, B. G. (1990). Antimicrobial activity of *Leuconostoc gelidum* against closely related species and *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Bacteriol.**, 69:

648-654.

- HARDY, K. G. (1975). Colicinogeny and related phenomena. **Bacterial Rev.**, 39: 464-515.
- HARRIS, L. J., DAESCHEL, M. E., STILES, M. A y KLAENHAMMER, T. R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, 52: 384-387.
- HARRIS, L. J., FLEMING, H. P. y KLAENHAMMER, T. R. (1992). Developments in nisin research. **Food Res. Int.**, 25: 57-66.
- HASTINGS, J. W. y HOLZAPFEL, W. H. (1987). Numerical taxonomy of lactobacilli surviving radurization of meat. **Int. J. Food Microbiol.**, 4: 33-49.
- HASTINGS, J. W. y STILES, M. E. (1991). Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. **J. Appl. Bacteriol.**, 70: 127-134.
- HASTINGS, J. W., SAILER, M., JOHNSON, K., ROY, K. L., VEDERAS, J. C. y STILES, M. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **J. Bacteriol.**, 173: 7491-7500.
- HENDERSON, J. T., CHOPKO, A. L. y Van WASSENAAR, P. DICK (1992). Purification and primary structure of Pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. **Arch. Biochem. Bioph.**, 259: 5-12.
- HERMANN, J. E. y CLIVER, D. O. (1973). Enterovirus persistence in sausage and ground beef. **J. Milk Food Technol.**, 36: 426-428.
- HERNÁNDEZ, P. E., RODRÍGUEZ, J. M., CINTAS, L. M., MOREIRA, W. L., SOBRINO, O. J., FERNÁNDEZ, M. F. y SANZ, B. (1993). Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. **Microbiol. SEM**, 9: 37-48.
- HITCHENER, B. J., EGAN, A. F. y ROGERS, P. J. (1982). Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. **J. Appl. Bacteriol.**, 52: 31-37.

- HOLLEY, R. A., JUI, P. A., WITTMANN, M. y KWAN, P. (1988). Survival of *S. aureus* and *S. typhimurium* in raw ripened dry sausages formulated with mechanically separated chicken meat. **Fleischwurstsch.**, 68: 194-201.
- HOLO, H. NILSSEN, O. y NES, I. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp cremoris: isolation and characterization of the protein and its gene. **J. Bacteriol.** 173: 3879-3887.
- HOOVER, D. G., WALSH, P. M., KOLAETIS, K. M. y DALY, M. M. (1988). A bacteriocin produced by *Pediococcus* species associated with a 5,5 megadalton plasmid. **J. Food. Prot.**, 51: 29-31.
- HORN, N., SWINDELL, S., DODD, H. y GASSON, M. (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. **Mol. Gen. Genet.**, 228: 129-135.
- HOSODA, M., HASHIMOTO, H., MORITA, H. y CHIBA, M. (1992). Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N^o-nitroso-N-nitrosoguanidine. **J. Dairy Sci.**, 75:976-981.
- HSU, C. Y. y WISEMAN, G. M. (1967). Antibacterial substances from staphylococci. **Can. J. Microbiol.** 13: 947-955.
- HURST, A. (1967). Function of nisin and nisin-like basic proteins in the growth cycle of *Streptococcus lactis*. **Nature**, 214: 1232-1234.
- HURST, A. (1981). Nisin. **Adv. Appl. Microbiol.**, 27: 85-123.
- INGRAM, M. (1975). The lactic acid bacteria. A broad view. En "**Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods**", pp. 1-13. J. G. Carr, C. V. Cutting and G. C. Whiting (eds.). Academic Press, London.
- JAY, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol.**, 44: 525-531
- JENSEN, E. M. y SEELEY, H. W., (1954). The nutrition and physiology of the genus *Pediococcus*. **J. Bacteriol.**, 67: 484 - 488.

- JETTEN, A. M. y VOGELS, G. D. (1973). Characterization and extrachromosomal control of bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 4: 49-57.
- JIMENEZ, R., PIARD, J. C., RUIZ, J. L. y DESMAZEAUD, M. M. (1990). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. **FEMS Microbiol. Rev.**, 87: 91.
- JOERGER, M. C. y KLAENHAMMER, T. R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. **J. Bacteriol.**, 167: 439-446.
- JOERGER, M. C. y KLAENHAMMER, T. R. (1990). Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. **J. Bacteriol.**, 172: 6339-6347.
- JOHNSON, C. W., H. D. WEST, H. L. JONES, y C. J. LONG. 1949. Biocerin: an antibiotic produced by *Bacillus cereus*. **J. Bacteriol.** 57: 63-65.
- JOHNSON, J. L., DOYLE, M. P. y CASSENS, R. G. (1988). Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. **Int. J. Food. Microbiol.**, 6: 243-247.
- KANDLER, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **J. Microbiol. Serol.**, 49: 209-224.
- KANDLER, O. y WEISS, N. (1986). Genus *Lactobacillus*. En: "**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**", vol. 2., pp. 1208-1234. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.). Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- KANTOR, M. A. y POTTER, N. N. (1975). Persistence of echovirus and poliovirus in fermented sausages. Effect of sodium nitrite and processing variables. **J. Food Sci.** 40: 968-972.
- KARUNARATNE, A., WEZENBERG, E. y BULLERMAN, L. B. (1980). Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* sp. **J. Food Prot.**, 53: 230-236.

- KEKESY, D. A. y PIGUET, J. D. (1970). New method for detecting bacteriocin production. **Appl. Microbiol.**, 20: 282-283.
- KITAHARA, K. y SUZUKI, J. (1963). *Sporolactobacillus* nov.subgen. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 9: 59-71.
- KITCHELL, A. G. y SHAW, B. G. (1975). Lactic acid bacteria in fresh and cured meat. En: "Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food", pp. 209-220. J. G. Carr, C. V. Cutting and G. C. Whiting (eds.). Academic Press, London.
- KLAENHAMMER, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochemie**, 70: 337-349.
- KONISKY, J. (1982). Colicins and other bacteriocins with established mode of action. **Annu Rev. Microbiol.**, 36: 125-144.
- KORKEALA, H. y MÄKELÄ, P. (1989). Characterization of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed cooked ring sausages. **Int. J. Food Microbiol.**, 9: 33-43.
- KOZAK, W., BARDOWSKI, J. y DOBRZANSKI, W. T. (1978). Lactostrepcins, acid bacteriocins produced by lactic streptococci. **J. Dairy Res.**, 45: 247-254.
- KULSHRESTHA, D. C. y MARTH, E. H. (1975). Some volatile and nonvolatile compounds associated with milk and their effects on certain bacteria. A review. **J. Milk Food Technol.**, 38: 604-620.
- KUTTNER, A. G. (1966). Production of bacteriocins by group A streptococci with special reference to the nephritogenic types. **J. Exp. Med.**, 124: 279-291.
- LAEMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.
- LEWUS, C. B., KAISER, A. y MONTVILLE, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Appl. Environm. Microbiol.**, 58: 143-149.

- LEWUS, C. B., SUN, S. y MONTVILLE, T. J. (1992). Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, 58: 143-149.
- LONDON, J. (1976). The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. **Ann. Rev. Microbiol.**, 30: 279-301.
- LONDON, J. y CHACE, N. M. (1976). Aldolase of the lactic acid bacteria. Demonstration of immunological relationship among eight genera of gram positive bacteria using antipeptidococcal aldolase serum. **Arch. Microbiol.**, 110: 121-128.
- LOWRY, O. M., ROSERBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the pholin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275.
- LÜCKE, F. K. (1986). Microbiological processes en the manufacture of dry sausages and raw ham. **Fleischwirstch.**, 66: 1505-1509.
- LÜCKE, F. K. y HELCHELMANN, H. (1987). Starter cultures for dry sausages and raw ham. **Fleischwirtsch.**, 67: 307-314.
- LYON, W. J. y GLATZ, B. A. (1991). Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionobacterium thoenii*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 701-706.
- MAHONY, D. E. (1974). Bacteriocin susceptibility of *Clostridium perfringens* : a provisional typing schema. **Appl. Microbiol.**, 28: 172-176.
- MANN, S. O. y OXFORD, A. E. (1954). Studies of some presumptive lactobacilli isolated from the rumens of young calves. **J. Gen. Microbiol.**, 11: 83-90.
- MARKWELL, M. A. K., HAAS, S. M., BIEBER, L. L. y TOLBERT, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplifty protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Anal. Biochm.**, 87: 206-210.
- MARUGG, J. D. GONZÁLEZ, C. F., KUNKA, B. S., LEDEBOER, A. M., PUCCI, M.

- J., TOONEN, M. Y., WALKER, S. A., ZOETMULDER, L. C. M. y VANDERBERGH, P. A. (1992). Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. **Appl. Environ. Microbiol.**, 58: 2360-2367.
- MASTERS, B. A., OBLINGER, J. L., GOODFELLOW, S. J., BACUS, J. N. y BROWN, W. L. (1981). Fate of *Salmonella newpot* and *Salmonella typhimurium* inoculated into summer sausage. **J. Food Prot.**, 44: 527-530.
- MATHER, D. W. y BABEL, F. J. (1959). Inhibition of certain types of bacterial spoilage in creamed cottage cheese by the use of a creaming mixture prepared with *Streptococcus citrovorus*. **J. Dairy Sci.**, 42: 1917-1926.
- MCKERCHER, P. D., HESS, W. R. y HAMDY, F. (1978). Residual viruses in pork products. **Appl. Environ. Microbiol.**, 35: 142-145.
- MEITERT, E. (1969). Sur les bactériocines de *Corynebacterium diphtheriae*. II. Etude des bactériocines produites par *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. atypique*, *C. hoffmani* y *C. xerose*. **Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.**, 28: 1086-1097.
- MERRIL, C. R., GOLDMAN, D., SEDMAN, S. A. Y EBERTH, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrilamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. **Science**, 211: 1437-1438.
- METAXOPOULOS, J., GENIGEORGIS, G., FANELLI, M. J., FRANTI, C. y COSMA, E. (1981). Effect of starter cultures and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, 42: 863-871.
- MOL, J. H. H., HIETBRING, J. A. E., MOLLEN, H. W. M. y VAN TINTERIN, J. (1971). Observations on the microflora of vacuum-packed sliced cooked meat products. **J. Appl. Bacteriol.**, 34: 377-379.
- MORTLAGH, A. M., BHUNIA, A. K., SZOSTEK, F., HANSEN, T. R., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1992). Nucleotide and amino acid sequence of pap-gene (pediocin ACh production) in *Pediococcus acidilactici*. **H. Lett. Appl. Microbiol.**, 15: 45-48.

- MØRTVEDT, C. I. y NES, I. F. (1990). Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. **J. Gen. Microbiol.**, 136: 1601-1607.
- MULDERS, J. W. M., BOERRIGTER, I. J. ROLLEMA, H. S., SIEZEN, R. J. y DE VOS, W. M. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **Eur. J. Biochem.**, 201: 581-584.
- MURIANA, P. M. y KLAENHAMMER, T. R. (1987). Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. **Appl. Environ. Microbiol.**, 53: 553-560.
- MURIANA, P. M. y KLAENHAMMER, T. R. (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 1108. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 114-121.
- NAKAGAWA, A. y KITAHARA, K. (1959). Taxonomic studies on the genus *Pediococcus*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 5: 95-96.
- NIELSEN, H. J. S. y ZEUTHEN, P. (1985). Influence of lactic acid bacteria and the overall flora on development of pathogenic bacteria in vacuum-packed, cooked emulsion-style sausage. **J. Dairy Sci.**, 68: (Suppl. 1): 83-88.
- NIELSEN, J. W., DICKSON, J. S. y CROUSE, J. D. (1990). Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, 56: 2142-2145.
- NIETO, J. C., MEYER, J. N., SLETTEN, K., PELAEZ, C. y NES, I. F. (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **J. Gen. Microbiol.**, 138: 1-6.
- NISKANEN, A. y NURMI, (1976). Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage. **Appl. Microbiol.**, 34: 11-20.
- NIVEN, C. F. Jr., DEIBEL, R. H. y WILSON, G. D. (1955). The use of pure culture "starters" in the manufacture of "summer sausage". Chicago Illinois, **Annual meeting of the American Meat Institute.**

- OKEREKE, A. y MONTIVILLE, T. J. (1991). Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. **J. Food Prot.**, 54: 349-353.
- ORLA-JENSEN, S. (1919). "The Lactic Acid Bacteria". Andr. Fred. Host and Son., Copenhagen.
- OUCHTERLONY, O. (1949). Antigen-antibody reactions in gels. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 26: 507.
- PALUMBO, S. A., SMITH, J. L., GENTILCORE, K. M. y FIDDLER, W. (1974). Investigations on the possible occurrence of nitrosamines in Lebanon bologna. **J. Food Sci.**, 39: 1257-1258.
- PARK, H. S. y MARTH, E. H. (1972). Behavior of *Salmonella typhimurium* in skim milk during fermentation by lactic acid bacteria. **J. Milk Food Technol.**, 35: 482-488.
- PARK, H. S. y MARTH, E. H. (1973). Fate of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. **J. Milk Food Technol.**, 36: 543-546.
- PEDERSON, C. S. (1949). The genus *Pediococcus*. **Bacteriol. Rev.**, 13: 225-232.
- PEDERSON, C. S., ALBURY, M. N. y BREED, R. S. (1954). *Pediococcus cerevisiae*, the beer sarcina. Wallerstein Lab. Comuns, 17: 7 in: Günther H. L. y White, H. R. (1961). **J. Gen. Microbiol.**, 26: 185-197.
- PERRY, K. D. y SHARPE, M. E., (1960). Lactobacilli in raw mild and in cheddar cheese. **J. Dairy Res.**, 27: 267.
- PIARD, J. C. DELORME, F. GIRAFFA, G. COMMISSAIRE, J. DESMAZEAUD, M. (1990). Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. **Neth Milk Dairy J.**, 44: 143-158.
- PIARD, J. C. y DESMAZEAUD, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1 Oxygen metabolites and products from catabolism. **Lait.**, 71: 525-541.

- PIARD, J. C., MURIANA, P. M., DESMAZEUD, M. y KLAENHAMMER, T. R. (1992). Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. **Appl. Environ. Microbiol.**, 54: 2349-2353.
- PIARD, J. C. y DESMAZEAUD, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2 Bacteriocins and other antibacterial substance. **Lait.**, 72: 113-142.
- PRICE, R. J. y LEE, J. S. (1970). Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. **J. Milk Food Technol.**, 33:13-18.
- PUCCI, M. J., VEDAMUTHU, E. R., KUNKA, B. S. y VANDENBERGH, P. A. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. **Appl. Environ. Microbiol.**, 54: 2349-2353.
- PULUSANI, S. R., RAO, D. R. y SUNKI, G. R. (1979). Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by *Streptococcus thermophilus*. **J. Food Sci.**, 44, 2: 575-578.
- RACCACH, M. y BAKER, R.C. (1978). Lactic acid bacteria as an antespoilage and safety factor in cooked, mechanically deboned poultry meat. **J. Food. Prot.**, 41:703-705.
- RACCACH, M., BAKER, R. C., REGENSTEIN, J. M. y MULNIX, E. J. (1979). Potential application of microbial antagonism to extended storage ability of a flesh type food. **J. Food Sci.**, 44: 43-46.
- RACCACH, M. Y HENNINGSEN, E. C. (1984). Role of lactic acid bacteria, curing salts, spices and temperature in controlling the growth of *Yersinia enterocolitica* **J. food Prot.**, 47: 354-358.
- RACCACH, M., McGRATH, R. y DAFTARIAN, H. (1989). Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* toward *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, 9: 25-32.
- RAMMELSBERG, M. y RADLER, F. (1990). Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. **J. Appl. Bacteriol.**, 69: 177-184.

- RAMMELSBERG, M., MULLER, E. y RADLER, F. (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. **Arch. Microbiol.** 154: 249-252.
- RAY, S. K., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1989a). Bacteriocin plasmids of *Pediococcus acidilactici*. **J. Ind. Microbiol.**, 4: 163-171.
- RAY, S. K., KIM, W. J., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1989b). Conjugal transfer of a plasmid encoding bacteriocin production and immunity in *Pediococcus acidilactici* H. J. **Appl. Bacteriol.**, 66: 393-399.
- RAY, B., MOTLAGH, A., JOHNSON, M. C. y BOZOGLU, F. (1992). Mapping of pSMB74, a plasmid-encoding bacteriocin, pediocin AcH, production (Pap⁺) by *Pediococcus acidilactici* H. **Lett. Appl. Microbiol.**, 15: 35-37.
- REDDY, S. G., HENRICKSON, R. L. y OLSON, H. C. (1970). The influence of lactic cultures on ground beef quality. **J. Food Sci.**, 35: 787-791.
- REDDY, S. G., CHEN, M. L. y PATEL, P. J. (1975). Influence of lactic cultures on the biochemical, bacterial and organoleptic changes in beef. **J. Food Sci.**, 40: 314-318.
- REDDY, S. G. y RANAGANATHAN, B. (1983). Nutritional factors affecting growth and production of antimicrobial substance by *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S1-67-C. **J. Food Prot.**, 46: 514-517.
- REITER, B. y HÄRNULV, B. G. (1984). Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. **J. Food Prot.**, 47: 724-730.
- REUTER, G. (1975). Classification problems, ecology and some biochemical activities of lactobacilli of meat products. En: "**Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food**", pp. 221-229. J. G. Carr, C. V. Cutting and G. C. Whiting (eds.). Academic Press, London.
- REUTER, G. (1981). Psychrotrophic lactobacilli in meat products. En: "**Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity**", pp. 253-258. T. A. Roberts,

- G. Hobbs, J. H. B. Christian and N. Skovgaard (eds.). Academic Press, London.
- RICE, S. L. y KOEHLER, PL E, (1976). Tyrosine and histidine decarboxylase activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus* species and the production of tyramine in fermented sausages. **J. Milk Food Technol.**, 39: 166-169.
- RIEMANN, H., LEE, W. H. y GENIGEORGIS, C. (1972). Control of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in semi-preserved meat products. **J. Milk Food Technol.**, 35: 514-523.
- RODRIGUEZ, J. M., SOBRINO, O. J., FERNANDEZ, M. F., HERNANDEZ, P. E. and SANZ, B. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry fermented sausages. **Proc. 35th Int. Cong. of Meat Science and Technology**, vol. 2., pp. 308-312, Copenhagen, Denmark.
- RODRIGUEZ, J. M. (1991). Aislamiento y caracterización parcial de bacterias lácticas de origen cárnico antagonistas del desarrollo de otros microorganismos. **Tesis Doctoral**. Universidad Complutense, Madrid.
- ROGERS, A. H. (1972). Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. **Appl. Microbiol.**, 24: 294-295.
- ROGOSA, M. (1961). Experimental conditions for nitrate reduction by certain strains of the genus *Lactobacillus*. **J. Gen. Microbiol.**, 24: 401-408.
- ROGOSA, M. (1970). Characters used in the classification of lactobacilli. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 20: 519-534.
- ROTH, L. A. y CLARK, D. S. (1975). Effect of lactobacilli and carbon dioxide on the growth of *Microbacterium thermosphactum* on fresh beef. **Can. J. Microbiol.**, 21: 629-632.
- RUBIN, H. E. y VAUGHAN, F. (1979). Elucidation of the inhibitory factors of yoghurt against *Salmonella typhimurium*. **J. Dairy Sci.**, 62: 1873-1879.
- SABINE, D. B. (1963). An antibiotic-like effect of *Lactobacillus acidophilus*. **Nature**, 199:

811-816.

- SAHL H. G., KORDEL M., BENZ, R. (1987). Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. **Arch. Microbiol.**, 149: 120-124.
- SANTIAGO, O. (1971). Contribuição ao estudo da flora ácido láctica do salame tipo italiano. **Boletim da DIPOA (Divisão de Inspeção de Prod. de Origem Animal), Ministério de Agricultura, DNPA/BRASIL nº 13.**
- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. K. (1987a). Starter cultures for dry sausages and raw ham. **Fleischwirtsch.**, 67: 307-314.
- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. K. (1987b). Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiol.**, 4: 199-208.
- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, 55: 1901-1906.
- SCHILLINGER, U. y HOLZAPFEL, W. H. (1990). Antibacterial activity of carnobacteria. **Food Microbiol.**, 7: 305-310.
- SCHILLINGER, U., KAYA, M. y LÜCKE, F. K. (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. **J. Appl. Bacteriol.**, 70: 473-478.
- SCHLEIFER, K. H. y KILPPER-BÄLZ, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **Int. J. System. Bacteriol.**, 34: 31-34.
- SCHLEIFER, K. H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILPPER-BÄLZ, R., COLLINS, M. D. y FISCHER, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. **System. Appl. Microbiol.**, 6: 183-195.
- SCHLEGEL, R., y SLADE, H. D. (1972). Bacteriocin production by transformable group H

- streptococci. **J. Bacteriol.**, 112: 824-829.
- SCHLEGEL, R., Y SLADE, H. D. (1973). Properties of a *Streptococcus sanguis* (group H) bacteriocin and its separation from the competence factor of transformation. **J. Bacteriol.** 115: 655-661.
- SCHVED, F., LALAZAR, A., HENIS, Y. y JUVEN, B. J. (1993). Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **J. Appl. Bacteriol.**, 74: 67-77.
- SEN, N. P., IYENGAR, J. R., DONALDSON, B. A. y PANALAKS, T. (1974). Effect of sodium nitrite concentration on the formation of nitrosopyrrolidine and dimethylnitrosamine in fried bacon. **J. Agric. Food Chem.**, 22: 540.
- SHAHANI, K. M., RAKIL, J. R. Y KILARA, A. (1976). Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus* I. Cultural conditions for the production of antibiosis. **Cult. Dairy Prod. J.**, 11: 14-17.
- SHARPE, M. E., FRYER, T. F. y SMITH, D. G. (1966). **Identification Methods for Microbiologists**. Part. A, pp. 65-79. Academic Press, New York.
- SHARPE, M. E., (1979a). Lactic acid bacteria in the dairy industry. **J. Soc. Dairy Technol.** 32:9-18.
- SHARPE, M. E. (1979b). Identification of the lactic acid bacteria. En: "**Identification Methods for Microbiologists**", pp. 233-259. F. A. Skinner and D. W. Lovelock (eds.). Academic Press, London.
- SHAW, B. B. y HARDING, C. C. (1984). A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. **J. Appl. Bacteriol.**, 56: 25-40.
- SHAY, B. J. y EGAN, A. F. (1981). Hydrogen sulphide production and spoilage of vacuum-packed beef by a *Lactobacillus*. En: "**Psychotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity**", pp. 241-252. T. A. Roberts, G. Hobbs, J. H. B.Christian and N. Skovgaard (eds.). Academic Press, London.

- SHELEF, L. A. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef and liver after storage at 4 and 25 °C. **J. Food Prot.**, 52:379-383.
- SILVA, M., JACOBUS, N. V., DENEKE, C. y GORBACH, S.L. (1987). Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 31: 1231-1233.
- SMITH, J. L. y PALUMBO, S. A. (1978). Reduction of nitrate in a meat system by *Lactobacillus plantarum*. **J. Appl. Bacteriol.**, 45: 153-155.
- SMITH, G. C., HALL, L. C. y VANDERZANT, C. (1980). Inoculation of beef steaks with *Lactobacillus* species II. Effect on meat quality characteristics. **J. Food Prot.**, 44: 936-955.
- SMITH, J. L. y PALUMBO, S. A. (1983). Use of starter cultures in meats. **J. Food Prot.**, 46: 997-1006.
- SOBRINO, O. J., RODRIGUEZ, J. M., MOREIRA, W. L., CINTAS, L. M., FERNÁNDEZ, M. F., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P. E. (1991). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. **Int. J. Food Microbiol.**, 13: 1-10.
- SOBRINO, O. J., RODRIGUEZ, J. M., MOREIRA, W. L., CINTAS, L. M., FERNANDEZ, M. F., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P. E. (1992). Sakacin M a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. **Int. J. Food Microbiol.**, 16: 215-225.
- SPELHAUG, S. R. y HARLANDER, S. K. (1989). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. **J. Food Prot.**, 52: 856-862.
- SPENCER, T. (1969). New procedure for determining the ability of microorganisms to reduce nitrate and nitrite. **Lab. Pract.**, 18: 1286-1296.
- STAMER, J. R. (1979). The lactic acid bacteria: microbes of diversity. **Food Technol.**, () 33: 60-65.

- STILES, M. E. y HASTINGS, J. W. (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends Food Sci. Technol.**, 2: 247-251.
- STODDARD, G. W., PETZEL, J. P., van BELKUM, M. J., KOK, J. and MCKAY, L. (1992). Molecular analysis of the lactococin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis WM4. **Appl. Environm. Microbiol.**, 58: 1952-1961.
- STTOFFELS, G., NISSEN-MEYER, J., GUDMONSDOTTIR, A., SLETTEN, K., HOLO, H. Y NES, I.F. (1992). Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from *Carnobacterium* sp. **Appl. Environm. Microbiol.**, 58: 1417-1422.
- SUBRAMANIAN, C. S. y MARTH, E. M. (1968). Multiplication of *Salmonella typhimurium* in skim milk with and without added hydrochlorid, lactic and citric acids. **J. Milk Food Technol.**, 31: 323-326.
- SWANK, R. T. y MUNKRES, K. D. (1971). Molecular weigth analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. **Anal. Biochm.**, 39: 462-477.
- TAGG, J. R. y McGIVEN, A. R. (1971). Assay system for bacteriocins. **Appl. Microbiol.**, 21: 943.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S. y WANNAMAKER, L. W. (1975). Bacteriocin of a group B *streptococcus* : partial purification and characterization. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 7: 764-772.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S. y WANNAMAKER, L. W. (1976). Bacteriocins or Gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.**, 40: 722-756.
- TALARICO, T. L., CASAS, I. A., CHUNG, T. C. y DOBROGOSZ, W. J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 32: 1854-1858.
- TALARICO, T. L. y DOBROGOSZ, W. J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrob. Agents**

- Chemother.**, 33: 674-679.
- TANAKA, N., TRAISMAN, E., LEE, M. H., CASSENS, R. G. y FOSTER, E. M. (1980). Inhibition of botulinum toxin formation in bacon by acid development. **J. Food Prot.**, 43: 450-457.
- TAYLOR, S. L., LEATHERWOOD, M. y LIERBER, E. R. (1978). A survey of histamine levels in sausages. **J. Food Prot.**, 41: 634-637.
- THORNLEY, M. J. y SHARPE, M. E. (1959). Microorganisms from chicken meat related to both lactobacilli and aerobic sporeformers. **J. Appl. Bact.**, 22: 368-376.
- TICHACZEK, W. P. (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A and skacin P produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and *Lactobacillus sake* LTH673. **System. Appl. Microbiol.** 37: 264-271.
- TIJSEN, P. (1985). Enzymes used in activity amplification assays. En: **Practice and Theory of Enzyme Immunoassays.**, R. H. Burdon y P. H. van Knippenberg, Eds. Elsevier. Londres.
- TOBA, T., YOSHIOKA, E. y ITOH, T. (1991). Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. **Letters Appl. Microbiol.**, 12: 43-45.
- TUBYLEWICZ, H. (1970). Antigenic properties of the bacteriocin preparations obtained from Type A. *Clostridium perfringens* strains. **Bull. Polish Academy Sci. (Biol.)**, 18: 253-257.
- TZANNETIS, S., PAPAVALASSILLIOU, J. y PAPANAYIOTOU, P. (1972). Naturally occurring antibodies against colicins in human sera. **J. Med. Microbiol.**, 5: 275-281.
- UPRETI, G. C. y HINS DILL, R. D. (1973). Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 4: 487-494.
- UPRETI, G. C. y HINS DILL, R. D. (1975). Production and mode of action of Lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. **Antimicrob. Agents**

- Chemother.**, 7: 139-145.
- VAN BELKUM, M. J., HAYEMA, B. J., JEENINGA, R. E., KOK, J. y VENEMA, G. (1991). Organization and nucleotid sequences of two lactococcal bacteriocin operons. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 492-498.
- VANKOVA, J. (1957). Motile catalase producing strains of *Lactobacillus delbrueckii*. **Nature**, 179: 204.
- VAN WEEMEN, B. K. y SCHUURS, A. H. W. M. (1972). Immunoassay using hapten enzyme conjugates. **FEBS Lett.**, 24: 77-81.
- VICENT, J. G., VEOMETT, R. C. y RILEY, R. F. (1959). Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. **J. Bacteriol.**, 78: 477-484.
- VOLLER, A., BIDWELL, D. y BARTLETT, A. (1986). Enzye-linked innumosorbent assay. En: **Manual of Clinical Laboratory Immunology**. N. R. Rose, H. Friedman y J. L. Fahey, Eds. pp. 99-109. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
- WEST, C. A. y WARNER, P. J. (1988). Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. **FEMS Microbiol. Lett.**, 49: 163-165.
- WESTHOFF, D. C. y ENGLER, T. (1972). The fate of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in cottage cheese whey. **J. Milk Food Technol.**, 36: 19-22.
- WHITTENBURY, J. R. (1963). The use of soft agar in the study of conditions affecting the use of fermentable substrates by lactic acid bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, 32: 375-384.
- WHITTENBURY, J. R. (1964). Hydrogen peroxide formation and catalase activity of the lactic acid bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, 35: 13-26.
- WISEMAN, D. W. Y MARTH, E. H. (1980). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*. **Mycopathologia**, 73: 49-56.
- YANG, C. y SEPÚLVEDA, F. (1985). Separation of phenylthiocarbamyl amino acids by

high-performance liquid chromatography on spherisorb octadecylsilane columns. **J. Chromatog.**, 346: 413-417.

YOUSEF, A. E., LUCHANSKY, J. B., DEGNAN, A. J. y DOYLE, M. P. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or Pediocin AcH during storage at 4 or 25 ° C. **Appl. Env. Microbiol.**, 57: 1461-1467.

ZAJDEL, J. K., CEGLOWSKI, W. T. (1985). Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. **Appl. Environ Microbiol.**, 49: 969-974.