

32

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Departamento de Nutrición y Bromatología III

(Higiene y Tecnología de los Alimentos)

FACULTAD DE VETERINARIA

**CARACTERIZACION PARCIAL,
BIOQUIMICA E INMUNOLOGICA,
DE UNA SUSTANCIA
ANTIMICROBIANA PRODUCIDA
POR *Lactobacillus sake* 148**

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

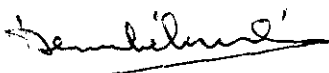
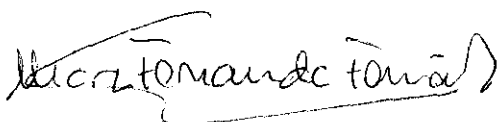
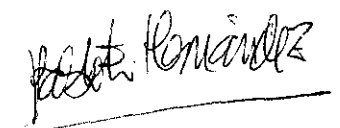
ODON JULIAN SOBRINO ABUJA

PABLO ELPIDIO HERNANDEZ CRUZA, CATEDRATICO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "CARACTERIZACION PARCIAL, BIOQUIMICA E INMUNOLOGICA, DE UNA SUSTANCIA ANTIMICROBIANA PRODUCIDA POR *LACTOBACILLUS SAKE* 148", de la que es autor D. Odón Julián Sobrino Abuja, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos), bajo la dirección conjunta del catedrático D. Bernabé Sanz Pérez, de la profesora titular Dña. María F. Fernández Alvarez y del que suscribe y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 19 de enero de 1993


Fdo: Bernabé Sanz Pérez
Fdo: Maria F. Fernández Alvarez
Fdo: Pablo E. Hernández Cruza

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Prof. D. Bernabé Sanz Pérez la confianza depositada en mi al acogerme en el Departamento, que tan acertadamente ha dirigido durante años y, en el que se ha desarrollado este trabajo. Deseo agradecerle también su paciencia y comprensión durante mis primeros pasos, torpes y vacilantes, por el laboratorio así como sus enriquecedoras orientaciones, que han contribuido sobremanera a mi completa formación.

De manera especial quiero mostrar mi agradecimiento al Prof. D. Pablo E. Hernández Cruza, verdadera piedra angular y soporte científico de este trabajo. Agradecerle, sobre todo, su ejemplo, modelo de trabajo, dedicación, abnegación y sacrificio. Su acertado asesoramiento, apoyo, comprensión y constante estímulo han conseguido, además de hacerme permanecer cientos de horas (incluidos fines de semana y festivos) en el laboratorio, inculcarme una enorme pasión por el trabajo de investigación desarrollado.

No puedo olvidar, por supuesto, expresar mi agradecimiento a los restantes miembros del "Hogar del Lactobacilo"; a Juan Miguel, "socio cofundador" y compañero de las situaciones más inverosímiles que en un laboratorio presentarse puedan (Rodríguez, 1991); a Wagner Luiz, por su amistad y por compartir conmigo peripecias, desaguizados y muchas horas de trabajo, jalonadas en algunas ocasiones, de pequeños éxitos; al resto de los miembros del "Hogar", a Luis por su entusiasmo y, en especial a Fernanda por su peculiar sentido del humor y por la ayuda, comprensión y cariño demostrados en los momentos más difíciles de este trabajo.

También quiero agradecer al resto de los componentes del Departamento de Nutrición y Bromatología III su contribución al clima de amistad y trabajo que han alimentado el desarrollo de esta tesis. A Almudena y Manuela por las agradables y terapéuticas tertulias, a

Olga por su colaboración en las técnicas de HPLC, esencial en la obtención de algunos de los resultados de este trabajo. A todos, en general, agradecerles su ilusión por mantener viva la titilante llama de la investigación y el compañerismo.

A Industrias Cabo, S.A. por su generosa colaboración al proporcionarnos las muestras de embutidos cuando fueron requeridas.

Al personal del hospital militar "Gómez Ulla" por su contribución al desarrollo de las pruebas inmunológicas.

A la Comunidad de Madrid por la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador, con la que se ha realizado parte de esta tesis. Asimismo, este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por el BRIDGE (Biotechnology Research for Innovation, Development and Growth in Europe) T-Proyect on Lactic Acid Bacteria (Contract BIOT-0263) y por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT ALI91-0255).

Por último, mi más especial agradecimiento a Cristina, por haber renunciado a más de un fin de semana y fiestas de guardar, y por la comprensión y cariño demostrado durante todos los años que ha durado la ejecución de este trabajo.

INDICE

CAPITULO I: EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA

A INVESTIGAR..... 1

CAPITULO II: REVISION BIBLIOGRAFICA..... 6

II. 1.- Utilización de agentes antimicrobianos en los alimentos;

presente y futuro.....	7
1.- Temperatura.....	7
2.- Actividad del agua.....	8
3.- pH.....	9
4.- Gases y atmósferas modificadas o controladas.....	9
5.- Acidos orgánicos.....	11
6.- Sales de curado.....	11
7.- Antibióticos.....	12
8.- Radiaciones.....	12
9.- Envasado.....	13
10.- Interacción de factores.....	13
11.- Las bacterias lácticas y su posible empleo como conservadores de los alimentos.....	14

II. 2.- Bacterias lácticas; introducción histórica 14

1.- Características generales	17
2.- Taxonomía.....	20

II. 3.- Género *Lactobacillus*..... 23

3. 1.- Morfología.....	23
1.- Motilidad.....	24
2.- Tinción.....	24
3. 2.- Pared celular y ultraestructura.....	25
3. 3.- Desarrollo y características de las colonias.....	25
3. 4.- Necesidades nutritivas.....	26

1.- Medios de cultivo.....	27
3. 5.- Metabolismo.....	28
3. 6.- Consideraciones taxonómicas; Clasificación.....	31
6. 1.- Grupo I.- Homofermentativos obligados.....	32
6. 2.- Grupo II.- Heterofermentativos facultativos.....	33
2. 1.- Streptobacterias atípicas.....	33
1.- <i>Lactobacillus sake</i>	33
6. 3.- Grupo III.- Heterofermentativos obligados.....	34
3. 7.- Ecología, habitats y biotecnología.....	34
II. 4.- Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas.....	35
4. 1.- Actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos.....	36
4. 2.- Actividad antimicrobiana de componentes inorgánicos.....	37
1.- Dióxido de carbono.....	37
2.- Peróxido de hidrógeno.....	38
3.- Diacetilo.....	39
4.- Reuterina.....	39
4. 3.- Efecto antimicrobiano de las bacteriocinas y sustancias afines.....	40
II. 5.- Bacteriocinas; Definición.....	40
5. 1.- Detección de bacterias productoras de bacteriocinas	41
1.- Detección de las cepas productoras.....	41
2.- Prueba del antagonismo directo.....	41
3.- Prueba del antagonismo diferido.....	42
5. 2.- La acción de las bacteriocinas y su diferenciación de otras posibles causas de inhibición.....	42
5. 3.- Producción óptima de bacteriocinas.....	44
5. 4.- Purificación.....	44
5. 5.- Propiedades de las bacteriocinas de las bacterias lácticas.....	45
1.- Composición química.....	45
2.- Propiedades físicas.....	46
3.- Espectro de acción.....	46
4.- Mecanismo de acción.....	47
5. 6.- Regulación genética.....	48

5. 7.- Bacteriocinas de las bacterias lácticas.....	50
1.- Bacteriocinas producidas por especies del género <i>Lactobacillus</i>	50
2.- Bacteriocinas producidas por especies del género <i>Lactococcus</i>	51
3.- Bacteriocinas producidas por especies del género <i>Pediococcus</i>	51
4.- Bacteriocinas producidas por especies del género <i>Carnobacterium</i>	52
5.- Bacteriocinas producidas por especies del género <i>Leuconostoc</i>	52
 CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS.....	53
 III. 1.- Materiales.....	54
1. 1.- Material biológico.....	54
1.- Microorganismos empleados.....	54
2.- Obtención de los inmunosueros.....	54
1. 2.- Productos y reactivos.....	55
1. 3.- Material de laboratorio.....	55
 III. 2.- Métodos.....	60
2. 1.- Medios de cultivo empleados en el crecimiento de los microorganismos.....	60
1.- Medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias lácticas.....	60
2.- Medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos indicadores distintos de las bacterias lácticas.....	62
2. 2.- Aislamiento y selección de las bacterias lácticas de los embutidos crudos madurados.....	63
2. 3.- Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas.....	65
3. 1.- Soluciones tampón empleadas.....	65
3. 2.- Pruebas directas de antagonismo.....	65
1.- Prueba directa de antagonismo en pocillos.....	65
3. 3.- Actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células.....	66
1.- Preparación de los sobrenadantes.....	66
2.- Detección de la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados 20 veces.....	67
3. 4.- Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias	

lácticas seleccionadas.....	67
2. 4.- Identificación y caracterización bioquímica de algunas bacterias	
lácticas con actividad antimicrobiana.....	68
1.- Morfología y tinción por el método de Gram.....	68
2.- Prueba de la catalasa.....	68
3.- Producción de gas a partir de glucosa.....	68
4.- Hidrólisis de la arginina.....	70
5.- Producción de ácido sulfhídrico.....	71
6.- Prueba de Voges-Proskauer.....	72
7.- Fermentación de carbohidratos.....	73
8.- Tolerancia al cloruro sódico.....	75
9.- Tolerancia al pH de 3,9.....	75
10.- Desarrollo a diversas temperaturas.....	75
2. 5.- Espectro antimicrobiano de las sustancias inhibidoras producidas	
por las cepas de <i>L. sake</i> números 77, 90, 148 y 180.....	76
2. 6.- Efecto de la composición del medio de cultivo en la actividad	
antimicrobiana de <i>Lactobacillus sake</i> 148.....	76
2. 7.- Crecimiento de <i>L. sake</i> 148, cinética del desarrollo y producción de	
sustancia antimicrobiana a diversas temperaturas.....	77
7. 1.- Crecimiento de los cultivos.....	77
7. 2.- Parámetros cinéticos del desarrollo microbiano.....	78
1.- Velocidad específica de crecimiento (μ).....	78
2.- Tiempo de duplicación (t_d).....	79
3.- Número de generaciones por hora (g/h).....	79
4.- Determinación del peso celular seco.....	80
2. 8.- Purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de	
<i>L. sake</i> 148.....	82
8. 1.- Cromatografía de filtración en geles.....	82
1.- Soluciones tampón empleadas.....	82
2.- Geles.....	82
3.- Condiciones de trabajo.....	83
8. 2.- Determinación de la proteína.....	84
2. 9.- Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana exocelular	
parcialmente purificada de <i>L. sake</i> 148.....	86

9. 1.- Preparación de la solución patrón de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada.....	86
9.2.- Efecto de diversos enzimas en la actividad inhibidora de <i>L. sake</i> 148.....	87
9. 3.- Efecto de diferentes pHs en la actividad inhibidora de <i>L. sake</i> 148.....	87
1.- Preparación de las soluciones tampón de distintos pHs.....	87
2.- Condiciones de trabajo.....	88
9. 4.- Cinética de termodestrucción de la actividad inhibidora de <i>L. sake</i> 148.....	89
1.- Tratamiento térmico.....	89
2.- Parámetros cinéticos de termodestrucción.....	89
9. 5.- Determinación del peso molecular de la sustancia inhibidora de <i>L. sake</i> 148 por cromatografía de filtración en Sephadex G-50...	94
9. 6.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).....	94
6. 1.- Técnica de Swank y Munkres (1971).....	96
1.- Tampones, geles y soluciones empleadas.....	96
2.- Preparación de las muestras.....	98
3.- Preparación de los geles.....	98
4.- Electroforesis.....	99
5.- Tinción de los geles.....	99
6.- Determinación del peso molecular.....	99
6. 2.- Técnica de Laemli (1970).....	100
1.- Tampones, geles y soluciones empleadas.....	100
2.- Preparación de las muestras.....	103
3.- Preparación de los geles y electroforesis.....	103
4.- Tinción de los geles.....	103
5.- Determinación del peso molecular.....	104
9. 7.- Determinación de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana de <i>L. sake</i> 148 por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	104
1.- Tampones y reactivos.....	104

2.- Digestión ácida de la muestra problema.....	106
3.- Preparación de los patrones.....	106
4.- Derivatización de los aminoácidos.....	106
5.- Técnica de la cromatografía en HPLC.....	107
2. 10.- Mecanismo de acción de la sustancia inhibidora de <i>L. sake</i> 148.....	108
2. 11.- Concentración inhibidora mínima de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada en diversos microorganismos indicadores.	109
2. 12.- Métodos inmunológicos.....	109
12. 1.- Obtención de los inmunosueros.....	109
1.- Pauta de inmunización.....	109
2.- Sangría final.....	110
3.- Obtención y conservación del suero.....	112
12. 2.- Inmunodifusión en geles de agarosa.....	113
1.- Preparación del gel.....	113
2.- Preparación de las placas de inmunodifusión.....	114
3.- Llenado de los pocillos e incubación de las placas.....	114
4.- Lavado y secado de los geles.....	114
5.- Tinción.....	115
12. 3.- Técnicas inmunoenzimáticas.....	115
1.- Técnicas del ELISA indirecto.....	115
2.- Técnica del ELISA indirecto clásico.....	115
3.- Técnica del ELISA indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina.....	119

CAPITULO IV: RESULTADOS..... 123

IV.1.- Evolución de las bacterias lácticas durante la maduración de un lote de embutidos crudos curados..... 124

IV. 2.- Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas..... 124

2. 1.- Actividad inhibidora directa.....	124
2. 2.- Actividad inhibidora de los sobrenadantes de los cultivos libres de células.....	152

2. 3.- Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas.....	152
IV. 3.- Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas seleccionadas por su actividad antimicrobiana.....	154
1.- Morfología y tinción por el método de Gram.....	154
2.- Prueba de la catalasa.....	154
3.- Producción de CO ₂ a partir de glucosa.....	154
4.- Hidrólisis de la arginina.....	154
5.- Producción de ácido sulfhídrico.....	155
6.- Prueba de Voges-Proskauer.....	155
7.- Fermentación de carbohidratos.....	155
8.- Tolerancia al cloruro sódico.....	156
9.- Tolerancia al pH de 3,9.....	157
10.- Crecimiento a diversas temperaturas.....	157
IV. 4.- Espectro antimicrobiano de la sustancia inhibidora exocelular de las cepas de <i>L. sake</i> 77, 90, 148 y 180.....	162
IV. 5.- Efecto de la composición del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus sake</i> 148.....	165
IV. 6.- Parámetros cinéticos y actividad inhibidora de <i>L. sake</i> 148 a distintas temperaturas.....	167
1.- Crecimiento y actividad antimicrobiana de <i>L. sake</i> 148.....	167
2.- Parámetros cinéticos del crecimiento microbiano.....	173
IV. 7.- Purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de <i>L. sake</i> 148.....	175
1.- Cromatografía de filtración en Sephadex G-150, G-75 y G-50.....	175

IV. 8.-Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana de	
<i>Lactobacillus sake</i> 148.....	182
1.- Efecto de diversos enzimas en la actividad inhibidora.....	182
2.- Efecto del pH en la actividad inhibidora.....	184
3.- Cinética de termodestrucción de la actividad antimicrobiana	
exocelular de <i>Lactobacillus sake</i> 148.....	184
4.- Determinación del peso molecular por cromatografía de filtración en	
Sephadex G-50.....	188
5.- Determinación del peso molecular por electroforesis en geles de	
poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.....	188
1.- Electroforesis según la técnica de Swank y Munkres	190
2.- Electroforesis en geles del 20% poliacrilamida con SDS	
(Laemly, 1979).....	190
6.- Determinación de la composición aminoacídica de la sustancia	
antimicrobiana parcialmente purificada.....	191
 IV. 9.-Mecanismo de acción de la sustancia antimicrobiana	
exocelular de <i>Lactobacillus sake</i> 148.....	194
 IV. 10.- Concentración inhibidora mínima (CIM) de la sustancia	
antimicrobiana exocelular de <i>L. sake</i> 148.....	194
 IV. 11.- Caracterización inmunológica parcial de la sustancia	
antimicrobiana de <i>L. sake</i> 148.....	199
11. 1.- Análisis por inmunodifusión en geles de agarosa, de los inmuno-	
sueros de conejos cuando se emplea como antígeno la sustancia	
antimicrobiana exocelular de <i>L. sake</i> 148.....	199
11. 2.- Detección de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada	
de <i>L. sake</i> 148, mediante técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)....	200
2. 1.- Detección por la técnica del ELISA indirecto clásico.....	200
1.- Evaluación de la concentración idónea de los reactivos que	
intervienen en el ensayo.....	200
2.- Determinación de la respuesta inmunológica de los conejos	
frente al extracto antigénico inoculado.....	201

2. 2.- Detección de la sustancia antimicrobiana de <i>L. sake</i> 148 en el medio de cultivo MM-triptosa.....	203
1.- Evaluación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo.....	203
11. 3.- Detección de la sustancia antimicrobiana de <i>L. sake</i> 148 mediante la técnica del ELISA indirecto con el sistema de amplificación biotina-avidina.....	207
CAPITULO V: DISCUSION.....	209
V. 1.- Aislamiento de bacterias lácticas de embutidos crudos curados.....	210
V. 2.- Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas.....	211
2. 1.- Elección de las pruebas de antagonismo microbiano.....	211
1.- Pruebas directas de antagonismo microbiano.....	211
2.- Antagonismo de los sobrenadantes libres de células.....	213
2. 2.- Actividad inhibidora de los cultivos de las bacterias lácticas seleccionadas.....	215
2. 3.- Actividad inhibidora de los sobrenadantes libres de células.....	217
2. 4.- Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas.....	218
V. 3.- Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana.....	219
V. 4.- Espectro antimicrobiano de los sobrenadantes libres de células de las cepas de <i>L. sake</i> seleccionadas, una vez neutralizados y concentrados.....	225
V. 5.- Efecto de la composición del medio de cultivo en la producción de actividad inhibidora.....	229

V. 6.-	Parámetros cinéticos y producción de la actividad inhibidora de <i>L. sake</i> 148 a diversas temperaturas.....	231
V. 7.-	Caracterización bioquímica parcial de la actividad antimicrobiana de <i>L. sake</i> 148.....	232
V. 8.-	Mecanismo de acción de la bacteriocina producida por <i>L. sake</i> 148.....	241
V. 9.-	Propiedades antigénicas de la bacteriocina de <i>L. sake</i> 148..	248
CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....		251
CAPITULO VII: TRABAJO FUTURO.....		254
CAPITULO VIII: BIBLIOGRAFIA.....		257

CAPITULO I

EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

La masificación y complejidad de los medios de producción y distribución de alimentos y el empleo de la refrigeración como principal método de conservación de los mismos, obliga a pensar en el desarrollo de nuevas técnicas que, unidas a las ya existentes, permitan, no sólo garantizar la calidad higiénica, sino prolongar la vida útil de los alimentos. Para alcanzar estos objetivos en los últimos años se han aplicado en la carne y productos cárnicos otras metodologías de conservación. Algunas podrían mejorarse empleando técnicas basadas en el antagonismo biológico existente entre algunos géneros microbianos saprofitos y los posibles microorganismos patógenos o alterantes cuya presencia se quiere eliminar.

Si se dispusiese de métodos que destruyeran selectivamente la flora patógena potencialmente presente en la carne o si se inhibiese el desarrollo de su flora psicotrofa alterante, la calidad higiénica y la vida útil de este alimento mejorarían considerablemente (Molin y Ternstom, 1982; Shaw y Latty, 1982, 1984; Dainty, 1986). Si bien éstos objetivos pueden cumplirse con la utilización de aditivos, antibióticos o radiaciones ionizantes, tales métodos presentan muchos inconvenientes. Asimismo, es conveniente disponer de otras alternativas que aumenten la calidad higiénica y la vida útil de las carnes envasadas al vacío o de las que, a pesar de someterse a la acción del calor, sufren un proceso tecnológico previo que puede permitir un desarrollo microbiano excesivo que determina una pérdida de su calidad tecnológica cuando no un peligro sanitario para el consumidor.

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos que, además de no ser peligrosos para el consumidor, inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos potencialmente presentes en la carne y en sus productos. Aunque el mecanismo íntimo de la acción antimicrobiana de éstas bacterias no se conoce completamente, se sabe que sintetizan metabolitos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, etc. que desempeñan un papel importante en la inhibición del desarrollo de otros microorganismos. Además también sintetizan otras sustancias inhibidoras, que cuando son de naturaleza proteica reciben el

nombre genérico de bacteriocinas.

La posible utilización de las bacterias lácticas o de las bacteriocinas que producen como conservadores o factores de "seguridad" en un amplio número de productos alimenticios, constituye una línea de trabajo desarrollada recientemente por algunos investigadores (Barefoot y Klaenhammer, 1984; Pucci y col, 1988; Daeschel, 1989; Bhunia y col., 1991) que han logrado purificar y, en algunos casos, caracterizar algunas bacteriocinas.

El objetivo de éste trabajo consiste en la búsqueda, identificación, purificación, y caracterización bioquímica e inmunológica parcial de sustancias antimicrobianas elaboradas por las bacterias lácticas procedentes de embutidos crudos madurados. Una vez purificadas y establecidas sus características bioquímicas se estudiará su posible utilización como factores de seguridad que incrementan la calidad higiénica y la vida útil de la carne y de los derivados cárnicos. Presumimos que, como factores de "seguridad", podrían utilizarse tanto las bacterias lácticas inhibidoras, como las sustancias antimicrobianas que producen, una vez que hayan sido purificadas.

Para lograr los objetivos propuestos se necesita desarrollar el programa de trabajo que se describe a continuación:

1º).- De los embutidos crudos madurados, que son teóricamente los sustratos cárnicos más adecuados para el desarrollo de bacterias lácticas productoras de sustancias inhibidoras, se seleccionará al azar un número de colonias microbianas cuyo potencial inhibidor del desarrollo de otros microorganismos será convenientemente evaluado.

2º).- El antagonismo bacteriano se estudiará tanto en las colonias aisladas como en el medio extracelular.

3º).- Los grupos microbianos frente a los que se evaluará el potencial inhibidor de las bacterias lácticas escogidas serán: bacterias lácticas de diversos orígenes (leche, carne, hortalizas), micrococáceas, enterococos, *Pseudomonas* sp. psicotrofas de la carne refrigerada, microorganismos de las carnes envasadas al vacío (*Brochothrix thermosphacta* y enterobacteriáceas) y microorganismos patógenos diversos como *E. coli* enteropatógeno, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens*.

4º).- Mediante técnicas microbiológicas adecuadas se identificarán el género y la especie de las bacterias lácticas con mayor poder antagonista.

5º).- Se evaluará el efecto de diversos parámetros, como composición del medio de cultivo, pH, temperatura, tiempo de crecimiento, etc, en la síntesis de las sustancias inhibidoras.

6º).- Mediante técnicas de separación de filtración en geles se intentará purificar la actividad inhibidora extracelular de la que resulte más interesante.

7º).- Se procederá a la caracterización bioquímica parcial de la sustancia inhibidora seleccionada, determinando su peso molecular y su sensibilidad al pH, al calor, y a los enzimas proteolíticos, lipolíticos y amilolíticos.

8º).- A partir de conejos se obtendrán anticuerpos policlonales frente a la bacteriocina parcialmente purificada.

9º).- Finalmente se establecerá, mediante técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), la capacidad de los anticuerpos obtenidos para caracterizar inmunológicamente dicha bacteriocina

que se comparará con las producidas por otras bacterias lácticas. También se estudiará la utilidad de los anticuerpos en la posible detección y cuantificación de la bacteriocina en medios de cultivo líquidos y en sustratos cárnicos.

CAPITULO II

REVISION BIBLIOGRAFICA

II. 1.- Utilización de agentes antimicrobianos en los alimentos: presente y futuro

Uno de los mayores problemas con los que el hombre se ha enfrentado a lo largo de su historia ha sido la necesidad de evitar, de una forma u otra, la alteración de los alimentos, incrementando su vida útil. Para solventarlo ha utilizado los materiales y técnicas a su alcance como miel, sal, especias, ahumado, desecación y otros sistemas sencillos de conservación. La mayor parte de los mismos se siguen empleando actualmente, en algunos casos sin variación tecnológica alguna y, en otros, con las modificaciones necesarias introducidas por los adelantos técnicos. A medida que crecen los conocimientos sobre los alimentos y la causa de su alteración, aumentan también las metodologías necesarias para evitar ésta última. Los métodos empleados para evitar la alteración de los alimentos e incrementar su vida útil se basan en la utilización de:

II. 1. 1.- Temperatura

La temperatura desempeña un papel muy importante en el desarrollo bacteriano y al modificarla se retrasa e incluso se elimina el desarrollo de los microorganismos patógenos y alterantes (ICMSF, 1980). Las temperaturas de refrigeración sólo retrasan el crecimiento de los microorganismos mesófilos o termófilos, permitiendo el desarrollo de los psicrófilos, entre los que se encuentran muchos alterantes de los alimentos y otros patógenos, por lo que la refrigeración no se puede considerar, por sí sola, como un método que permita asegurar unos alimentos sanos, en periodos de tiempo que superen una o, en el mejor de los casos, dos semanas.

Si la temperatura es tan baja que tiene lugar la congelación del agua, incluso se inhibe el desarrollo de los microorganismos psicrófilos, permitiendo la conservación de los alimentos durante largos periodos de tiempo (Speck y Ray, 1977). Pero la utilización de temperaturas de

congelación no implica la eliminación de los microorganismos patógenos o alterantes que pueden permanecer viables (Obafemi y Davies, 1986). Además la congelación provoca daños celulares en las bacterias aunque, con el tiempo, también ocasiona modificaciones perjudiciales en los alimentos.

El empleo de temperaturas altas permite la destrucción de la mayor parte de los microorganismos (pasterización) así como de sus formas de resistencia (esterilización), sin embargo no pueden aplicarse a todos los alimentos por que modifican su estructura y/o sus características organolépticas.

La temperatura ambiental puede emplearse como factor de seguridad si favorece el desarrollo de ciertos microorganismos que, además de modificar los caracteres organolépticos de los alimentos, mejoran su calidad microbiológica. Los procesos más representativos de la industria alimentaria que tienen lugar a temperatura ambiente son los que se basan en la fermentación láctica y/o alcohólica desarrollada por microorganismos distintos (Gibbs, 1987).

II. 1. 2.- Actividad del agua

El desarrollo de los microorganismos depende, invariablemente, de la presencia de agua libre (ICMSF, 1980). La actividad del agua (a_w) de un alimento orienta, objetivamente, de la cantidad de agua de que disponen los microorganismos para su desarrollo. La determinación de la a_w limitante del desarrollo de un microorganismo dado, es importante para pronosticar su viabilidad en un alimento concreto. La a_w disminuye al aumentar la concentración de solutos (azúcares o sales) y al eliminar el agua disponible para el desarrollo microbiano por calentamiento o liofilización.

II. 1. 3.- pH

Al igual que ocurre con la temperatura, los microorganismos poseen un pH mínimo, óptimo y máximo para su crecimiento. El pH de los alimentos es uno de los factores que determinan los microorganismos que se desarrollan en ellos, originando su alteración, una fermentación deseable o un riesgo para la salud del consumidor.

La disminución natural o artificial del pH se ha utilizado, durante cientos de años, para garantizar la estabilidad microbiológica de los alimentos. Como ejemplos de disminución natural del pH en conservación de alimentos citaremos las fermentaciones controladas de la leche, carne y hortalizas, que originan productos tan estables y seguros como el queso, yogur, embutidos y encurtidos. La acidificación artificial de los alimentos se consigue añadiéndoles ácidos orgánicos.

Los alimentos ácidos ($\text{pH} < 4,6$), aunque pueden alterarse, es muy difícil que permitan la proliferación de los microorganismos patógenos o la germinación de esporas, en cambio esto sí ocurre en los alimentos débilmente ácidos ($\text{pH} > 4,6$) cuyo pH no garantiza, por sí mismo, su estabilidad microbiológica (Tanaka y col., 1986).

II. 1. 4. - Gases y atmósferas modificadas o controladas

Durante los últimos años se ha generalizado el empleo de ciertos gases como conservadores de los alimentos. En la acción inhibidora de estos gases influyen, además de la naturaleza del gas, un gran número de factores relacionados con el alimento, el proceso tecnológico utilizado y el tipo de microorganismo implicado. Así por ejemplo, el CO_2 inhibe el desarrollo de un número variable de microorganismos, dependiendo de la concentración del gas, temperatura de almacenamiento del alimento y actividad de agua del medio. En general, se

considera que las mezclas gaseosas con un 10% de CO₂ inhiben el desarrollo del 50% de los microorganismos (Ledward y col., 1971). Este gas se emplea para inhibir el crecimiento de microorganismos en productos envasados al vacío y en atmósferas modificadas; sin embargo, la evidencia de que el CO₂ puede favorecer el crecimiento de algunos esporulados, como los del género *Clostridium*, hace necesario un estudio previo de las características del alimento en el que se va a utilizar.

Otros gases experimentados han sido; el monóxido de carbono (CO) (Davidson y col., 1983), que se ha comprobado que inhibe el desarrollo de psicotrofos, hongos y levaduras (Clark y Takacks, 1980) pero cuya toxicidad para quienes lo manipulan desaconseja su empleo, y el N₂ que inhibe el desarrollo de los mohos. El dióxido de azufre (SO₂) es efectivo frente a bacterias, hongos y levaduras (Dziezak, 1986), por formar sulfitos con los compuestos orgánicos de las soluciones acuosas que inhiben el desarrollo microbiano. Sin embargo, solamente es activa la forma iónica que se produce a pH≤4, de otro lado origina en las personas sensibles reacciones de hipersensibilidad, por lo que no es aconsejable su uso en los alimentos. El óxido de etileno también se ha empleado para reducir el número de microorganismos de los alimentos, pero su elevada toxicidad limita su utilización. El óxido de propileno, menos estudiado que el anterior, también se ha empleado para inhibir el desarrollo microbiano (Skinner y Hugo, 1976). Y, por último, citaremos el ozono, cuyo empleo se limita a la esterilización de líquidos (Torriceili, 1959).

Las atmósferas modificadas o controladas se consiguen mediante la mezcla de varios gases que se introducen en el interior del envase que protege al alimento, pudiéndose mantener constante la mezcla gaseosa inicial (atmósferas controladas) o no (atmósferas modificadas). En los alimentos envasados al vacío lo que se hace es extraer el aire del interior del alimento empaquetado. El objetivo de los métodos descritos es limitar el desarrollo de la flora alterante

de los alimentos. El problema es que con ello aumenta la posibilidad del desarrollo de anaerobios como *C. botulinum*.

II. 1. 5.- Acidos orgánicos

A los ácidos orgánicos se les considera los antimicrobianos naturales más difundidos en la naturaleza. Los más empleados en la industria alimentaria son el acético, benzoico, propiónico y sórbico. El ácido acético y sus sales ejercen su mayor acción inhibidora a pH próximo a 4,5. El ácido benzoico es más eficaz en el control de mohos y levaduras que en el de bacterias (Chichester y Tanner, 1972). Generalmente en los alimentos se emplea la sal sódica. El ácido propiónico y sus sales inhiben a los mohos, pero muy poco a bacterias y levaduras. El ácido sórbico es activo en alimentos cuyo pH está próximo a 6,0. Generalmente los sorbatos son más efectivos en las levaduras y mohos que en las bacterias (Lück, 1976).

II. 1. 6.- Sales de curado

El curado es uno de los métodos más antiguos de conservación de los alimentos; inicialmente se realizaba de forma empírica con sal común contaminada con nitro o salitre, más tarde, a la sal común se le añadía nitrato sódico; las impurezas o contaminantes del cloruro sódico, es decir el salitre, eran los responsables de la aparición de la tonalidad rosa-rojiza típica de los alimentos curados. Los nitritos, procedentes de la reducción de los nitratos, originan NO que reaccionando con la mioglobina dota a los alimentos curados de un color atractivo para el consumidor e impide el desarrollo bacteriano pero, a su vez, participa en la formación de nitrosaminas cancerígenas por lo que el empleo de nitratos y nitritos está regulado por la legislación alimentaria.

II. 1. 7.- Antibióticos

Los antibióticos, producidos por microorganismos o por síntesis química, inhiben el desarrollo de muchos microorganismos incluso a concentraciones pequeñas. Sin embargo, su presencia en los alimentos y los riesgos que ello conlleva para el consumidor, limitan su empleo. La nisina, un polipéptido producido por *Lactococcus lactis*, ha sido aceptado como aditivo para su empleo en los alimentos por la comunidad científica internacional desde 1956, y sus condiciones de empleo se encuentran reguladas por la FDA (Food and Drug Administration) (CFR, 1988).

En los últimos años se ha descrito la síntesis por las bacterias lácticas, de sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica, denominadas bacteriocinas, cuyas propiedades han permitido concebir grandes esperanzas sobre su potencialidad como conservadores de los alimentos.

II. 1. 8.- Radiaciones

Las radiaciones ionizantes se caracterizan por su gran poder de penetración y su letalidad a nivel celular (ICMSF, 1980). La aplicación práctica de las radiaciones ionizantes para destruir microorganismos en productos alimenticios se ha desarrollado en las últimas décadas. Durante los últimos 30 años, el empleo de las radiaciones ha sufrido constantes cambios. Así, mientras a principios de los 60 se permitía su empleo en algunos alimentos, un poco más tarde la administración americana las prohibió, basándose en que quizá éste método de conservación pudiera inducir la formación de compuestos potencialmente mutagénicos, cancerígenos o teratógenos. Por último, los resultados de múltiples estudios han demostrado la seguridad de éste método: de ahí que la Comisión de expertos de la FAO/WHO haya recomendado su empleo como procedimiento de conservación de los alimentos

(FAO/IAEA/WHO Expert Committee, 1977).

La utilización de las radiaciones ionizantes presenta una serie de ventajas sobre otros métodos higienizantes de conservación de los alimentos ya que, a dosis pequeñas ($< 0,5$ Mrad) no se producen cambios organolépticos apreciables en los alimentos e incluso a dosis más elevadas (> 1 Mrad), los cambios químicos son mínimos. Además, la penetración de la radiación es instantánea, homogénea y profunda, permitiendo un control exacto del proceso, lo que no ocurre en los tratamientos térmicos.

II. 1. 9.- Envasado

El envase que envuelve a los alimentos durante su almacenamiento, transporte y manipulaciones posteriores, les proporciona una protección; química, impidiendo el paso de agua, oxígeno y otros gases; física, al proteger al alimento de la luz, polvo o suciedad, de la pérdida de peso y de las alteraciones de origen mecánico y aún biológico, al prevenir la entrada de microorganismos e insectos. Los factores de los que depende el desarrollo microbiano en los alimentos envasados son, aparte de la naturaleza del alimento y del tipo de microorganismo, la permeabilidad del material del envase al O_2 , CO_2 y vapor de agua, sobre todo cuando en el envasado se utilizan el vacío o las atmósferas modificadas (Calvet, 1968).

II. 1. 10.- Interacción de factores

Ninguno de los métodos descritos pueden, aisladamente, garantizar la calidad higiénica de los alimentos, lo que lleva a emplearlos conjuntamente para conseguir una actividad aditiva o sinérgica.

II. 1. 11.- Las bacterias lácticas y su posible empleo como conservadores de los alimentos

Los mecanismos mediante los que las bacterias lácticas ejercen su acción antimicrobiana se describirán en la sección II. 4. Las bacterias lácticas reúnen una gran parte de las actividades antimicrobianas utilizadas actualmente para la conservación de los alimentos en la industria agroalimentaria; además poseen otros mecanismos que, si bien aisladamente no tienen gran importancia, conjuntamente contribuyen a mejorar la efectividad antimicrobiana .

La síntesis por las bacterias lácticas de productos metabólicos finales como el CO₂, H₂ O₂ y los ácidos orgánicos, el descenso del pH que ello conlleva y la producción de sustancias antimicrobianas como la reuterina y las bacteriocinas, hacen que, cada vez más, se profundice en el estudio de las bacterias lácticas que han sido seleccionadas por su actividad antimicrobiana, para su empleo como conservantes de los alimentos. (Friend y col., 1983; Raccach, 1981; Rubin y col., 1982)

II .2.- Bacterias lácticas: introducción histórica

Bajo el nombre genérico de "bacterias lácticas" se agrupan un número de microorganismos cuya principal característica es la producción de ácido láctico a partir de hidratos de carbono fermentables. El término "Bacterium acidi lactici" se debe a Weigmann que lo propuso en 1899, aunque las primeras referencias a este tipo de bacterias se deban a Hueppe (1884), quien describió una parte de la flora microbiana responsable de la acidificación de la leche y productos lácteos, a la que se denominó "Milchsauerbacillus".

Las bacterias lácticas se encuentran en los más variados habitats, entre los que se

incluyen la leche y productos lácteos, carne y productos cárnicos, pescado, productos vegetales, tracto gastrointestinal y urinario de personas y animales e, incluso, aguas residuales y estiercol. Esta diversidad ecológica también origina una diversidad morfológica y fisiológica de las especies de este grupo, lo que entraña una gran dificultad para establecer los rasgos de semejanza que permiten reunir a todas las especies en un grupo homogéneo desde el punto de vista taxonómico.

Orla-Jensen (1919) fué responsable de los primeros intentos de demarcación de éste grupo microbiano, y son esos mismos criterios los que constituyen, todavía en la actualidad, las bases de su clasificación:

1).- Criterios morfológicos: El grupo estaría constituido por cocos y bacilos Gram-positivos, no esporulados e inmóviles.

2).- Criterios fisiológicos: Microorganismos fermentativos con producción final de ácido láctico, catalasa-negativos, microaerófilos o anaerobios, mesófilos, y con complejos requerimientos nutritivos.

A pesar de que las características esenciales no se han alterado desde su establecimiento por Orla-Jensen, si se ha modificado la nomenclatura del grupo. Así por ejemplo, de los seis géneros establecidos inicialmente (*Betabacterium*, *Streptobacterium*, *Thermobacterium*, *Betacoccus*, *Streptococcus* y *Tetracoccus*) (Orla-Jensen, 1919), sólo se mantiene el género *Streptococcus*. Los otros 5 han sido sustituidos por los géneros *Lactobacillus* (englobaría a *Betabacterium*, *Streptobacterium* y *Thermobacterium*), *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Estos cambios en la asignación de los nombres genéricos no son más que un reflejo del dinamismo y fluidez de los criterios de clasificación, ya que, a medida que se producen avances en las metodologías analíticas y en la filosofía de su clasificación,

también se producen cambios en la denominación de géneros y especies, trasvase de especies de unos géneros a otros y aumento del número total de especies. Como mejor se aprecia esta evolución es observando las especies que se describen en las tres últimas ediciones del manual de Bergey (Tabla II. 1) (Breed y col., 1957; Buchanan y Gibsons, 1974; Kandler y Weiss, 1986).

Tabla II. 1.- Modificaciones en el número de especies de las bacterias lácticas

	<u>Nº de especies listadas en el manual de Bergey en</u> <u>las ediciones de:</u>		
	1957	1974	1986
<u>Bacilos</u>			
Gén. <i>Lactobacillus</i>	15	27	45
<u>Cocos</u>			
Gén. <i>Streptococcus</i>	19	21	29
Gén. <i>Pediococcus</i>	2	5	8
Gén. <i>Leuconostoc</i>	3	6	4
Nº total de especies	39	59	86

II. 2. 1.- Características generales

Los microorganismos de este grupo se caracterizan principalmente por ser bacterias Gram-positivas, catalasa-negativas, no esporuladas, inmóviles, anaerobias o microaerófilas, ácido-tolerantes, no reductoras del nitrito y productoras de ácido láctico como producto final de la fermentación de los hidratos de carbono.

Sin embargo la tinción de Gram es la única característica definitoria, excluyéndose del grupo todo microorganismo Gram-negativo. Las otras, ni son exclusivas de las bacterias lácticas, ni son constantes dentro del grupo. Así por ejemplo, a pesar de considerarse catalasa-negativos, se conoce desde hace tiempo las reacciones catalasa-positivas de los *Pediococcus* (Felton y col., 1953) e incluso de otros géneros, incluido el *Lactobacillus* (Whittenbury, 1964).

Las bacterias lácticas son generalmente inmóviles, aunque se han descrito un gran número de cepas móviles con flagelos peritricos, especialmente cuando proceden de medios diferentes de la leche y sus derivados; así se han descrito en la carne (Deibel y Niven, 1958), en zumos de frutas (Hays y Reister, 1952) y en diversos productos fermentados (Vankova, 1957). El carácter microaerófilo es muy variable (Whittenbury, 1963), considerándose que es la tensión de CO₂, más que la anaerobiosis, la que favorece el desarrollo de las bacterias lácticas.

La reducción de los nitratos a nitritos no se detecta en los medios que se emplean en el desarrollo de éstas bacterias (Rogosa, 1961). La concentración de glucosa (2%) de estos medios origina una elevada producción de ácido láctico y, consecuentemente, un gran descenso de pH que inhibe la reducción. La capacidad reductora sólo se aprecia empleando medios de cultivo con un 0,1-1% de glucosa (Rogosa, 1961). De esta manera se ha

visto que la mayor parte de las bacterias lácticas aisladas de carnes curadas reducen los nitratos.

La producción de ácido láctico o, más exactamente, la síntesis de este metabolito como producto final de la fermentación de los hidratos de carbono, es uno de los principales criterios para la diferenciación fisiológica de los distintos componentes del grupo. Las bacterias lácticas se dividen en tres grupos fisiológicos distintos en virtud de sus diferencias enzimáticas (Buyze y col., 1957):

1º).- Heterofermentativas obligadas: poseen los enzimas glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, pero carecen de la fructosa difosfato aldolasa, originando como productos finales de la fermentación de las hexosas CO₂ y ácido láctico. Como fuente de hidratos de carbono sólo pueden utilizar las hexosas.

2º).- Homofermentativas obligadas: poseen fructosa difosfato aldolasa, pero carecen de las dos deshidrogenasas. Al igual que las anteriores son incapaces de utilizar las pentosas como fuente de hidratos de carbono.

3º).- Homofermentativas facultativas: poseen las dos deshidrogenasas pero metabolizan la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof (glicolisis); utilizan las pentosas y se corresponden con las *Streptobacteria* de Orla-Jensen.

Los esteroisómeros (D, L, DL) del ácido láctico resultante de la utilización de los hidratos de carbono sirven como criterios de clasificación del grupo. Las especies del género *Leuconostoc* producen el isómero D(-) exclusivamente, mientras que los lactobacilos heterofermentativos producen la forma racémica (DL). Esta diferenciación bioquímica se refleja en la Tabla II. 2.

Tabla II. 2.- Diferenciación bioquímica de las bacterias lácticas

Género	Tipo de fermentación	Producto final del metabolismo	Configuración del ácido láctico
<i>Streptococcus</i>	Homofermentativa	ácido láctico	L(+)
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativa	ác. láctico	DL, L(+)
<i>Lactobacillus:</i>			
<i>Thermobacterium</i>	Homofermentativa	ác. láctico	D(-), L(+), DL
<i>Streptobacterium</i>	Homofermentativa	ác. láctico	D(-), L(+), DL
	Heterofermentativa ⁽¹⁾	ác. láctico: ácido acético (1:1)	D(-), L(+), DL
<i>Betabacterium</i>	Heterofermentativa	ác. láctico: ácido acético: CO ₂ (1:1:1)	DL
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativa	ác. láctico: ácido acético: CO ₂ (1:1:1)	D(-)

(1) Utilización de pentosas.

Fuente: Kandler, 1983.

II. 2. 2.- Taxonomia

La clasificación de las bacterias lácticas según la última edición del manual de Bergey Kandler y Weiss, 1986) se muestra en la Tabla II. 3. Los Grupos I, II y III sustituyen a las denominaciones de *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Betabacterium* establecidas por Orla-Jensen. Sin embargo, desde la publicación de ésta edición en 1986, y gracias a la flexibilidad taxonómica y modificaciones de los criterios de clasificación anteriormente citados, ya se han producido nuevos cambios en la taxonomía de este grupo.

Recientemente (Schillinger y Holzapfel, 1990), se ha propuesto la creación de un nuevo género, denominado *Carnobacterium*, integrado por especies relacionadas con los lactobacilos pero con peculiaridades diferenciadoras, como son el no poder desarrollarse en agar acetato, y hacerlo en medios con un pH alto (pH 8,5-8,9) y el sintetizar ácido oleico en lugar de ácido *cis*-vaccénico. Actualmente *Lactobacillus divergens* y *L. piscicola* se denominan, respectivamente, *Carnobacterium divergens* y *C. piscicola*, mientras *C. mobile* y *C. gallinarum* son los restantes componentes del nuevo género.

La sugerencia de separar a los estreptococos lácticos (tipo N de Lancefield) del resto de los estreptococos, creando con ellos un nuevo género denominado *Lactococcus* (Schleifer y col., 1985), cristalizó en 1986 con la validación del nuevo género por la "International Union of Microbiological Societies". En éste caso, los criterios empleados para establecer la nueva clasificación resultaron de tecnologías basadas en la hibridación de ácidos nucleicos, afinidad inmunológica, composición lipídica y características químicas de la pared bacteriana (Sandine, 1988).

Tabla II. 3.- Taxonomía de las bacterias lácticas^(a)

Género	Nº de especies
<i>Lactobacillus</i>	
Grupo I: Homofermentativos obligados	16
Grupo II: Heterofermentativos facultativos	11
Grupo III: Heterofermentativos obligados	18
<i>Streptococcus</i>	
Estreptococos piógenos	5
Estreptococos orales	9
Enterococos (tipo D de Lancefield)	4
Estreptococos lácticos (tipo N de Lancefield)	2
Estreptococos anaeróbicos	4
Otros Streptococos	5
<i>Pediococcus</i>	8
<i>Leuconostoc</i>	4
Nº total de especies	86

(a) Fuente: Kandler y Weiss, 1986; Hardie, 1986 y Garvie, 1986a, 1986b.

Estas modificaciones taxonómicas se muestran en la Tabla II-4; actualmente el grupo de las bacterias lácticas está constituido por microorganismos pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*.

Tabla II. 4.- Modificaciones recientes en la taxonomía de las bacterias lácticas

Nueva denominación	Antigua denominación
Género <i>Lactococcus</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordinae</i>	<i>Lactobacillus hordinae</i>
<i>Lactococcus</i> . <i>garviae</i>	<i>Streptococcus garviae</i>
<i>Lactococcus plantarum</i> (1)	<i>Streptococcus plantarum</i>
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Streptococcus raffinolactis</i>
Género <i>Carnobacterium</i>	
<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Lactobacillus divergens</i>
<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Lactobacillus piscicola</i>
<i>Carnobacterium mobile</i>	_____
<i>Carnobacterium gallinarum</i>	_____

(1) No confundir con *Lactobacillus plantarum*

Fuente: Sandine, 1988 y Schillinger y Holzapfel, 1990.

II. 3.- Género *Lactobacillus*

Realizar una descripción profunda de los componentes de las bacterias lácticas resultaría larga, tediosa e incluso improcedente, dado el tema central de este trabajo. Sin embargo, si es interesante conocer algunas de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas más relevantes del género *Lactobacillus*.

La última edición del "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (1986) clasifica al género *Lactobacillus* en el volumen 2, sección 14 como "bacilos Gram-positivos no esporulados". La sección comprende 7 géneros (*Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Listeria*, *Kurthia*, *Caryophanon* y *Renibacterium*) que poseen en común ser bacilos Gram-positivos, no esporulados, mesófilos, y que requieren medios complejos para su crecimiento.

II. 3. 1.- Morfología

La morfología de los lactobacilos es variable, desde bacilos largos, rectos o ligeramente curvados, hasta cocobacilos. Su longitud y curvatura depende de la edad del cultivo, la composición del medio y la tensión de oxígeno. Como ejemplo de variabilidad en su morfología podría citarse a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que en medios de cultivo líquidos o en agar MRS crece en formaciones espirales debido a que las células permanecen unidas después de la división, mientras que en la leche origina cadenas largas y filamentosas.

Según Bottazzi (1988), los distintos lactobacilos podrían distinguirse por sus diferencias morfológicas. Así por ejemplo, los lactobacilos mesófilos son bacilos cortos, gruesos, regulares y unidos, formando filamentos (*Streptobacteria*). Las especies termófilas

son bacilos largos y rectos, de células separadas, en parejas o en empalizada. En las especies heterofermentativas obligadas, la morfología típica es la de bacilos cortos, rectos y separados. Algunas especies de lactobacilos productores de gas (*L. fermentum* o *L. brevis*) pueden presentar una morfología mezcla de bacilos largos y cortos, en el mismo cultivo e, incluso, en una misma colonia (Kandler y Weiss, 1986).

Los cocobacilos pueden ser tan extremadamente cortos que pueden llegar a confundirse con los *Leuconostoc* o estreptococos. De otra parte, algunos estreptococos ligeramente alargados se han confundido durante mucho tiempo con lactobacilos (Garvie y col., 1981). La división celular de los lactobacilos tiene lugar en un solo plano, mientras que la tendencia a formar cadenas varía entre las distintas especies e, incluso, entre las distintas cepas, dependiendo de la fase de desarrollo y del pH (Rhee y Pack, 1980).

II. 3. 1. 1.- Motilidad

El género *Lactobacillus* comprende bacterias inmóviles, aunque algunas especies se ha visto que son móviles por poseer flagelos peritricos. En cualquier caso su motilidad depende del medio y de la edad del cultivo, y sólo se observa en el momento del aislamiento, perdiéndose al resembrarlas en diversos medios de cultivo.

II. 3. 1. 2.- Tinción

Quizá la característica común de éste género (al igual que en las bacterias lácticas en general) sea la reacción positiva a la tinción de Gram. Sólo las bacterias de cultivos viejos y las deterioradas muestran resultados variables. Si se emplea la tinción de Gram o la del Azul de Metileno pueden observarse granulaciones internas, sobre todo cuando se trata de lactobacilos homofermentativos que forman bacilos largos. Observados con microscopía electrónica

En los medios de cultivo líquidos las bacterias sedimentan rápidamente cuando cesa su desarrollo. El sedimento es liso y homogéneo, siendo muy rara la presencia de precipitados granulares o mucilaginosos. Los lactobacilos no forman películas superficiales ni originan olores específicos durante su crecimiento en los medios de cultivo ordinarios, a pesar de contribuir al desarrollo del aroma de los alimentos fermentados. Este aroma es consecuencia de la producción de compuestos volátiles, como diacetilo y derivados, H_2S y aminas, que se liberan al medio durante el desarrollo microbiano (Sharpe y Franklin, 1962).

II. 3. 4.- Necesidades nutritivas

El género *Lactobacillus*, al igual que el resto de las bacterias lácticas, tiene unas necesidades nutritivas muy complejas ya que necesitan como fuente de energía y de carbono, además de hidratos de carbono, nucleótidos, aminoácidos y vitaminas. Todas las especies del género, (salvo algunas cepas) requieren ácido pantoténico y nicotínico, mientras que la tiamina sólo es necesaria para el desarrollo de los lactobacilos heterofermentativos. Las necesidades de vitaminas son variables dependiendo de la especie, pero la mayoría necesita riboflavina y, muy pocas, biotina o vitamina B₂.

A pesar de necesitar medios muy complejos para su desarrollo, la mayor parte de los componentes del género (sino todos) tienen en su genoma la información necesaria para sintetizar todos los nutrientes citados. Además, se ha visto que los mutantes de *L. casei* sintetizan determinados aminoácidos en medios carentes de los mismos (aunque crecen mucho más lentamente), dicha capacidad la pierden cuando crecen en medios más complejos, lo que acelera su velocidad de crecimiento (Morishita y col., 1974). Estos complejos requerimientos nutritivos de los lactobacilos actuales reflejan la selección natural de mutantes deficientes en determinados rutas biosintéticas, lo que les permite crecer más rápidamente que las cepas

originarias en medios de cultivo con muchos nutrientes

II. 3. 4. 1.- Medios de cultivo

Los medios empleados para el crecimiento de los lactobacilos cubren sus necesidades nutritivas y están constituidos por hidratos de carbono fermentables, extractos de carne y extracto de levadura. Además, la mayor parte de las especies necesitan otros compuestos específicos que favorezcan su crecimiento; en algunos casos son esenciales para el desarrollo, tal como ocurre con el jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico (especialmente Tween 80). Los compuestos citados, excepto el jugo de tomate, forman parte del medio de cultivo MRS (De Man y col., 1960) que es, sin duda, el más utilizado para el crecimiento de los lactobacilos.

Por otra parte, algunos lactobacilos adaptados a sustratos muy particulares necesitan factores de crecimiento especiales. Algunas especies aisladas del vino de arroz, necesitan ácido D-mevalónico, mientras que *L. sanfranciscus* necesita un péptido de bajo peso molecular aislado del extracto de levadura (Berg y col., 1981).

El pH del medio también influye en el crecimiento que es mayor en medios ligeramente ácidos, cuyo pH inicial varía de 6,4 a 4,5. El crecimiento se detiene cuando se alcanza un pH de 4,0 a 3,6 dependiendo de la especie y cepa. La aireación también es importante ya que, aunque la mayor parte de las cepas se desarrollan en condiciones normales de aerobiosis, el crecimiento será óptimo bajo condiciones de anaerobiosis o microaerofilia. Pero, más que la anaerobiosis, lo que influye en el crecimiento es la tensión de CO₂ (más incluso que la tensión de O₂), considerándose óptima la presencia de un 5-10% de CO₂ (Kandler y Weiss, 1986).

La temperatura de incubación óptima, que fué uno de los criterios iniciales de clasificación de las bacterias lácticas (Orla-Jensen, 1919), también varía con la especie. La mayor parte de las especies (mesófilas) tienen una temperatura óptima de crecimiento de 25-30 °C, con un límite superior de 40 °C. Algunas crecen a temperaturas menores de 15 °C y, muy raramente, a menos de 5 °C siendo el límite inferior los 4 °C, temperatura a la que crecen algunas estreptobacterias atípicas de indudable interés bromatológico (Schillinger y Lücke, 1987a).

II. 3. 5.- Metabolismo

Desde el punto de vista metabólico se considera que los lactobacilos se encuentran en el límite entre el metabolismo anaeróbico y aeróbico. No poseen quinonas isoprenoides (excepto *L. yamamashiensis* y *L. casei* subsp. *ramnosus*) (Collins y Jones, 1981), ni sistemas de citocromos con los que realizar la fosforilación oxidativa típica del metabolismo aeróbico. Sin embargo, poseen oxidasas y peroxidasas que oxidan el NADH₂ utilizando al O₂ como aceptor final de electrones. A pesar de no tener catalasas ni peróxido-dismutasas también metabolizan los peróxidos mediante un sistema enzimático catalizado por el Mg⁺⁺ (Götz y col., 1980).

los lactobacilos son de metabolismo esencialmente fermentativo; degradan las hexosas utilizando dos vías enzimáticas (fig. 2.1):

1º).- Via de Embden-Meyerhof (glucolisis), por la que convierten un mol de hexosa en dos moles de ácido láctico (fermentación homoláctica).

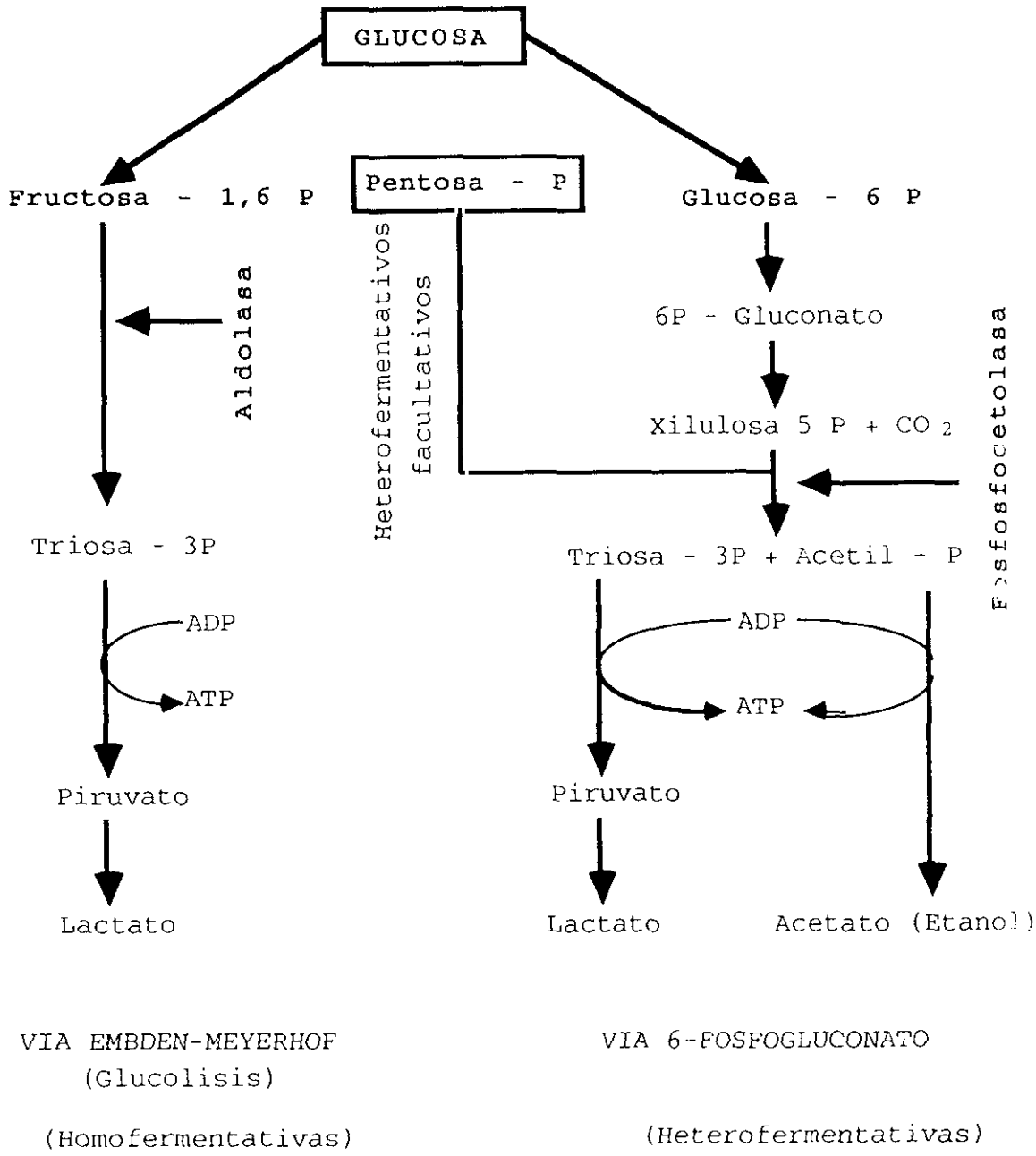


Figura 2. 1.- Representación esquemática de las rutas metabólicas del género *Lactobacillus*.
(Adaptado de Kandler, 1983).

2º).- Vía del 6-fosfogluconato, por la que producen un mol de CO₂, un mol de etanol (o de ácido acético) y un mol de ácido láctico (fermentación heteroláctica). En condiciones de aerobiosis, la mayor parte de las cepas utilizan al O₂ como aceptor final de electrones, mientras no reducen el Acetil-CoA (Kandler, 1983).

El ácido pirúvico es un metabolito intermediario de las dos rutas metabólicas fermentativas, siendo la cantidad de hexosa del medio la que regula el tipo de fermentación, de forma que si escasea éste azúcar, la fermentación homoláctica se convierte en heteroláctica con, producción final de ácidos acético, fórmico y de etanol (Thomas y col., 1979). El ácido láctico formado, puede oxidarse originando ácido acético y fórmico mediante mecanismos no bien conocidos (Kandler, 1983).

La diferencia entre lactobacilos homo y heterofermentativos se encuentra en la presencia o ausencia de los enzimas difosfofructo-aldolasa y fosfocetolasa. Así, mientras los lactobacilos heterofermentativos obligados sintetizan fosfocetolasa pero no aldolasa, los homofermentativos sintetizan aldolasa pero no fosfocetolasa.

Los lactobacilos heterofermentativos hidrolizan las pentosas gracias al enzima fosfocetolasa, originando cantidades equimolares de los ácidos acético y láctico. Sin embargo, algunos lactobacilos homofermentativos (*Streptobacterium* de Orla-Jensen) poseen un aldolasa y un fosfocetolasa que se activan únicamente en presencia de pentosas, de manera que hidrolizan las hexosas siguiendo la vía Embden-Meyerhoff, originando ácido láctico, mientras que las pentosas por la vía del 6-fosfogluconato dan lugar a cantidades equimolares de ácidos láctico y acético, pero no originan CO₂, convirtiéndose así en los denominados heterofermentativos facultativos (Kandler, 1983).

El ácido láctico procedente de la fermentación de los hidratos de carbono, posee una configuración D- o L- dependiendo de la estereoespecificidad del lactato deshidrogenasa celular. En presencia de D- y L-lactato deshidrogenasas, el ácido láctico se produce en su forma racémica (DL). Lo mismo que ocurre cuando coexisten L-lactato deshidrogenasa y lactato racemasa inducible. Esta última circunstancia es la que se produce en *L. casei*, *L. curvatus* y *L. sake* (De Vries y col., 1970). La mayor parte de los enzimas no son alostéricos, pero algunas especies (*L. casei*, *L. curvatus*, *L. sake* y *L. bavaricus*), poseen L-lactato deshidrogenasas alostéricos cuyos activadores son la fructosa difosfato y el Mn^{++} (Hensel y col., 1977).

Los lactobacilos también emplean los hidratos de carbono con otros fines además de la obtención de energía. La sacarosa se utiliza en la síntesis de mucopolisacáridos y la fructosa puede utilizarse como aceptor de electrones dando lugar a la formación de manitol. La mayoría de los monosacáridos y oligosacáridos que utilizan las células como fuente de energía proceden del medio extracelular, penetrando en su interior con ayuda de permeasas específicos, no obstante, en algunas especies la lactosa y la galactosa se transportan mediante un sistema enzimático fosfoenol piruvato fosfotransferasa (PEP-PTS) (Chassy y Thompson, 1983). También se conocen otros sistemas de transporte activo de aminos y aminoácidos (Law y Kolstad, 1983).

II. 3. 6.- Consideraciones taxonómicas; Clasificación

Para la clasificación de las distintas especies del género *Lactobacillus* se han considerado numerosos parámetros, entre los que se encuentran la determinación de los tipos de peptidoglicano de la pared celular (Willians, 1975), la fermentación de los azúcares y la temperatura de crecimiento (Schillinger y Lücke, 1987b), la movilidad electroforética de diversos enzimas (London, 1976), el análisis inmunológico de las lactato deshidrogenasas

homólogas (London, 1976), el grupo antigénico (Sharpe, 1970), la determinación de los isómeros de ácido láctico y, por último, la de hibridación del DNA, que es la más empleada en la actualidad para determinar la proximidad filogenética entre dos especies (Simonds y col., 1971).

El primer intento de clasificación de los lactobacilos lo realizó Orla-Jensen (1919), quién los dividió en tres géneros distintos según las temperaturas óptimas de crecimiento y los productos finales de su metabolismo fermentativo. Estos tres géneros, ("*Thermobacterium*", "*Streptobacterium*" y "*Betabacterium*"), ya no aparecen como tales en la última edición del "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" (Kandler y Weiss., 1986) al considerarse que la división de Orla-Jensen no origina grupos homogéneos desde el punto de vista filogenético.

Así, y a pesar de que la mayoría de las especies de cada uno de los grupos actuales (denominados I, II y III) coincide con las características de las "termobacterias", "estreptobacterias" y "betabacterias" respectivamente, algunas de las especies descubiertas recientemente no cumplen dichas características. La clasificación en tres grupos se realiza en virtud de su metabolismo fermentativo.

II. 3. 6. 1.- Grupo I.- Homofermentativos obligados

Este grupo se encuentra formado por dos subgrupos de especies relacionadas entre sí: en el primero se encuentran *L. delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* y *L. leichmannii*, mientras en el segundo aparecen *L. acidophilus*, *L. gasseri* y *L. crispatus*. Dicho grupo comprende la mayor parte de las termobacterias de Orla-Jensen.

II. 3. 6. 2.- Grupo II.- Heterofermentativos facultativos

El grupo lo integran tres subgrupos: Uno primero, representado mayoritariamente por *L. plantarum*, un segundo con distintas subespecies de *L. casei* y un tercero que comprende a *L. sake*, *L. curvatus* y *L. bavaricus*. Los dos primeros subgrupos de esta división se corresponderían con las antiguas "estreptobacterias", mientras el tercero comprendería las denominadas "estreptobacterias atípicas" (Thornley y Sharpe, 1959).

II. 3. 6. 2. 1.- Estreptobacterias atípicas

Las dos primeras especies de éste grupo, *L. sake* y *L. curvatus*, muestran un alto porcentaje de homología según las técnicas de hibridación del DNA. Además, las dos poseen una racemasa inducible por ácido láctico, que convierte el ácido L(+)-láctico en ácido láctico racémico (Kandler y Weiss, 1986). Esta circunstancia, y otras características fenotípicas diferencian éstas dos especies del tercer componente del grupo, *L. bavaricus*. La diferenciación entre *L. sake* y *L. curvatus* se fundamenta en su capacidad de utilizar diversos azúcares (Schillinger y Lücke, 1987b). Este subgrupo también se considera como los "lactobacilos psicrotófos verdaderos" (Reuter, 1981), al ser los que se desarrollan a temperatura más baja de todos los lactobacilos (2-4 °C). Otra característica que las diferencia de las estrepto- bacterias típicas es su aspecto cocoide cuando se siembran en medios sólidos (Reuter, 1981).

II. 3. 6. 2. 1. 1.- *Lactobacillus sake*

Lactobacillus sake recibe esta denominación (Katagiri y col., 1934) por haberse aislado por primera vez de este producto japonés, siendo sus principales características (Champomier y col., 1987) las de poseer una morfología cocobacilar ligeramente curvada y regular, sobre todo en la fase estacionaria, con un tamaño de 0,8-1 µm de ancho por 2-3 µm

de largo y por desarrollarse aislado o en cadenas cortas. Heterofermentativo facultativo, produce los isómeros D- y L- del ácido láctico, se desarrolla a 2-4 °C y 15 °C, pero no a 45 °C, crece a pH 3,9 y en medios con un 8% de NaCl, pero no cuando tienen un 10% de NaCl y utiliza los siguientes hidratos de carbono: D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, N-acetilglucosamina, D-melibiosa, D-trealosa, sacarosa y gluconato, pero no estos otros: dulcitol, inulina, D-melicitosa, D-rafinosa, glucógeno, D-tagatosa, L-fucosa, D-arabitol, D-arabinosa, D-xilosa, L-sorbosa, ramnosa, D-manitol y sorbitol. *L. sake* también se ha aislado de ensilados, carne, embutidos crudos madurados (Schillinger y Lücke, 1987b, 1989) y de productos cárnicos envasados al vacío.

II. 2. 6. 3.- Grupo III.- Heterofermentativos obligados

Este grupo lo forman casi integramente las "betabacterias" de Orla-Jensen, a las que se han unido otras especies de reciente descubrimiento y comprende 18 especies entre las que destacan: *L. bifementans*, *L. viridescens*, *L. sanfranciscus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. confusus*, *L. brevis*, *L. halotolerans*, *L. kefir* y *L. fructivorans*.. En la última edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandler y Weiss, 1986) también se incluye en este grupo a *L. divergens*, aunque actualmente se admite que esta especie pertenece al género *Carnobacterium*.

II. 3. 7.- Ecología, habitats y biotecnología

El género *Lactobacillus*, como el resto de las bacterias lácticas, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza debido a que es capaz de desarrollarse en las condiciones ambientales mas diversas, siempre y cuando existan en el medio los complejos nutrientes que necesita (hidratos de carbono, péptidos y aminoácidos, ácidos nucleicos y vitaminas). El desarrollo en anaerobiosis y entre un amplio intervalo de temperaturas (2-45

°C), así como su tolerancia a una tensión de O_2 baja, permite detectarlos en los más variados habitats, como en los ensilados y productos fermentados vegetales, zumos de frutas, cerveza, vino (Whitting, 1975; Sharpe, 1981; Kandler, 1984), queso (Botazzi y col., 1973), yogur (Davis, 1975) y otras leches fermentadas (Kandler y Kunath, 1983), productos cárnicos refrigerados (Reuter, 1975), embutidos crudos curados y productos cárnicos envasados al vacío (Holzapfel y Gerber, 1983). También se han aislados de pescados (Cone, 1982) del tracto gastrointestinal y urinario de personas y animales (Sharpe y col., 1973; Sharpe, 1981; Dent y Willians, 1982), así como del estiércol y de las aguas residuales (Okada y col., 1979; Weiss y col., 1981).

El efecto beneficioso de éstos microorganismos al impedir de diversas maneras el desarrollo de otros microorganismos patógenos alterantes, así como los cambios organolépticos y nutritivos favorables que originan al multiplicarse en diversos sustratos, hacen que algunas especies del género *Lactobacillus* se hayan utilizado desde hace tiempo en la elaboración de alimentos fermentados (yogur, kefir, leches acidificadas, embutidos crudos curados) y ensilados. Son microorganismos tecnológicos indispensables y seguirán siéndolo en la futura tecnología de los alimentos y, sin duda, aumentará su interés en salud humana y animal.

II. 4.- Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas

La actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas se conoce desde hace tiempo, si bien de una forma empírica. Hasta hace muy poco tiempo no se inició el estudio científico del mecanismo, o los mecanismos mediante los que las bacterias lácticas manifiestan su actividad antimicrobiana.

Actualmente se piensa que el primer mecanismo antimicrobiano ejercido por las

bacterias lácticas podría ser el de la simple competencia por los nutrientes, como consecuencia de las distintas velocidades de crecimiento de los microorganismos, es muy posible que una determinada especie bacteriana de crecimiento rápido agote los nutrientes críticos presentes en el sustrato, perjudicando la existencia de otros microorganismos. Este sistema no es exclusivo de las bacterias lácticas, aunque si los son los que a continuación se detallan.

II. 4. 1.- Actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos

Como consecuencia de su metabolismo fermentativo, las bacterias lácticas sintetizan ácidos orgánicos, lo que se acompaña de una notable caída del pH del medio.

La acción antimicrobiana de los ácidos orgánicos puede deberse a tres factores (Beuchat y Golden, 1989):

1º).- Al efecto antagonista de la caída del pH, que inhibe el desarrollo de otros microorganismos ácido-sensibles.

2º).- A la actividad antagonista de la forma no disociada del ácido que penetra en el interior de las células e inhibe algunas reacciones enzimáticas metabólicamente importantes.

3º).- A la acción específica de los ácidos orgánicos, ya que los de más de 4 átomos de carbono aumentan su actividad antimicrobiana a medida que lo hace la longitud de la cadena. No obstante, la escasa liposolubilidad de los ácidos de más de 8 átomos de carbono, disminuye su actividad en las bacterias Gram-negativas (Baird Parker, 1980).

Los ácidos orgánicos de cadena corta, como el láctico y acético, son lipofílicos cuando no están disociados, por lo que pueden penetrar al interior de los microorganismos

disminuyendo el pH intracelular, alterando sustratos enzimáticos e inhibiendo funciones metabólicas esenciales como la fosforilación oxidativa (Baird Parker, 1980). El que el ácido acético sea más inhibidor en mohos y levaduras (Baird Parker, 1980) que el láctico podría deberse a que a pH 4,0-4,6 (el natural del entorno donde se desarrollan las bacterias lácticas) este ácido está entre 2 y 4 veces menos disociado que el láctico (Lindgren y Dobrogosz, 1990). Los ácidos acético y láctico pueden actuar sinérgicamente inhibiendo el crecimiento de salmonelas (Rubin, 1978) y levaduras (Moon, 1983) ya que el bajo pH que proporciona el ácido láctico aumenta la concentración del ácido acético no disociado. Otros ácidos producidos por las bacterias lácticas en diversos sustratos, como fórmico, cítrico y málico, tienen una actividad antimicrobiana menor que los citados.

II. 4. 2.- Actividad antimicrobiana de componentes inorgánicos

Las bacterias lácticas también producen otros compuestos antimicrobianos como CO_2 , H_2O_2 y el diacetilo.

II. 4. 2. 1.- Dióxido de carbono

El CO_2 producido como consecuencia del metabolismo heterofermentativo obligado ejerce su acción antibacteriana creando un ambiente anaeróbico al reemplazar el O_2 , impidiendo así el desarrollo de los microorganismos aeróbios obligados, o bien mediante una actividad inhibidora intrínseca y variable según el microorganismo de que se trate (Clark y Takacs, 1980).

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo íntimo por el que el CO_2 ejerce su acción antimicrobiana, quizá se deba al efecto de dicho compuesto en la inhibición de

descarboxilaciones enzimáticas (King y Nagel, 1975) o por acúmulo del CO_2 en la bicapa lipídica de la membrana celular, alterando su permeabilidad (Eklund, 1984).

II. 4. 2. 2.- Peróxido de hidrógeno

Algunas bacterias lácticas sintetizan H_2O_2 en presencia de oxígeno gracias a la actividad de determinadas flavoprotein-oxidasas o NADH-peroxidasas. Este H_2O_2 se acumula en el medio exocelular ya que las bacterias lácticas carecen, de actividad catalasa (Kandler y Weiss, 1986). La producción de H_2O_2 por las bacterias lácticas depende de la cepa y de la cantidad de oxígeno presente (Collins y Aramaki, 1980). Dahiya y Speck (1968) y Price y Lee (1970), demostraron el efecto inhibidor del H_2O_2 , producido por las bacterias lácticas, en diversas cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* spp. El efecto bactericida del H_2O_2 se atribuye a su potente acción oxidante en la célula bacteriana (Fooster y col., 1957) y a la destrucción de estructuras moleculares básicas de las proteínas celulares (Sykes, 1965).

Asimismo, algunas bacterias lácticas presentes en la leche, activan el sistema antibacteriano de la lactoperoxidasa (Björck, 1985), debido a la síntesis en aerobiosis de H_2O_2 (Carlsson y col., 1983). La actividad antimicrobiana del H_2O_2 es variable, no afectando prácticamente a las bacterias Gram-positivas entre las que se incluyen las bacterias lácticas, mientras que las Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Pseudomonas* spp. son muy sensibles a su actividad (Björck, 1985). Se cree que el efecto antimicrobiano del sistema lactoperoxidasa se debe a la oxidación de los grupos -SH de algunos enzimas metabólicos vitales, como la hexoquinasa, aldolasa y gliceraldehído-3P deshidrogenasa (Björck, 1985).

II. 4. 2. 3.- Diacetilo

Algunas especies de bacterias lácticas producen, a partir del citrato, diacetilo (2,3-butanodiona) (Jay,1982), siguiendo la vía del piruvato que es el metabolito intermediario (Kandler, 1983). A pesar de que el metabolismo de las hexosas inhibe la producción de diacetilo, éste se acumula en el medio y, además de generar el aroma que caracteriza a ciertos productos como la mantequilla, ejerce una actividad inhibidora sobre un gran número de microorganismos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos (Jay, 1982). Esta actividad se favorece cuando el pH del medio es bajo (Jay, 1982). El diacetilo inhibe el desarrollo de los microorganismos Gram-negativos al interaccionar con el metabolismo de la arginina, impidiendo la utilización de éste aminoácido (Jay. 1986).

II. 4. 2. 4.- Reuterina

Lactobacillus reuterii es el único lactobacilo y quizás la única bacteria, que produce reuterina y la libera en el medio exocelular como consecuencia del metabolismo anaeróbico del glicerol.

La reuterina (Axelsson y col., 1989), es una sustancia antimicrobiana activa frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, levaduras, hongos y protozoos. Químicamente es una mezcla homogénea de monómeros, monómeros hidratados y dímeros cíclicos del aldehído 3-hidroxipropiónico (Talaricco y Dobrogosz, 1990) que proceden del glicerol mediante una reacción catalizada por una coenzima glicerol-deshidratasa dependiente de la vitamina B₁₂ (Talaricco y Dobrogosz, 1990; Talaricco y col., 1990). De ésta forma *L. reuterii* es la única bacteria conocida capaz de utilizar el glicerol como aceptor alternativo de hidrógeno durante la fermentación de los hidratos de carbono, produciendo mayor cantidad de aldehído 3-hidroxipropiónico del que es capaz de reducir, por lo que éste se libera en el medio

extracelular donde manifiesta su actividad antimicrobiana. Entre los microorganismos sensibles a esta sustancia se encuentran *Salmonella* sp., *Shigella* sp., clostridios, estafilococos, listerias, candidas y tripanosomas.

II. 4. 3.- Efecto antimicrobiano de las bacteriocinas y sustancias afines

La primera noticia sobre la producción por las bacterias lácticas de sustancias antagonistas, distintas de los productos finales del metabolismo microbiano, se atribuye a Rogers (1928), quien describió la actividad antimicrobiana de *Streptococcus lactis* (actualmente *Lactococcus lactis*) sobre *L. acidophilus*. Desde entonces se han identificado un cierto número de sustancias proteicas, con actividad antimicrobiana sobre otros microorganismos. Este grupo está constituido por una serie de sustancias de composición química, mecanismo de acción y espectro antimicrobiano variable.

Por la importancia que tiene este grupo de sustancias, al que pertenece el agente antimicrobiano aislado y caracterizado parcialmente en este trabajo, seáenos permitido describir y revisar con cierto detalle sus aspectos más sobresalientes.

II. 5.- Bacteriocinas: Definición

Las bacteriocinas se definen como proteínas o complejos de naturaleza proteica con acción bactericida en microorganismos filogenéticamente muy próximos a la bacteria productora (Tagg y col., 1976). Este grupo heterogéneo de sustancias, generados tanto por microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos, varía mucho en propiedades bioquímicas, espectro antimicrobiano y mecanismo de acción.

II. 5. 1.- Detección de bacterias productoras de bacteriocinas

La detección de bacterias con actividad antimicrobiana, atribuible a las bacteriocinas, se realiza en dos fases o etapas: 1).- detección de la cepa productora de la actividad antagonista, y 2).- diferenciación de la actividad antimicrobiana debida a las bacteriocinas de otras posibles causas de inhibición.

II. 5. 1. 1.- Detección de las cepas productoras

Sí lo que se pretende es detectar la posible actividad antimicrobiana de un gran número de bacterias lácticas aisladas de diversos sustratos alimentarios, el método de elección consiste en utilizar la denominada "prueba general de antagonismo", que se realiza en un medio de cultivo sólido en el que se observan fácilmente los halos resultantes de la inhibición del desarrollo de un microorganismo indicador producida al crecer en la misma placa cada una de las bacterias lácticas aisladas. Los métodos experimentales más utilizados son el "antagonismo directo" y el "antagonismo diferido" (Tagg y col.,1976). En cualquier caso, se basan en la siembra de colonias aisladas de la cepa problema en un medio sólido apropiado, sobre el que se deposita una capa de medio sólido o semisólido que lleva el microorganismo indicador.

II. 5. 1. 2.- Prueba del antagonismo directo

La prueba más sencilla y utilizada se basa en el método desarrollado por Gratia (1946). En este caso, la cepa problema y el cultivo indicador se desarrollan simultáneamente y la visualización de la actividad antimicrobiana sólo es posible si se produce durante las primeras fases de crecimiento de la cepa problema (Tagg y col.,1976). También es importante la densidad del cultivo indicador utilizado (Kuttner, 1966). El cultivo indicador se deposita en las placas inmediatamente después de inoculadas con la cepa problema.

Una variante de éste método consiste en cortar pocillos en las placas de medio sólido y rellenarlos con una gota del mismo medio conteniendo la cepa problema. Una vez solidificado el agar del pocillo se siembra sobre la placa el microorganismo indicador (Tagg y col., 1976).

Pero quizás el método de elección sea el empleado por De Klerk (1967). En esta variante la cepa problema se siembra en profundidad, con un asa de platino o un palillo, en el medio de cultivo sólido y después se inocula su superficie con el microorganismo indicador.

II. 5. 1. 3.- Prueba del antagonismo diferido

En esta prueba la bacteria problema se siembra y desarrolla en placas de medio sólido, durante un periodo de tiempo dado, inactivándola a continuación por exposición al calor o al cloroformo. Más tarde, el cultivo indicador mezclado con agar semisólido, se siembra en las placas inactivadas como queda dicho (Fredericq, 1948; Barefoot y Klaenhammer, 1984). Este sistema tiene la ventaja de permitir el crecimiento de la bacteria problema y del indicador en condiciones óptimas de temperatura ya que la incubación no es simultánea. No obstante, puede ocurrir que el cultivo indicador sea sensible a los métodos que inactivan el cultivo problema (Tagg y col., 1976).

II. 5. 2.- La acción de las bacteriocinas y su diferenciación de otras posibles causas de inhibición

Los métodos antes descritos no garantizan que la actividad antimicrobiana del microorganismo estudiado se deba a las bacteriocinas, en consecuencia debe evaluarse la actividad antimicrobiana de los microorganismos de interés utilizando ensayos experimentales complementarios. En estos ensayos se trata de eliminar la presencia en el medio de cultivo de

otros microorganismos o productos metabólicos con actividad antimicrobiana. Consecuentemente, la bacteria problema que interesa se siembra en un medio líquido que se cultiva en condiciones óptimas para la producción máxima de actividad antimicrobiana. Tales condiciones se determinarán experimentalmente ya que no tienen porqué coincidir con las óptimas de crecimiento (Tagg y col., 1976), a continuación se esteriliza el medio de cultivo por filtración para eliminar la posible presencia de bacteriófagos (Tagg y col., 1976), que podrían ser los responsables de los halos de inhibición observados al cultivar las bacterias problema con el microorganismo indicador.

La actividad antagonista del H_2O_2 que pudiera producir la cepa de interés se elimina incubando el microorganismo en anaerobiosis estricta (Schillinger y Lücke, 1989), o también añadiendo al medio de cultivo catalasa (Su, 1949) o peroxidasa (Holmberg y Hallander, 1973), antes de determinar su actividad antimicrobiana frente al microorganismo indicador.

Finalmente, la acidez del medio de cultivo se neutraliza tratándolo con una solución básica fuerte (Tramer, 1966).

De esta manera, una vez eliminadas otras causas de inhibición distintas de las bacteriocinas, se evalúa la actividad antimicrobiana de los medios de cultivo libres de células. Esto se realiza de tres formas:

1).- Depositando una gota del medio líquido problema neutralizado, en una placa de Petri con agar semisólido en la que se desarrolla el microorganismo indicador (Daeschel y Klaenhammer, 1985).

2).- Practicados unos pocillos en placas de medio sólido, se recubre su superficie con agar y se deposita una gota del medio líquido problema previamente neutralizado, se deja

transcurrir un tiempo suficiente para que difunda y, finalmente, se rellenan los pocillos con agar y se deposita en ellos el microorganismo indicador (Daeschel y col., 1990; Ahn y Stiles, 1990a); también se puede separar el agar de la placa de Petri que lo contiene y, después de invertido, se siembra el microorganismo indicador en la otra cara de la capa de agar (Tagg y McGiven, 1971; Schillinger y Lücke, 1989).

3).- Saturando un disco de papel de filtro con una cantidad suficiente del medio líquido neutralizado. Una vez seco el disco, se coloca sobre el microorganismo indicador sembrado en agar semisólido (Bhunja y col., 1987; Bhunja y col., 1988).

II. 5. 3.- Producción óptima de bacteriocinas

Tanto la composición de los medios de cultivo, como las condiciones de desarrollo necesarias para una producción óptima de bacteriocinas varían de unas bacterias productoras a otras (Tagg y col., 1976). Así por ejemplo, algunas bacteriocinas sólo se producen cuando el microorganismo se cultiva en medios sólidos o semisólidos (Geis y col., 1983), mientras que otras bacterias productoras necesitan suplementos específicos como extracto de levadura (Nielsen y col., 1990) o glucosa (Bhunja y col., 1987). Los medios semisintéticos, de composición más sencilla, se emplean para favorecer las labores de purificación de las bacteriocinas (Bhunja y col., 1987). La temperatura, el tiempo de incubación el cultivo con agitación o estacionario también influyen en la producción de bacteriocinas (Biswas y col., 1991).

II. 5. 4.- Purificación

En la caracterización bioquímica parcial de las bacteriocinas se necesita su purificación previa a partir del medio de cultivo libre de células en el que se encuentra la sustancia

inhibidora. Con esta purificación se pretende separar la sustancia activa del resto de componentes del medio de cultivo y de las células que en él crecieron. Debido a la heterogeneidad de estas sustancias es muy difícil establecer un protocolo modelo de purificación, cada tipo de bacteriocina requiere una técnica específica que debe determinarse empíricamente, al igual que las condiciones de cultivo, (Tagg y col., 1976).

En general, el primer paso de la purificación de las bacteriocinas consiste en concentrarlas en el medio de cultivo neutralizado mediante precipitación con sales, ácidos o etanol, diálisis o liofilización. Una vez obtenido el concentrado, se procede a la separación de los distintos compuestos por su tamaño molecular (cromatografía de filtración, ultrafiltración, centrifugación, etc.) o por su distinto potencial eléctrico (cromatografía de intercambio iónico, electroforesis, etc.).

El único punto en el que coinciden todos los métodos de purificación es en la pérdida de actividad, a veces masiva, durante la purificación de las bacteriocinas (Tagg y col., 1976). Por eso es importante determinar, en cada paso del proceso de purificación, la cantidad de proteína y su actividad específica (actividad inhibidora/mg de proteína) a fin de evitar aquellos pasos que impliquen una gran pérdida de actividad (Tagg y col., 1976).

II. 5. 5.- Propiedades de las bacteriocinas de las bacterias lácticas

II. 5. 5. 1.- Composición química

Las bacteriocinas son, según la definición de Tagg y col. (1976), sustancias antagonistas de naturaleza proteica. Por tanto, la inhibición o desaparición de la actividad antagonista mediante la utilización de enzimas proteolíticos es definitiva para catalogar a una sustancia inhibidora como bacteriocina. No obstante, aunque las bacteriocinas suelen ser

moléculas sencillas (agregadas o no), algunas presentan en su composición al menos durante los estadios previos a su purificación, además de proteína, componentes lipídicos y/o hidrocarbonados (De Klerck y Smith, 1967; Upreti y Hinsdill, 1973).

II. 5. 5. 2.- Propiedades físicas

El peso molecular de estas sustancias varía desde los 2.700 daltons de la pediocina AcH (Bhunja y col., 1988), hasta los 37.000 daltons de la helveticina J que puede llegar a formar agregados de hasta 300.000 daltons; agregados de éste tamaño sólo se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) (Joerger y Klaenhammer, 1986). El peso molecular suele determinarse por cromatografía de filtración en geles empleando agentes disociantes para evitar la formación de agregados (Pulusani y col., 1979; Joerger y Klaenhammer, 1986) también puede hacerse por electroforesis en SDS-PAGE (Bhunja y col., 1987).

Una característica que prácticamente la presentan todas las bacteriocinas es su termoestabilidad (West y Warner, 1988; Daeschel y col., 1990; Schillinger y Lücke, 1989); sin embargo, esta característica es difícil de cuantificar, ya que depende de su grado de purificación, del pH, de la fuerza iónica y de la presencia de moléculas termoprotectoras (Tagg y col., 1976).

II. 5. 5. 3.- Espectro de acción

En cuanto a su espectro de acción, las bacteriocinas se han dividido arbitrariamente en dos tipos (Klaenhammer, 1988):

1º).- Bacteriocinas con un espectro de acción muy restringido, limitado a especies

bacterianas muy relacionadas filogenéticamente con la cepa productora, lo que concuerda con la definición clásica de bacteriocinas (Tagg y col., 1976) y entre las que se incluyen muchas bacteriocinas caracterizadas hasta ahora, como la diplococina, lactacinas B y F y lactocina 27.

2º).- Bacteriocinas con un espectro más amplio activas, además de frente a las especies con ellas relacionadas, frente a otras bacterias Gram-positivas. Como ejemplo de este grupo se cita la nisina, que impide la esporulación y crecimiento de especies bacterianas de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. No obstante, todavía no se han descrito bacteriocinas activas frente a bacterias Gram- negativas (Klaenhammer, 1988).

II. 5. 5. 4.- Mecanismo de acción

El mecanismo de acción suele determinarse adicionando la sustancia, más o menos purificada, a un cultivo líquido en crecimiento inoculado con una población determinada del microorganismo sensible. Durante su incubación (microorganismo+ bacteriocina), se toman muestras a intervalos de tiempo regulares y se determinan las bacterias viables mediante recuentos en placa. La sustancia será bactericida si disminuye el número de microorganismos viables y bacteriostática si los recuentos se mantienen constantes.

Según la definición clásica de Tagg y col. (1976), las bacteriocinas son bactericidas para los microorganismos sensibles. El mecanismo mediante el que ejercen esta acción no es bien conocido ya que, aunque algunos autores (Tagg y col., 1976) describen esta actividad en dos etapas: a).- adsorción a la pared bacteriana y b).- destrucción de la pared bacteriana seguida de lisis celular, otros (Barefoot y Klaenhammer, 1983; Harding y Shaw, 1990) han puesto de manifiesto la adsorción de la bacteriocina incluso en las paredes de bacterias resistentes; por tanto, la actividad antimicrobiana no estaría ligada a la presencia de receptores específicos en la pared celular.

También se han descrito sustancias con características idénticas a las bacteriocinas, pero cuyo mecanismo de acción es bacteriostático. Entre ellas se encuentran la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975) y otras todavía no caracterizadas bioquímicamente (Raccach y col., 1989). El mecanismo por el que la lactocina 27 ejerce su acción bacteriostática se debe a su adsorción a la pared celular de las bacterias sensibles y a la posterior inhibición de la síntesis proteica celular sin afectar a la del ADN, ARN ni ATP.

II. 5. 6.- Regulación genética

Una de las cuestiones sobre las que los investigadores han puesto mayor énfasis en los últimos años es la de caracterización genética, a nivel molecular, de la producción de bacteriocinas. De hecho, los ensayos destinados al estudio de los determinantes genéticos que regulan su producción y la resistencia a su acción, así como el estudio de los mecanismos de transferencia genética de éstos determinantes han contribuido significativamente al desarrollo y aplicación de las modernas técnicas genéticas (Klaenhammer, 1988).

Se ha demostrado con ello que la producción y la resistencia a las bacteriocinas suele encontrarse codificada en plásmidos, generalmente en un mismo plásmido (Klaenhammer, 1988). Pero la producción de bacteriocinas no está siempre codificada en estos elementos genéticos. Así por ejemplo, la lactacina B producida por *L. acidophilus* N2 no se encuentra asociada a la presencia de plásmidos y lo mismo ocurre con la lactacina F (Barefoot y Klaenhammer, 1984). Tampoco se ha determinado la existencia de plásmidos ni de otros elementos genéticos extracromosomales en la producción de la lactostrepcina *Las 5* de *L. lactis* subsp. *cremoris* (Dobrzanski y col., 1982).

Pero como ya se ha dicho, son numerosos los investigadores que han comprobado que la producción de bacteriocinas se encuentra ligada a la presencia de plásmidos. De esta forma,

la diplococina de *L. lactis* subsp. *cremoris* 346 se halla ligada a un plásmido de 54 Megadaltons (Davey, 1984), mientras la pediococina A de *P. pentosaceus* FBB61 está codificada en un plásmido de 13,6 Megadaltons (Daeschel y Klaenhammer, 1985). Asimismo la producción de nisina por diversas cepas de *L. lactis* se encuentra codificada en un plásmido de 28-30 Megadaltons, en el que también se codifica la resistencia a dicha bacteriocina y la fermentación de la sacarosa (Gonzalez y Kunka, 1987).

Además, no sólo se han identificado los plásmidos que codifican la síntesis de bacteriocinas, sino que se ha llegado, incluso, a clonar los genes responsables de su producción y de la resistencia a la acción de dicha bacteriocina en otras bacterias receptoras (Van Belkum y col., 1989), determinándose la secuencia de nucleótidos de los operones que los regulan (Van Belkum y col., 1991).

El rápido desarrollo de las tecnologías genéticas en los últimos años puede permitir el desarrollo de bacterias lácticas de interés portando plásmidos de producción y resistencia a las bacteriocinas, facilitando su supervivencia al crecer con otras bacterias carentes de éstos plásmidos (Klaenhammer, 1988). Estas técnicas también permitirían expresar en una misma bacteria los determinantes de varias bacteriocinas, pero no ya sólo de las bacteriocinas de otras bacterias lácticas, sino de otras especies bacterianas distintas, con lo que el espectro antimicrobiano de las bacterias lácticas se vería notablemente aumentado. Además se les podría proporcionar resistencia frente a todos los compuestos antimicrobianos lo que supondría una ventaja adicional al poder crecer en un medio hostil (Klaenhammer, 1988). El empleo de estas metodologías genéticas en la producción y "mejora" de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas (sobre todo en las cepas de mayor interés industrial), abre unas perspectivas prometedoras a la industria de fermentación y conservación de alimentos (Klaenhammer, 1988).

II. 5. 7.- Bacteriocinas de las bacterias lácticas

Prácticamente todos los géneros de las bacterias lácticas presentan especies o cepas productoras de bacteriocinas:

II. 5. 7. 1.- Bacteriocinas producidas por especies del género *Lactobacillus*

La primera especie de este género en la que se identificó una actividad antimicrobiana asociada a una bacteriocina fué en *L. fermentii* (De Klerk y Goetzze, 1961). A partir de entonces se han identificado y, en algunos casos caracterizado, sustancias de éste tipo en otras especies del género.

a) *L. helveticus* .- Se conocen dos bacteriocinas producidas por esta especie, la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1973), y la helveticina J (Joerger y Klaenhamer, 1986).

b) *L. acidophilus* .- A la primera sustancia con actividad bacteriocina identificada en esta especie se le denominó acidofilina (Vicent y col., 1959), aunque más tarde se identificaron la lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1984) y la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991).

c) *L. plantarum* .- En esta especie se han descrito tres bacteriocinas, la lactolina (Kodama, 1952), la plantaricina SIK-83 (Andersson y col., 1988) y la plantaricina A (Daeschel y col., 1990).

d) *L. sake* .- En los últimos años y de forma casi simultánea se han identificado dos bacteriocinas producidas por microorganismos de esta especie, la sakacina A (Schillinger y Lücke, 1989), y la lactocina S (Mørtvedt y Nes, 1990).

También se ha citado la producción de bacteriocinas en *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Toba y col., 1991), *L. bulgaricus* (Abdel-Bar y col., 1987) y en cepas de lactobacilos aislados a partir de intestino humano (Silva y col., 1987) y de la flora vaginal saprofita (McGroarty y Reid, 1988).

II. 5. 7. 2.- Bacteriocinas producidas por especies del género *Lactococcus*

La nisina producida por *L. lactis* subsp. *lactis* es, quizá, la bacteriocina mejor identificada y caracterizada de todas las producidas por las bacterias lácticas (Hurst, 1981). No obstante, además de la nisina se han descrito otras bacteriocinas, como la diplococina producida por *L. lactis* subsp. *cremoris* (Davey y Richardson, 1981) y las lactostrepcinas, distintas a la nisina y producidas por diversas cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* (Közak y col., 1978; Dobrzanski y col., 1982). También se han identificado, en otras especies de este género, 8 tipos diferentes de bacteriocinas que son claramente distintas de la nisina y las lactostrepcinas, (Geis y col., 1983).

II. 5. 7. 3.- Bacteriocinas producidas por especies del género *Pediococcus*

Los primeros indicios de producción de bacteriocinas por parte de este género datan de mediados de los años 70, cuando se identificó una actividad inhibidora distinta del H₂O₂ en una cepa de *P. cerevisae* (Fleming y col., 1975). Posteriormente se ha caracterizado la pediococina A de *P. pentosaceus* (Daeschel y Klaenhammer, 1985) y las pediococina PA-1 (Gonzalez y Kunka, 1987) y pediococina AcH (Bhunja y col., 1988) producidas por *P. acidilactici*.

II. 5. 7. 4.- Bacteriocinas producidas por especies del género *Carnobacterium*

Aunque es un género de nueva creación (Collins y col., 1987), ya se ha descrito la producción de bacteriocinas por *C. piscicola* (Ahn y Stiles, 1990) y *C. divergens* (Schillinger y Holzapfel, 1990).

II. 5. 7. 5.- Bacteriocinas producidas por especies del género *Leuconostoc*

A este género solamente se le atribuía actividad inhibidora debida a la producción de ácidos orgánicos y diacetilo, hasta que se ha caracterizado la producción una bacteriocina por una cepa de *Leu. gelidum* (Harding y Shaw, 1990; Hasting y Stiles, 1991).

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 han aislado de embutidos crudos madurados, elaborados sin cultivo iniciador industrial y donados generosamente por la empresa cárnica Industrias Cabo S.A., de Madrid. Las cepas se aislaron siguiendo un método aleatorio y la mayor parte de ellas se identificaron tentativamente como *Lactobacillus sake* siguiendo el esquema de identificación de Schillinger y Lücke (1987b).

En la tabla III.1 se muestran los microorganismos utilizados como indicadores para evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas procedentes de los embutidos crudos madurados, así como su origen. Todos los microorganismos se liofilizaron en un medio de leche desnatada al 10 % para garantizar su conservación. Los "stocks" de trabajo se mantuvieron en congelación a -20 °C en caldo nutritivo con un 15% de glicerol, revitalizándolos cada dos meses mediante dos o tres pases en el mismo caldo.

II. 1. 1. 2. - Obtención de los inmunosueros

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

III. 1. 2. - Productos y reactivos

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

II. 1. 3. - Material de laboratorio

En la preparación de los medios de cultivo y soluciones acuosas se ha empleado agua destilada, obtenida de un destilador "Afora"⁽¹⁾ y desmineralizada en un intercambiador iónico "Seta" mod. R600.

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.

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

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

Microorganismo indicador	Cepa nº	Origen ^a
<u>Bacterias Gram-positivas</u>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	289	CECT
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb226	IMTH
<i>Lactobacillus carnis</i>	Lv61	FRIB
<i>Lactobacillus casei</i>	475	CECT
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Lb726	IMTH
<i>Lactobacillus farciminis</i>	Lb34	IMTH
<i>Lactobacillus fermentum</i>	285	CECT
<i>Lactobacillus mesentericus</i>	394	CECT
<i>Lactobacillus plantarum</i>	221	CECT
	Lb577	IMTH
<i>Lactobacillus sake</i>	Lb684	IMTH
<i>Lactobacillus mesentericus</i>	MR364	FRIB
<i>Carnobacterium divergens</i>	Lv13	FRIB
<i>Carnobacterium piscicola</i>	MR371	FRIB
<i>Micrococcus varians</i>	230	CECT
<i>Enterococcus faecalis</i>	481	CECT
<i>Enterococcus faecalis</i> (var. <i>liquefaciens</i>)	184	CECT
<i>Enterococcus faecium</i>	410	CECT
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	49	CECT
<i>Bacillus cereus</i>	148	CECT
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	10018	NCIB
<i>Staphylococcus xylosus</i>	237	CECT
<i>Staphylococcus aureus</i>	59	CECT
<i>Staphylococcus aureus</i>	137	FRI
<i>Staphylococcus aureus</i>	361	FRI

Tabla III. 1. - (continuación)

Microorganismo indicador	Cepa nº	Origen ^a
<u>Bacterias Gram-positivas</u>		
<i>Listeria monocytogenes</i>	5105	NCTC
<i>Listeria monocytogenes</i>	7973	NCTC
<i>Listeria monocytogenes</i>	LI5 sv 1/2	FVM
<i>Listeria monocytogenes</i>	LI1 sv 4	FVM
<i>Listeria monocytogenes</i>	Scott A	CECT
<i>Clostridium perfringens</i>	376	CECT
<i>Clostridium botulinum</i>	551	CECT
<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>Salmonella typhi</i>	409	CECT
<i>Salmonella thyphimurium</i>	443	CECT
<i>Salmonella thyphimurium</i>	T91	CENAN
<i>Pseudomona fluorescens</i>	DC5	FRIB
<i>Pseudomona fluorescens</i>	DC7	FRIB
<i>Pseudomona fluorescens</i>	NT19	FRIB
<i>Yersinia enterocolitica</i>	WA	DHHS
<i>Yersinia enterocolitica</i>	E20	NC
<i>Yersinia enterocolitica</i>	14405	IPP

^a Abreviaturas: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Burjasot, Valencia); CENAN, Centro Nacional de Nutrición y Alimentación (Majadahonda, Madrid); DHHS, Dpt. of Health and Human Services. (Washington DC. USA); FRI, Food Research Institute (Madison, USA); FRIB, Food Research Institute (Bristol, Reino Unido); FVM, Facultad de Veterinaria (Madrid); IEKC, International Escherichia and Klebsiella Centre (Copenhage, Dinamarca); IMTH, Institute für Mikrobiology, Toxicology und Histology (Kulmbach, RFA); IPP, Institut Pasteur (Paris, Francia); MIT, Masachussets Institute of Technology (Boston, USA); NCIB, National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Aberdeem, Reino Unido); NCTC, National Collection of Type Cultures (Londres, Reino Unido)

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 tuvo lugar por filtración con filtros "Millipore" de 0,22 y 0,45 μm de diámetro de poro.

Las homogenizaciones se llevaron a cabo 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 una microcentrífuga "Heraeus" Christ, mod. Biofuge, equipada con un rotor tipo 1220.

Las siembras microbianas se realizaron 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 de la temperatura más preciso 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, empleando un colorímetro "Klett-Summerson" mod. 800-3. Los recuentos microbianos se hicieron 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 $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ construido por una firma local.

Las liofilizaciones se efectuaron en una 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.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico se practicaron 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 "Titerek Multiskan" mod. Plus.

En la determinación de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada mediante técnicas de 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 Hewlett Packard mod. HP-3394A.

Como material general de laboratorio se han utilizado pipetas, micropipetas automáticas "Gilson", mods. P-20, P-200, P-1000, agitadores, mecheros de gas, termómetros, etc. El material de vidrio empleado fué siempre del tipo "Pirex".

III. 2. - METODOS

III. 2. 1. - Medios de cultivo empleados en el crecimiento de los microorganismos

III. 2. 1. 1. - Medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias lácticas

1. - 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	1	ml
pH 6,2		

Preparación

Se suspenden 52 g del medio de MRS en 1.000 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/l de agar bacteriológico (DIFCO) y 7,5 g/l cuando se elaboraba el agar de MRS semisólido para los experimentos de inhibición.

2. - Medio base

Contiene:	g/l
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 de manganeso	0,05
Sulfato ferroso	0,01
Tween 80	1 ml
pH final llevado a 6,2 con HCl 1N	

Preparación.

Para estudiar la influencia de la fuente de nitrógeno en la producción de las sustancias antibacterianas, este medio base se suplementó con 15 g/l de uno de los siguientes extractos: triptona, triptosa, proteosa-peptona, casitona, peptona (suministrados por Difco) o extracto de

carne (Oxoid). Los componentes citados se disolvieron en 1.000 ml de agua destilada. La preparación ulterior de cada uno de los medios semisintéticos así obtenidos es idéntica a la señalada para el medio de MRS (sección III. 2. 1. 1). El medio base suplementado con 15 g/l con triptosa (MM-Triptosa) se empleó para 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 infusión de cerebro y corazón (BHI, "Oxoid")

Contiene:	g/l
Extracto de cerebro	12,5
Extracto de corazón	5,0
Proteosa-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. La preparación ulterior del medio así obtenido es idéntica a la señalada para el medio de MRS (sección III. 2. 1. 1) .

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

Contiene:	g/l
Triptona	12,5
Dextrosa	10,1
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. La preparación ulterior del medio así obtenido es idéntica a la señalada para el medio de MRS (sección III. 2. 1. 1).

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

Las bacterias lácticas (cepas LAB) utilizadas en este trabajo se aislaron durante la maduración de un lote de embutidos comerciales a los que no se les había añadido ningún

cultivo iniciador. Las muestras se tomaron de la masa cárnica durante los siguientes días de maduración: 0, 2, 6, 10, 21 y 35. Para el aislamiento de las bacterias lácticas se recogieron asépticamente 20 g de la porción central de los embutidos que se homogeneizaron durante 10 minutos en 180 ml de un medio que contenía peptona (1 g/l) y cloruro sódico (8,5 g/l) en agua destilada.

El recuento total de microorganismos presentes en el homogeneizado se realizó en placas de PCA suplementado con cloruro sódico (1%). El agar de recuentos en placa (PCA, "Oxoid") contiene (por litro); 5,0 g de triptona, 2,5 g de extracto de levadura, 1,0 g de dextrosa y 9,0 g de agar. Su pH final es de 7,0 y se prepara suspendiendo 17,5 g de polvo del medio deshidratado en un litro de agua destilada. El resto de las operaciones de preparación del medio son idénticas a las indicadas para el medio de MRS (sección III. 2. 1. 1. 1). El recuento de bacterias lácticas se efectuó en agar de MRS. Las placas de PCA y de MRS se incubaron a 32 °C durante 3 días.

De las colonias crecidas en agar de MRS se seleccionaron 180, en grupos de 30, durante los días 0, 2, 6, 10, 21 y 35 de maduración siguiendo el método aleatorio descrito por Ordóñez (1979). Las colonias seleccionadas se recogieron con una asa de platino y se sembraron en tubos que contenían caldo de MRS, manteniendo los tubos durante 16 h 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. Alícuotas de cada una de las cepas se almacenaron en liofilización con leche desnatada al 10 %.

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 , 4mM.

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. - Pruebas directas de antagonismo

III. 2. 3. 2. 1. - Prueba directa de antagonismo en pocillos

Para detectar la actividad inhibidora de las bacterias lácticas (LAB), aisladas de los embutidos crudos madurados, frente a los microorganismos indicadores, se ideó un sistema consistente en utilizar placas de Petri con medio MRS sólido en las que, con un sacabocados de 7 mm de diámetro, se hicieron pocillos, cuyo fondo se tapizó con 10 μl del mismo medio. A continuación se depositaron en cada pocillo 20 μl de los cultivos de las cepas LAB escogidas y cultivadas en caldo MRS, después de lavadas y resuspendidas en el mismo medio.

Las placas se prepararon por duplicado y cada pocillo se rellenó con agar MRS. Posteriormente, los microorganismos indicadores a una concentración aproximada de 1×10^5 ufc/ml, se sembraron en una de las placas del par, que contenía agar MRS, cuando se trataba de bacterias lácticas y agar BHI en el resto de los casos. Tanto las placas a las que se les había añadido el indicador como sus compañeras del par carentes del mismo, se incubaron a 32 °C durante 24 horas. Transcurrido éste tiempo se añadió indicador a las placas del par que carecían del mismo y cuyas cepas LAB habían obtenido una ventaja de crecimiento de 24 horas, siguiendo la pauta citada (prueba de actividad inhibidora diferida). Estas placas se incubaron durante a 32 °C durante otras 24 horas.

Con esta técnica la inhibición ejercida por las bacterias lácticas en el microorganismo indicador se manifiesta por la aparición de halos en la superficie de las placas. Dicha inhibición se cuantifica determinando el área de la corona circular del halo de inhibición (mm^2) por unidad de densidad óptica de los cultivos en unidades Klett y por 0,020 ml de medio de cultivo.

III. 2. 3. 3. - Actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células

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

Las 24 bacterias lácticas seleccionadas (20 con gran actividad inhibidora directa y 4 con una actividad manifiestamente menor), se cultivaron en caldo MRS durante 16-18 h a 32 °C y 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 1N y, a continuación, 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, resuspendiéndolos en tampón de fosfato 4 mM, de pH 7,0.

III. 2. 3. 3. 2. - Detección de la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados 20 veces

Para detectar y cuantificar la actividad inhibidora de dichos sobrenadantes se utilizaron discos de papel de filtro Whatman nº 3, de 7 mm de diámetro, que contenían 0,030 ml de los sobrenadantes concentrados 20 veces. Estos discos se colocaron en placas de Petri que tenían su fondo tapizado con una fina capa de agar base y en las que se depositaron aproximadamente 3×10^5 células de los microorganismos indicadores de interés señalados en la tabla III. 1, resuspendidos en 6 ml de agar semisólido MRS o BHI (0,75 % de agar en todos los casos). Las placas se incubaron a 32 °C durante 24 h y la actividad inhibidora de los sobrenadantes se determinó midiendo los halos de inhibición formados alrededor de los discos de papel de filtro. Para ello se utilizó la expresión: Diámetro del halo de inhibición = (Radio de la zona de inhibición x 2) + diámetro del papel de filtro (7 mm).

III. 2. 3. 4. - Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas

La influencia del H₂O₂ en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas se evaluó adicionando catalasa (130 UI/ml) a los cultivos libres de células neutralizados y filtrados. La actividad inhibidora se determinó empleando el sistema de discos en placas descrito en la sección III. 2. 3. 3. 2. La actividad inhibidora debida al H₂O₂ se determinó cuantificando la diferencia de diámetro entre los halos de inhibición de las muestras problema y las de los controles a las que no se les había adicionado catalasa.

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

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

Los cultivos de las 6 bacterias lácticas seleccionadas por la mayor actividad inhibidora de sus cultivos libres de células, se tiñeron por el método Gram y se observaron al microscopio para determinar su morfología y sus afinidades tintoriales.

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

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

III. 2. 4. 3. - Producción de gas a partir de glucosa

La producción de CO₂ a partir de la glucosa se determinó de dos 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 cultivos, éste se manifiesta por la presencia de burbujas en el interior de la campana.

2.) - Colocando en los tubos de medio CS-T modificado tapones de agar (2 % p/v) y observando si durante la incubación de aquellos se produce un desplazamiento de los tapones debido a la presencia de gas.

El medio CS-T modificado contiene:

	g/l	
Casaminoácidos ⁽¹⁾	5,0	
Extracto de levadura	5,0	
Fosfato monopotásico	0,6	
Fosfato dipotásico	0,6	
Sulfato magnésico (7 H ₂ O)	0,2	
Sulfato de manganeso (1 H ₂ O)	0,05	
Sulfato ferroso	0,01	
Cloruro sódico	0,01	
Bromotímol azul	0,08	
Agar	2,5	
Tween 80	1,0	ml
pH 6,2		

Preparación

A un litro de medio de cultivo esterilizado a 121 °C durante 15 minutos, se le añade una solución de glucosa al 10 % en una proporción del 10% (v/v). La solución de glucosa se esteriliza por filtración con filtros Millipore de 0,22 µm de tamaño de poro. Una vez enfriado el medio, se le adicionan 150 µl del cultivo a investigar realizándose a continuación picaduras en el medio semisólido. Se le añaden 2,5 ml del agar al 2 %. La formación de gas se detecta por el desplazamiento del tapón hacia arriba después de 3 días de incubados los tubos a 32 °C.

(1) Una mezcla comercial de aminoácidos obtenidos por hidrólisis de caseína

III. 2. 4. 4. - Hidrólisis de la arginina

1.) 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	0,02
L-Arginina	3,0
Tween 80	1,0

Preparación.

Una vez disueltos los componentes del medio, 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 mercuríco	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 éstos 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. 5. - Producción de ácido sulfhídricoIII. 2. 4. 5. 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 ebullición 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 sulfhídrico, se observa un ennegrecimiento del medio.

III. 2. 4. 5. 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. 6. - Prueba de Voges-Proskauer

a.) Caldo MR-VP.

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

a.) Solución de α -naftol en etanol.

Contiene:

α -naftol	6	g
Etanol	100	ml

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 ml 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. 7. - 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. trealosa; 33. inulina; 34. melicitosa; 35. rafinosa; 36. almidón; 37. glucógeno; 38. xilitol; 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 microtubo, debido a la producción anaeróbica de ácido, que es detectado por el indicador de pH incluido en el medio API CHL.

III. 2. 4. 8. - Tolerancia al cloruro sódico

La tolerancia de las bacterias seleccionadas a la sal se determinó en caldo MRS suplementado con un 7 y un 10 % de NaCl, respectivamente. El medio, una vez inoculado, se incubó durante 6 días a 32 °C.

III. 2. 4. 9. - 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. 10. - Desarrollo a diversas temperaturas

El desarrollo de los cultivos a diversas temperaturas se analizó depositando alícuotas de cada uno de ellos en tubos de ensayo que contenían caldo MRS. Una vez inoculados los tubos, se procedió a su incubación a las diversas temperaturas 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. 5.- Espectro antimicrobiano de las sustancias inhibidoras producidas por las cepas de *L. sake* números 77, 90, 148 y 180

El espectro antimicrobiano de las 4 cepas de *L. sake* que mostraron una mayor actividad antagonista, se determinó viendo la actividad inhibidora frente a los microorganismos indicadores citados en la tabla III. 1 del sobrenadante concentrado libre de células, elaborado según se describe en la sección III. 2. 3. 3. La actividad inhibidora se determinó midiendo los halos de inhibición alrededor de los círculos de papel de filtro y se expresó como: Diámetro de inhibición = (Radio de la zona de inhibición x 2) + diámetro del papel de filtro (7 mm).

III. 2. 6. - Efecto de la composición del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus sake* 148

Para estudiar el efecto del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de *L. sake* 148, 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:
 - a) con 10 g de triptosa/l (APT-Triptosa)
 - b) con 10 g de proteosa-peptona/l (APT-Proteosa)
 - c) con 10 g de peptona/l (APT-Peptona)
 - d) con 10 g de extracto de carne/l (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:

a) con 15 g de triptosa/l (MM-Triptosa)

b) con 15 g de proteosa/l (MM-Proteosa)

c) con 15 g de peptona/l (MM-Peptona)

d) con 15 g de extracto de carne/l (MM-Extracto de carne)

e) con 15 g de caseína/l (MM-Caseína)

f) con 15 g de triptona/l (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., utilizando a *L. fermentum* CECT285 como el microorganismo indicador

III. 2. 7. - Crecimiento de *L. sake* 148, cinética del desarrollo y producción de sustancia antimicrobiana a diversas temperaturas

III. 2. 7. 1. - Crecimiento de los cultivos

Alícuotas de 100 µl de un cultivo de *L. sake* 148 se inocularon en tubos con caldo MRS y MM-Triptosa y se incubaron a 4, 8, 15, 20 y 32 °C durante 7 días, 5 días, 30 h, 16 h y 12 h, respectivamente. El desarrollo de los cultivos se estimó por turbidometría a determinados intervalos de tiempo; 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 valor del pH del cultivo.

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes obtenidos en cada intervalo, se determinó como se indica en la sección III. 2. 3. 3., empleando a *L. fermentum* CECT285

como el microorganismo indicador.

III. 2. 7. 2. - Parámetros cinéticos del desarrollo microbiano

III. 2. 7. 2. 1. - Velocidad específica de crecimiento (μ)

Se define como el aumento de la masa celular de los cultivos respecto del 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).

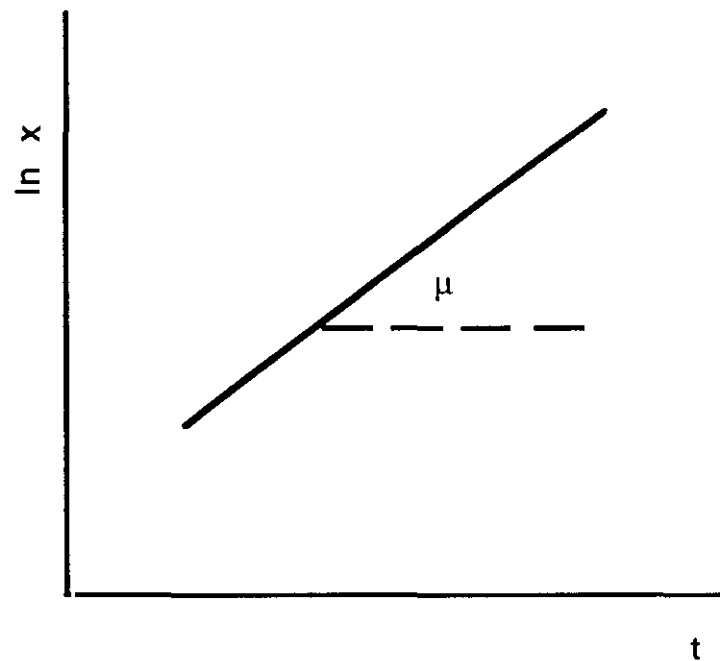


Figura 3. 1.- Representación gráfica teórica del incremento de la masa celular de los cultivos en función del tiempo de incubación.

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. 7. 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. Su valor se calcula 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. 7. 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. 7. 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. 7. 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 cultivo estériles de MRS y MM-triptosa, que se inocularon con *L. sake* 148 y se incubaron a 32 °C.

La absorbancia de los cultivos se determinó cada 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 (n $\mu\text{g/ml}$), 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).

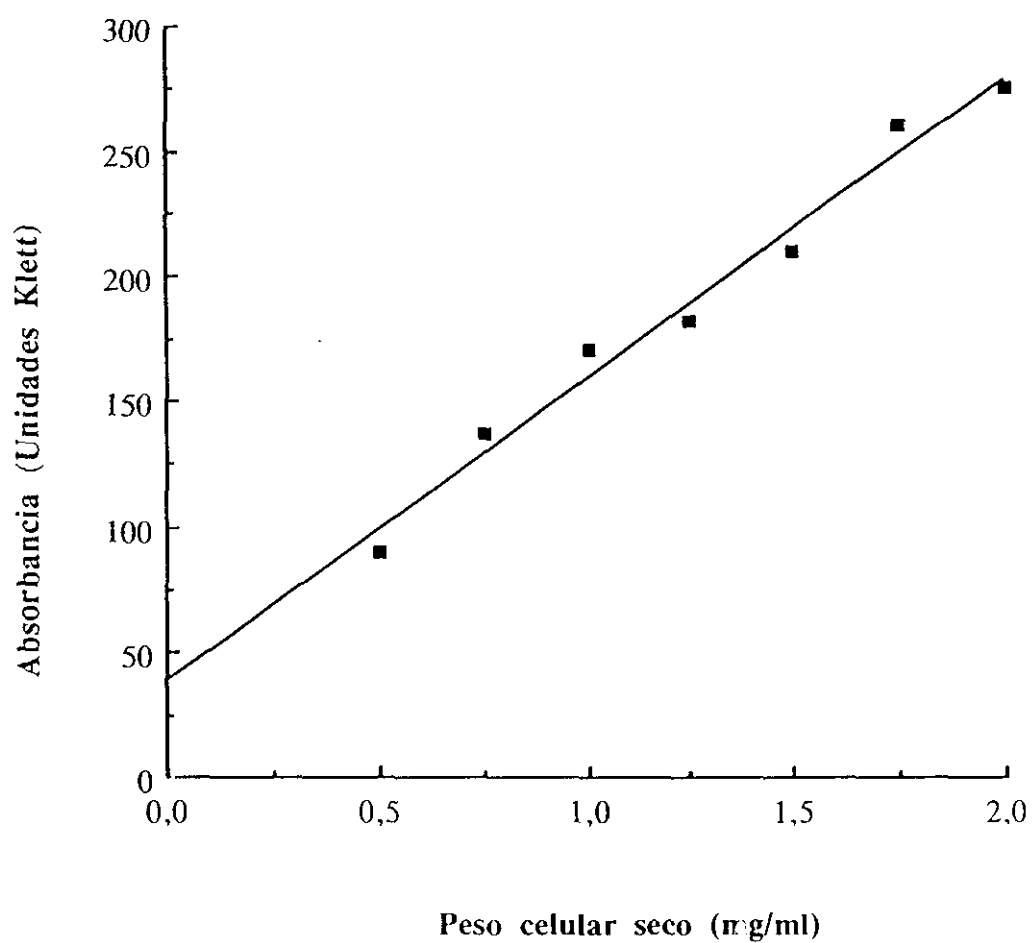


Figura 3. 2.- Recta patrón para la determinación del peso celular seco en virtud de la absorbancia del medio de cultivo.

III. 2. 8.- Purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148

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, de pH 5,6.

(a.) Solución de ácido cítrico, 0,1 M.

Contiene 21,01 g de ácido cítrico (1 H₂O) por litro de agua destilada.

(b.) Solución de Na₂HPO₄, 0,2 M.

Contiene 28,4 g de Na₂HPO₄ por litro de agua destilada.

Preparación.

Se mezclan 42 ml de ácido cítrico, 0,1 M con 58 ml de Na₂HPO₄, 0,2 M.

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

A la solución tampón base (sección III. 2. 8. 1. 1. 1), se le añaden, respectivamente, 6 g ó 60 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 epiclorhidrina. 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 y que en el caso de los Sephadex G-150 fino, 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

La cromatografía se realizó en una cámara termostatada a 4 ± 1 °C y el eluato cromatografiado se recogió en un colector de fracciones.

El sobrenadante, libre de células y liofilizado, de cultivos de *L. sake* 148 desarrollados en MM-triptosa durante 16 h a 32 °C, se resuspendió en el tampón de ácido cítrico-fosfato, de pH 5,6 y urea 1 M, hasta una concentración 20 veces mayor que la inicial. A continuación 20 ml de esta solución se depositaron en una columna (3,2 x 40 cm) de Sephadex G-150, previamente equilibrada con el tampón de ácido cítrico-fosfato, de pH 5,6 y urea 0,1 M. El eluato, en fracciones de 5 ml, se sometió a una lectura espectrofotométrica a 280 nm para determinar su contenido proteico, mientras que su actividad inhibidora se estableció de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3. 2. utilizando *L. fermentum* CECT285 como el microorganismo indicador. 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 posteriormente se detallan. 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 fracción V de la seroalbúmina bovina (figura 3. 3).

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 0,16 % en agua destilada.

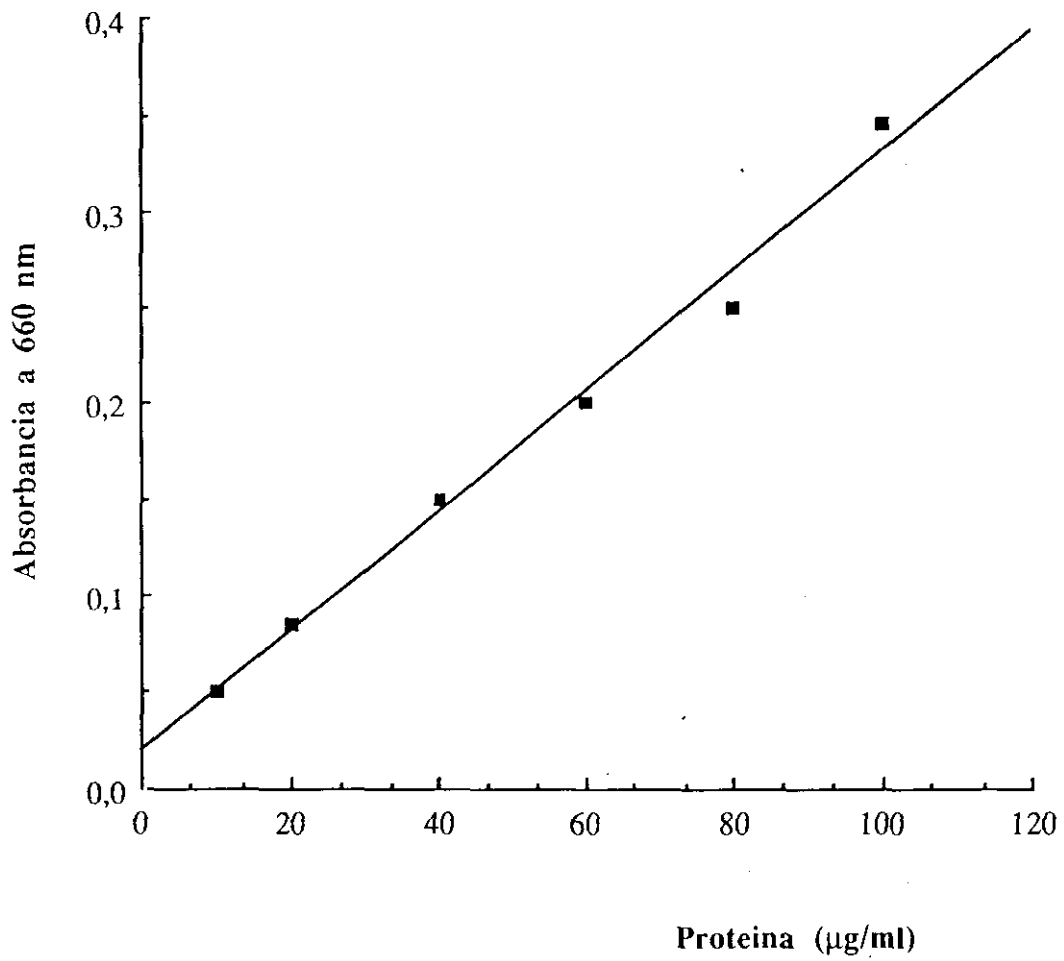


Figura 3.3.- Recta patrón para la determinación de proteína por el método de Lowry modificado.

- 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.
- Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada en la 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 aumento de la absorbancia a 660 nm con referencia a un blanco preparado de la misma manera pero con agua destilada.

III. 2. 9. - Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana exocelular parcialmente purificada de *L. sake* 148

III. 2. 9. 1. - Preparación de la solución patrón de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada

Para realizar las pruebas de estabilidad enzimática y térmica, se resuspendieron 200 mg de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada, obtenida de la columna de Sephadex G-50 (sección III. 2. 8. 2), en 1 ml de una solución tampón de citrato-fosfato 4mM, de pH7. Esta solución se preparaba justo antes de su empleo.

III. 2. 9. 2. - Efecto de diversos enzimas en la actividad inhibidora de *L. sake* 148

Para determinar la sensibilidad de la actividad inhibidora a los enzimas proteolíticos (tripsina, pepsina, papaína, proteasa II y proteasa XIV), lipolíticos (lipasa I y lipasa VII) y amilolíticos (α -amilasa), se preparó una solución de la sustancia inhibidora parcialmente purificada (sección III. 2. 9. 1). A los pocillos de placas de ELISA en los que se habían depositado 60 μ l de las dos soluciones (2 y 10 mg/ml) de los distintos enzimas en tampón de citrato-fosfato, se añadieron 60 μ l de la solución conteniendo la sustancia inhibidora, de tal manera que la concentración final del enzima fué de 1 y 5 mg/ml respectivamente en cada dos pocillos. Como control positivo en un pocillo se colocó la sustancia antimicrobiana diluida al 50% con el tampón citado. Para determinar la posible acción inhibidora o estimulante del crecimiento del microorganismo indicador, ejercida por los enzimas empleados, se determinó la posible actividad antimicrobiana a las concentraciones descritas. La actividad antimicrobiana residual de los pocillos se determinó tras 2, 6, y 12 horas de incubación de las mezclas a 32 °C, según el método descrito en la sección III. 2. 3. 3. 2; como microorganismo indicador se utilizó *L. fermentum* CECT285.

III. 2. 9. 3. - Efecto de diferentes pHs en la actividad inhibidora de *L. sake* 148

III. 2. 9. 3. 1. - Preparación de las soluciones tampón de distintos pHs

1.) Tampón universal (Dawson y col., 1969).

a) Solución A.

Contiene:	g/l
Acido cítrico	6,008
Fosfato monopotásico	3,893

Acido bórico	1,769	
Acido dietilbarbitúrico	5,266	
Agua destilada hasta	1000	ml

b) Solución B.

Contiene 0,8 g de NaOH en 1.000 ml de agua destilada.

Procedimiento:

A 100 ml de la solución A se le añaden los ml de la solución B necesarios para obtener el valor de pH deseado. Se realizaron soluciones con valores de pH de 2,6, 3,6, 4,6, 5,6, 6,6, 7,6, 8,6, 9,6, 10,6, 11,6 y 12,0.

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

Para establecer la estabilidad de la actividad antimicrobiana parcialmente purificada (sección III. 2. 8. 2.) a los diferentes pHs, se distribuyeron en tubos alícuotas de 1 ml de la solución tampón. Después de incubar los tubos 24 h a 24 °C, se determinó su actividad antimicrobiana por el sistema de los discos (sección III. 2. 3. 3. 2), utilizando a *L. fermentum* CECT285 como microorganismo indicador. Para comprobar que los tampones de diferente pH no ejercían acción inhibidora en el microorganismo indicador, se realizó la misma prueba de inhibición con soluciones de la sustancia con actividad antimicrobiana.

III. 2. 9. 4. - Cinética de termodestrucción de la actividad inhibidora de *L. sake* 148

III. 2. 9. 4. 1. - Tratamiento térmico

En viales de vidrio (10 x 30 mm) herméticamente cerrados se colocaron 0,1 ml de la solución de sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148 que se calentaron a 80, 100, 121, 135 y 150 °C en un baño de glicerina termostatado, 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 y se determinó su actividad antimicrobiana residual de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3. 2. empleando como indicador a *L. fermentum* CECT285.

III. 2. 9. 4. 2. - Parámetros cinéticos de termodestrucción

A) Valor "D" o tiempo de reducción decimal

Se define como el tiempo necesario para disminuir en un 90 % a una temperatura determinada, la actividad inhibidora inicial de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148, y se corresponde con el tiempo en el que la curva de supervivencia atraviesa un ciclo logarítmico. Se calcula a partir de la ecuación de la recta de regresión de una gráfica de termodestrucción, que representa el logaritmo del porcentaje de la actividad inhibidora inicial en función del tiempo de calentamiento (figura 3. 4).

De la figura 3. 4, se deduce que:

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

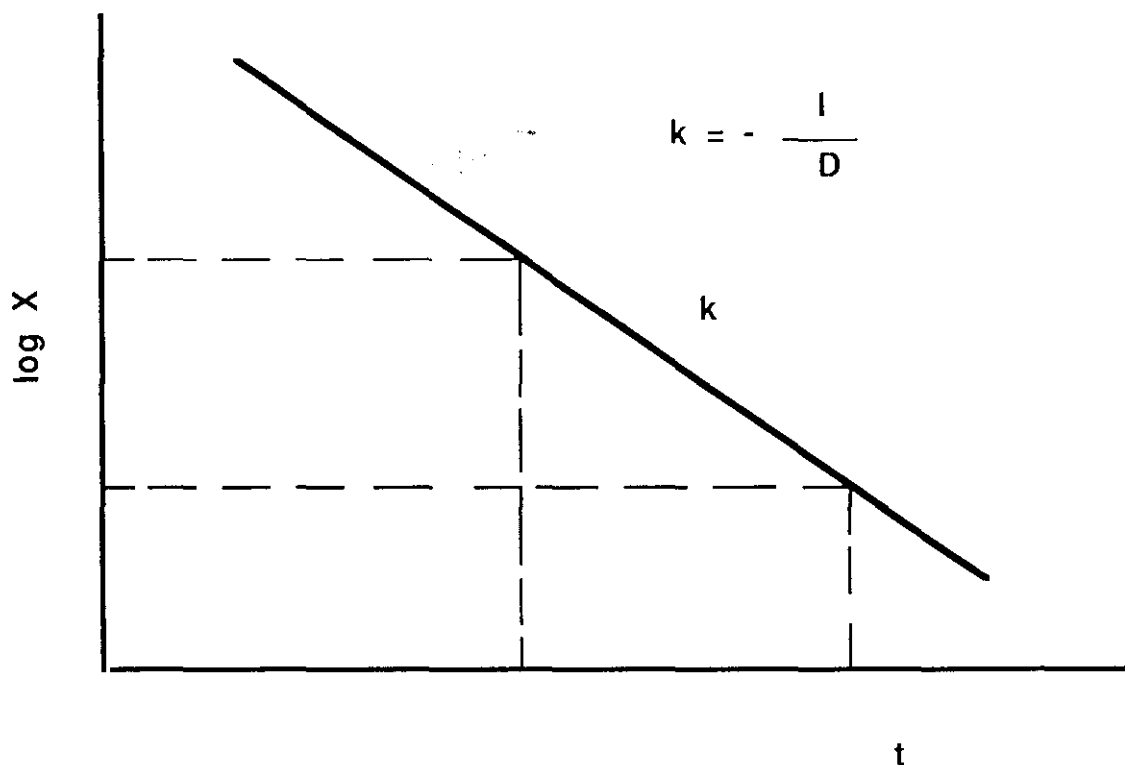


Figura 3. 4. - Representación gráfica teórica de la actividad inhibidora en función del tiempo de calentamiento.

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:

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

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

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. 5), 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),

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

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

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 inhibidora inicial en el tiempo t_0 , resulta:

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

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

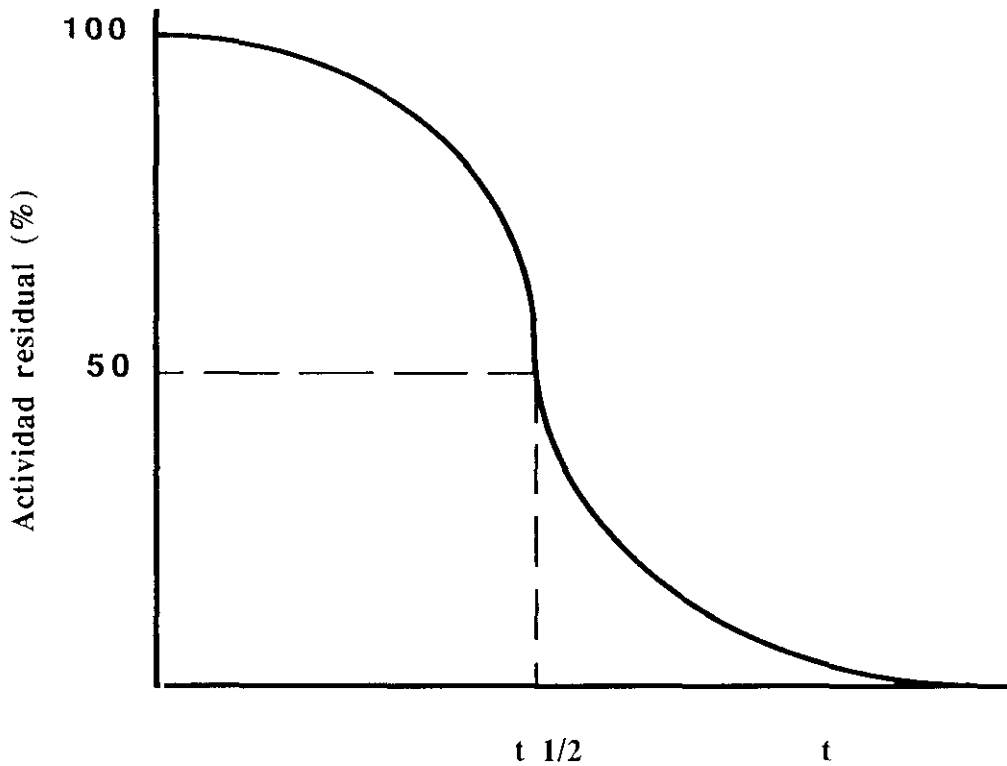


Figura 3. 5. - Representación gráfica teórica de la actividad inhibidora en función del tiempo de calentamiento.

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. 6).

De la figura 3. 6 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.

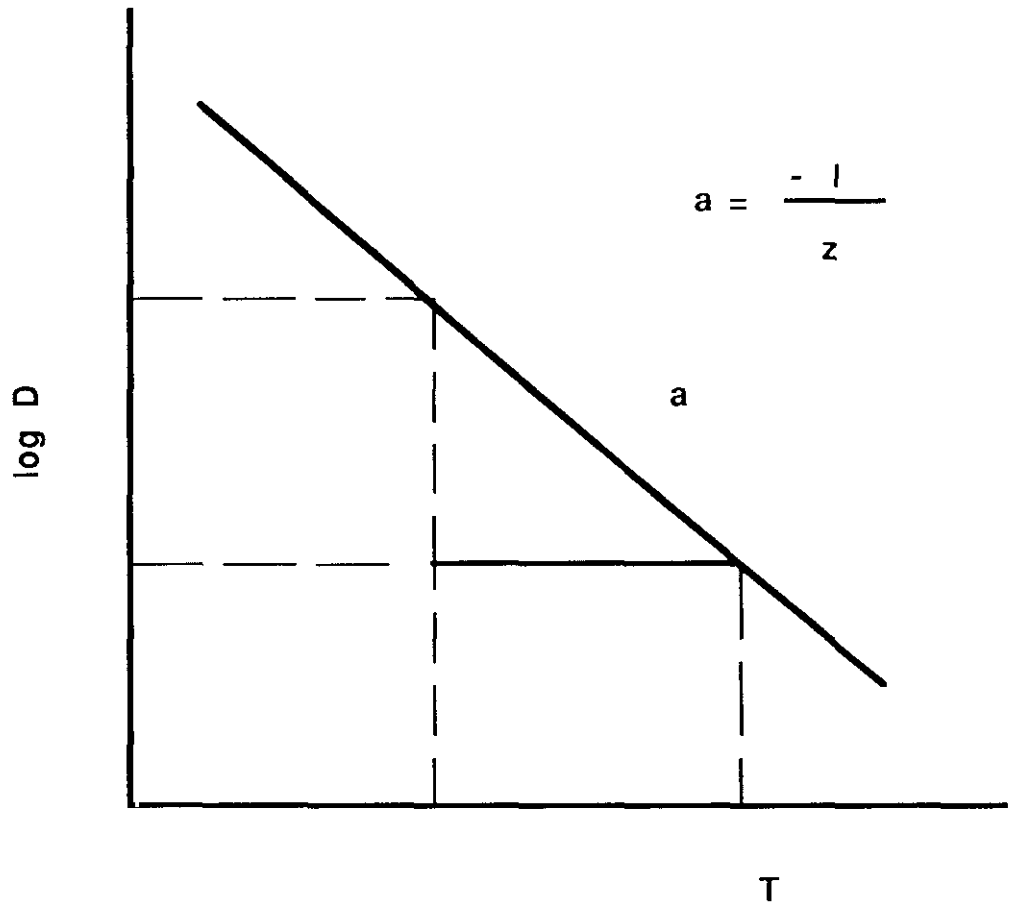


Figura 3. 6. - Representación gráfica teórica de los valores "D" en función de la temperatura.

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

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

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

III. 2. 9. 5. - Determinación del peso molecular de la sustancia inhibidora de *L. sake* 148 por cromatografía de filtración en Sephadex G-50

La cromatografía de filtración en geles de Sephadex G-50 para determinar el peso molecular de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada, se realizó de la manera descrita en la sección III. 2. 8. 1. 3. Para ello 20 mg de la sustancia parcialmente purificada, disuelta en 3 ml de tampón de ácido cítrico-fosfato, de pH 5,6 y urea 1 M 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 se disolvió la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148. 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. 9. 6. - 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 desnaturalización de las proteínas a subunidades y, además, proporciona

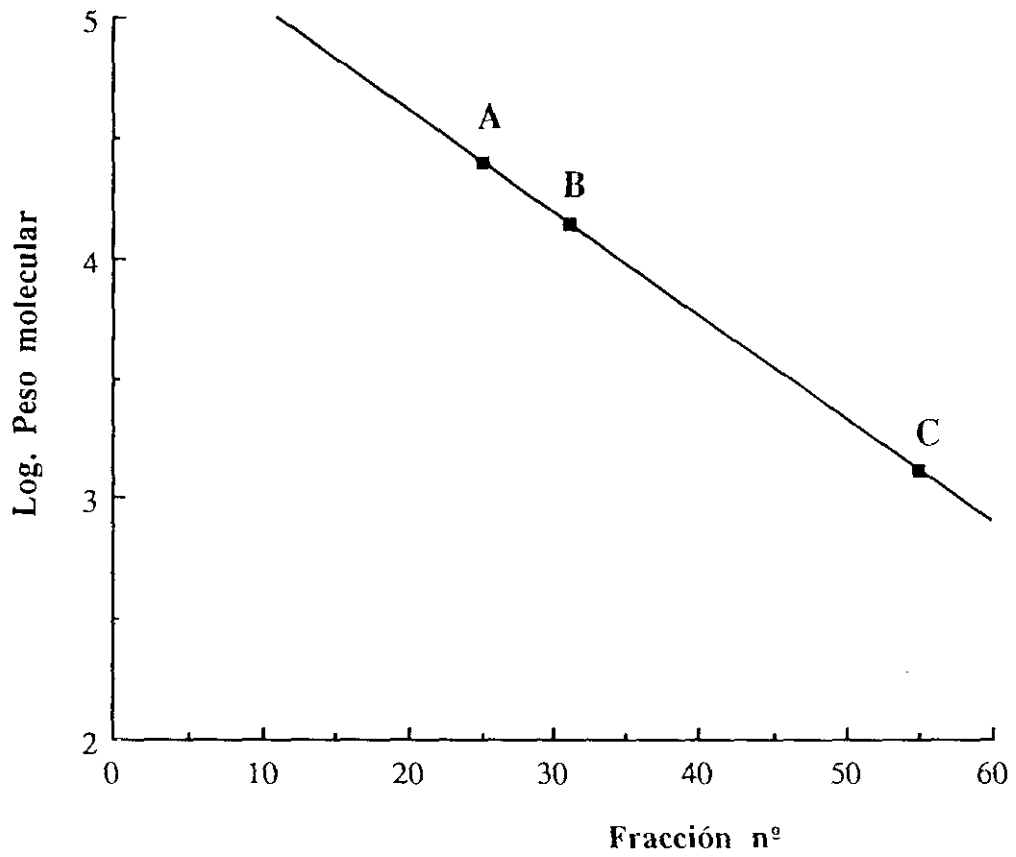


Figura 3. 7. - Recta patrón para la determinación de pesos moleculares por cromatografía de filtración en Sephadex G-50. (A) α -quimotripsinógeno, (B) RNAsa pancreática bovina, (C) vitamina B₁₂.

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. 9. 6. 1. - Técnica de Swank y Munkres (1971)

III. 2. 9. 6. 1. 1. - Tampones, geles y soluciones empleadas

1.) Tampón para solubilizar las muestras.

Se compone de:

Urea	4,8	g
β -mercaptoetanol	0,5	ml
SDS	0,25	g
Acido ortofosfórico 0,01 M hasta	10,0	ml

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

Contiene:

Acido ortofosfórico (85 %)	33,7	ml
SDS	5,0	g
Agua destilada, hasta	500,0	ml
El pH se ajusta a 6,8 con Tris.		

3.) Solución de acrilamida-bisacrilamida.

Está formado por:

Acrilamida	18,75	g
------------	-------	---

N,N'-metilén-bisacrilamida	1,87	g
Agua destilada hasta	50,0	ml

4.) Gel de separación.

Consta de:

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

5.) Gel de concentración.

Lo forman:

Solución de acrilamida-bisacrilamida	1,65	ml
Tampón de ácido fosfórico 1 M-SDS	0,5	ml
Urea	2,45	g
Agua destilada	10,0	ml
TEMED	1,5	μl
Persulfato amónico (6 %)	0,1	ml

6.) Tampón de electroforesis.

Contiene:

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

7.) Solución de fijación.

Consta de 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. 9. 6. 1. 2. - Preparación de las muestras

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

III. 2. 9. 5. 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 fase superior (gel de concentración). Los geles se prepararon como se describe en las secciones III. 2. 9. 6. 1. 4 y III. 2. 9. 6. 1. 5. Para evitar la presencia de burbujas de aire en los geles, la mezcla se desgasificó a temperatura ambiente 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 la solución del gel de separación hasta unos 3 cm de su extremo superior, mientras en la superficie de la mezcla, y para que no se formaran 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 su superficie 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. El gel se polimeriza durante 30 minutos a 37 °C, quedando listo para realizar la electroforesis.

III. 2. 9. 6. 1. 4. - Electroforesis

La electroforesis tuvo lugar 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 del soporte.

III. 2. 9. 6. 1. 5. - Tinción de los geles

Terminada la electroforesis, los geles se sumergieron en 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 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. 9. 6. 1. 6. - Determinación del peso molecular

El peso molecular 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 bajo peso molecular: mioglobina III (2,5 KDa), mioglobina II (6,2 KDa), mioglobina I (8,1 KDa), mioglobina I y II (14 KDa) y mioglobina (16,9 KDa).

III. 2. 9. 6. 2. - Técnica de Laemli (1970)III. 2. 9. 6. 2. 1. - Tampones, geles y soluciones empleadas

1.) Tampón para solubilizar las muestras.

Se compone de:

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

2.) Solución de acrilamida-bisacrilamida.

Está formada por:

Acrilamida	14,6	g
N,N'-metilén-bisacrilamida	0,4	g
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
SDS (10 %)	0,3	ml
Persulfato amónico (10 %)	0,15	ml
TEMED	15,0	μ l

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	10,0 µl

5.) Tampón de electroforesis.

Consta de:

Tris base	6,6 g
Glicina	28,8 g
SDS	2,0 g
Agua destilada	2,2 l

6.) Solución de tinción.

Está formado por:

Acido acético	10,0 ml
Alcohol metílico	40,0 ml
Agua destilada	50,0 ml
Azul de coomasie	0,25 g

7.) Solución desteñidora

Se compone de:

Acido acético	10,0 ml
Alcohol metílico	40,0 ml

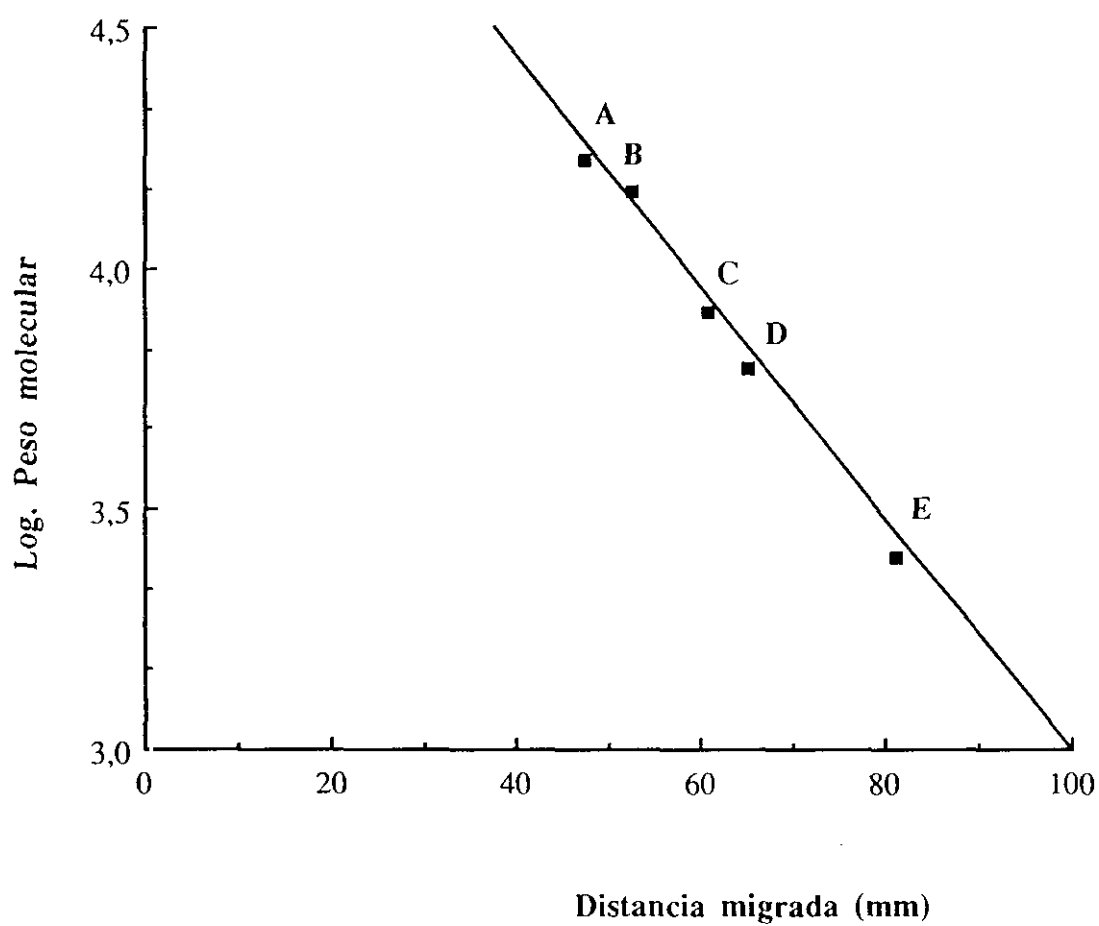


Figura 3. 8.- Recta patrón para la determinación del peso molecular por la técnica de Swank y Munkres. Patrones de bajo peso molecular; (A) Mioglobina, (B) Mioglobina I y II, (C) Mioglobina I, (D) Mioglobina II y (E) Mioglobina III.

Agua destilada 50,0 ml

8 .) Solución de fijación:

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

III. 2. 9. 6. 2. 2. - Preparación de las muestras

Cinco, 10 y 15 µg de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada se disolvieron y 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. 9. 6. 2. 3. - Preparación de los geles y electroforesis

Tanto la preparación de los geles como la electroforesis correspondiente se realizó de la manera descrita en las secciones III. 2. 9. 6. 1. 3. y III. 2. 9. 6. 1. 4.

III. 2. 9. 6. 2. 4. - Tinción de los geles

III. 2. 9. 6. 2. 4. 1. - Técnica del nitrato de plata

Los geles se tiñeron con el reactivo de nitrato de plata distribuido comercialmente por la casa Bio-Rad. Este reactivo, elaborado según el método de Merrill y col. (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. 9. 6. 2. 5. - Determinación del peso molecular

El peso molecular 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 bajo peso molecular descritas en la sección III. 2. 9. 6. 1. 6.

III. 2. 9. 7. - Determinación de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La determinación de la composición aminoacídica se realizó según la técnica descrita por Beaver y col (1986).

III. 2. 9. 7. 1. - Tampones y reactivos

1.) Solución A: tampón acetato-trietilamina, de pH 6,8

a) Solución de acetato sódico 0,03M.

Disolver 2,46 g de acetato sódico en 1 litro de agua destilada.

b) Solución de trietilamina al 0,05% v/v.

Diluir 0,5 ml de trietilamina en 1 litro de agua destilada.

Procedimiento:

Mezclar ambas soluciones hasta obtener un pH de 6,8.

2.) Solución B: acetonitrilo al 90%.

A 900 ml de acetonitrilo de calidad HPLC, añadirle agua Milli-Q hasta 1 litro.

3.) Solución de acetonitrilo en tampón fosfato 0,5M, de pH 7,4

a) Solución de fosfato sódico dibásico, 0,5M

Disolver 7 g de fosfato sódico dibásico en 100 ml de agua destilada.

b) Solución de fosfato sódico monobásico, 0,5M

Disolver 6,8 g de fosfato sódico monobásico en 100 ml de agua destilada.

Procedimiento

Añadir solución b) a la a) hasta obtener un pH de 7,4. La solución así obtenida se filtra por un filtro de 0,45 μm de diámetro de poro y se añade acetonitrilo calidad HPLC hasta una proporción del 5% (v/v).

4.) Solución de fenilisotiocianato

Contiene:	μl
Alcohol etílico	500
Trietilamina	350

Fenilisotiocianato	100
Agua destilada	50

III. 2. 9. 7. 2 - Digestión ácida de la muestra problema

En viales de vidrio (10 x 30 mm) que se cerraron herméticamente al vacío, se colocaron previamente 10 mg de proteína de la sustancia antimicrobiana (sección III. 2. 8. 1.), disuelta en 1 ml de HCl 6 N; a continuación se calentaron a 120 °C durante 24 horas para realizar la hidrólisis ácida de la muestra. Una vez hidrolizada se liofiliza y el liofilizado obtenido después se resuspende en 750 µl de HCl 0,2N y se le añaden 100 µl de una solución acuosa de norleucina al 1% (p/v) en agua Milli-Q. Este aminoácido, que no se encuentra normalmente en las muestras, actúa como patrón interno.

III. 2. 9. 7. 3. - Preparación de los patrones

De cada uno de los aminoácidos patrón y de la norleucina se pesaron 10 mg, que se disolvieron en 10 ml de una solución de 0,2N HCl. Los aminoácidos patrón empleados fueron los contenidos en un "kit" comercial de la casa Sigma.

III. 2. 9. 7. 4. - Derivatización de los aminoácidos

Tanto la solución de aminoácidos procedente de la hidrólisis de la sustancia antimicrobiana como la de los aminoácidos patrón, se derivatizaron haciéndolas reaccionar durante 10 minutos en el doble de volumen de la solución de derivatización de Etanol:Trietilamina: Fenilisotiocinato (7:2:1). Una vez terminada la reacción, el medio líquido se evaporó en corriente de N₂. El material desecado resultante se resuspendió en una solución de acetonitrilo en tampón fosfato 0,5M, de pH 7,4.

III. 2. 9. 7. 5. - Técnica de la cromatografía en HPLC

En un cromatógrafo HPLC dotado de una columna de fase reversa (Supelco 18c) termostatada a 35 °C se inyectaron alícuotas de 20 µl de la solución problema y de los aminoácidos patrón derivatizados. La fase móvil estaba constituida por un gradiente de la Solución B en la A (tabla III. 2) y la detección de los aminoácidos derivatizados se realizó determinando su absorbancia a 254 nm. La composición aminoacídica, cualitativa y cuantitativa, de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada se determinó comparando el cromatograma obtenido con el de los aminoácidos patrón.

Tabla III. 2.- Condiciones de trabajo para la determinación, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% de B en A	Duración (min)
0	1	4	0
0,5	1	6	5
5,5	1	15,5	9,5
15	1	35	7
22	1	38,5	10
32	1,5	99	5

III. 2. 10. - Mecanismo de acción de la sustancia inhibidora de *L. sake* 148

Su determinación se realizó esencialmente de la forma descrita por Schillinger y Lücke (1989). Se procedió como sigue: El sobrenadante de un cultivo de *L. sake* 148, crecido en medio MRS, se concentró unas 20 veces.

De este concentrado se tomó una alícuota de 0,5 ml que se vertió en 5 ml de medio MRS o BHI (dependiendo del microorganismo indicador utilizado) recién inoculado con un microorganismo indicador; la concentración del inóculo fué en todos los casos de unas 5×10^5 ufc/ml.

Como microorganismos indicadores se emplearon los siguientes: *L. fermentum* CECT285, *L. curvatus* CECT726, *Car. divergens* LV13, *Leu. mesenteroides* CECT394, *L. monocytogenes* NCTC5105, *L. monocytogenes* LI5 sv 1/2, *L. monocytogenes* Scott A, *S. typhimurium* T91, *Y. enterocolitica* E20, *S. aureus* FRI137, *S. aureus* FRI361 y *C. botulinum* CECT551, *C. perfringens* CECT376. Los cultivos se incubaron, a 32 °C o 37 °C y en aerobiosis o anaerobiosis según el microorganismo indicador, durante 5 h y, a continuación, se hicieron los correspondientes recuentos microbianos depositando alícuotas de 100 µl de dicho cultivo en placas de MRS o BHI. Como control se realizó una experiencia similar en la que al microorganismo indicador se le añadieron 0,5 ml del sobrenadante concentrado de un cultivo de *L. sake* 23, microorganismo cuyo sobrenadante concentrado no mostraba ninguna actividad inhibidora detectable.

El mecanismo de acción de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 sería bactericida si se observase una disminución de la viabilidad del microorganismo indicador y bacteriostática, si las ufc/ml del microorganismo indicador permanecieran constantes respecto de su valor inicial.

III. 2. 11. - Concentración inhibidora mínima de la sustancia antimicrobiana en diversos microorganismos indicadores

Para determinar la concentración inhibidora mínima (CIM), se preparó una solución de la proteína purificada en tampón de fosfato 4 mM, de pH 7,0 a una concentración de 8 mg/ml; a continuación se diluyó 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. Los microorganismos indicadores empleados fueron *L. fermentum* CECT285, *C. divergens* LV13, *L. monocytogenes* 7973, LI5 sv 1/2 y Scott A, *S. aureus* FRI 137, FRI 349 y FRI 362, *C. botulinum* 551 y *C. perfringens* 376.

La concentración inhibidora mínima (CIM), se define como la concentración mínima de proteína que produce un halo de inhibición en el medio sólido de crecimiento del microorganismo indicador empleado. En este ensayo, únicamente se consideraron como halos de inhibición aquéllos cuya corona circular tenía un radio mayor de 1 mm.

III. 2. 12. - Métodos inmunológicos

III. 2. 12. 1. - Obtención de los inmunosueros

La sustancia responsable de la actividad inhibidora de *L. sake* 148 (sección III. 2. 8. 1), se empleó para la inmunización de conejos con el fin de obtener los correspondientes inmunosueros portadores de anticuerpos.

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

Como animales de experimentación se emplearon 2 conejos machos de la raza "New

Zealand" de 2,5-3 Kg de peso a los que se inoculó la sustancia inhibidora parcialmente purificada. Depilada y desinfectada (con alcohol) la zona de inoculación se inyectaron subcutáneamente a los conejos, en ambos lados de la espina dorsal, comenzando por la zona más proxima a la región cervical. Como inóculo se emplearon 1-4 mg del antígeno (sustancia inhibidora parcialmente purificada), 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 llevaron a cabo durante un periodo de 91 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 los antígenos utilizados. Asimismo a los 21, 42, 63, 84 y a los 91 días del proceso de inmunización y, con el fin de verificar la efectividad de dicho proceso, se realizaron sangrías parciales (S_1 , S_2 , S_3 y S_4).

En las sangrias parciales la sangre se obtuvo de la vena marginal de la oreja, según el siguiente procedimiento: El animal se introducía en una caja, de la que sobresalía la cabeza, para inmovilizarlo; la zona elegida de la oreja se frotaba con algodón empapado en xilol para producir una vasodilatación que favoreciera la sangría y, a continuación, se efectuaba una punción con aguja o bien se seccionaba el vaso cuidadosamente con bisturí, recogiénose por goteo de 5 a 10 ml de sangre.

III. 2. 12. 1. 2. - Sangría final

Después de anestesiado el animal por vía intramuscular con Ketolar (clorhidrato de ketamina) a una dosis de 10 mg/kg de peso, se colocaba en una mesa en posición de decúbito supino y se inmovilizaba por las 4 extremidades.

Tabla III. 3. - Pauta de inmunización de los conejos por inoculación subcutánea de la sustancia con actividad antimicrobiana de *L. sake* 148

Días	Extracto antigénico (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	S ₃
70	3	—	0,5	—
77	4	—	0,5	—
84	4	—	0,5	S ₄
91	—	—	0,5	S _f

S₀ = sangría inicial

S₁ = sangría parcial día 21

S₂ = sangría parcial día 42

S₃ = sangría parcial día 63

S₄ = sangría parcial día 84

S_f = sangría final día 91

Una vez depilada y desinfectada perfectamente la zona cervical inferior, con el material quirúrgico apropiado se practicaban las incisiones cutáneas siguientes:

- a) longitudinal a lo largo de la línea media ventral
- b) transversal a nivel de la segunda vertebra cervical
- c) transversal a nivel de la sexta vertebra cervical

A continuación se disecan los músculos ventrales del cuello visibles en este 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*.

Por el borde lateral del *Ms. sternothyroideus* se diseca en profundidad hasta llegar al paquete vásculo-nervioso situado a uno y otro lado de la tráquea (*A. carotis comunis*, *V. jugularis* y *Truncus vagosympathicus*). Se diseca la *A. carotis comunis* y con una pinza de tipo "mosquito" se fija el *N. vagus*, que continúa 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 de sangre, se recomienda aplicar un masaje cardiaco con el fin de conseguir el mayor volumen de sangre posible. De cada animal se recogieron de 120 a 150 ml de sangre cuando la sangría final se realizaba según las normas señaladas.

III. 2. 12. 1. 3. - Obtención y conservación del suero

La sangre obtenida se trasvasa lentamente a un tubo de centrífuga, a fin de evitar su hemólisis, y se centrifuga a 2.000 g durante 10 minutos. A continuación, el coágulo formado se desprende de las paredes laterales con una espátula o aguja y el sobrenadante se recoge con

una jeringa. En caso de requerirlo, el sobrenadante se centrifuga de nuevo. Una vez obtenido el suero se distribuye en fracciones de 2 ml en viales, añadiéndoles una o dos gotas de una solución de azida de sodio al 0,01 % que actúa como agente conservador. El suero se mantiene en congelación a -20 °C hasta su utilización posterior.

III. 2. 12. 2. - Inmunodifusión en geles de agarosa

Esta técnica, que permite visualizar la interacción entre antígenos y anticuerpos, se basa en su difusión por un medio semisólido (agarosa). Si ambos se corresponden, se forma una línea de precipitación cuya posición dependerá del coeficiente de difusión de los antígenos y anticuerpos, de sus respectivas concentraciones y del tiempo de reacción.

En este trabajo se ha empleado la técnica de inmunodifusión doble descrita por Ouchterlony (1949), que permite verificar el proceso de inmunización de los animales de experimentación y la correspondencia inmunológica entre los inmunosueros obtenidos y los extractos antigénicos de interés.

Los extractos antigénicos utilizados fueron el sobrenadante neutralizado y concentrado de *L. sake* 148 (sección III. 2. 3. 3. 1.) y la sustancia responsable de su actividad inhibidora obtenida tal y como se describe en la sección III. 2. 8.

III. 2. 12. 2. 1. - Preparación del gel

El gel se preparaba inmediatamente antes de usarlo, constaba de agarosa al 1% en solución de cloruro sódico al 0,85% (Suero fisiológico salino); se le adicionaba como agente conservador un 0,01% de azida de sodio. Para prepararlo, la solución de agarosa en el suero salino se calentaba con agitación hasta ebullición, añadiendo a continuación la solución de

azida de sodio.

III. 2. 12. 2. 2. - Preparación de la placas de inmunodifusión

Se utilizaron portaobjetos de vidrio de 7.5 x 5 cm que se situaban sobre una mesa niveladora depositando sobre cada uno de ellos 6 ml de la solución de agarosa caliente. Una vez solidificada la agarosa, con la ayuda de moldes metálicos de sección circular, se realizaron excavaciones: una central, de 12 mm de diámetro y 6 periféricas, dispuestas en forma de roseta de 6 mm de diámetro que deistaban de la central 7 mm. Seguidamente, y con ayuda de una aguja, se retiraron cuidadosamente los discos de agarosa añadiendo a continuación un par de gotas de agarosa fundida en el fondo de los pocillos formados y evitar así posibles anomalías en la difusión de los anticuerpos.

III. 2. 12. 2. 3. - Llenado de los pocillos e incubación de las placas

Preparadas las placas de inmunodifusión se depositaron 150 µl del inmunosuero en el pocillo central y 50 µl de los extractos antigénicos en los pocillos periféricos. A continuación se colocaron en unas bandejas que se introdujeron en una cubeta que contenía de 5 a 10 ml de una solución de azida de sodio al 1%: de esta forma, además de inhibir el crecimiento microbiano, se mantenía la humedad de la cubeta que, por último, se tapaba y se mantenía durante 18-24 horas a 37 °C.

III. 2. 12. 2. 4. - Lavado y secado de los geles

Una vez incubadas, las placas se lavaron en solución salina al 0,85% durante 48 horas a temperatura ambiente; la solución de lavado se cambió tres veces cada día y el último lavado se realizó con agua destilada; la superficie de las placas se secó con una tira de papel de filtro

Whatman nº 1 procurando eliminar las burbujas de aire que se sitúan entre el gel y el papel. Una vez seco el gel, el papel se desprende con facilidad de la superficie de la placa.

III. 2. 12. 2. 5. - Tinción

Tuvo lugar sumergiendo los portaobjetos durante 2 horas en una solución formada por 90 partes de metanol, 10 de ácido acético y un gramo de negro amida 10B (Merck). Posteriormente se lavan 30 minutos con una solución de ácido acético al 5%, tras lo cual el último se arrastra con lavados repetidos de agua destilada.

III. 2. 12. 3. - Técnicas inmunoenzimáticas

III. 2. 12. 3. 1. - Técnica del ELISA indirecto

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

III. 2. 12. 3. 2. - Técnica del ELISA indirecto clásico

En esta técnica los antígenos se inmovilizan por adsorción pasiva en una superficie inerte; los anticuerpos específicos reconocen a sus correspondientes antígenos 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) Antígenos:

Como antígenos se emplearon la actividad antimicrobiana de *L. sake* 148 parcialmente purificada (obtenida tal y como se describe en la sección III. 2. 8. 1.) así como los sobrenadantes libres de células de *L. sake* 148 y de una cepa (*L. sake* 23), que no manifiesta ninguna actividad antimicrobiana detectable; en ambos su desarrollo se llevó a cabo en MM-Triptosa y en MRS.

b) Anticuerpos

Se utilizó el inmunosuero total obtenido al inmunizar los conejos con la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada.

c) Conjugado

El conjugado utilizado fué uno comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo, obtenidas en macho cabrio, y marcadas con el enzima 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 (12 H ₂ O)	2,9	g
KCl	0,2	g

Agua destilada hasta	1000	ml
----------------------	------	----

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 Na_2HPO_4 0,2M, 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 ácido 2-2'-azino-bis-3-etil benzotiazolina sulfónico (ABTS) (Sigma) en agua destilada a una concentración de 15 mg/ml 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_2O_2 (30% en peso)	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:

Los pocillos de las placas de ELISA (Costar 3590) se llenaron con 100 µl de una solución de la sustancia inhibidora en tampón PBS, de pH 7,2 o con 100 µl de los sobrenadantes de los cultivos de interés. Las placas se incubaron durante una hora a 37 °C, tras lo cual se lavaron 5 veces con PBST para eliminar el exceso de antígeno no adsorbido en los pocillos.

Una vez secas las placas y, para tapizar las zonas del pocillo en las que no se hubiese adsorbido el antígeno, se añadieron a cada pocillo 200 µl de gelatina al 1% en PBS, incubándose las placas durante una hora a 37 °C. Después de lavadas otras cinco veces con PBST, se añadieron a los pocillos 100 µl de suero de conejo diluido en PBST; las placas se incubaron en un agitador de placas de ELISA durante una hora a temperatura ambiente.

Terminada la incubación, se lavaron de nuevo cinco veces con PBST para eliminar los complejos antígeno-anticuerpo formados en la neutralización y los restos de anticuerpo que no hubieran reaccionado. Seguidamente se adicionaron a los pocillos 100 µl del conjugado anti-conejo diluido en PBST y, de nuevo, se incubaron las placas durante una hora a temperatura ambiente en el agitador.

Tras lavar las placas cinco veces con agua destilada para eliminar los restos de conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 150 μ l del sustrato y las placas se incubaron en el agitador durante 45 minutos a temperatura ambiente; inmediatamente se para la reacción adicionando 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.

Además, en la prueba descrita se realizaban siempre 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. 3. 3. - Técnica del ELISA indirecto utilizando el sistema de amplificación biotina-avidina

Se diferencia de la técnica anterior en que los anticuerpos procedentes de la inmunización de los conejos se conjugan con la biotina, y en que la detección del complejo antígeno-anticuerpo/biotina se realiza con un conjugado de avidina o de estreptavidina 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 elevadísima 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 por un conjugado de avidina-enzima, en lugar de por las anti-inmunoglobulinas de la especie de la que procede el anticuerpo unido al enzima.

III. 2. 12. 3. 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 inmunosero

1) Tampones y reactivos

a) Solución saturada de Sulfato amónico

Se obtiene disolviendo 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 a través de un papel de filtro Whatman nº1 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. 2. d.) 1.)

Procedimiento

25 ml del suero procedente de los conejos inmunizados se centrifugaron a 3.000 g durante 30 minutos. Al sobrenadante obtenido se le añadió un volumen igual de solución saturada de sulfato amónico y se dejó reposar a 4 °C durante 12 h. Pasado este tiempo, se realizó una segunda centrifugación a 3.000 g durante 30 minutos y el precipitado obtenido tras la eliminación del sobrenadante se diluyó en 12,5 ml de tampón PBS. Los anticuerpos así obtenidos se dializaron frente a PBS y se liofilizaron antes de su conjugación con la biotina.

b.) Conjugación de los anticuerpos purificados con la biotina

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

1. Preparar una solución del reactivo de biotina (1 mg/ml de dimetilsulfóxido).
2. En el tampón PBS de pH 7,2, preparar 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. Eliminar la biotina no reaccionante mediante diálisis de la mezcla frente al tampón PBS (16 h a 4 °C).
6. Los anticuerpos conjugados se conservan en fracciones de 0,1 ml a -20 °C hasta el momento de su utilización.

III. 2. 12. 3. 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. 12. 3. 2.), salvo que el conjugado empleado es uno comercial de Estreptavidina-peroxidasa de rábano (Sigma).

CAPITULO IV

RESULTADOS

IV. 1. - Evolución de las bacterias lácticas durante la maduración de un lote de embutidos crudos curados

Cuando se analiza la relación entre carga microbiana total y carga de bacterias lácticas, durante la maduración de un lote de embutidos se observa (Fig. 4.1) un rápido aumento del número de bacterias lácticas que alcanza su punto álgido hacia el sexto día de maduración igualándose con el recuento microbiano total, lo que sugiere que casi la totalidad de los microorganismos de los embutidos crudos madurados pertenecen a este grupo. Los altos recuentos de bacterias lácticas se mantienen, prácticamente sin sufrir modificaciones, a lo largo de la maduración de los embutidos.

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

IV.2.1.- Actividad inhibidora directa

Como ya se ha descrito en la sección III.2.3.1 de este trabajo, durante la maduración de un lote de embutidos crudos se aislaron 30 bacterias lácticas en los días 0, 2, 6, 10, 21 y 35 de maduración, de forma que al final del periodo madurativo se reunieron 180 bacterias cuya actividad antimicrobiana directa se estudió frente a diversos microorganismos indicadores. Los resultados de la prueba directa de antagonismo se reflejan en las figuras 4. 2 a 4. 5. De las mismas se deduce que la actividad inhibidora es distinta en cada cepa analizada, siendo significativamente mayor cuando las bacterias se incubaron en las placas 24 h antes de la incorporación de los microorganismos indicadores.

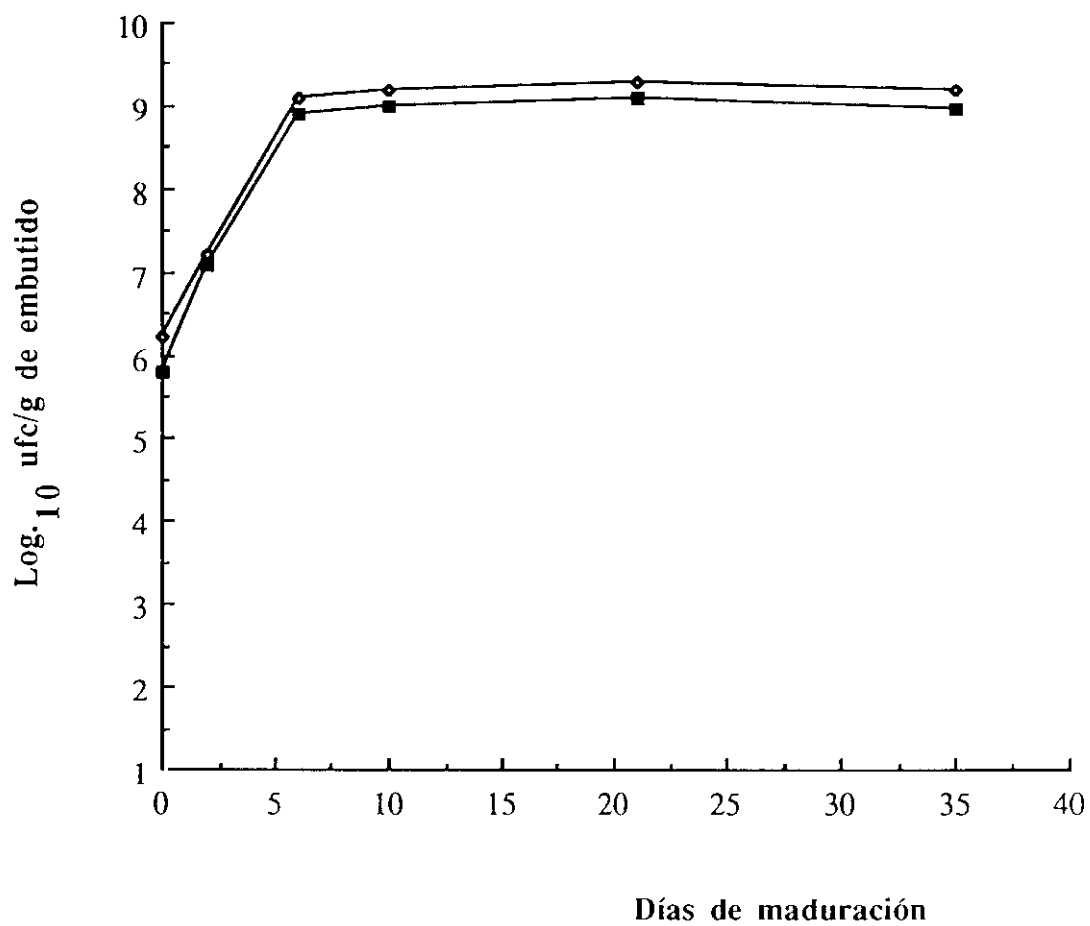


Figura 4. 1.- Evolución de la flora microbiana total (◇), y láctica (■) durante la maduración de los embutidos crudos curados.

La actividad antimicrobiana de las 180 bacterias lácticas seleccionadas se determinó empleando como microorganismos indicadores a *Lactobacillus fermentum* CECT285 (fig. 4. 2), *L. plantarum* CECT221 (fig. 4. 3), *Staphylococcus aureus* CECT59 (fig. 4. 4) y *Salmonella typhimurium* CECT443 (fig. 4. 5). Los resultados obtenidos indican una mayor actividad inhibidora cuando las cepas seleccionadas se enfrentaron a otras bacterias lácticas, tanto cuando crecían simultáneamente como cuando lo hacían 24 h antes de incorporarles el indicador. Frente a las bacterias patógenas como *S. aureus* y *S. typhimurium* no se aprecia una actividad inhibidora definida cuando se desarrollan simultáneamente con ellas, lo que contrasta con lo que ocurre cuando las bacterias lácticas seleccionadas se desarrollan en las placas 24 h antes de la incorporación del indicador.

Es de destacar la presencia de halos de inhibición de bordes nitidos y definidos en algunas de las cepas evaluadas frente a *L. fermentum* y *L. plantarum*. Estas cepas, que parecían poseer un mecanismo de inhibición diferenciado de las demás, representan un 25 % de las analizadas y en las figuras se señalan con un asterisco.

De las 180 cepas estudiadas, se seleccionaron 20 que estaban dotadas de una manifiesta actividad antimicrobiana (halo de bordes nítidos) y 4 cuya actividad era menor. En las figuras 4. 6 a 4. 29 se muestra la actividad antimicrobiana de las 24 cepas frente a *L. brevis* LB826, *L. carnis*, *L. curvatus* LB726, *L. divergens* MR375, *L. farciminis* LB34, *L. sake* LB684, *Leu. mesenteroides* MR364, *M. varians* CECT230, *B. thermosphacta* NCIB10018, *S. faecium* CECT410, *E. coli* LB841, *B. stearothermophilus* CECT49, *E. cloacae* CECT149, *B. cereus* CECT148, *Ps. fluorescens* DC7, *Y. enterocolitica* NC E20, *S. flexnerii* CECT585, *S. faecalis* CECT481, *L. monocytogenes* LI1sv4, *L. fermentum*, *L. plantarum* CECT221, *S. typhimurium* CECT443 y *S. aureus* CECT59. Las actividades inhibidoras observadas son similares a las reseñadas antes y notablemente superiores cuando se emplean como indicadores otras bacterias lácticas.

La mayor parte de las 24 cepas analizadas poseen una actividad antimicrobiana directa claramente cuantificable frente a *Y. enterocolitica* E20 y *S. typhimurium* CECT443 y, sobre todo, frente a *S. aureus* CECT59 y *L. monocytogenes* LI 1sv4, originando en los dos últimos indicadores halos de inhibición definidos y de un diámetro apreciable, similares a los observados frente a las bacterias lácticas. No obstante, frente a otros indicadores, como *B. cereus* CECT148 y *S. flexnerii* CECT585, son pocas las cepas que ejercen acción inhibidora definida.

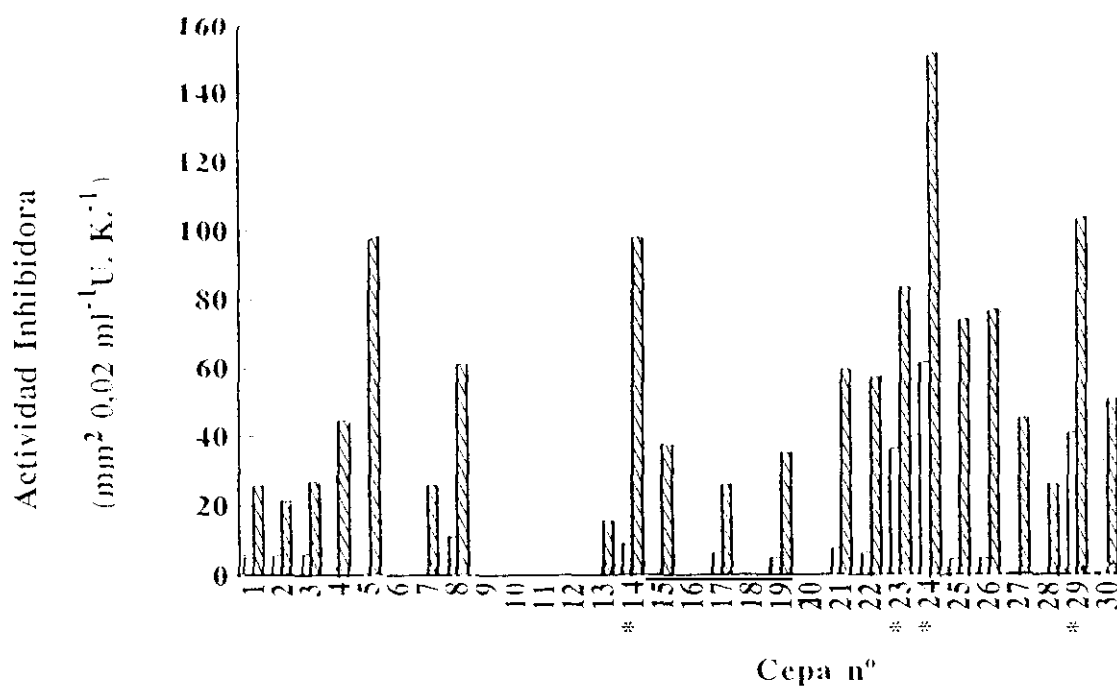


Figura 4. 2(I).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. fermentum* CECT285.

□ Actividad Inhibidora directa. ▨ Actividad Inhibidora diferida.

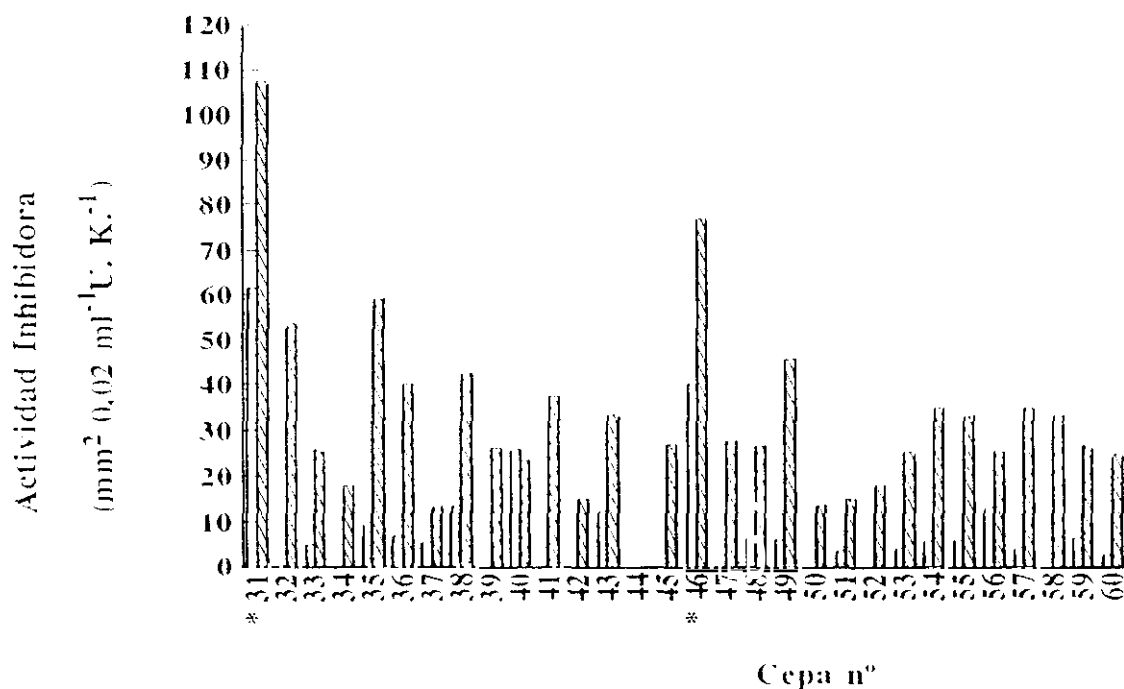


Figura 4. 2(II).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. fermentum* CECT285. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

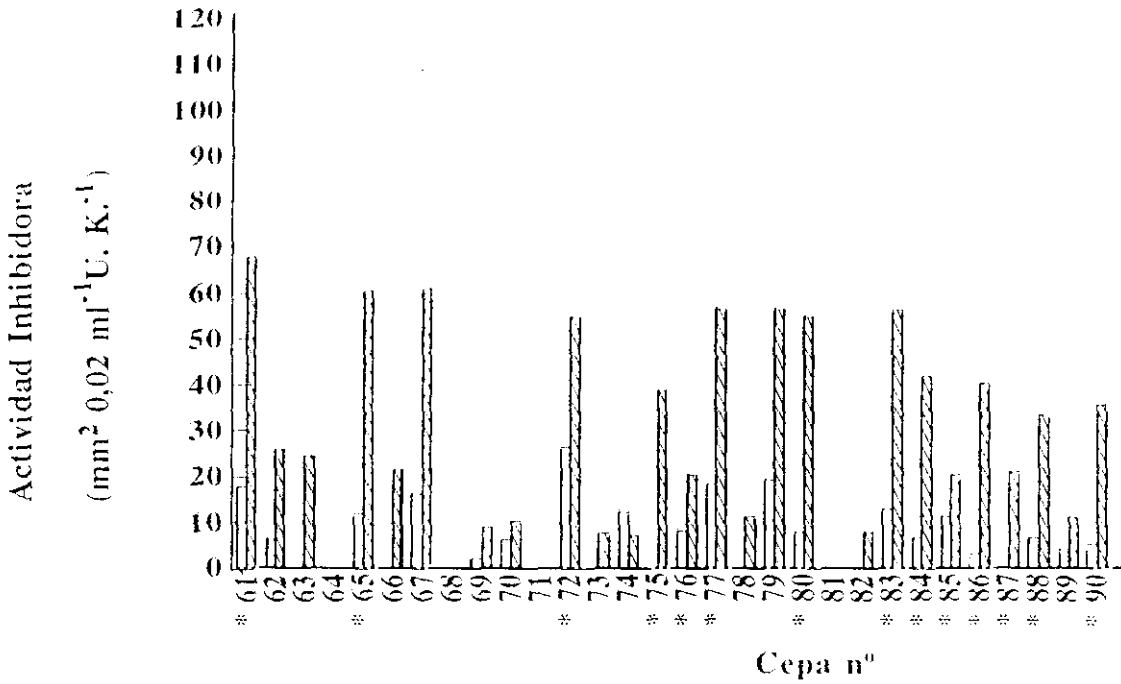


Figura 4. 2(III).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. fermentum* CECT285. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

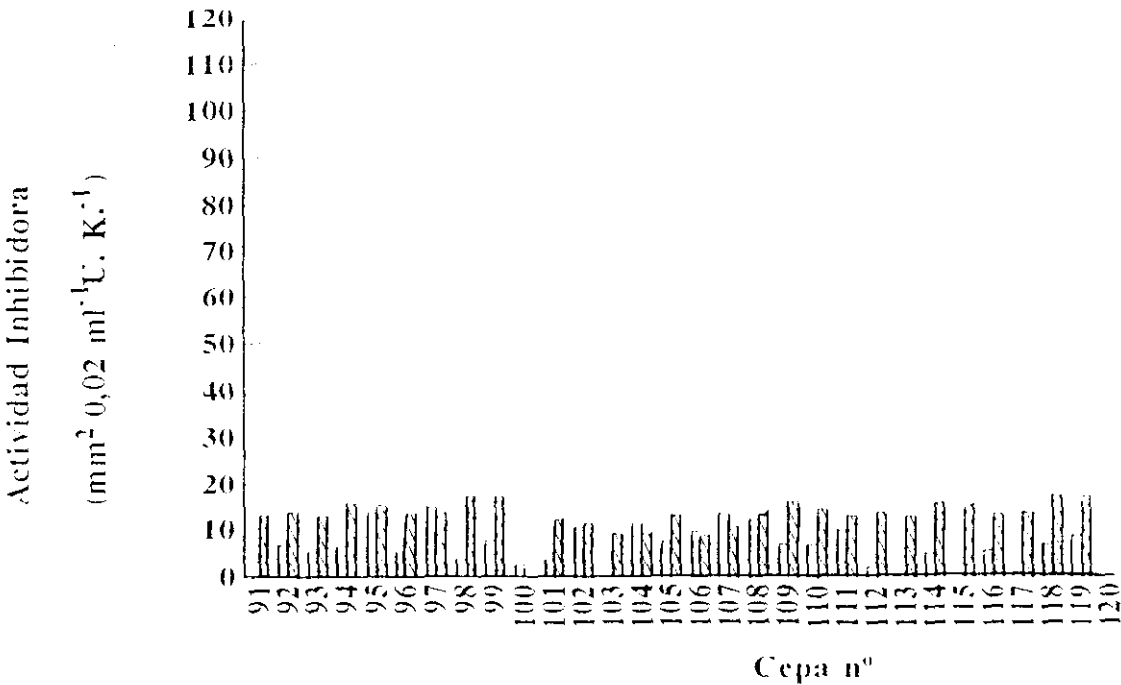


Figura 4. 2(IV).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. fermentum* CECT285. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

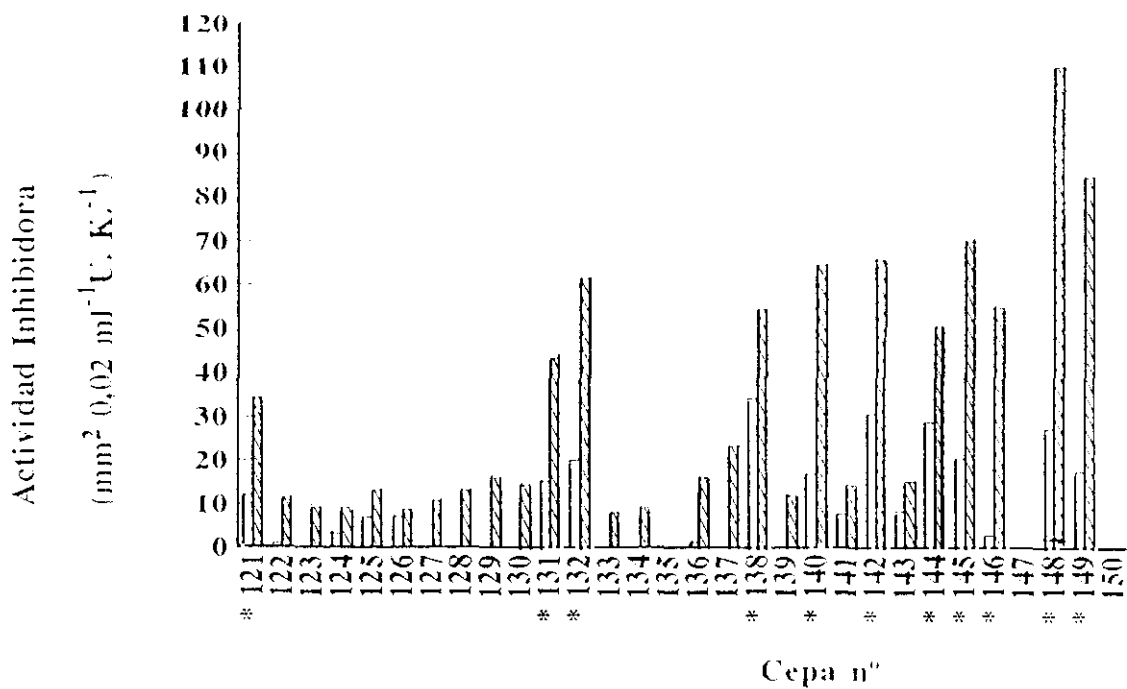


Figura 4. 2(V).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. fermentum* CECT285. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

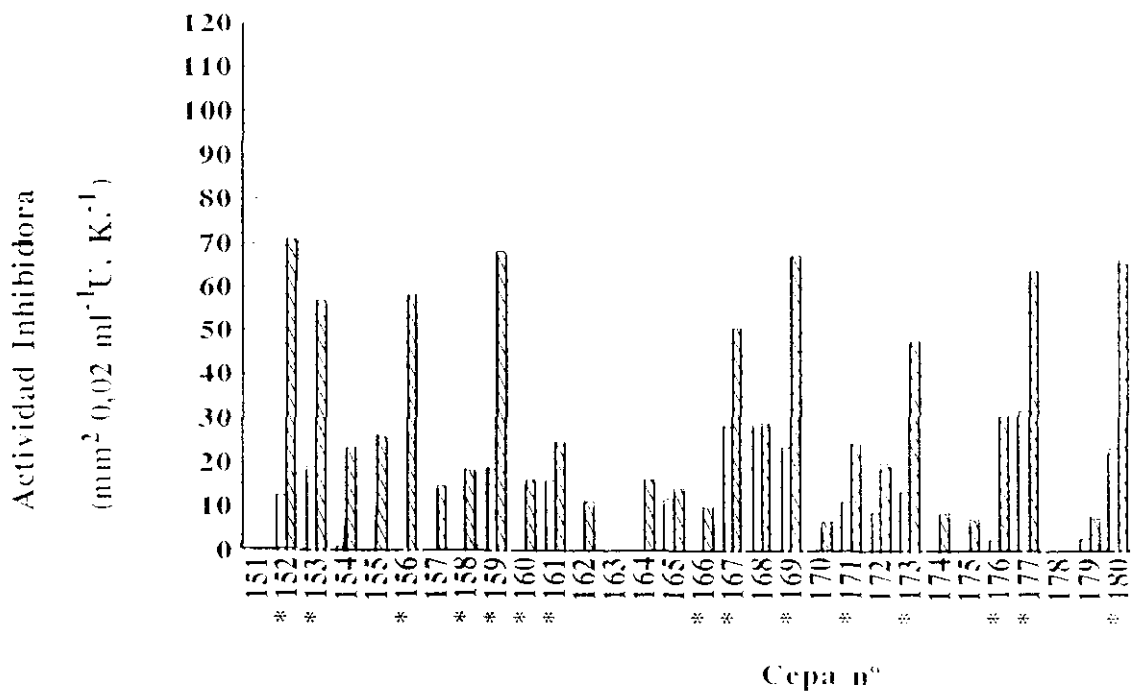


Figura 4. 2(y VI).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. fermentum* CECT285. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

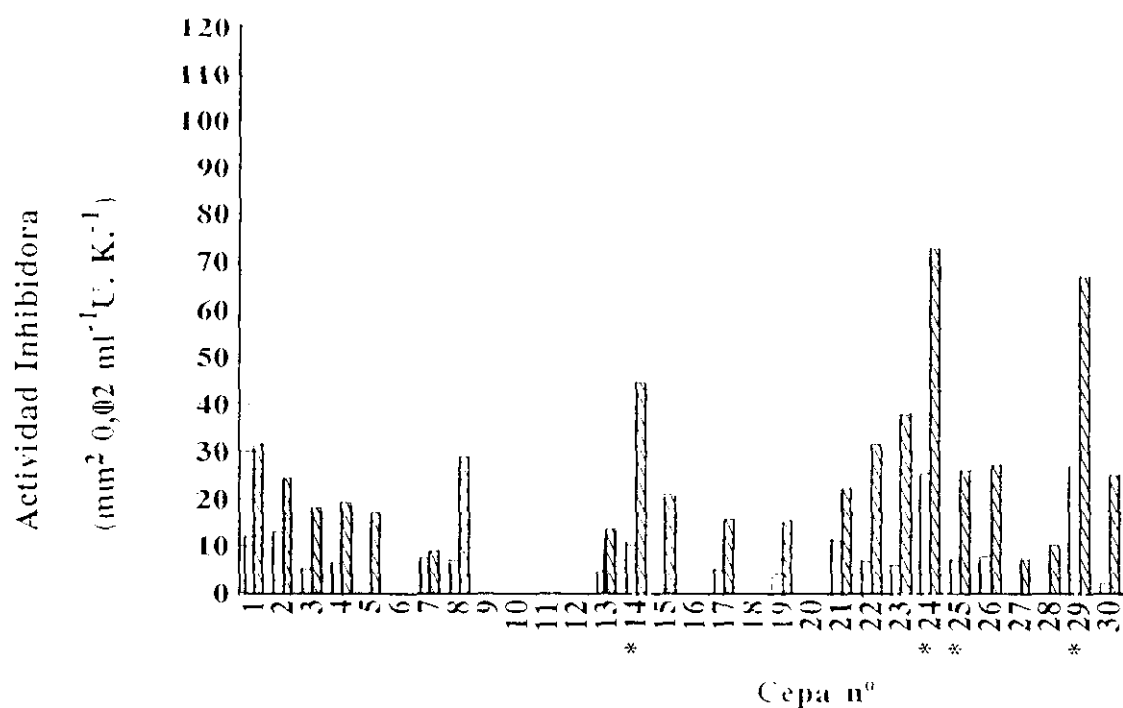


Figura 4. 3(I).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. plantarum* CECT221. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

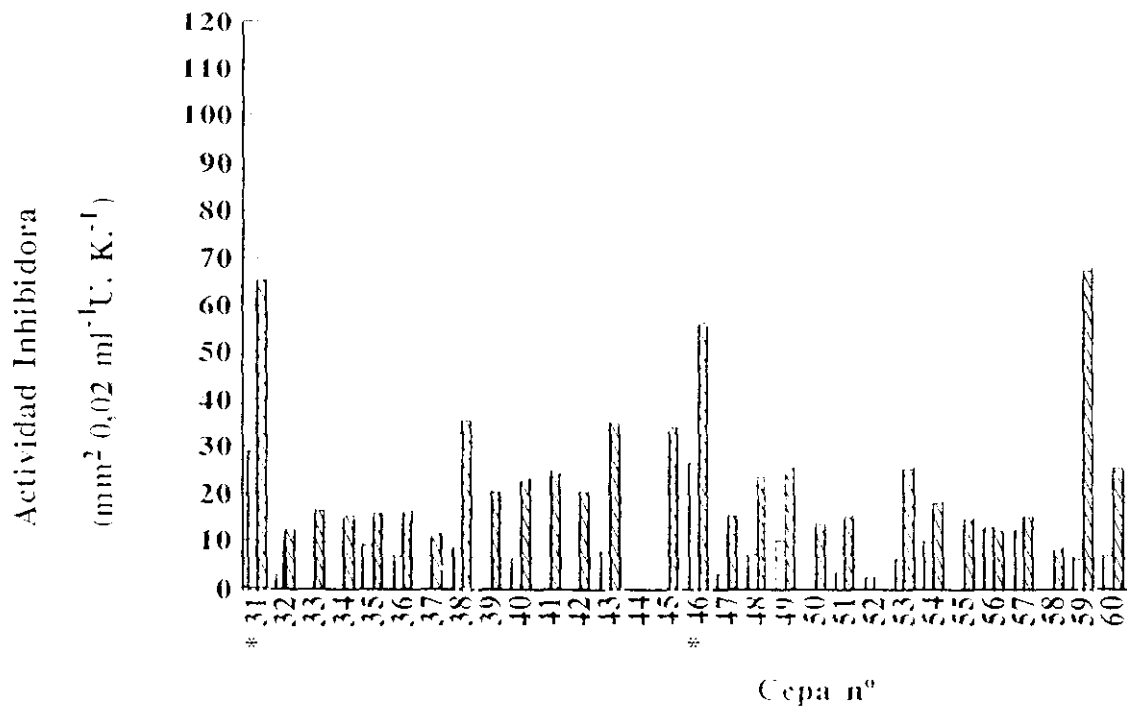


Figura 4. 3(II).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. plantarum* CECT221. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

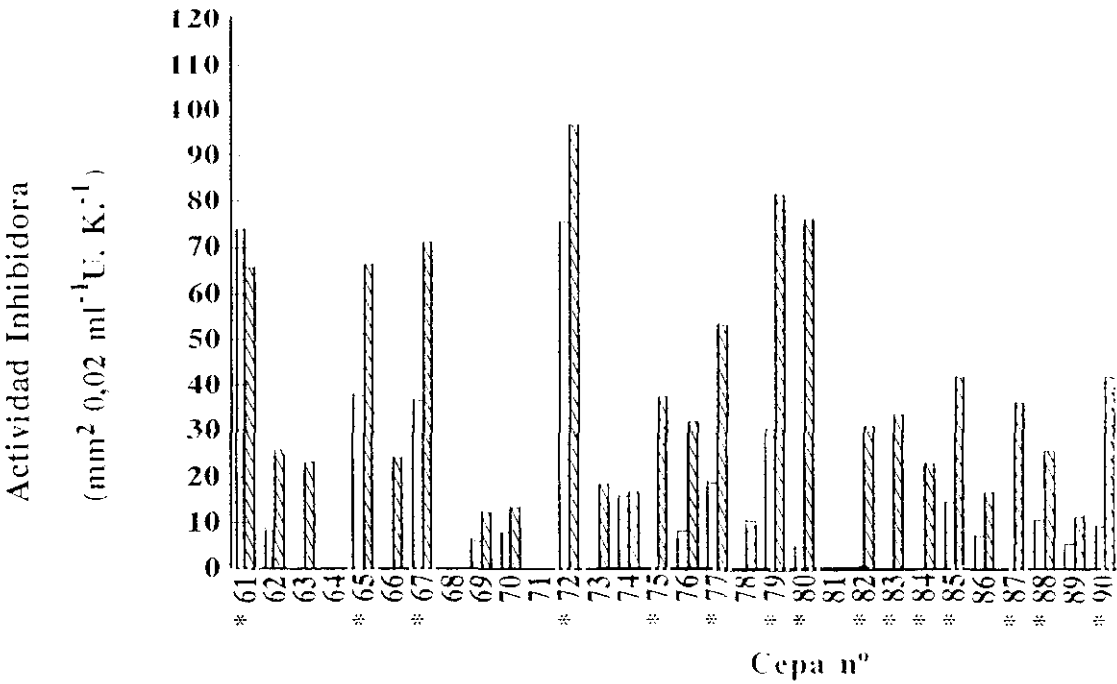


Figura 4. 3(III).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. plantarum* CECT221. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

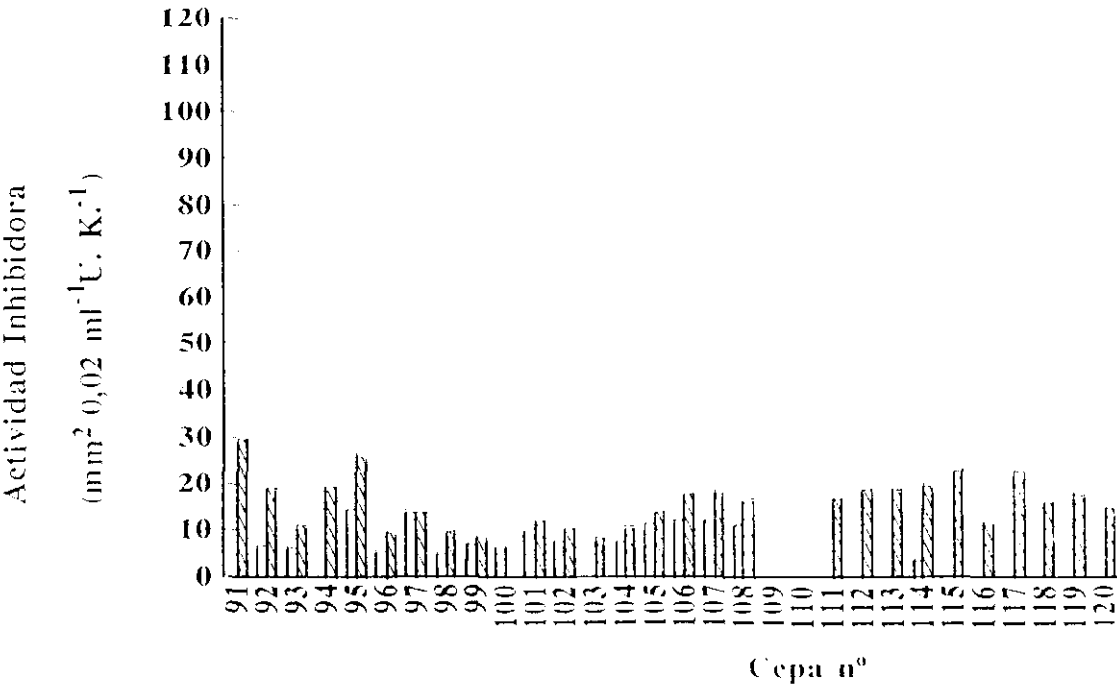


Figura 4. 3(IV).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. plantarum* CECT221. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

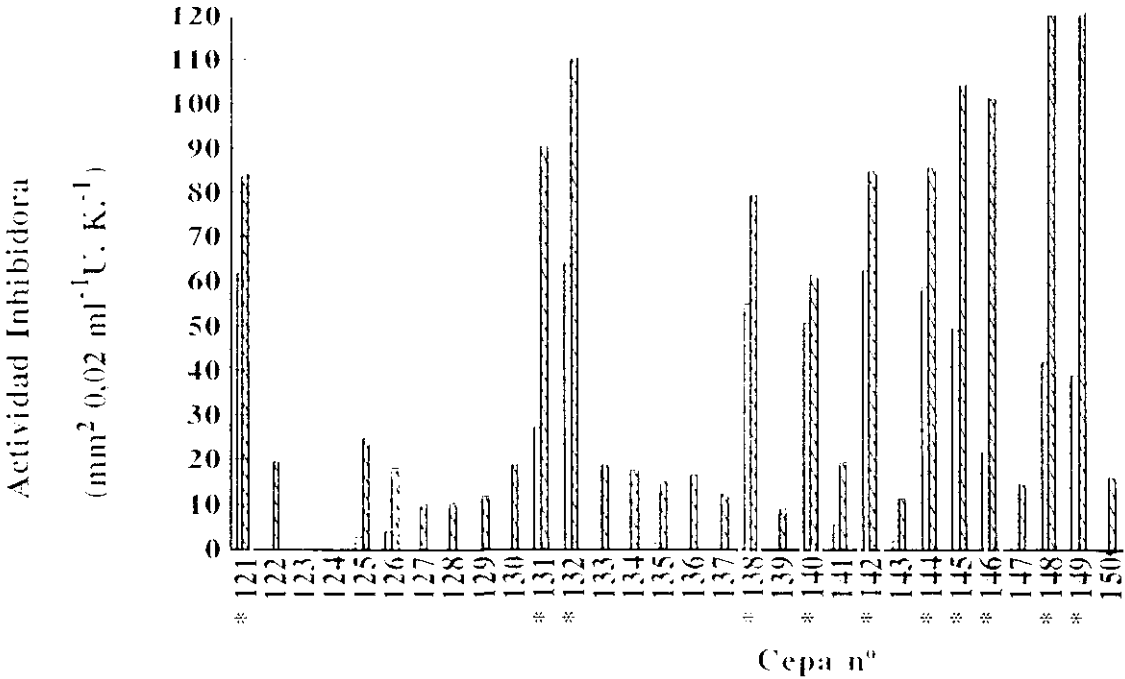


Figura 4. 3(V).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. plantarum* CECT221. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

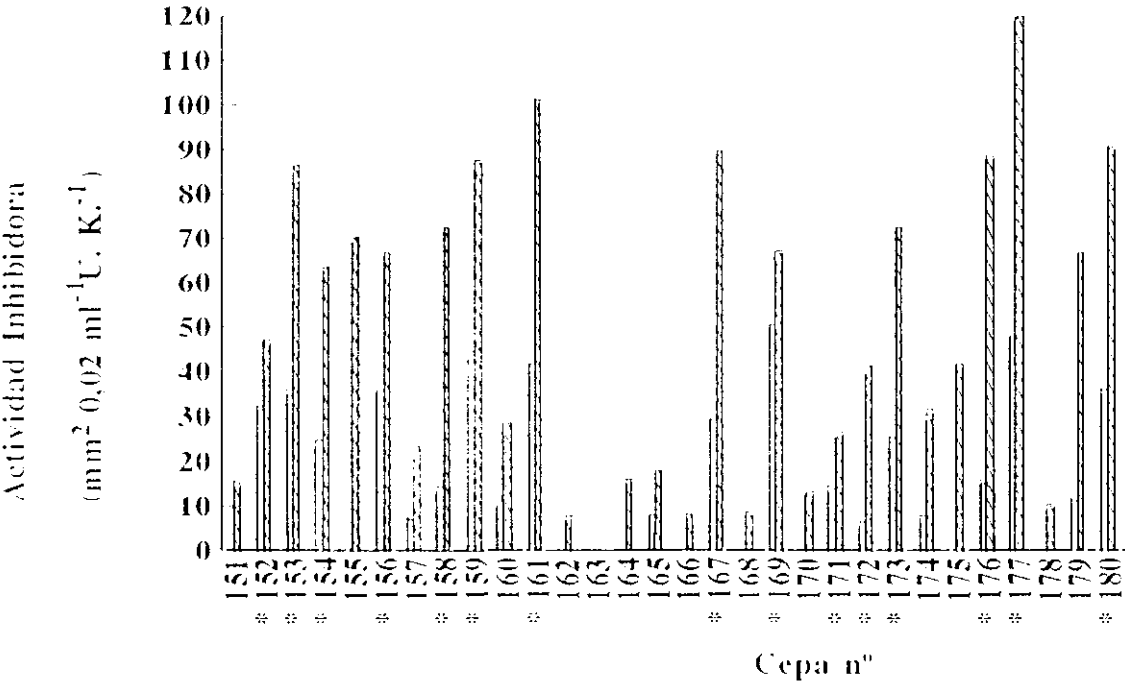


Figura 4. 3(y VI).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. plantarum* CECT221. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

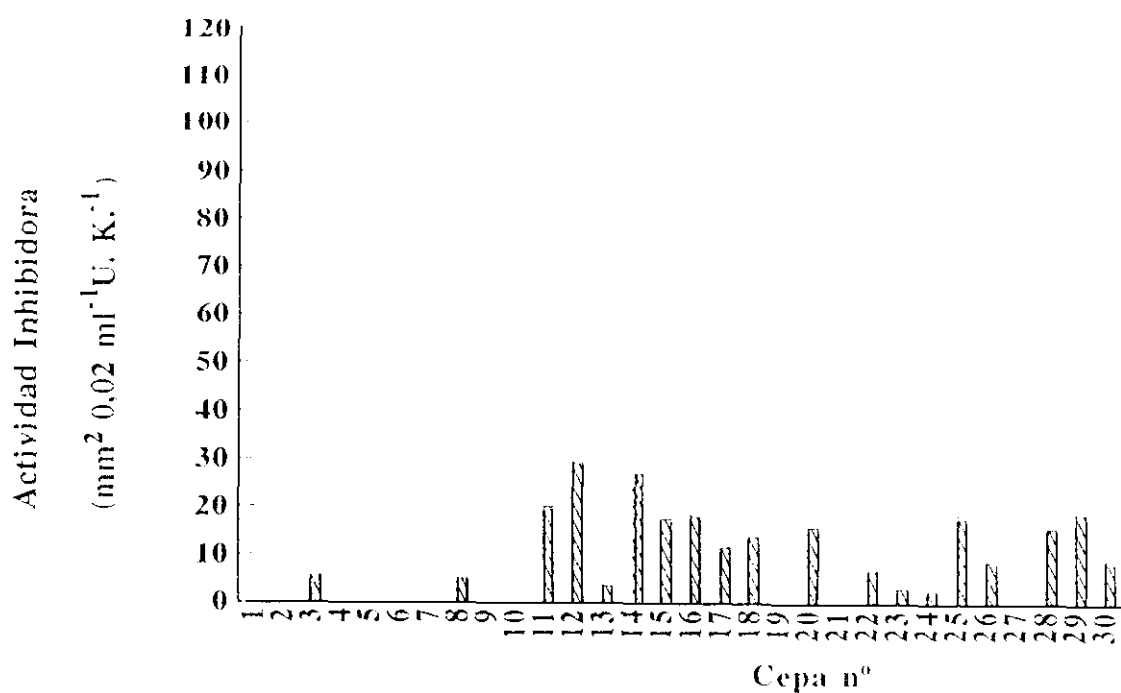


Figura 4. 4(I).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. aureus* CECT59. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

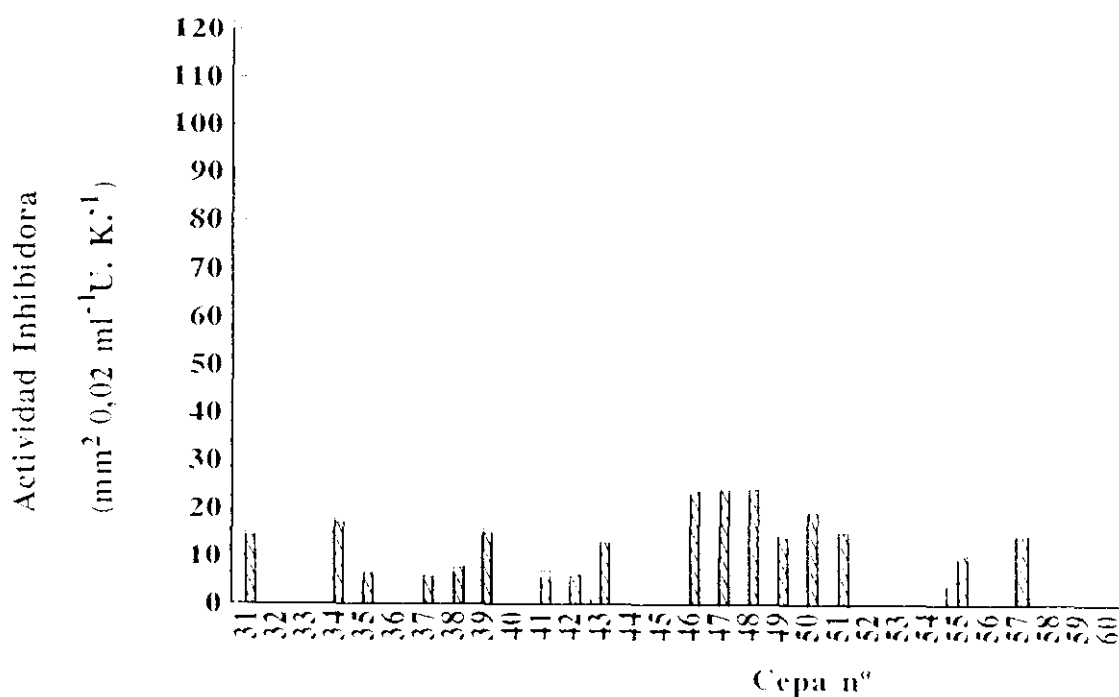


Figura 4. 4(II).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. aureus* CECT59. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

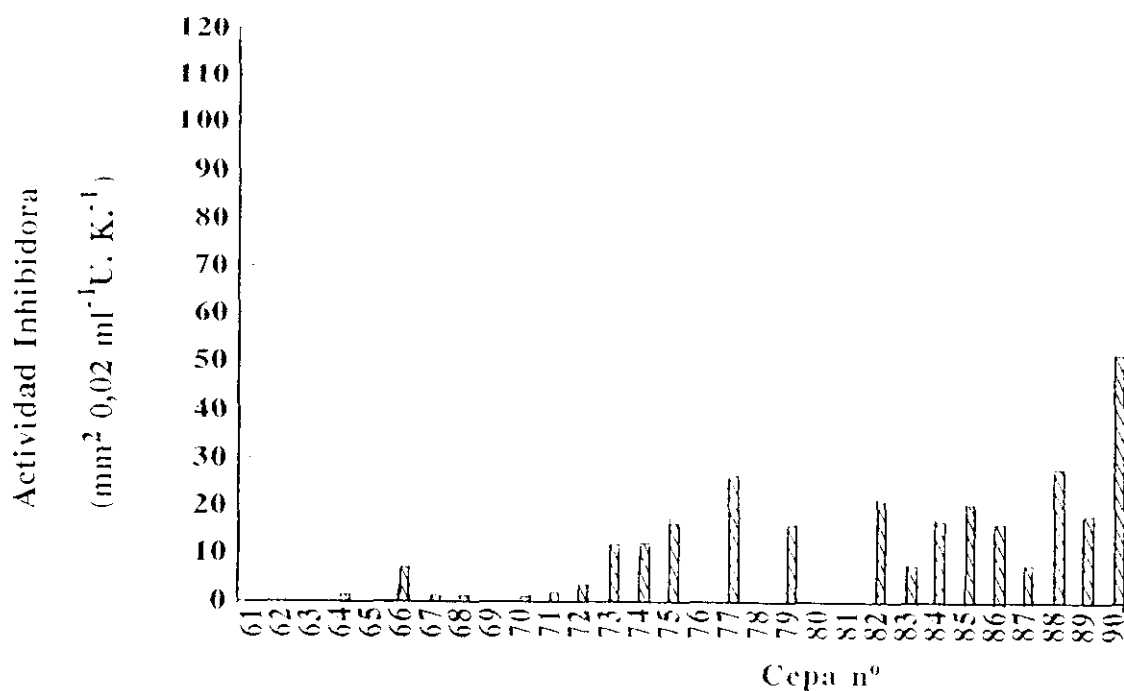


Figura 4. 4(III).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. aureus* CECT59. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

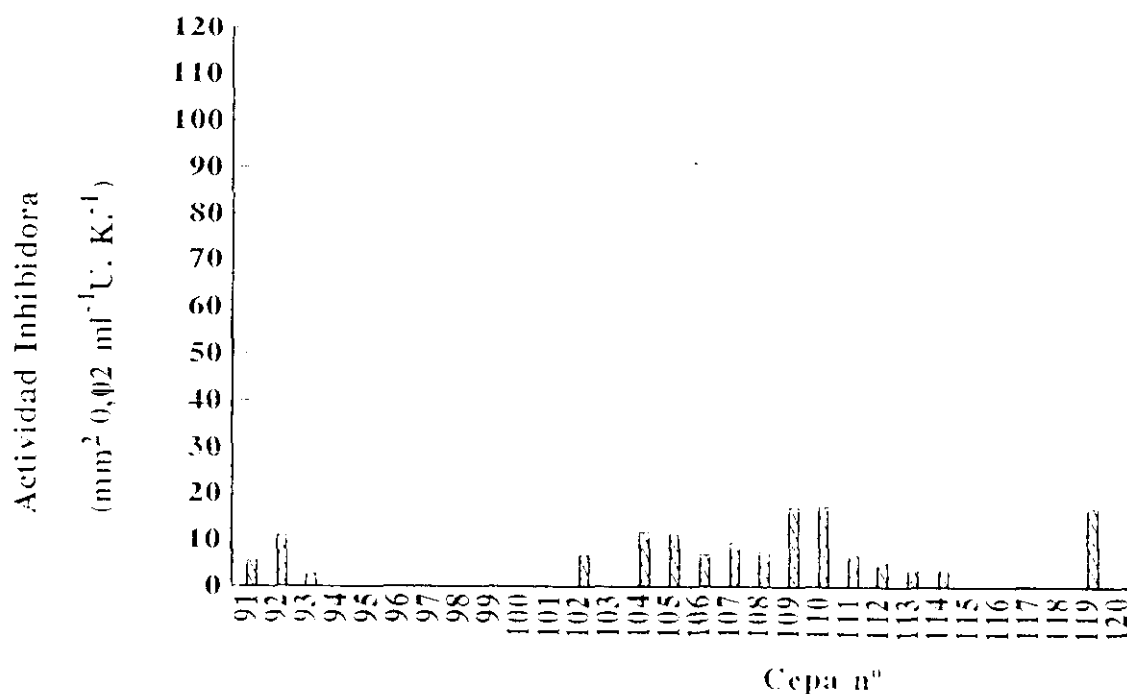


Figura 4. 4(IV).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. aureus* CECT59. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

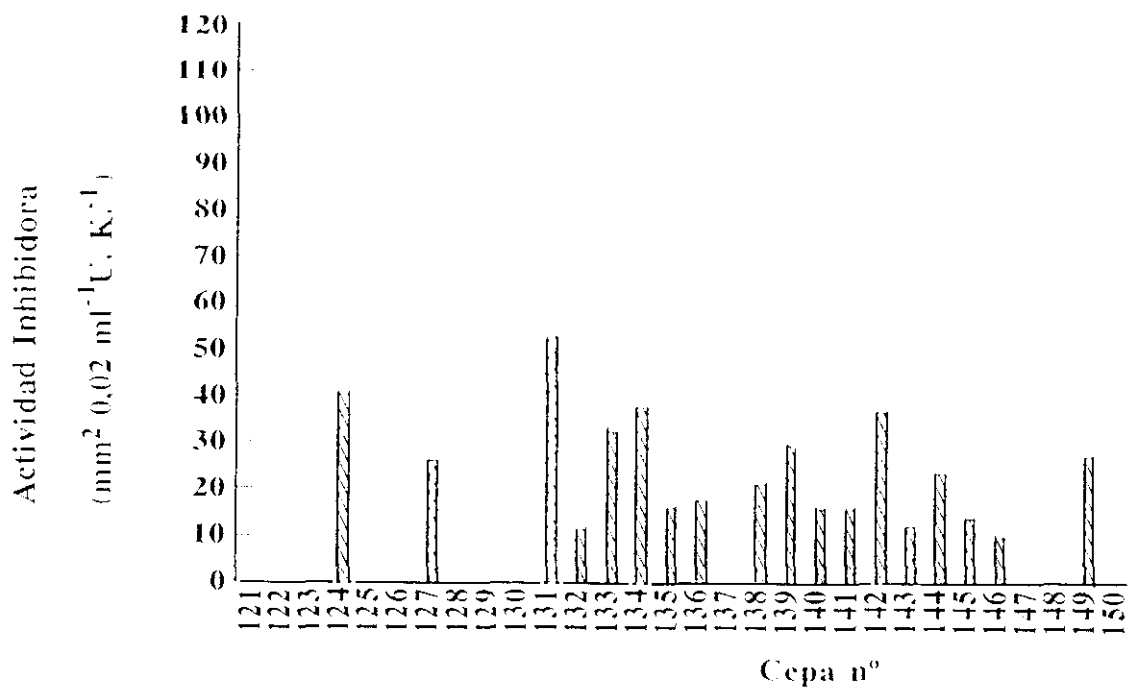


Figura 4. 4(V).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. aureus* CECT59. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

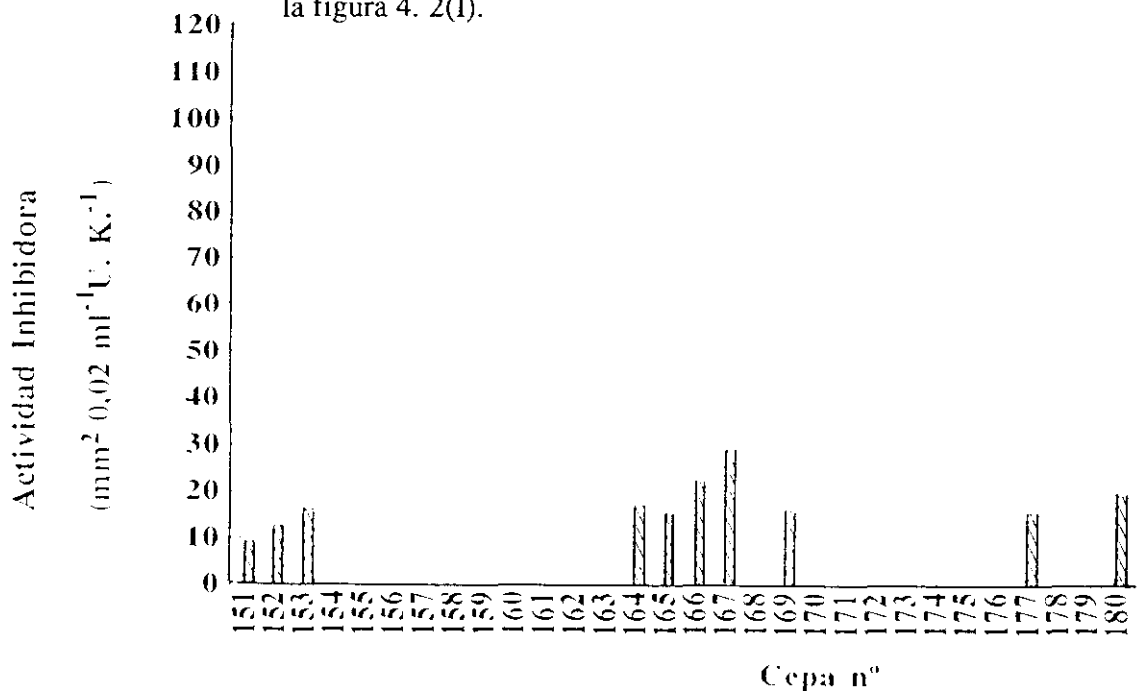


Figura 4. 4(y VI).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. aureus* CECT59. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

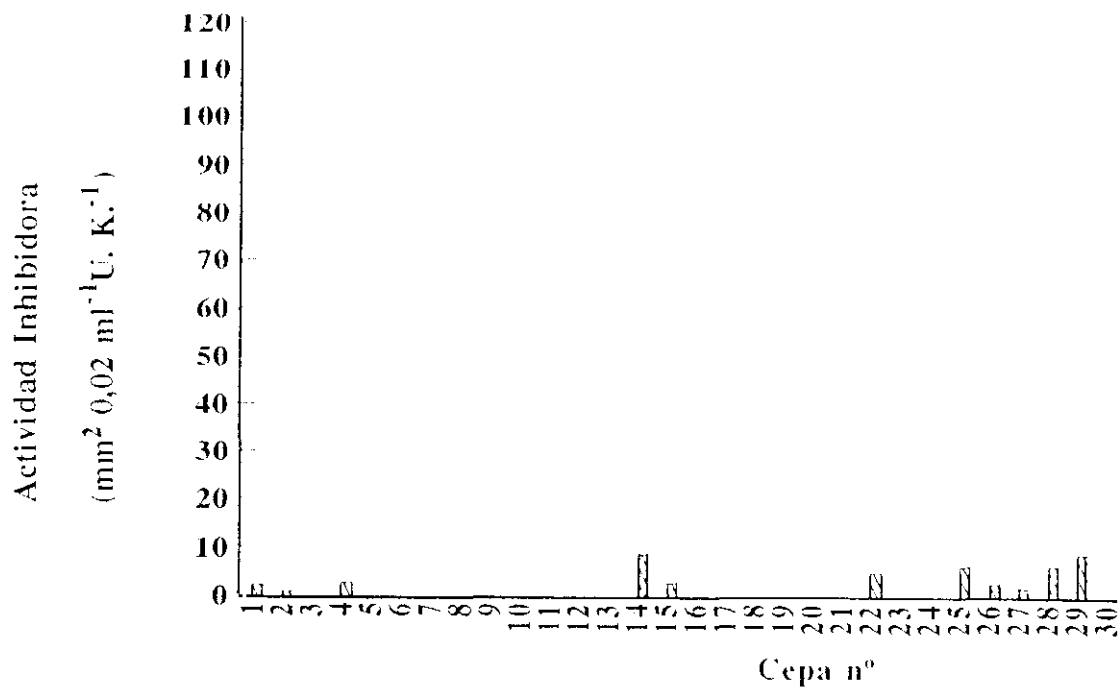


Figura 4. 5(I).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. typhimurium* CECT443. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

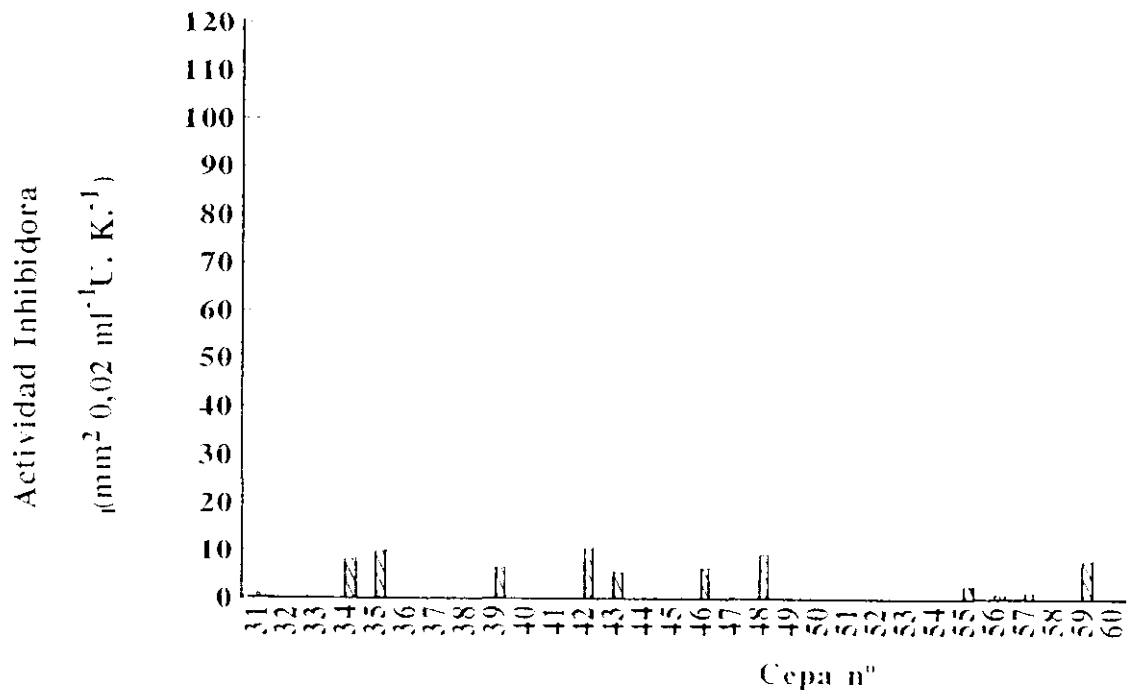


Figura 4. 5(II).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. typhimurium* CECT443. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

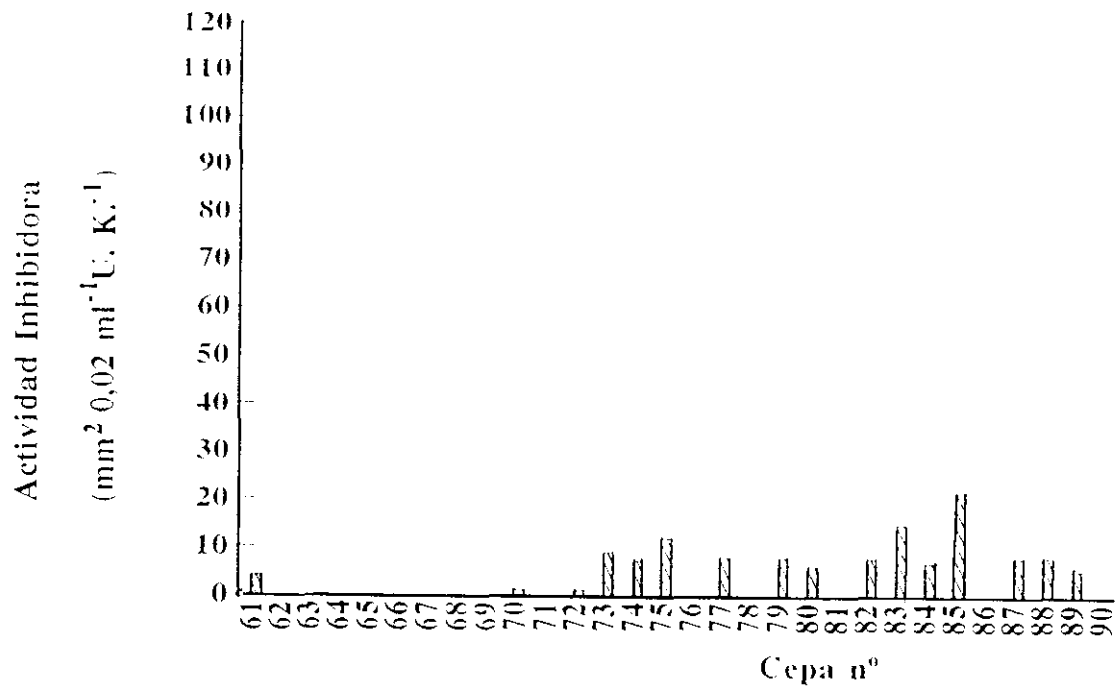


Figura 4. 5(III).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. typhimurium* CECT443. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

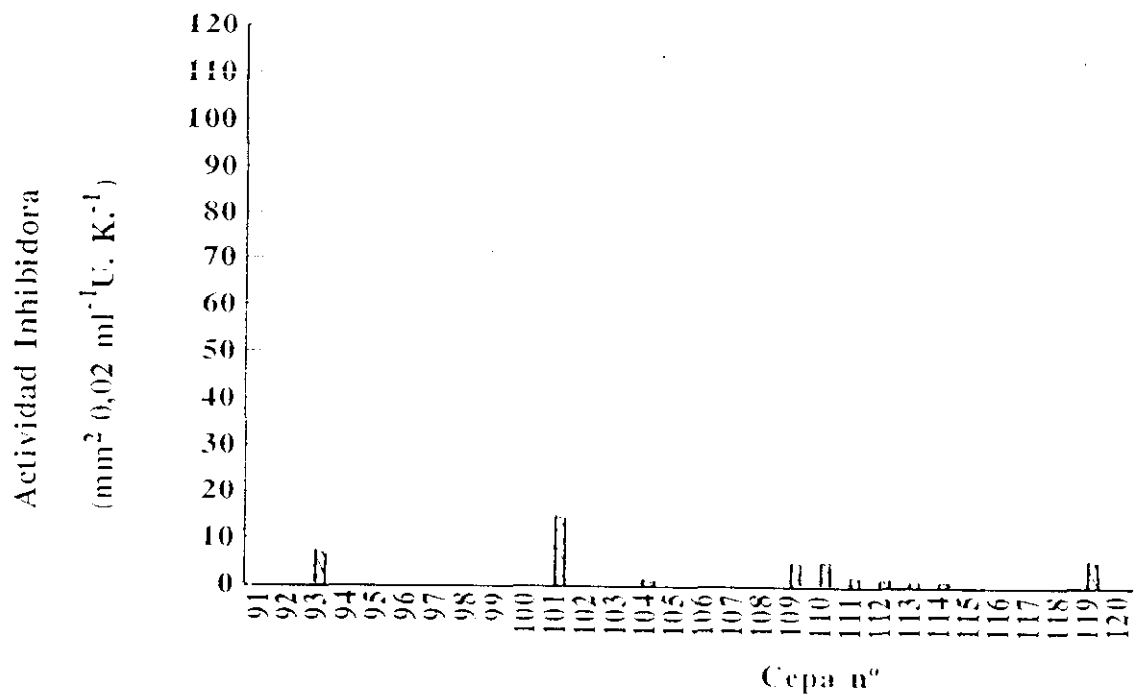


Figura 4. 5(IV).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. typhimurium* CECT443. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

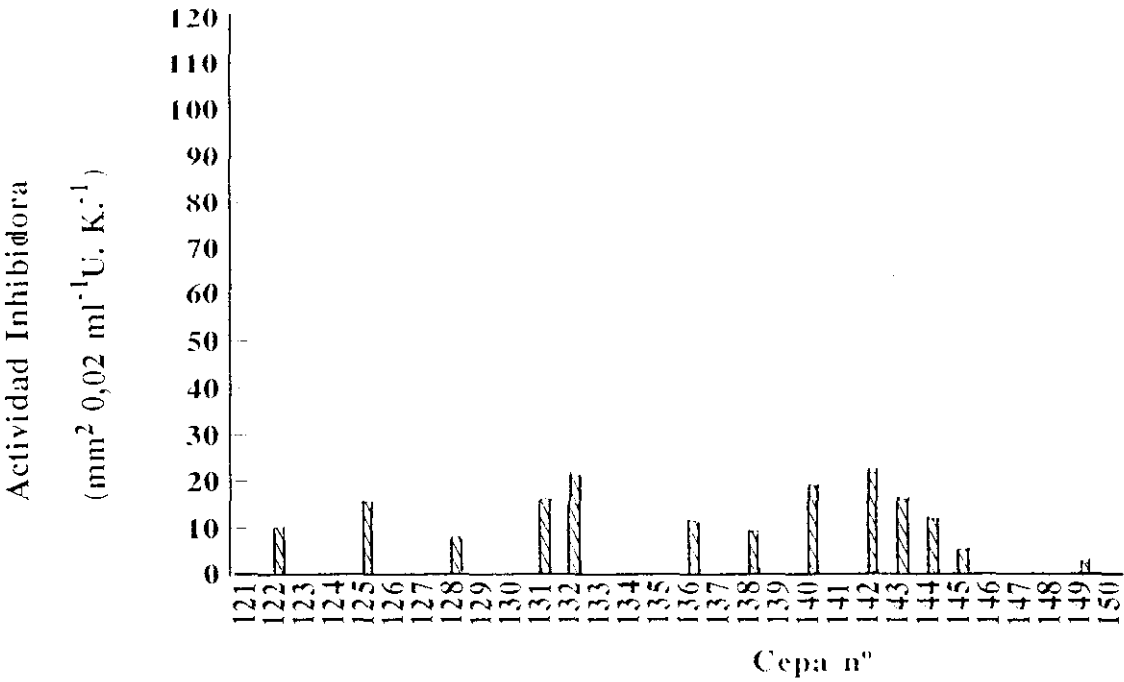


Figura 4. 5(V).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. typhimurium* CECT443. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

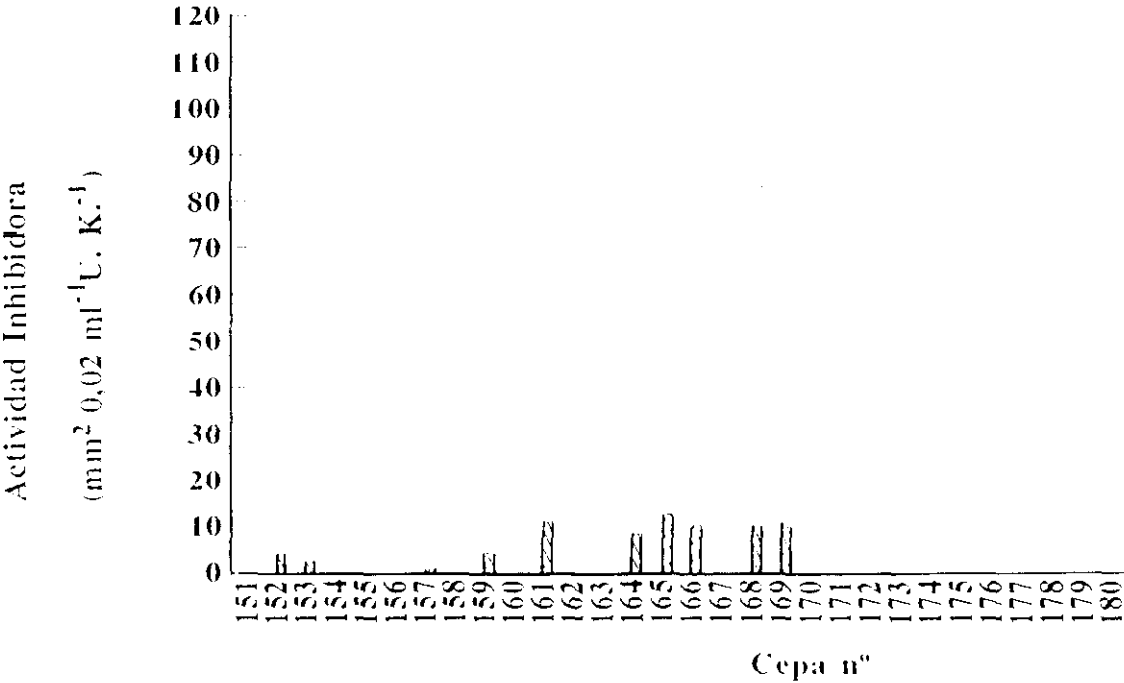


Figura 4. 5(y VI).- Actividad inhibidora de las 180 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. typhimurium* CECT443. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

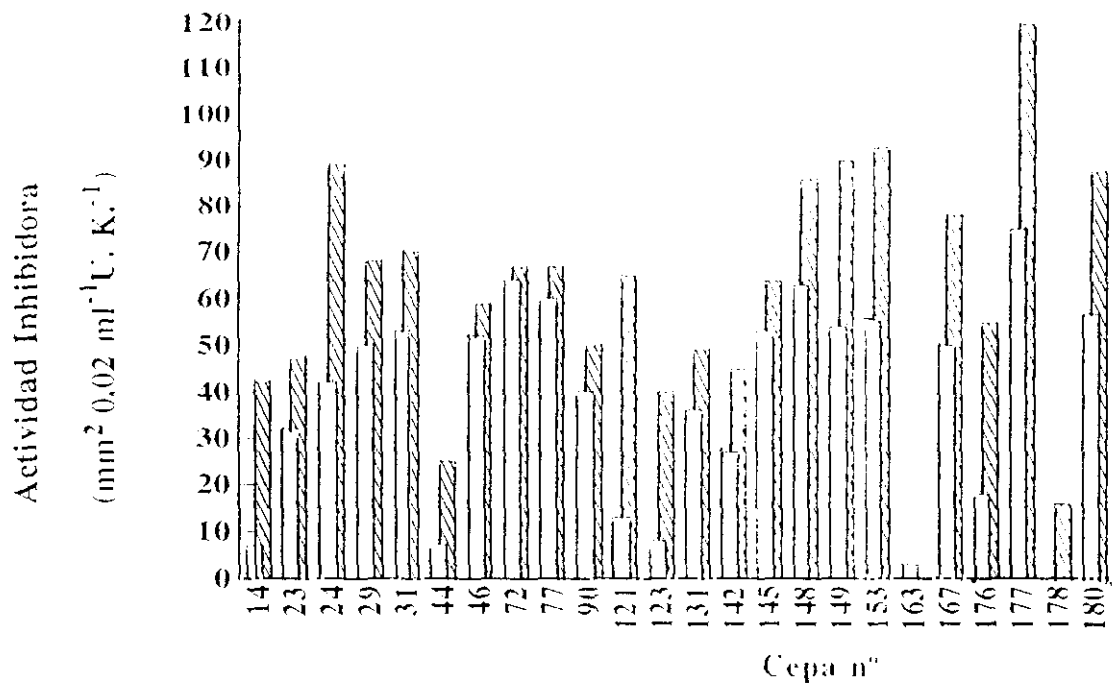


Figura 4. 6.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. brevis* LB826. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

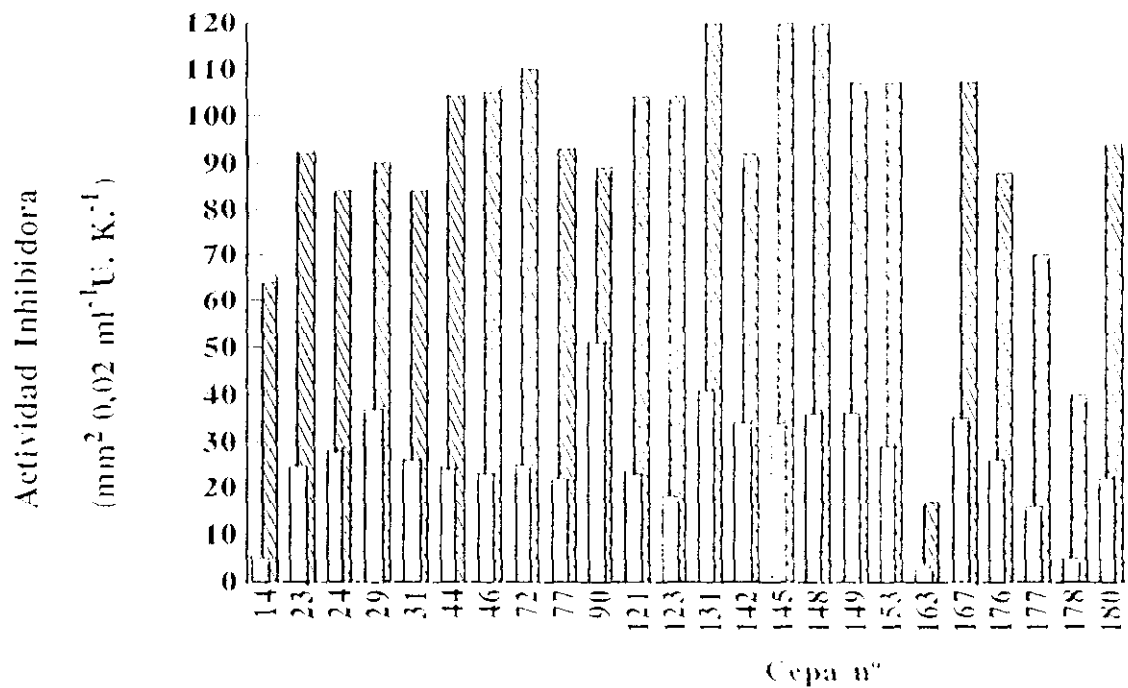


Figura 4. 7.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. carnis* MR371. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

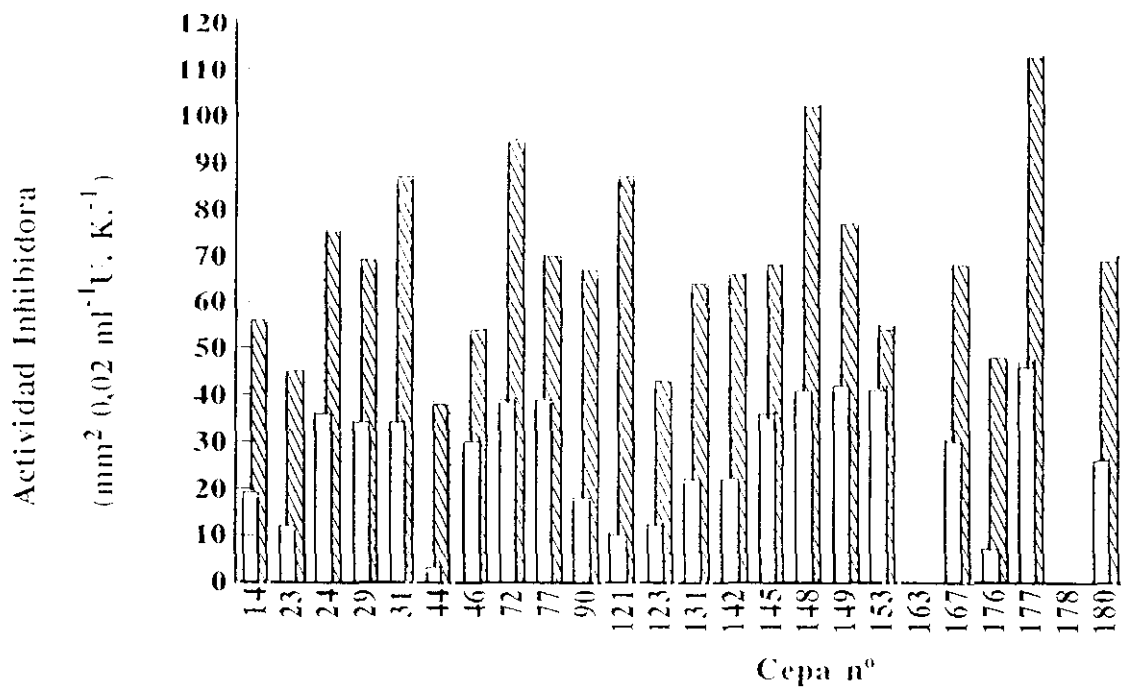


Figura 4. 8.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. curvatus* LB726. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

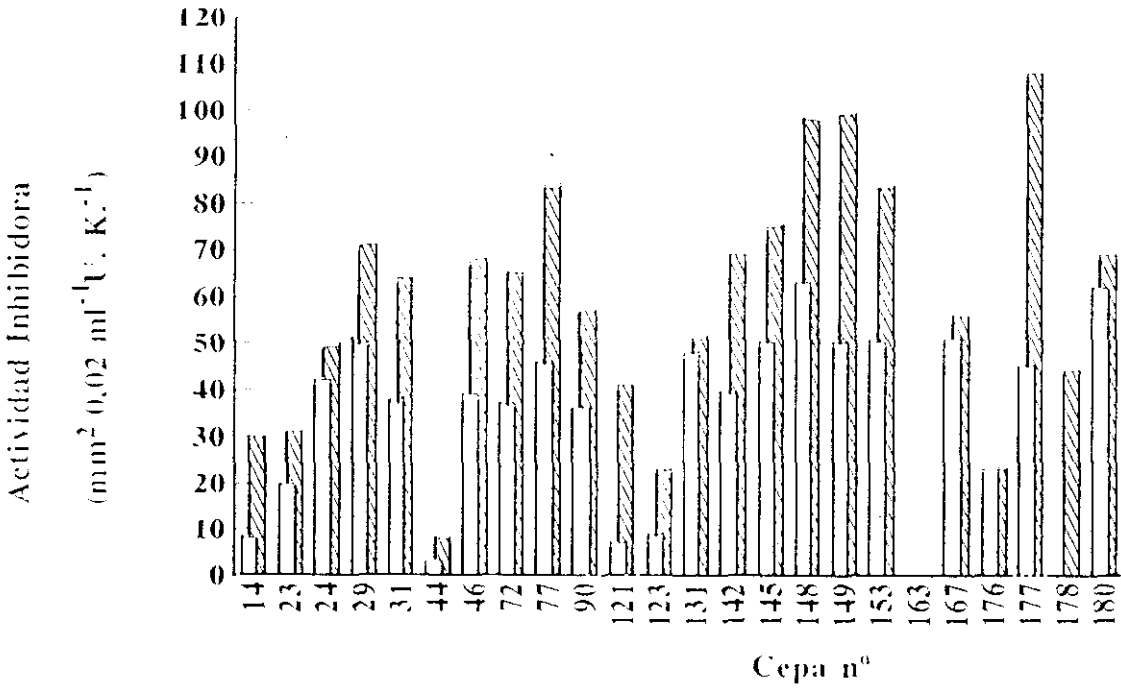


Figura 4. 9.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. divergens* MR375. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

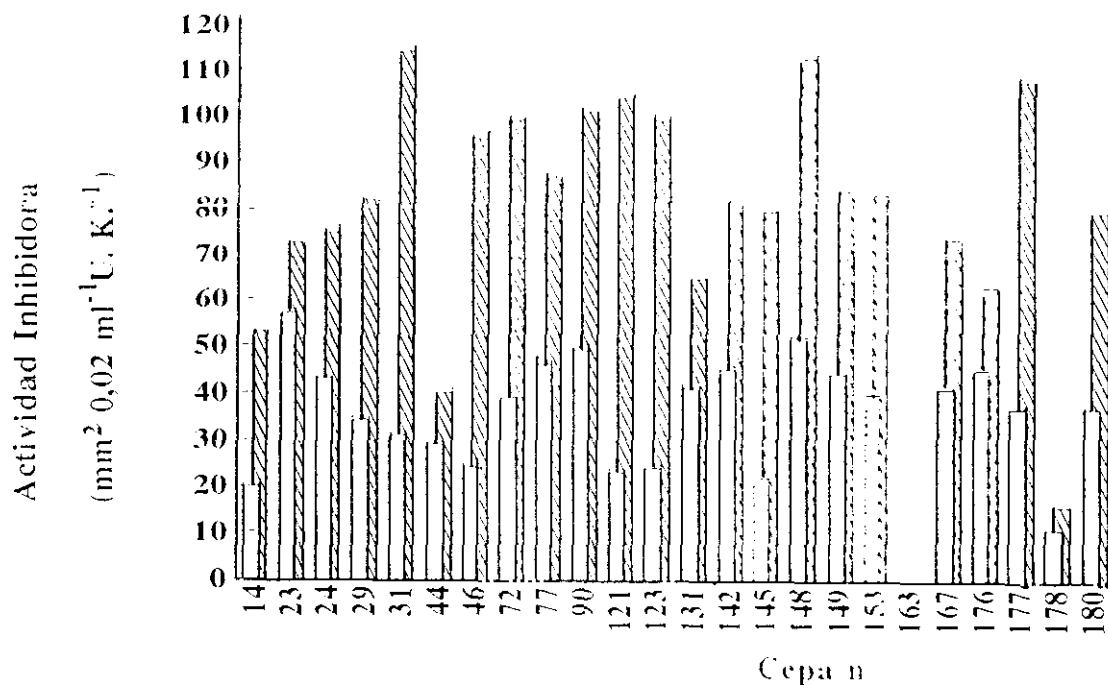


Figura 4. 10.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. farciminis* LB34. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

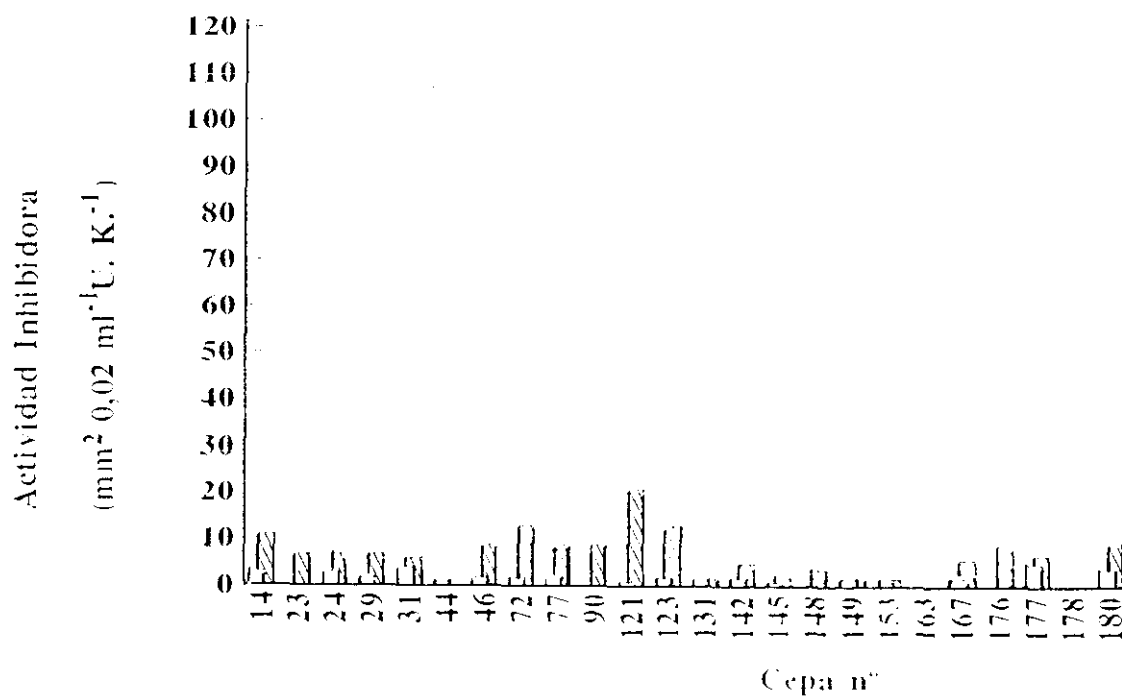


Figura 4. 11.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. sake* LB684. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

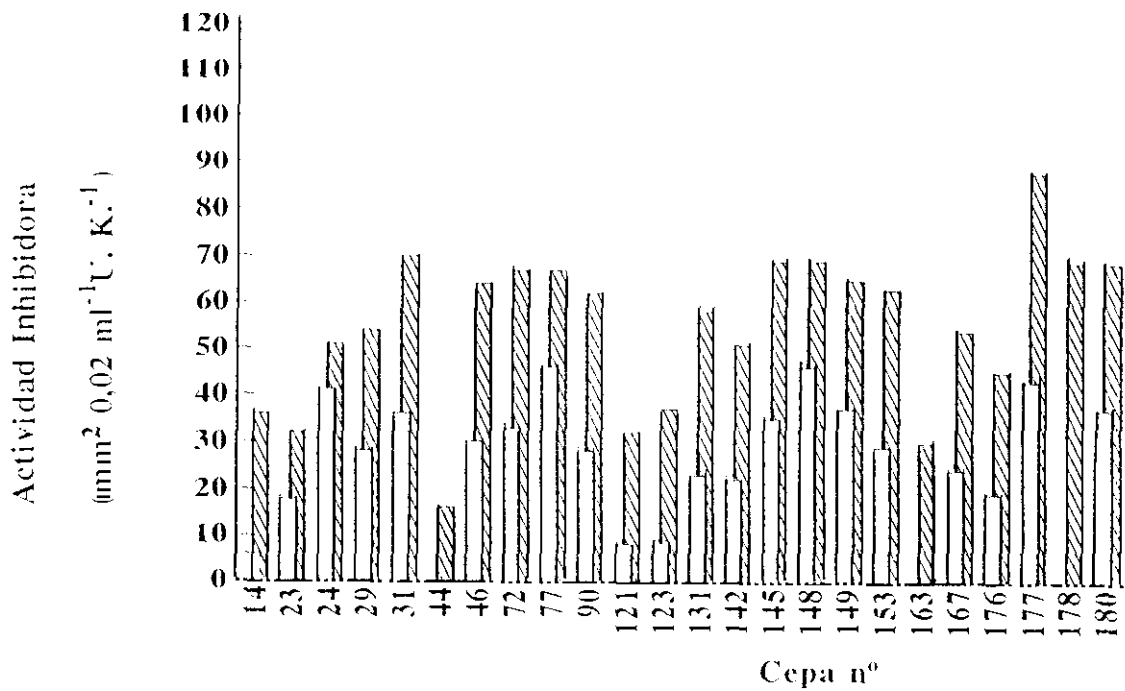


Figura 4. 12.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *Leu. mesenteroides* MR364. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

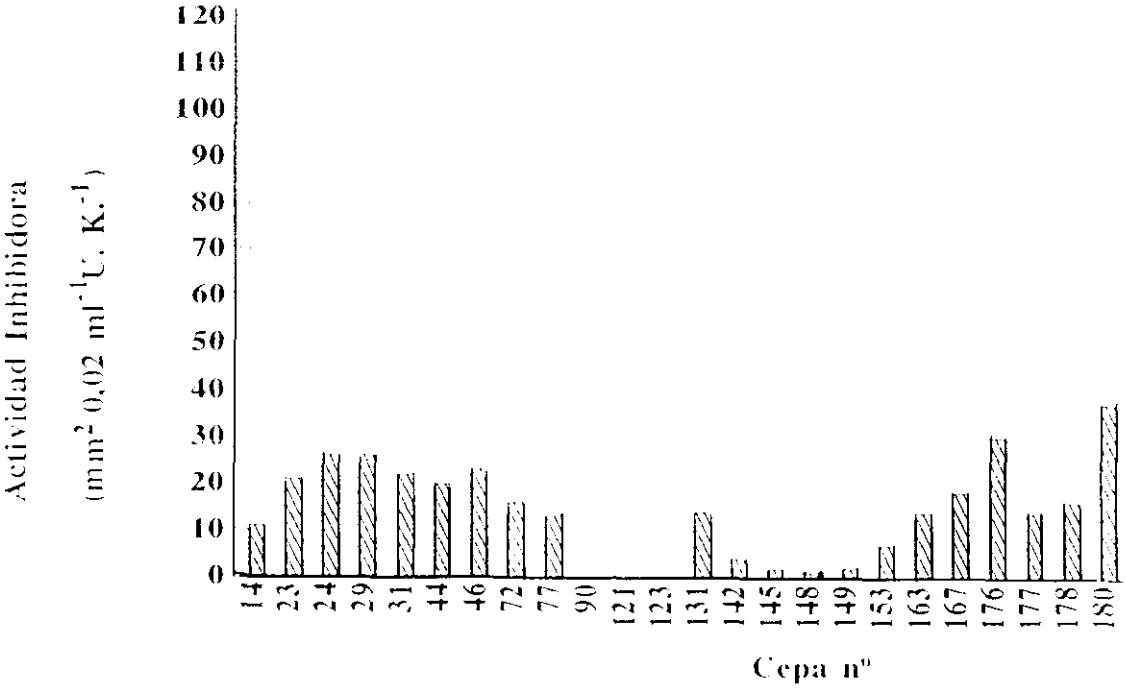


Figura 4. 13.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *M. varians* CECT230. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

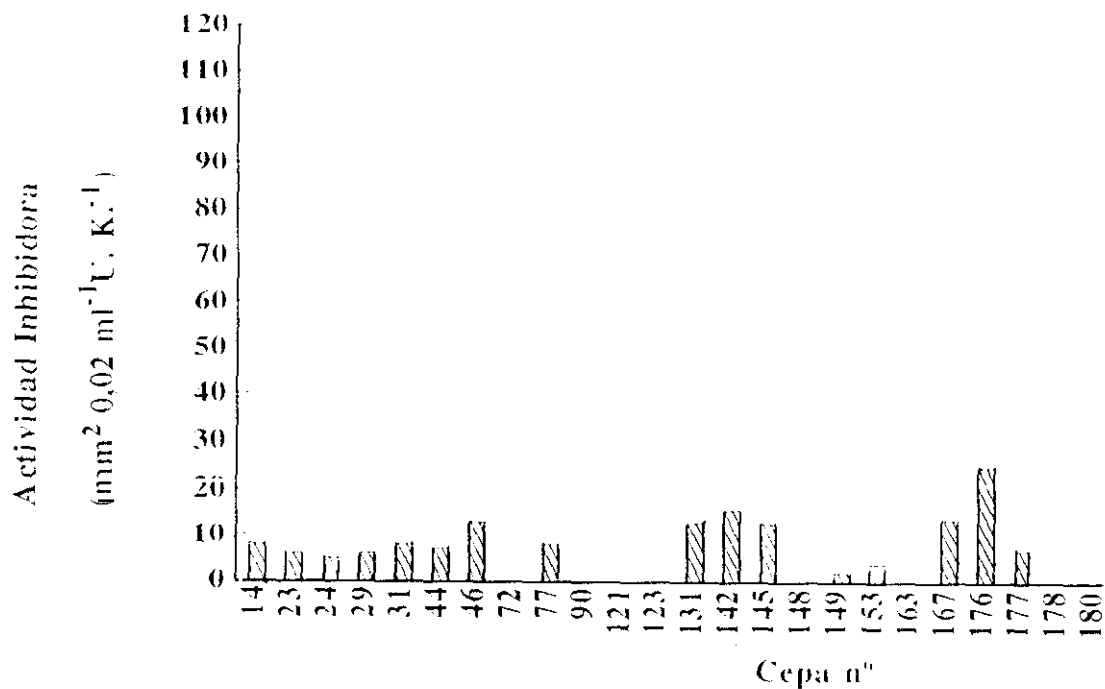


Figura 4. 14.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *B. thermosphacta* NCIB10018. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

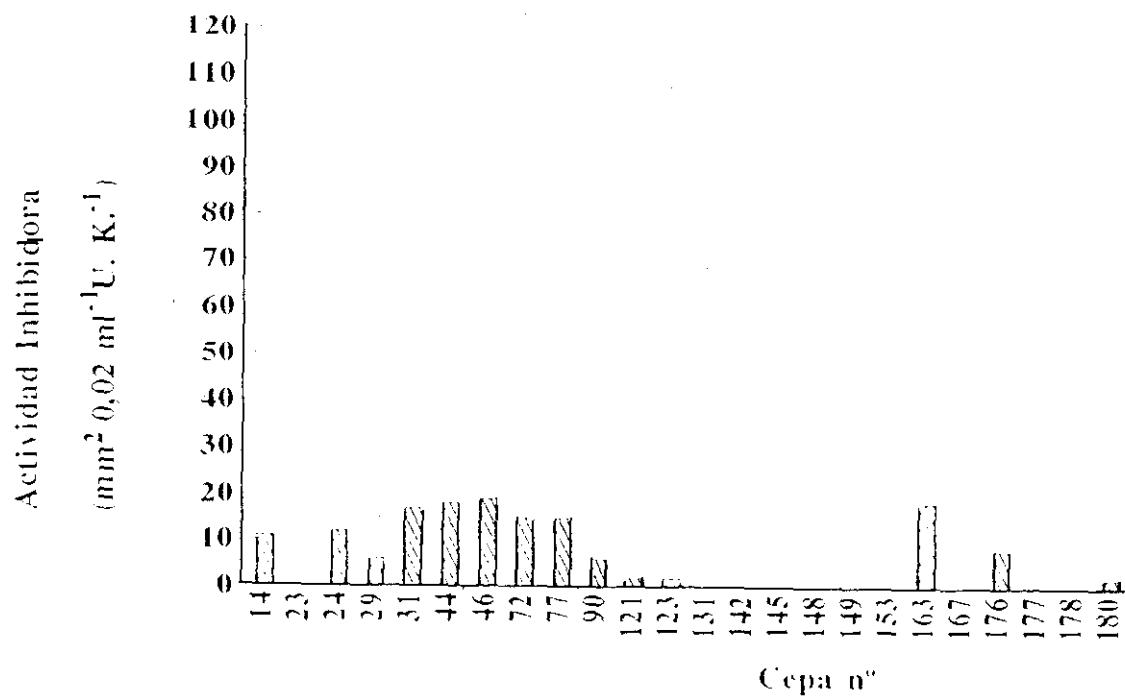


Figura 4. 15.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. xilosus* CECT237. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

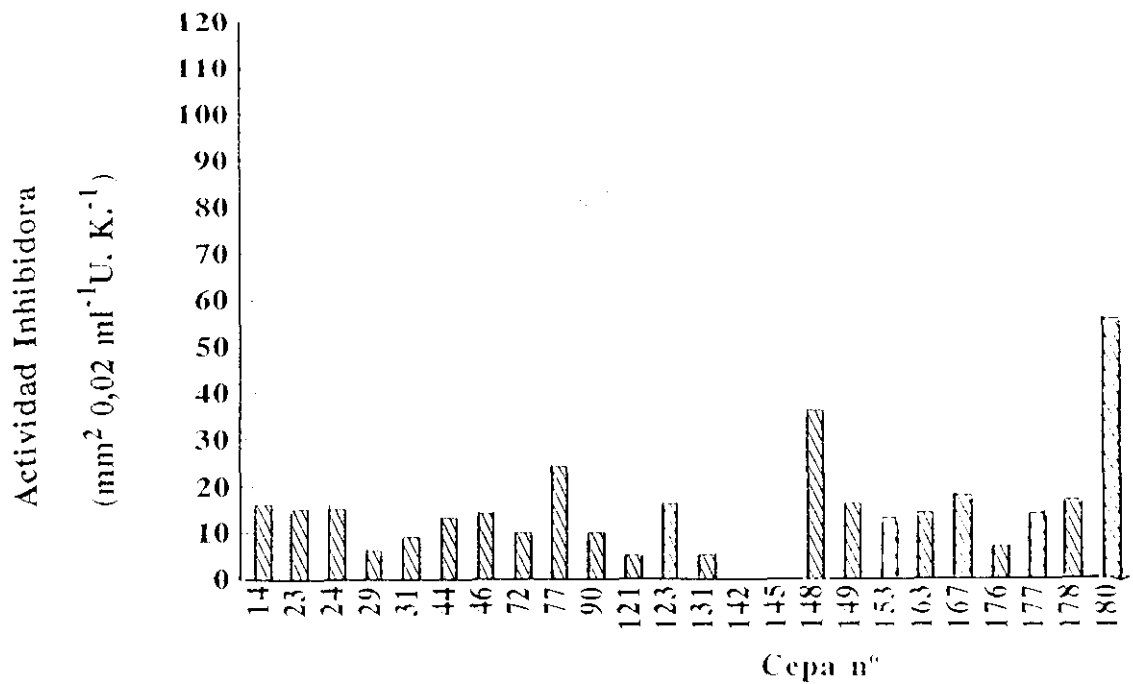


Figura 4. 16.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. faecium* CECT410. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

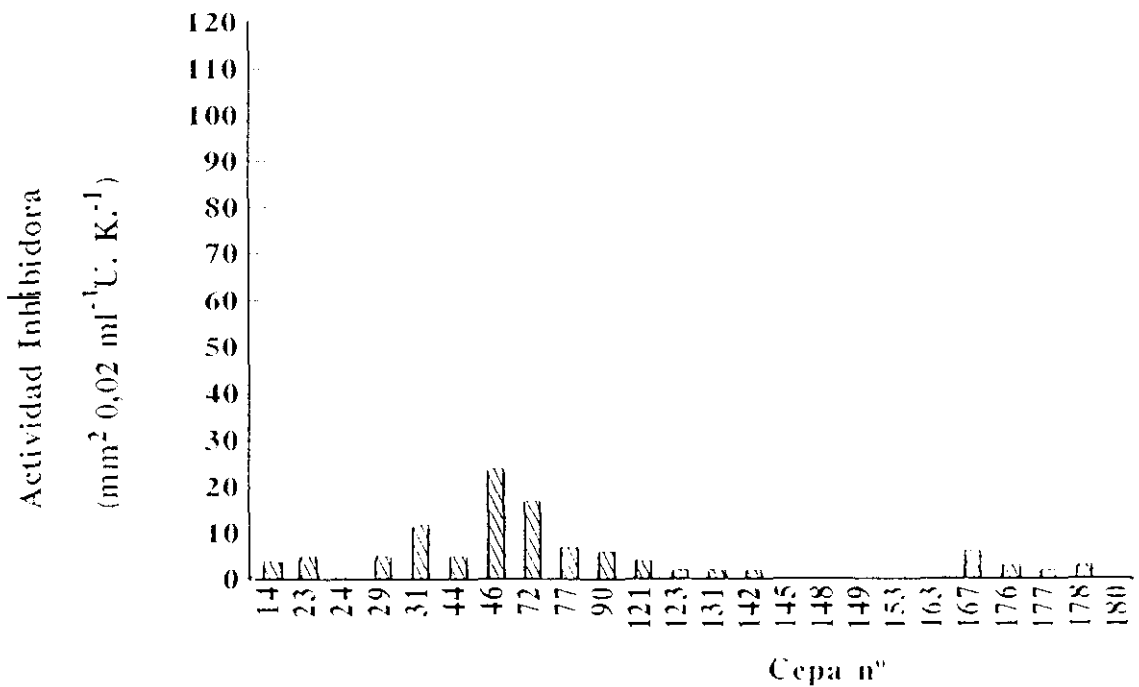


Figura 4. 17.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *E. coli* LB841. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

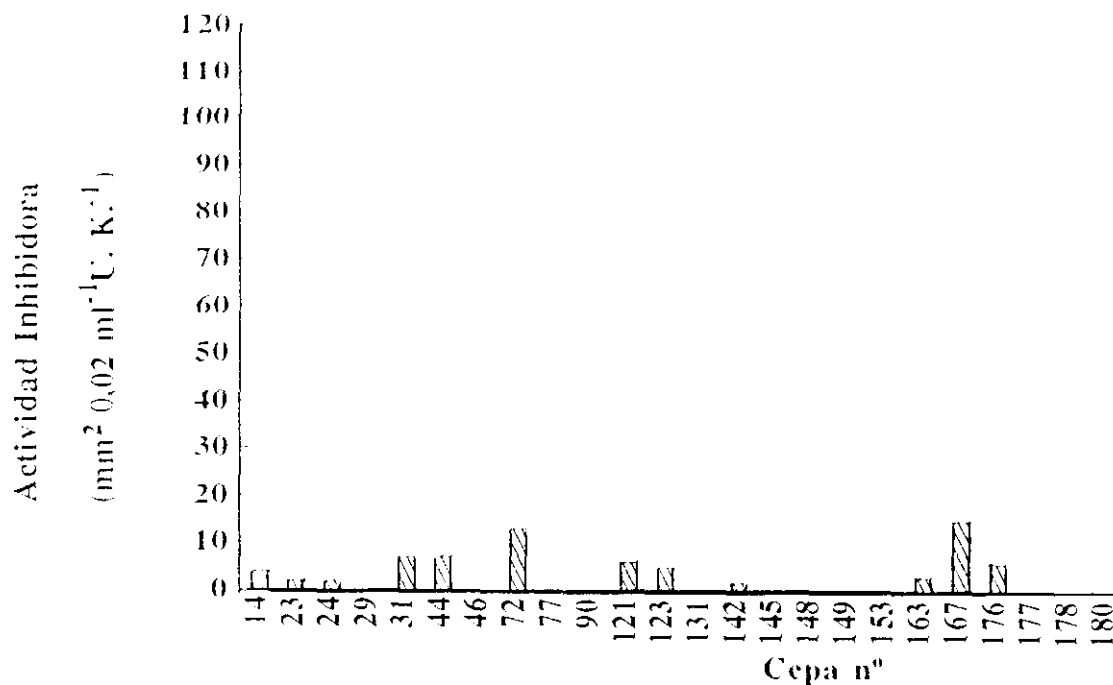


Figura 4. 18.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *B. stearothermophilus* CECT49. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

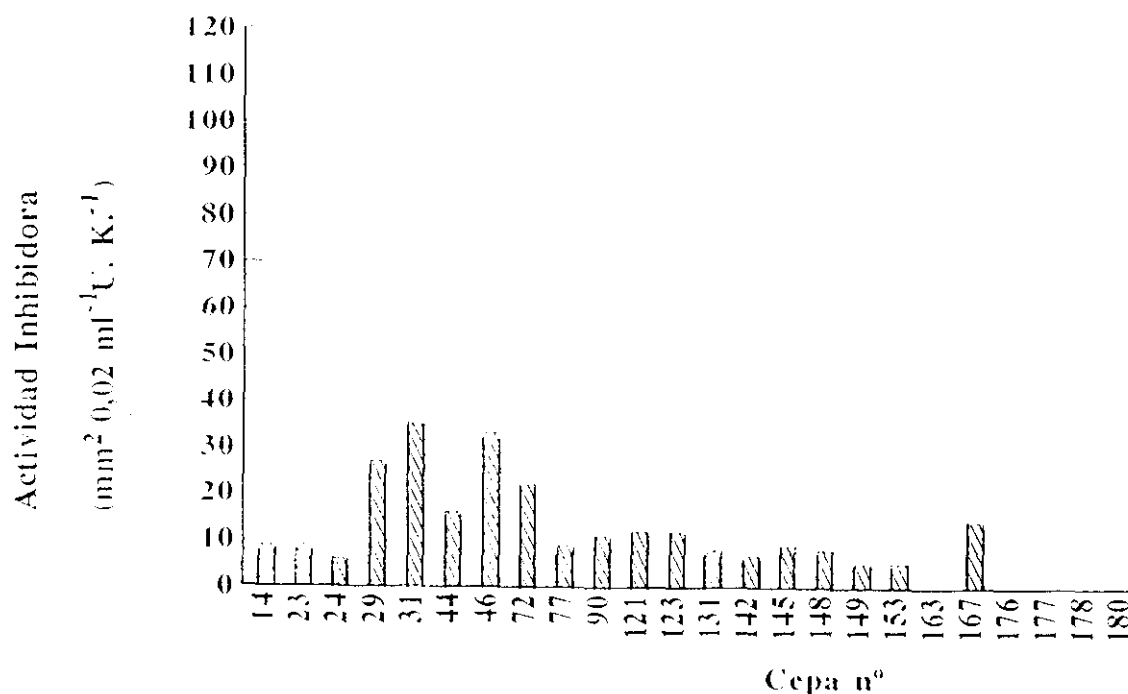


Figura 4. 19.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *E. cloacae* CECT149. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

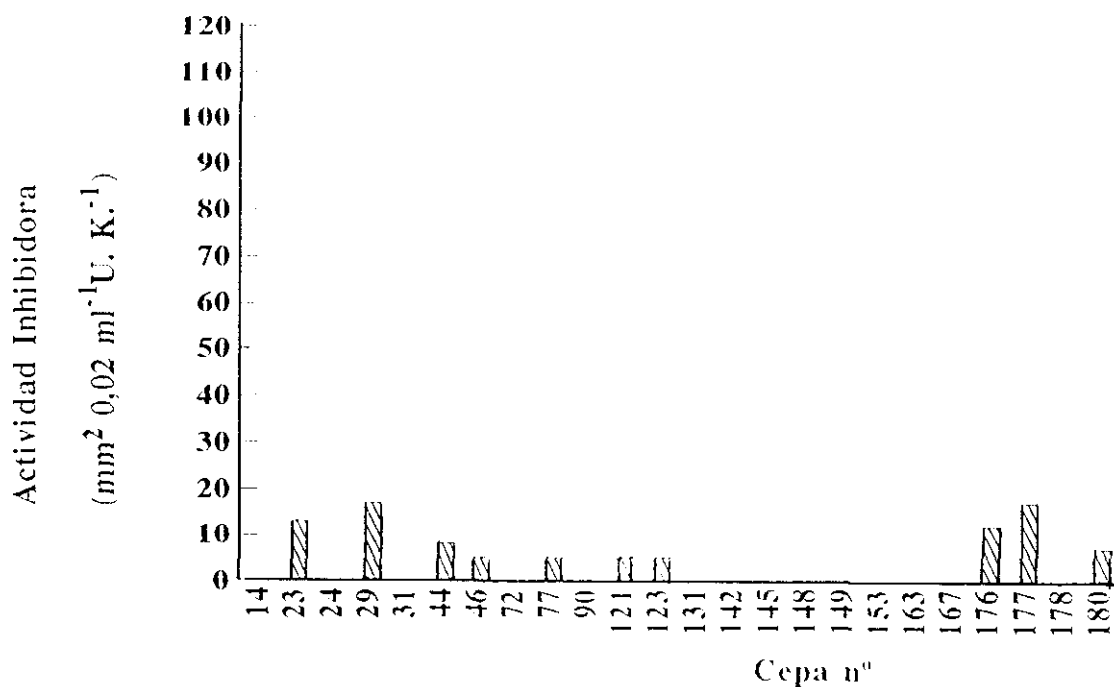


Figura 4. 20.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *B. cereus* CECT148. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

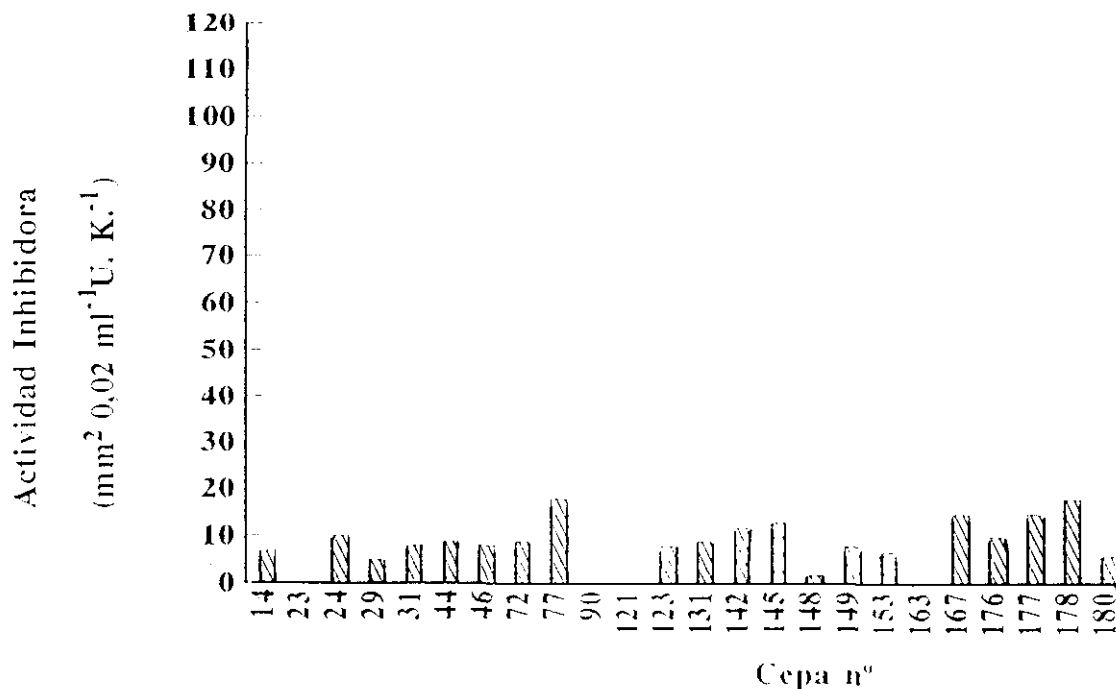


Figura 4. 21.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *Ps. fluorescens* DC7. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

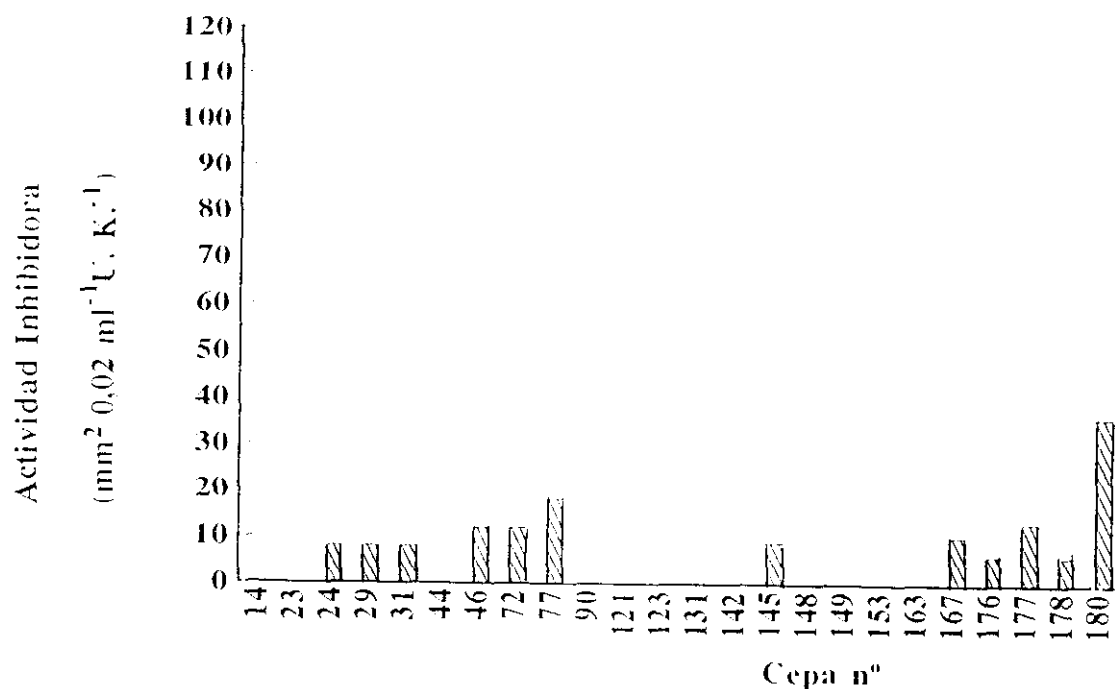


Figura 4. 22.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *Y. enterocolitica* E20. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

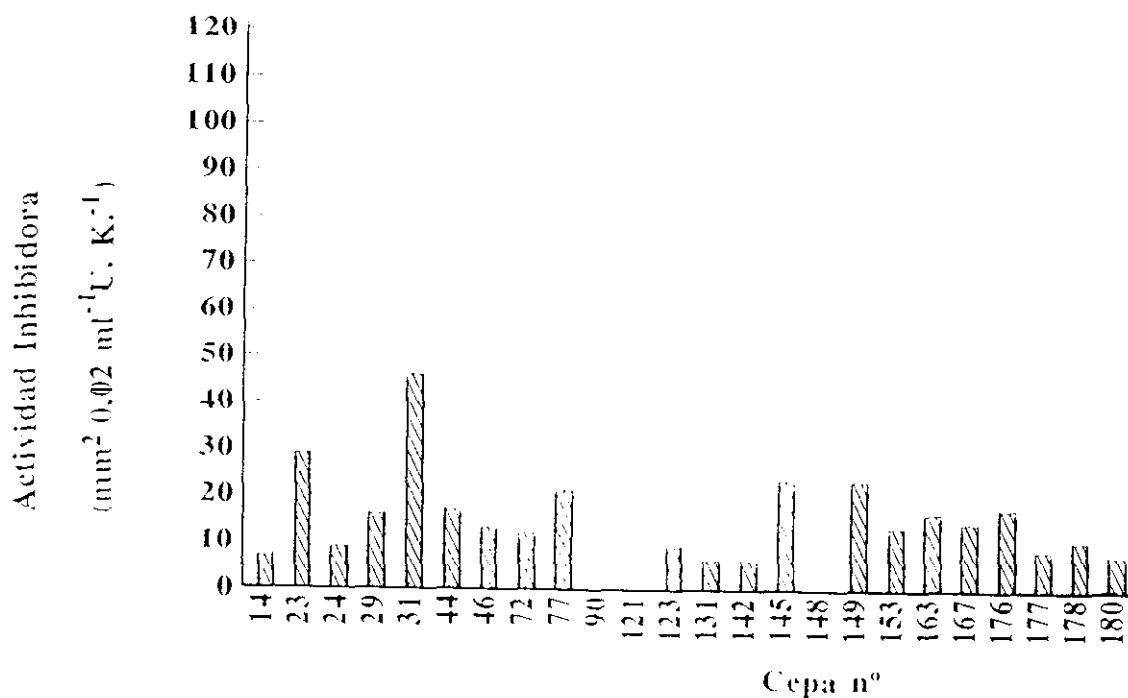


Figura 4. 23.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. flexnerii* CECT585. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

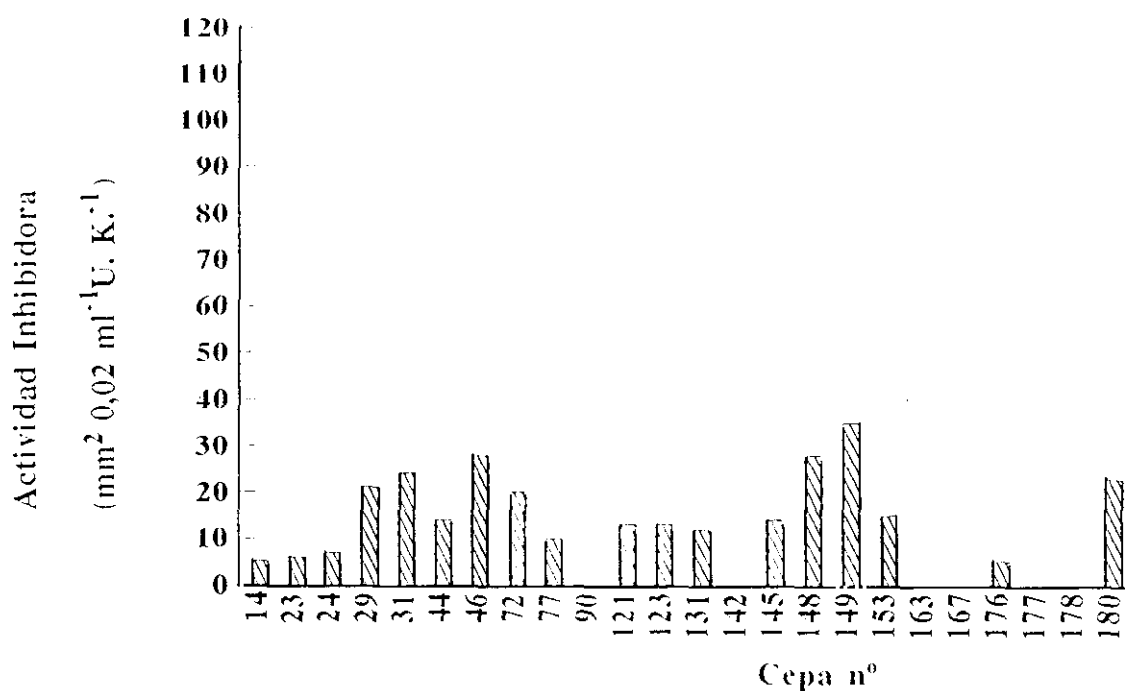


Figura 4. 24.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. faecalis* CECT481. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

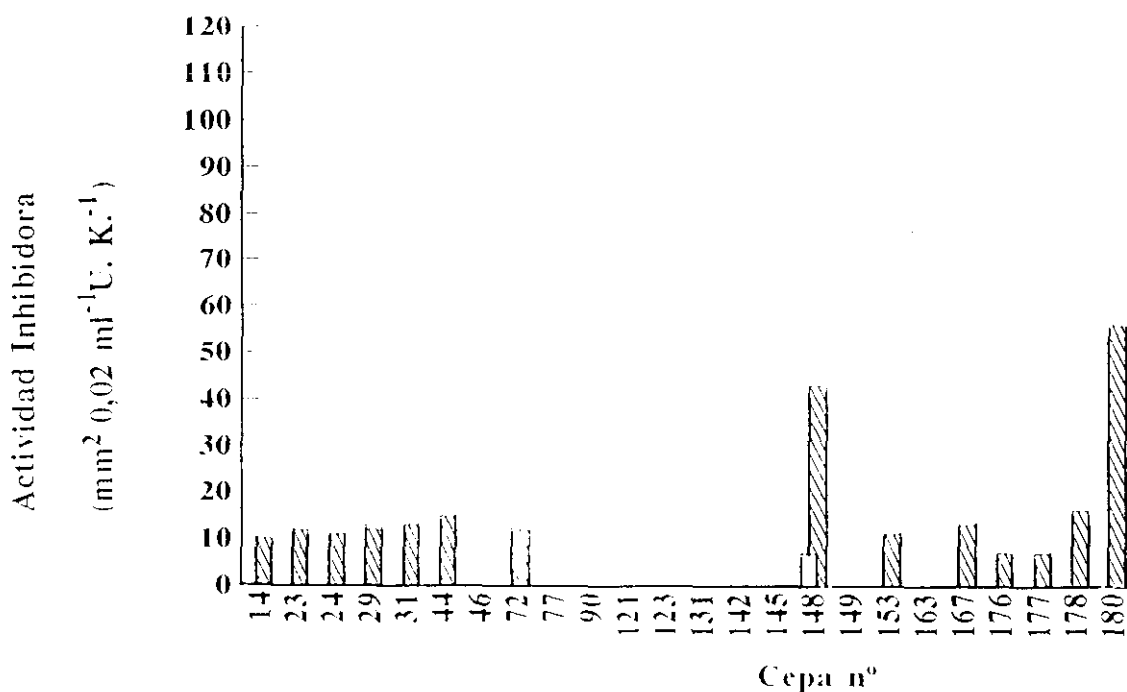


Figura 4. 25.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. monocytogenes* LI1sv4. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

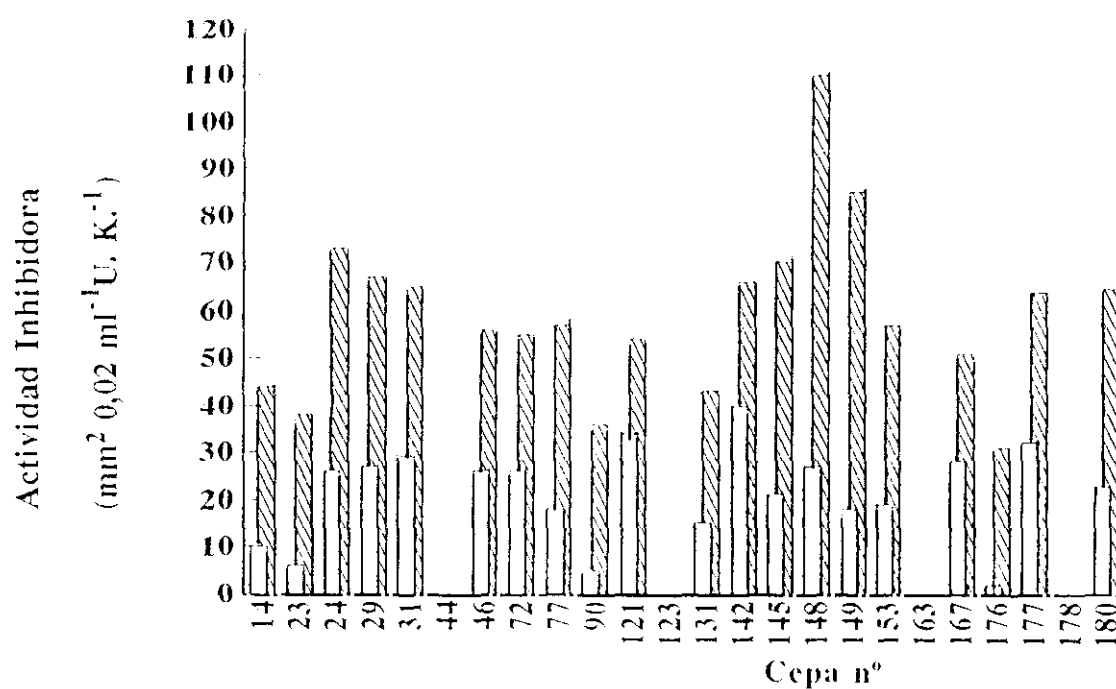


Figura 4. 26.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. fermentum* CECT285. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

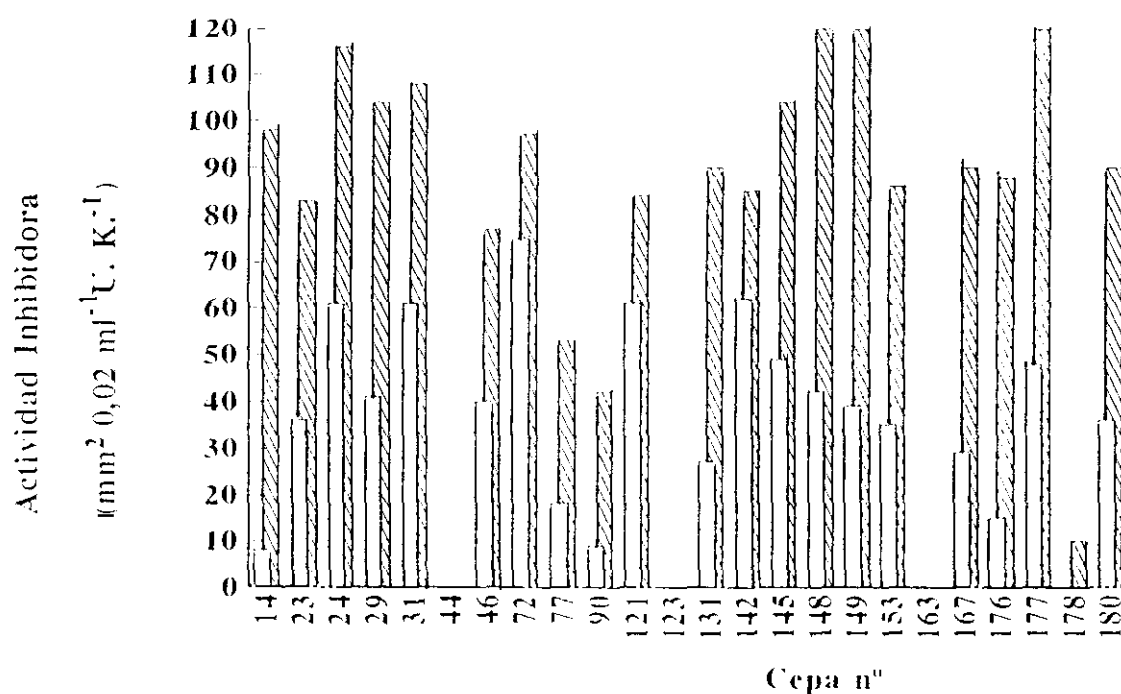


Figura 4. 27.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. plantarum* CECT221. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

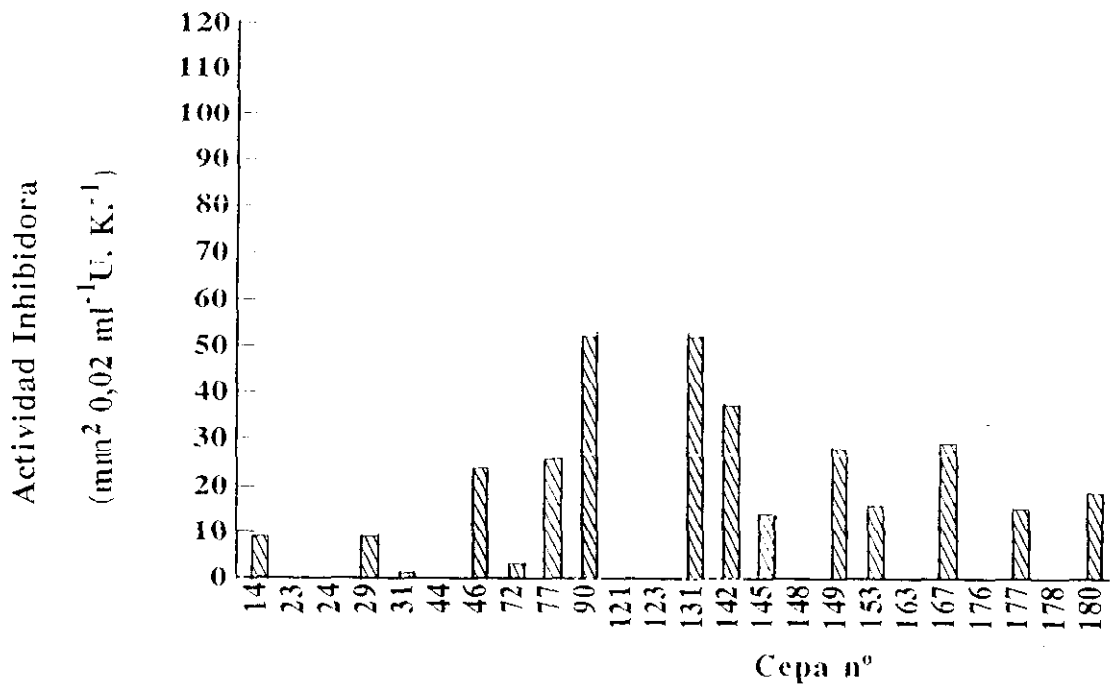


Figura 4. 28.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. typhimurium* CECT443. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

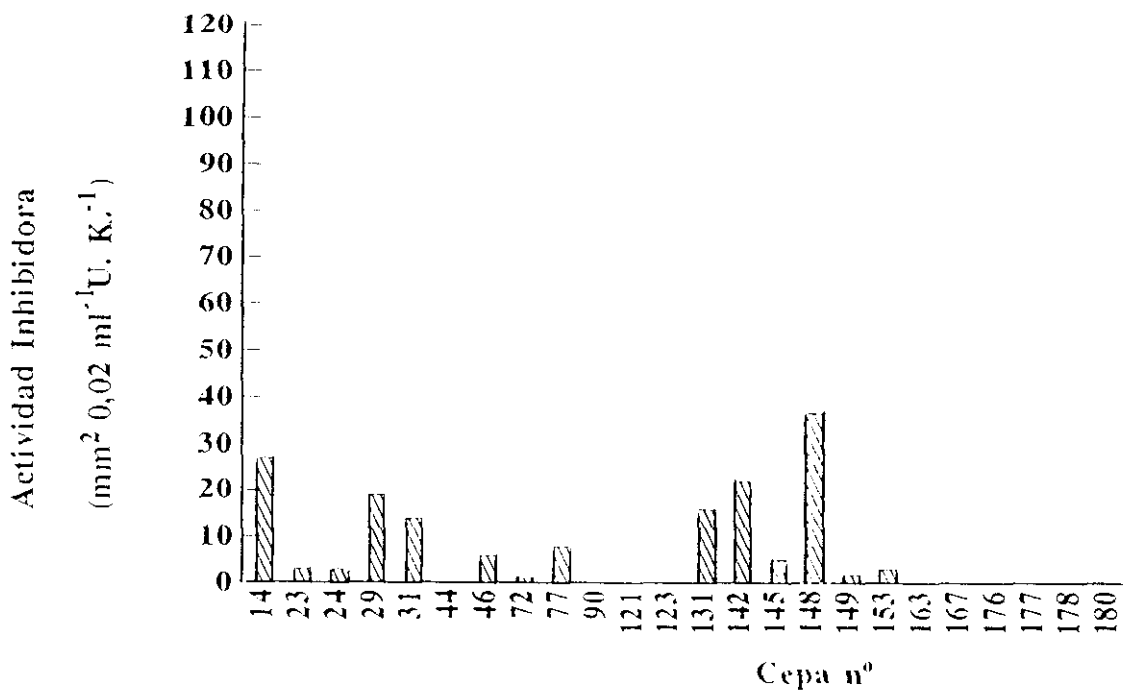


Figura 4. 29.- Actividad inhibidora de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. aureus* CECT59. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 2(I).

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

En la tabla IV.1 se muestra la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivos libres de células de las 24 cepas previamente descritas después de filtrados, neutralizados y concentrados siguiendo el procedimiento descrito en la sección III. 2. 3. 3. Como se observa, algunos presentan una actividad notable frente a ciertos microorganismos indicadores, sobre todo frente a otras bacterias lácticas. Es digno de mención que los sobrenadantes de las cepas 148 y 180 presenten una notable actividad frente a *L. monocytogenes*. No obstante, frente a otros indicadores carecen de actividad inhibidora detectable, lo que significa que, o bien éstos son insensibles a dicha actividad, o bien que la concentración de la sustancia inhibidora es demasiado pequeña para detectarse con esta técnica.

IV. 2. 3. - Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas

Ya se ha descrito que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), producido por algunas bacterias lácticas, inhibe el crecimiento de otras bacterias. Sin embargo, el tratamiento con 130 UI/ml de catalasa de los sobrenadantes de los cultivos libres de células con actividad inhibidora no disminuye dicha actividad (no se muestran los resultados). Así pues, una vez comprobado que, ni la acidez, ni la síntesis de H_2O_2 , ni la presencia de bacteriófagos estaban involucrados en la actividad antimicrobiana de las cepas estudiadas, se pensó que éstas quizás sinteticen otros compuestos activos de bajo peso molecular y/o bacteriocinas. Por ello se procedió a la identificación y caracterización bioquímica parcial de aquellas cepas cuyos sobrenadantes libres de células, una vez concentrados, manifestaban la máxima actividad antimicrobiana.

Tabla IV. 1.- Actividad inhibidora de los sobrenadantes libres de células concentrados de 24 bacterias lácticas seleccionadas frente a diversos microorganismos indicadores

Cepa N°	Microorganismo indicador (*)															
	Lf	Lp	Lb	Lca	Lcu	Cd	Lfa	Ls	Lm	Mv	Bt	Sx	Sf	Ec	Bc	Ps
	Ye	Sfl	Sfe	St	Sa	Lm										
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	10	-	8	-	-	9,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	9,6	-	9	-	-	7,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	13	-	12	-	-	9,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	13	-	13	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	11	-	11	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	17	-	14	-	9	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	19	-	17	-	14	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
90	17	-	15	-	16	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
131	15	-	13	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
142	14	-	11	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
145	7,8	-	12	-	-	9,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
148	16	-	20	-	17	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,6
149	18	-	17	-	17	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
153	14	-	13	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
167	13	-	15	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
176	7,2	-	7,6	-	-	7,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
177	18	-	18	-	14	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
180	14	-	12	-	14	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
																9

(*) Actividad inhibidora expresada como el diámetro del halo de inhibición en mm. Lf: *L. fermentum* CECT285; Lp: *L. plantarum* CECT221; Lb: *L. brevis* LB826; Lca: *L. carnis* CECT371; Lcu: *L. curvatus* LB726; Cd: *C. divergens* CECT375; Lfa: *L. farciminis* LB34; Ls: *L. sake* LB684; Lm: *Leu. mesenteroides* CECT364; Mv: *M. varians* CECT230; Bt: *B. thermosphacta* CECT10018; Sx: *S. xilosus* CECT237; Sf: *S. faecium* CECT410; Ec: *E. coli* LB841; Bcv: *B. stearothermophilus* CECT49; Ps: *Ps. fluorescens* C7; Ye: *Y. enterocolitica* E20; Sfl: *Sh. flexnerii* CECT585; St: *S. typhimurium* CECT443; Sa: *S. aureus* CECT59; Lm: *L. monocytogenes* LI 1sv4.

IV. 3. - Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas seleccionadas por su actividad antimicrobiana

Las seis bacterias lácticas cuyos sobrenadantes concentrados libres de células manifestaron la máxima actividad antimicrobiana, se sometieron a la mayoría de las pruebas recomendadas por Schillinger y Lücke (1987b), reseñadas en la sección III. 2. 4., para la identificación rápida de las bacterias lácticas procedentes de la carne y productos cárnicos. Las cepas seleccionadas fueron las correspondientes a los números 31, 77, 90, 148, 177 y 180.

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

La observación microscópica de las cepas seleccionadas, teñidas con el método de Gram, evidencia una morfología de bacilos cortos Gram positivos (tabla IV. 2).

IV. 3. 2. - Prueba de la catalasa

Todas las cepas analizadas fueron catalasa negativas (tabla IV. 2)

IV. 3. 3. - Producción de CO₂ a partir de glucosa

La capacidad de las cepas analizadas de producir CO₂, se investigó como se describe en la sección III. 2. 4. 3. Ninguna de las cepas seleccionadas produjo dicho gas (tabla IV. 2).

IV. 3. 4. - Hidrólisis de la arginina

Los resultados de la prueba de hidrólisis de la arginina se muestran en la tabla IV. 2,

no observándose una respuesta uniforme en las diferentes cepas seleccionadas. Dicha respuesta varía desde la reacción negativa de las cepas 31, 77, 90 y 180, hasta la positiva de las cepas 148 y 177.

IV. 3. 5. - Producción de ácido sulfhídrico

La realización de las técnicas descritas en la sección III. 2. 4. 5., no evidenció, en ningún caso, la producción de ácido sulfhídrico por ninguna de las cepas analizadas (tabla IV. 2).

IV. 3. 6. - Prueba de Voges-Proskauer

La producción de acetoina por las cepas seleccionadas se evaluó mediante la prueba de Voges-Proskauer (sección III. 2. 4. 6.). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV. 2; de ellos se deduce que todas las cepas producen acetoina en cantidades mayores (cepas 77 y 90) o menores (cepas 31, 177 y 180). Sin embargo, la cepa 148 fué negativa en esta prueba.

IV. 3. 7. - Fermentación de carbohidratos

La capacidad fermentativa de carbohidratos de las cepas seleccionadas se evaluó siguiendo el procedimiento descrito en la sección III. 2. 4. 7. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV. 3. De ellos se deduce que:

1.) Todas las cepas analizadas fermentan la ribosa, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, N-acetil glucosamina, escualina, melibiosa, sacarosa, trealosa y gluconato.

2.) La fermentación de los azúcares L-arabinosa, α -metil D-glucósido, D-turanosa,

salicilina, maltosa, lactosa, D-rafinosa, celobiosa y 2 ceto-gluconato es variable dependiendo de las cepas analizadas. Así, mientras la cepa 177 es la única que fermenta la L-arabinosa, α -metil D-glucósido y D-turanosa, todas, con excepción de la 77, utilizan la salicilina. La maltosa es fermentada por las cepas 31, 77 y 177 y la lactosa por las cepas 90, 148, 177 y 180. Las cepas 31, 77 y 177 utilizan la D-rafinosa, mientras que la 148 y 177 fermentan el 2-cetogluconato. La celobiosa sólo es débilmente fermentada por la cepa 180.

3.) Ninguna de las cepas analizadas fermenta el glicerol, eritritol, D-arabinosa, D-xilosa, L-xilosa, adonitol, β -metil xilósido, L-sorbosa, ramnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α -metil manósido, amigdalina, arbutina, inulina, melizitosa, almidón, glucógeno, xilitol, β -gentibiosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol y 5 ceto-gluconato.

La fermentación de los azúcares manitol, ribosa, melibiosa, manosa, sacarosa y trehalosa, es de gran importancia en la clasificación de los lactobacilos de origen cárnico. Con los resultados obtenidos y siguiendo el esquema de identificación propuesto por Schillinger y Lücke (1987b), todas las bacterias lácticas analizadas se clasificaron tentativamente como *Lactobacillus sake*.

IV. 3. 8. - Tolerancia al cloruro sódico

En la tabla IV.2 se muestra el desarrollo de las bacterias lácticas seleccionadas en medio MRS suplementado con un 7 o un 10% de NaCl, incubado a 32 °C durante un tiempo máximo de 6 días. Todas las cepas seleccionadas, salvo la 77, crecen a una concentración de NaCl del 7%, sin embargo, ninguna manifiesta desarrollo mensurable cuando la concentración de NaCl se eleva al 10%.

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

Ninguna cepa se desarrolla en el medio MRS a pH de 3,9 (ajustado con HCl, 1N)
(tabla IV. 2)

IV. 3. 10. - Crecimiento a diversas temperaturas

Las temperaturas a las que las bacterias lácticas se desarrollan son también importantes en el esquema de identificación de Schillinger y Lücke (1987b). En la sección III. 2. 4. 10 se describe la metodología seguida para estudiar el crecimiento bacteriano a las temperaturas de 4, 15 y 45 °C, cuyos resultados se recogen en la tabla IV. 2. Todas las cepas seleccionadas se desarrollan a 4 y 15 °C, pero a 45 °C únicamente lo hacen las cepas 148 y 177.

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

Característica	Cepa N°					
	31	77	90	148	177	180
Morfología	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo
Tinción Gram	+	+	+	+	+	+
Catalasa	-	-	-	-	-	-
Producción de CO ₂	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de la arginina	-	-	+	+	-	-
Producción SH ₂	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	-	+	+
<u>Crecimiento en:</u>						
7% NaCl	+	-	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	-
<u>Crecimiento a:</u>						
pH 3,9	-	-	-	-	-	-
4 °C	+	+	+	+	+	+
15 °C	+	+	+	+	+	+
45 °C	-	-	-	+	+	-

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

Carbohidrato	Cepa N°					
	31	77	90	148	177	180
Glicerol	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-
D-arabinosa	-	-	-	-	-	-
L-arabinosa	-	-	-	-	+	-
Ribosa	+	+	+	+	+	+
D-xilosa	-	-	-	-	-	-
L-xilosa	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
β -metil-xilosido	-	-	-	-	-	-
Galactosa	+	+	+	+	+	+
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+
D-Fructosa	+	+	+	+	+	+
D-Manosa	-	-	-	-	-	-
L-Sorbosa	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-

Tabla IV. 3. - (continuación)

Carbohidrato	Cepa N°					
	31	77	90	148	177	180
Manitol	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
α -metil D-manosido	-	-	-	-	-	-
α -metil D-glucosido	-	-	-	-	+	-
N-acetil glucosamina	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	-	-	-	-	-	-
Arbutina	-	-	-	-	-	-
Escualina	+	+	+	+	+	+
Salicilina	+	-	+	+	+	+
Celobiosa	-	-	-	-	-	+
Maltosa	+	+	-	-	+	-
Lactosa	-	-	+	+	+	+
Melibiosa	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+
Trealosa	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-
D-rafinosa	+	+	-	-	+	-
Almidón	-	-	-	-	-	-

Tabla IV. 3. - (continuación ...y 2)

Carbohidrato	Cepa N°					
	31	77	90	148	177	180
Glucógeno	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-
β -gentobiosa	-	-	-	-	-	-
D-turanosa	-	-	-	-	+	-
D-lixosa	-	-	-	-	-	-
D-tagatosa	-	-	-	-	-	-
D-fucosa	-	-	-	-	-	-
L-fucosa	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-
Gluconato	+	+	+	+	+	+
2 ceto-gluconato	-	-	-	+	+	-
5 ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-

IV. 4.- Espectro antimicrobiano de la sustancia inhibidora exocelular de las cepas de *L. sake* 77, 90, 148 y 180

Una vez caracterizadas bioquímicamente las seis bacterias lácticas de interés, en cuatro de ellas se evaluó de nuevo la actividad inhibidora de sus sobrenadantes concentrados libres de células frente a un número mayor y más diverso de bacterias alterantes y patógenas. Con la metodología señalada en la sección III. 2. 5 (tabla IV. 4) se observó que los sobrenadantes concentrados de las 4 cepas de *L. sake* analizadas eran activos frente a cepas de *L. brevis*, *L. curvatus*, *Carnobacterium divergens*, *Leu. mesenteroides*, *S. aureus*, *C. botulinum*, *C. perfringens* y *L. monocytogenes*.

La actividad inhibidora de las cepas estudiadas variaba no solo desde el punto de vista cuantitativo sino también cualitativo. Así por ejemplo, el sobrenadante de *L. sake* 148 fué el único que se mostró activo frente a todas las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas, además fué también el único que inhibía el desarrollo de las cepas CECT5105 y Scott-A.

La magnitud de la actividad inhibidora, cuando ésta existía, también fué distinta en cada cepa ensayada siendo, en general, el sobrenadante de *L. sake* 148 el más potente, si se exceptúa a *L. sake* 180 cuya capacidad de inhibir a *S. aureus* FRI137 o *L. monocytogenes* LI5 sv 1/2 era mayor. Sin embargo, no se inhibió ninguna de las bacterias Gram-negativas ensayadas, entre las que se incluían microorganismos potencialmente productores de toxii infecciones alimentarias como *Salmonella typhimurium* y *Yersinia enterocolítica*.

Tabla IV. 4.- Espectro antimicrobiano de las cepas de *Lactobacillus sake* seleccionadas

			Inhibición por el sobrenadante concentrado de la cepa de <i>L. sake</i> n°			
Microorganismo		Origen ^a	77	90	148	180
Bacterias Gram-positivas						
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	289	CECT	0	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb289	IMTH	16,8	15	20,4	12
<i>Lactobacillus carnis</i>	Lv61	FRIB	0	0	0	0
<i>Lactobacillus casei</i>	475	CECT	0	0	0	0
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Lb726	IMTH	14,2	15,6	17,2	13,8
<i>Carnobacterium divergens</i>	Lv13	FRIB	17	17	21,6	13
<i>Lactobacillus fermentum</i>	285	CECT	19,4	17,4	23,8	14
<i>Lactobacillus mesentericus</i>	394	CECT	0	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	221	CECT	0	0	0	0
<i>Lactobacillus sake</i>	Lb68	IMTH	0	0	0	0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	394	CECT	0	0	0	0
<i>Micrococcus varians</i>	230	CECT	0	0	0	0
<i>Staphylococcus xilosus</i>	237	CECT	0	0	0	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	481	CECT	0	0	0	0
<i>Streptococcus faecalis</i> (var. <i>licuefaciens</i>)	184	CECT	0	0	0	0
<i>Streptococcus faecium</i>	410	CECT	0	0	0	0
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	49	CECT	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	148	CECT	0	0	0	0
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	10018	NCIB	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	137	FRI	0	8,4	9	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	361	FRI	0	8,8	9,2	8

Tabla IV. 4.- (continuación)

Microorganismo	Origen ^a	Inhibición por el sobrenadante concentrado de la cepa de <i>L. sake</i> n°			
		77	90	148	180
<i>Listeria monocytogenes</i> 5105	NCTC	0	0	14,2	0
<i>Listeria monocytogenes</i> 7973	NCTC	9	9,6	17	10
<i>Listeria monocytogenes</i> LI5 sv 1/2	FVM	17,2	9,6	17	19,4
<i>Listeria monocytogenes</i> LI1 sv 4	FVM	9	0	17	9
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	FVM	0	0	15,2	0
<i>Clostridium botulinum</i> 551	CECT	0	9,4	9,8	10,2
<i>Clostridium perfringens</i> 376	CECT	11,4	10	15	10,6

Bacterias Gram-negativas

<i>Enterobacter cloacae</i> 194	CECT	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> BW545	MIT	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> enteropatogenica B41	IEKC	0	0	0	0
<i>Salmonella typhi</i> 409	CECT	0	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> T91	CENAN	0	0	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DC5	FRIB	0	0	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DC7	FRIB	0	0	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NT19	FRIB	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i> E20	Nuestra colección	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i> 14405	IPP	0	0	0	0

^a Abreviaturas como en tabla III. 1^b Actividad inhibidora expresada como diámetro de halo de inhibición en mm.

De los resultados obtenidos se desprende que:

1). Las sustancias inhibidoras producidas por las cepas de *L. sake* seleccionadas son distintas, ya que varían tanto en su espectro antimicrobiano como en la magnitud de su inhibición.

2). La sensibilidad de los distintos microorganismos indicadores frente a las sustancias inhibidoras varía de acuerdo con la especie y cepa utilizada, de donde se desprende que la cepa productora no sólo origina una sustancia inhibidora específica, sino que la sensibilidad frente a dicha actividad del microorganismo indicador empleado depende además de la especie también de la cepa.

3). La actividad inhibidora de *L. sake* 148 fué superior a la del resto de las cepas estudiadas, por lo que se seleccionó dicho microorganismo para la realización de estudios posteriores.

IV. 5. - Efecto de la composición del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus sake* 148

El medio MRS, que se emplea generalmente para el desarrollo de las bacterias lácticas es muy rico en sustancias proteicas por lo que dificultaría la purificación de las sustancias proteicas antimicrobianas. Consecuentemente, la actividad inhibidora de *L. sake* 148 se determinó en otros medios de cultivo, unos complejos y otros más definidos, de acuerdo con la metodología descrita en la sección III. 2. 6. La actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de los cultivos libres de células se comparó con la correspondiente de *L. sake* 148 crecido en medio MRS (tabla IV. 5).

Tabla IV. 5. - Actividad antimicrobiana de *L. sake* 148 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.

Los resultados de la tabla IV. 5. indican que los medios de cultivo APT y BHI (suplementado o no) no son adecuados para que se exprese la actividad antimicrobiana de *L. sake* 148. Lo mismo ocurre con el medio base (MM), suplementado con triptona o casitona, (hidrolizados proteícos derivados de la caseína). Sin embargo, la actividad inhibidora es cuantificable cuando el microorganismo se cultiva en medio complejo de APT o en medio base MM, suplementados con triptosa, proteosa-peptona, peptona o extracto de carne (todos ellos son hidrolizados proteicos de origen cárnico). La actividad inhibidora de en el medio base suplementado con triptosa (MM-triptosa), es similar a la obtenida en el medio MRS. Dado que la triptosa es, como se ha dicho, un hidrolizado proteico cárnico que contiene, fundamentalmente, aminoácidos y péptidos pequeños lo que facilita la purificación de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148.

IV. 6. - Parámetros cinéticos y actividad inhibidora de *L. sake* 148 a distintas temperaturas

IV. 6. 1. - Crecimiento y actividad antimicrobiana de *L. sake* 148

En las figuras 4,30 a 4,34 se muestra la relación entre crecimiento y actividad antimicrobiana de *L. sake* 148, al desarrollarse en los medios MRS y MM-triptosa a diversas temperaturas. De los resultados obtenidos se deduce que:

1.) *L. sake* 148 manifiesta un crecimiento cuantificable a 4, 8, 16, 25 y 32 °C, si bien el desarrollo es mayor a 25 y 32 °C.

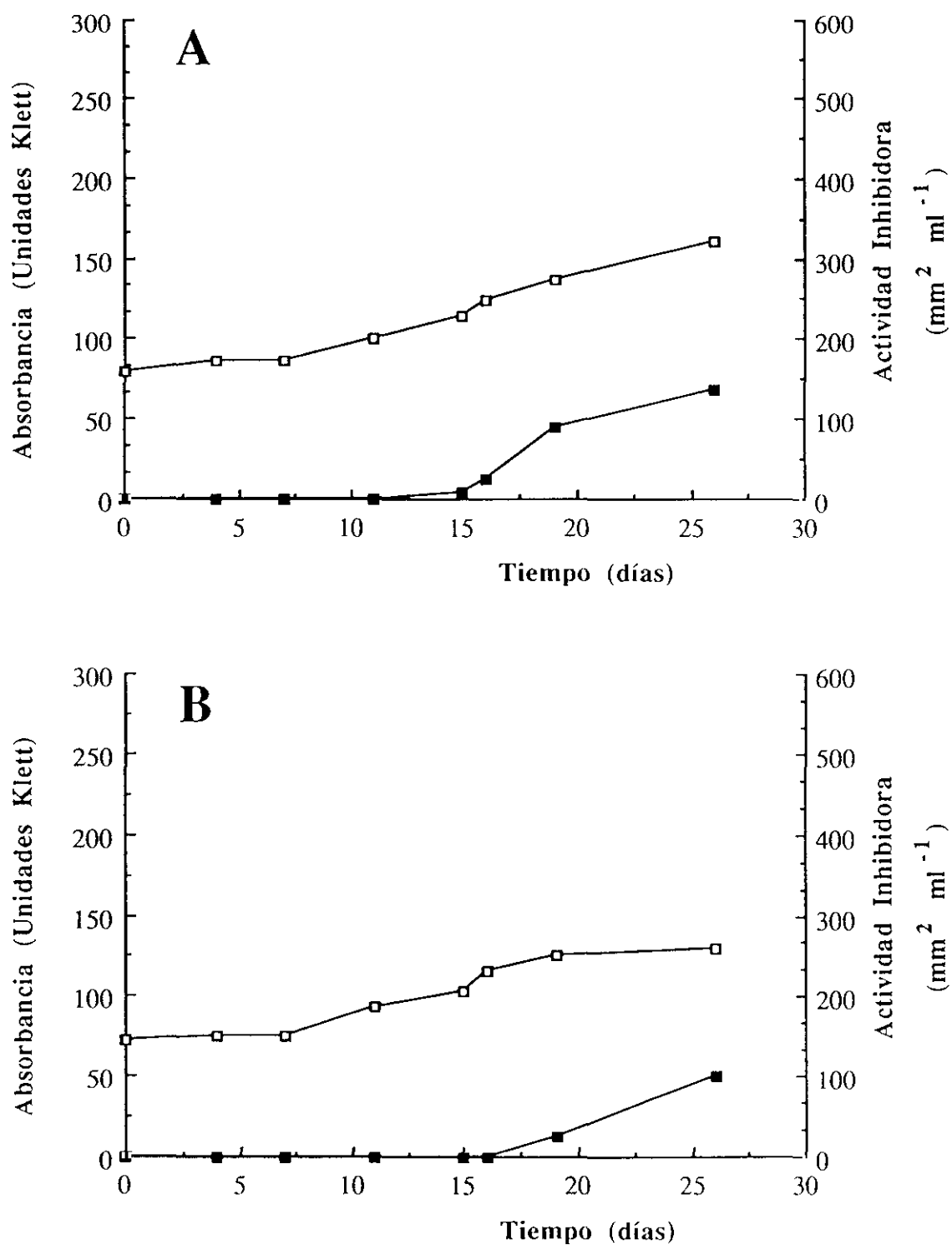


Figura 4. 30.- Crecimiento (□) y actividad antimicrobiana (■) de *Lactobacillus sake* 148 cultivado en los medios MRS (A) y MM-triptosa (B) a 4 °C.

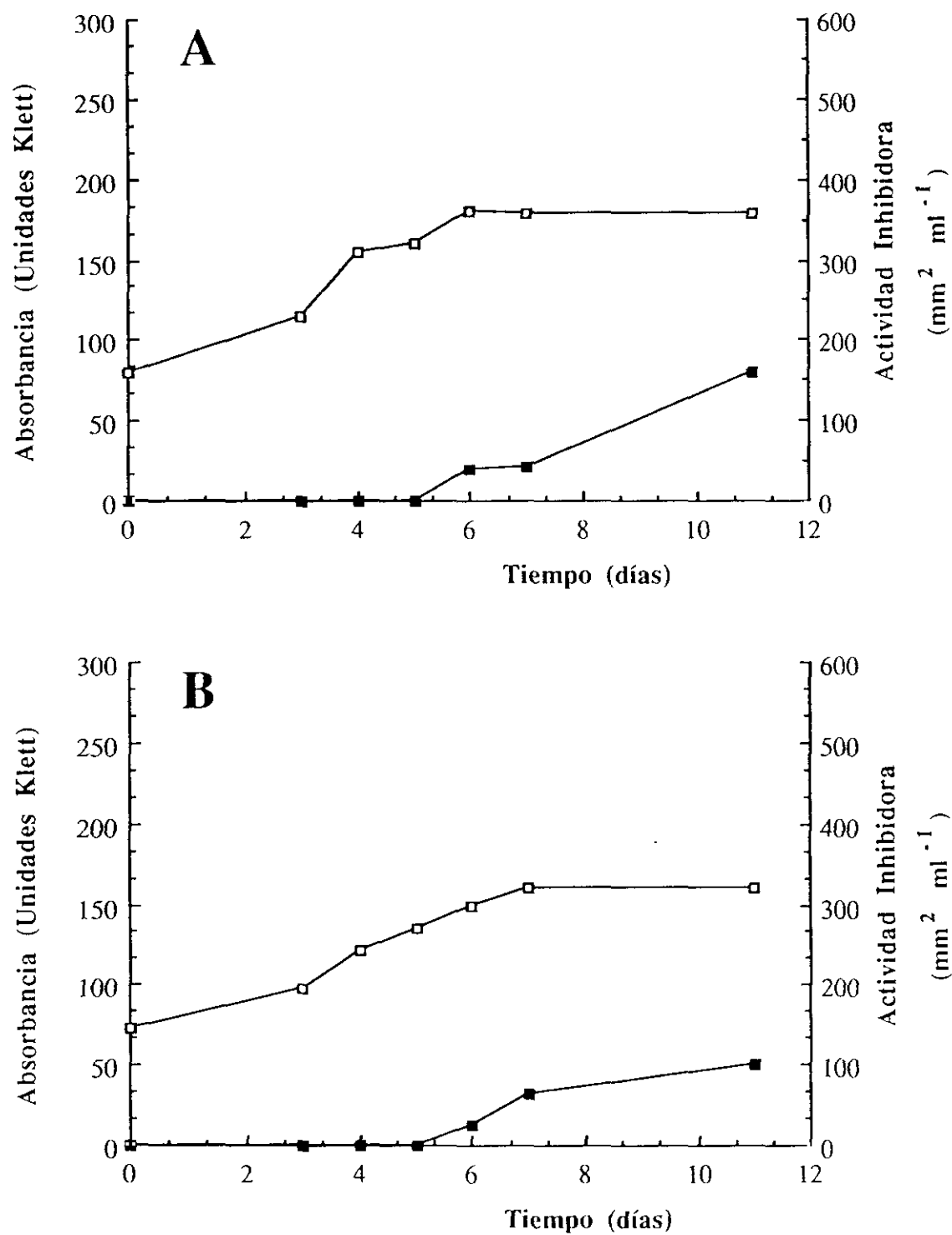


Figura 4. 31.- Crecimiento (□) y actividad antimicrobiana (■) de *Lactobacillus sake* 148 cultivado en los medios MRS (A) y MM-triptosa (B) a 8 °C.

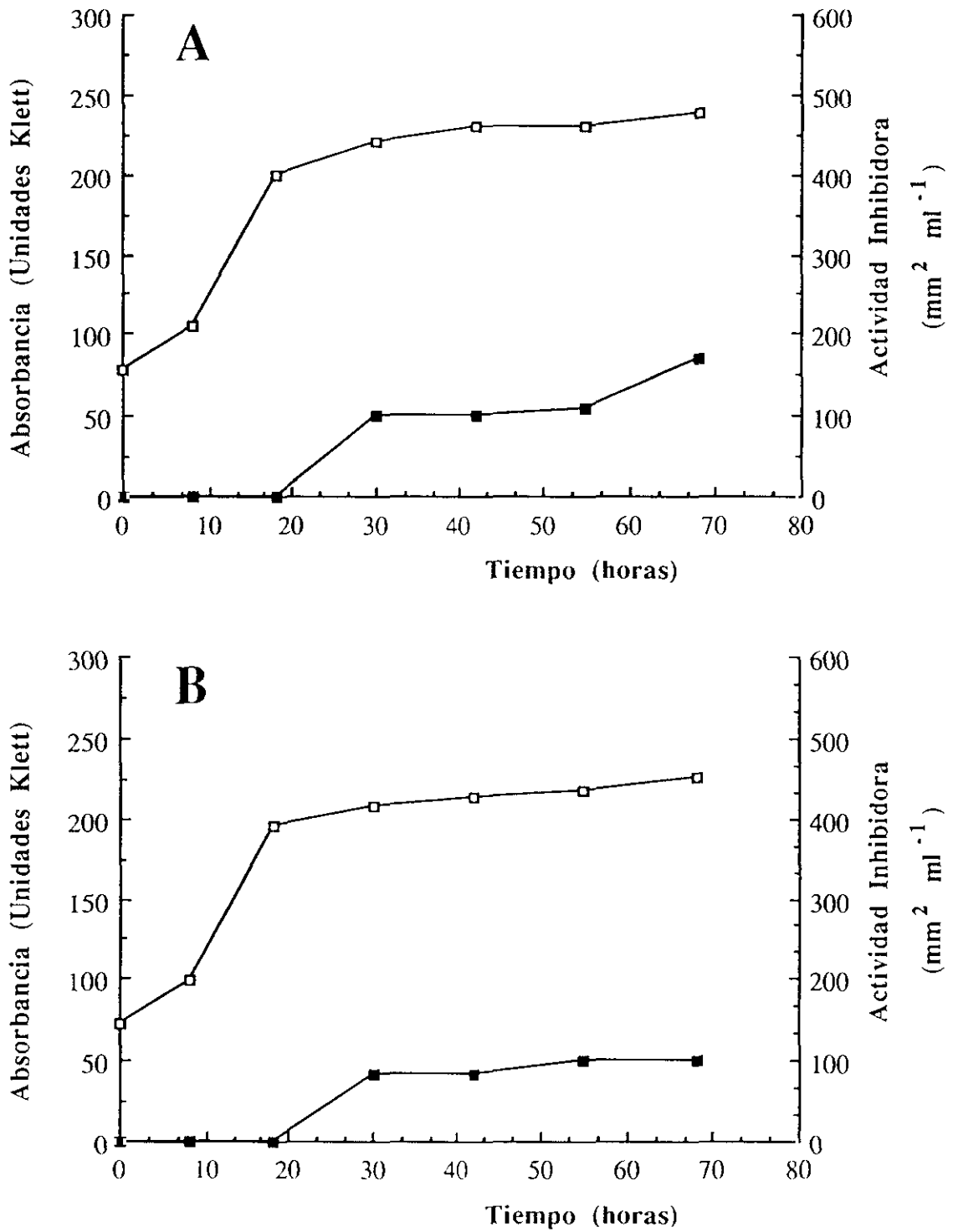


Figura 4. 32.- Crecimiento ($\square$) y actividad antimicrobiana ($\blacksquare$) de *L. sake* 148 cultivado en los medios MRS (A) y MM-triptosa (B) a 16 °C.

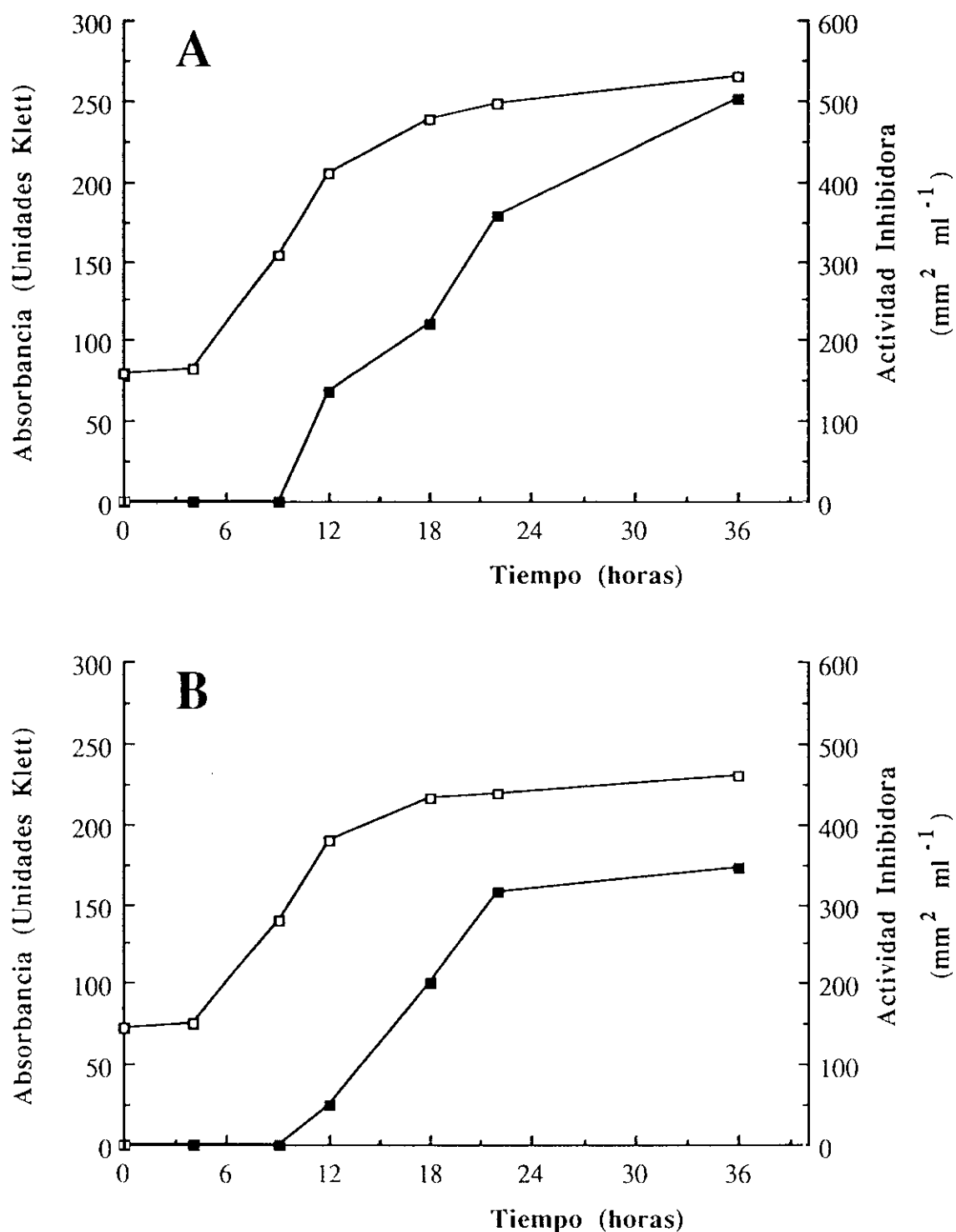


Figura 4. 33.- Crecimiento (□) y actividad antimicrobiana (■) de *Lactobacillus sake* 148 cultivado en los medios MRS (A) y MM-triptosa (B) a 25 °C.

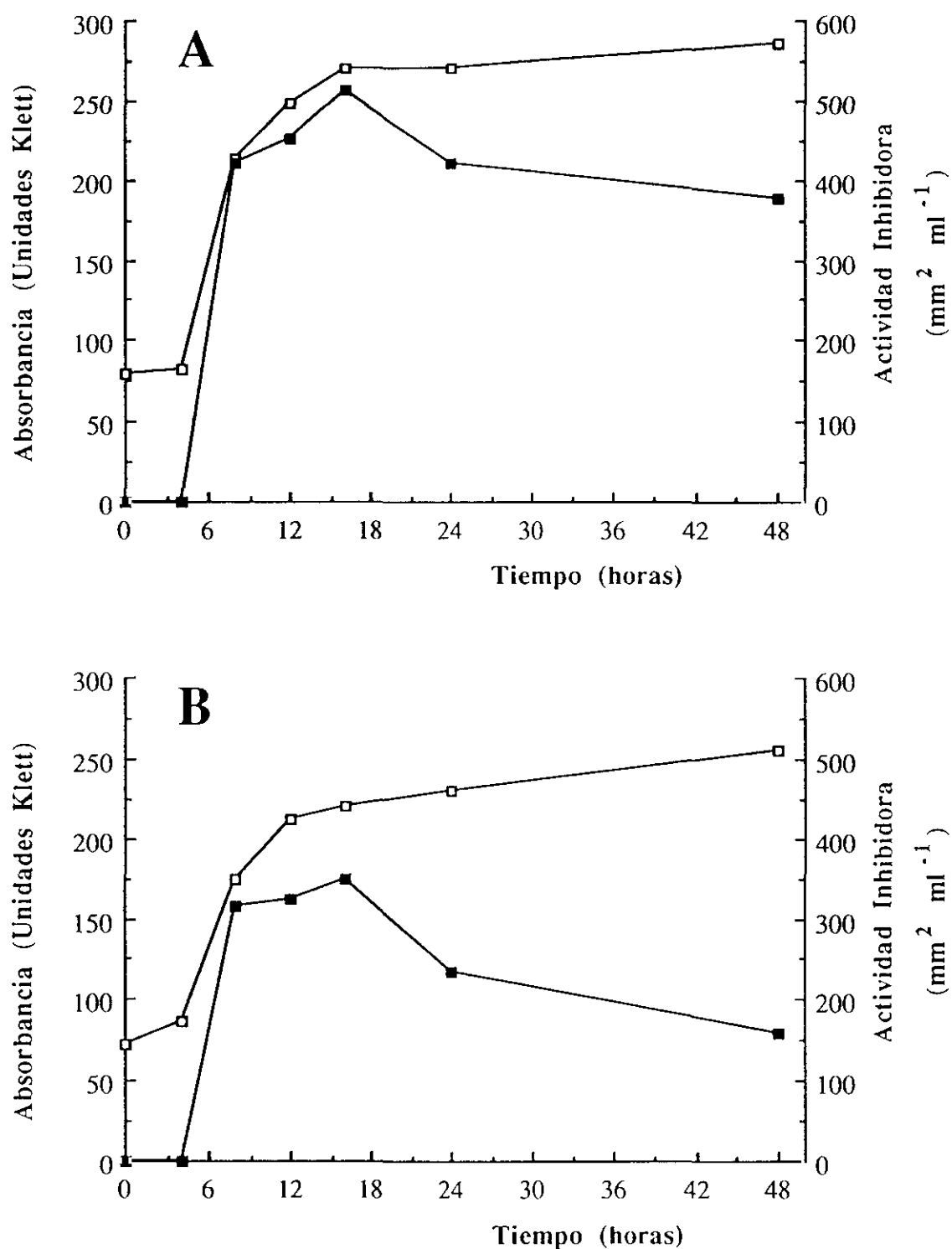


Figura 4. 34.- Crecimiento (□) y actividad antimicrobiana (■) de *Lactobacillus sake* 148 cultivado en los medios MRS (A) y MM-triptosa (B) a 32 °C.

2.) Dentro de una misma temperatura, el desarrollo óptimo se alcanza en el medio MRS.

3.) A las temperaturas de incubación empleadas, la actividad antimicrobiana se detectó poco después de iniciarse la fase logarítmica de crecimiento. Por tanto, la actividad antimicrobiana de esta cepa es una propiedad ligada al desarrollo celular, siendo detectable y cuantificable durante su crecimiento en un medio base o mínimo, suplementado con triptosa.

4.) Tanto en el medio MRS como en el MM-triptosa, la actividad antimicrobiana fué máxima cuando *L. sake* 148 se cultivaba a 32 °C, no obstante, la actividad fué siempre mayor en el medio complejo MRS. La actividad máxima a esta temperatura se detecta a las 16 horas de crecimiento; posteriormente se observaba un ligero descenso hasta el final de la incubación.

IV. 6. 2. - Parámetros cinéticos del crecimiento microbiano

Los parámetros cinéticos estudiados en *L. sake* 148 cultivado en los medios MRS y MM-triptosa a 4, 8, 16, 25 y 32 °C, fueron los siguientes; velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación celular (td), número de generaciones por hora (g/h) y peso celular seco final (mg/ml).

Los parámetros citados, así como el pH y la actividad antimicrobiana final se muestran en la tabla IV. 6. De ella se deduce que:

1.) La velocidad específica de crecimiento y el número de generaciones/hora fué mayor y, consiguientemente, el tiempo de duplicación menor, cuando *L. sake* 148 se desarrollaba a 25 y 32 °C. El crecimiento fué ligeramente inferior cuando el medio empleado era el MM-triptosa.

Tabla IV. 6. - Parámetros cinéticos de crecimiento, pH final y actividad inhibidora de *Lactobacillus sake* 148, 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	0,001	0,006	0,035	0,075	0,093
	MM-triptosa	0,001	0,005	0,035	0,073	0,087
td	MRS	563	108	19,2	9,2	7,4
	MM-triptosa	700	137	19,8	9,9	7,9
g/h	MRS	0,002	0,009	0,050	0,108	0,130
	MM-triptosa	0,001	0,007	0,050	0,100	0,120
pcs	MRS	0,82	0,89	1,14	1,25	1,34
	MM-triptosa	0,83	0,87	1,15	1,20	1,28
pH	MRS	5,4	5,2	4,9	4,5	4,5
	MM-triptosa	5,2	4,8	4,4	4,3	4,3
AI	MRS	137	160	170	503	513
	MM-triptosa	101	101	108	502	485
AIE	MRS	0,8	0,9	0,7	1,9	1,9
	MM-triptosa	0,8	0,6	0,5	2,2	2,2

(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 y AIE, actividad inhibidora del sobrenadante (mm^2/ml) y actividad inhibidora específica del mismo ($\text{mm}^2/\text{ml/Unidad Klett}$)

2.) El peso celular seco final fué mayor a 32 °C. Con el medio de MM-triptosa se obtenía un peso celular ligeramente inferior.

3.) El pH final fué más bajo a las temperaturas óptimas de crecimiento, siendo menor que el obtenido cuando el medio de cultivo empleado era el de MM-triptosa.

4.) La actividad inhibidora máxima se alcanzó a los 32 °C en el medio MRS, sin embargo, la actividad inhibidora específica, es decir, el cociente de dividir la actividad inhibidora máxima por la absorbancia del cultivo (Unidades Klett), fué igual a 25 y 32 °C y ligeramente superior en el medio de MM-triptosa.

IV. 7. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148

Conocidas las condiciones óptimas de producción de la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148 en medio semisintético de MM-triptosa, se procedió a su purificación por cromatografía de filtración en geles.

IV. 7. 1. - Cromatografía de filtración en Sephadex G-150, G-75 y G-50

El sobrenadante concentrado libre de células de *L. sake* 148, obtenido como se describe en la sección III. 2. 3. 3. 1. se purificó parcialmente en columnas de Sephadex G-150 fino, G-75 y G-50 de la manera descrita en la sección III.2. 8. de este trabajo. El resultado de ésta purificación se refleja en las figuras 4. 35, 4. 36 y 4. 37, en las que se muestra la actividad antimicrobiana y la absorbancia de las fracciones eluidas.

Al pasar el sobrenadante concentrado por la columna de Sephadex G-150 fino (figura 4. 35), la actividad antimicrobiana eluye tardíamente aunque antes de que aparezca el pico mayor de la absorbancia. Dado que este pico coincide con el volumen de elución de la columna

se supone que el peso molecular de la sustancia antimicrobiana se encuentra muy próximo al límite inferior de exclusión del Sephadex G-150 fino, que es de unos 5.000 daltons. Para obtener una mejor separación, las fracciones con mayor actividad antimicrobiana se juntaron y liofilizaron, volviéndolas a pasar por una columna de Sephadex G-75.

El resultado de la segunda filtración se observa en la figura 4. 36, apreciándose 2 picos de absorbancia máxima no bien definidos. El primero de ellos, más pequeño, coincide con el de la actividad inhibidora, mientras que el segundo coincide con el volumen de elución de la columna. La actividad inhibidora queda, por tanto, retenida en la columna. Sin embargo, la capacidad de separación de ésta columna es muy amplia (3.000 - 80.000 Da) por lo que, para obtener la mayor separación posible por cromatografía de filtración, se recurrió a una tercera columna con un intervalo de separación entre 1.500 y 30.000 Da. De nuevo, las fracciones con mayor actividad inhibidora procedentes de la segunda columna se juntaron y liofilizaron, pasándolas a continuación por una columna de Sephadex G-50.

Los resultados obtenidos con la columna de Sephadex G-50 se reflejan en la figura 4. 37, en la que se observa que el pico de actividad se corresponde con el de absorbancia máxima.

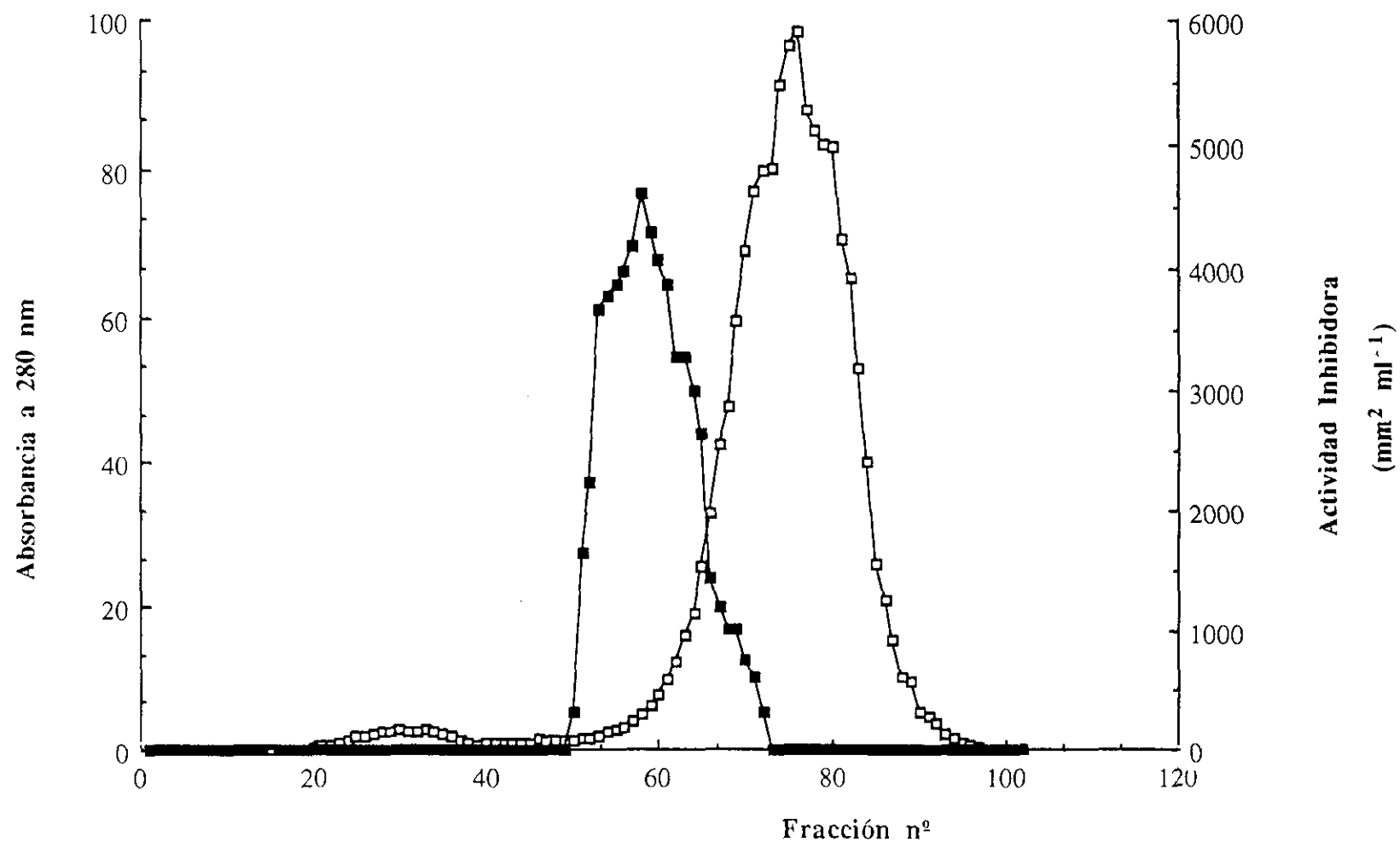


FIGURA 4. 35. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus sake* 148 en Sephadex G-150 fino.
(□) absorbancia a 280 nm, (■) actividad inhibidora.

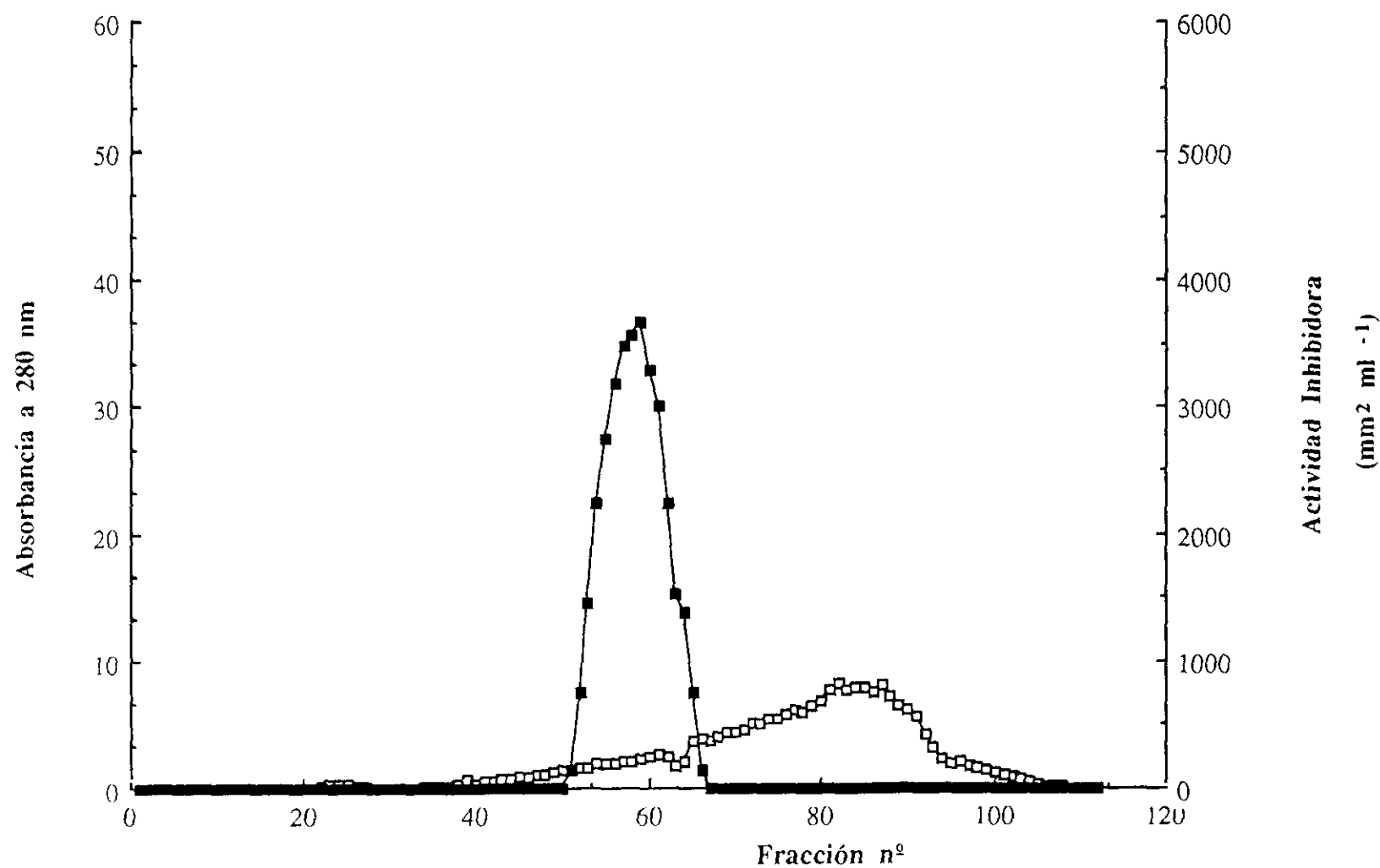


FIGURA 4. 36. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus sake* 148 en Sephadex G-75 .
 (□) absorbancia a 280 nm, (■) actividad inhibidora.

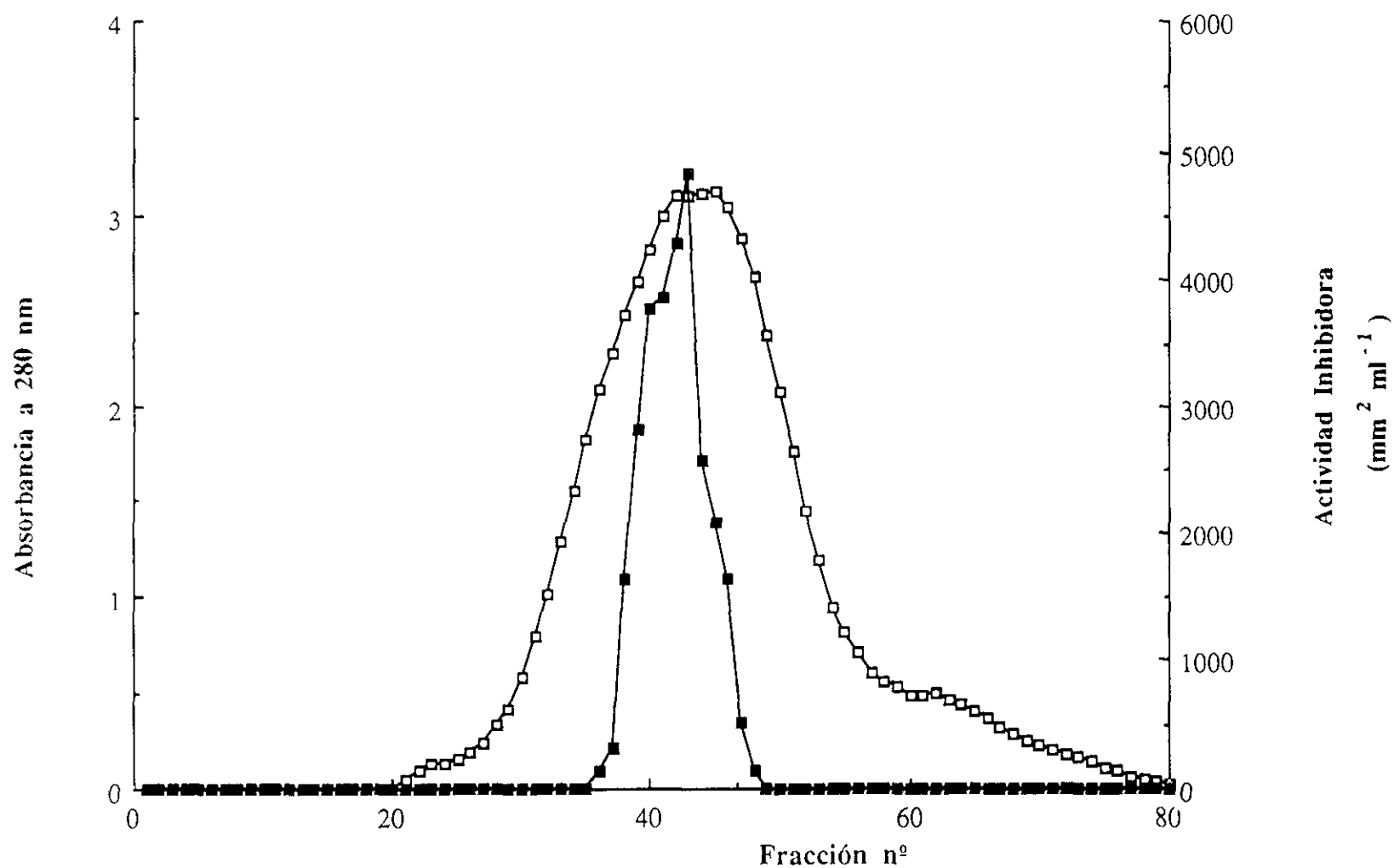


FIGURA 4. 37. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus sake* 148 en Sephadex G-50.
 ($\square$) absorbancia a 280 nm, ($\blacksquare$) actividad inhibidora.

La purificación de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148 se muestra en la tabla IV. 7, en la que se detalla el grado de purificación y porcentaje de recuperación para cada una de las etapas. La purificación final fué de 6,7, con una recuperación de la actividad antimicrobiana del 8 %.

Tabla IV. 7. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus sake* 148

	Volumen (ml)	Actividad		Actividad		Grado de Purificación (veces)
		Actividad Inhibidora (cm ² /ml)	Inhibidora Total (cm ²)	Proteína Total (mg/ml)	Inhibidora Específica (cm ² /ml)	Actividad Recuperada (%)
Sobrenadante del cultivo libre de células	500	6,5	3.267	10	0,6	100
Sephadex G-150	17	148,5	2.525	50	2,9	77
Sephadex G-75	6	111,6	670	25,9	2,2	21
Sephadex G-50	3	88,3	265	30	4,4	8

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

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

IV. 8. - Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus sake* 148

IV. 8. 1. - Efecto de diversos enzimas en la actividad inhibidora

Para determinar la sensibilidad de la actividad antimicrobiana parcialmente purificada a los enzimas proteolíticos, lipolíticos y amilolíticos, se realizó el ensayo descrito en la sección III. 2. 9. 2. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla IV. 8, de la que se deduce que:

1.) - La actividad antimicrobiana de *L. sake* 148 es destruida por los enzimas proteolíticos inespecíficos papaina, proteasa XIV y proteasa II. Otros enzimas proteolíticos, como la tripsina y pepsina, reducen la actividad antimicrobiana en un 92 % tras 12 horas de incubación a 32 °C.

2.) - Los enzimas lipolíticos lipasa I y lipasa VII, no modifican la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus sake* 148 y lo mismo ocurre cuando se emplean enzimas amilolíticos.

Los resultados obtenidos indican que la actividad antimicrobiana de *L. sake* 148 es de naturaleza proteica, sin que existan en su estructura componentes lipídicos ni hidrocarbonados que intervengan en dicha actividad.

Tabla IV. 8. - Efecto de diversos enzimas en la actividad antimicrobiana parcialmente purificada de *Lactobacillus sake* 148

Enzima	Concentración Final (mg/ml)	Actividad residual (%)		
		Tiempo de incubación (h)		
		2	6	12
Tripsina	1	46	25	8
	5	31	8	8
Pepsina	1	24	8	8
	5	31	8	8
Papaina	1	67	55	0
Proteasa XIV	1	21	16	0
Proteasa II	1	77	26	16
	5	37	16	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

IV. 8. 2. - Efecto del pH en la actividad inhibidora

El ensayo se realizó como se describe en la sección III. 2. 9. 3., variando el pH del tampón utilizado en la disolución de la actividad antimicrobiana entre 2,6 y 12 y utilizando a *L. fermentum* CECT285 como microorganismo indicador.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4. 38, de la que se deduce que la sustancia antimicrobiana es activa en el intervalo de pH analizado, aunque la mayor actividad se observa a valores de pH entre 5,6 y 6,6. La actividad inhibidora es ligeramente inferior cuando los valores de pH son extremos, tanto ácidos como básicos.

IV. 8. 3. - Cinética de termodestrucción de la actividad antimicrobiana exocelular de *Lactobacillus sake* 148

La cinética de termodestrucción de la actividad antimicrobiana de *L. sake* 148, se determinó depositando en viales de vidrio 20 mg de la sustancia parcialmente purificada en 100 µl de tampón citrato-fosfato 4 mM de pH 7, a continuación se cierran herméticamente, y se calientan durante intervalos de tiempo variables, dependiendo de la temperatura de calentamiento (sección III. 2. 9. 4).

La figura 4. 39 muestra la inactivación térmica de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 a 80, 100, 121, 135 y 150 °C; de ella se deduce:

1.- La actividad antimicrobiana de *L. sake* 148 es resistente a temperaturas de 80 y 100 °C, perdiendo únicamente un 40 % de su actividad inhibidora inicial cuando se calienta a 100 °C durante 30 min.

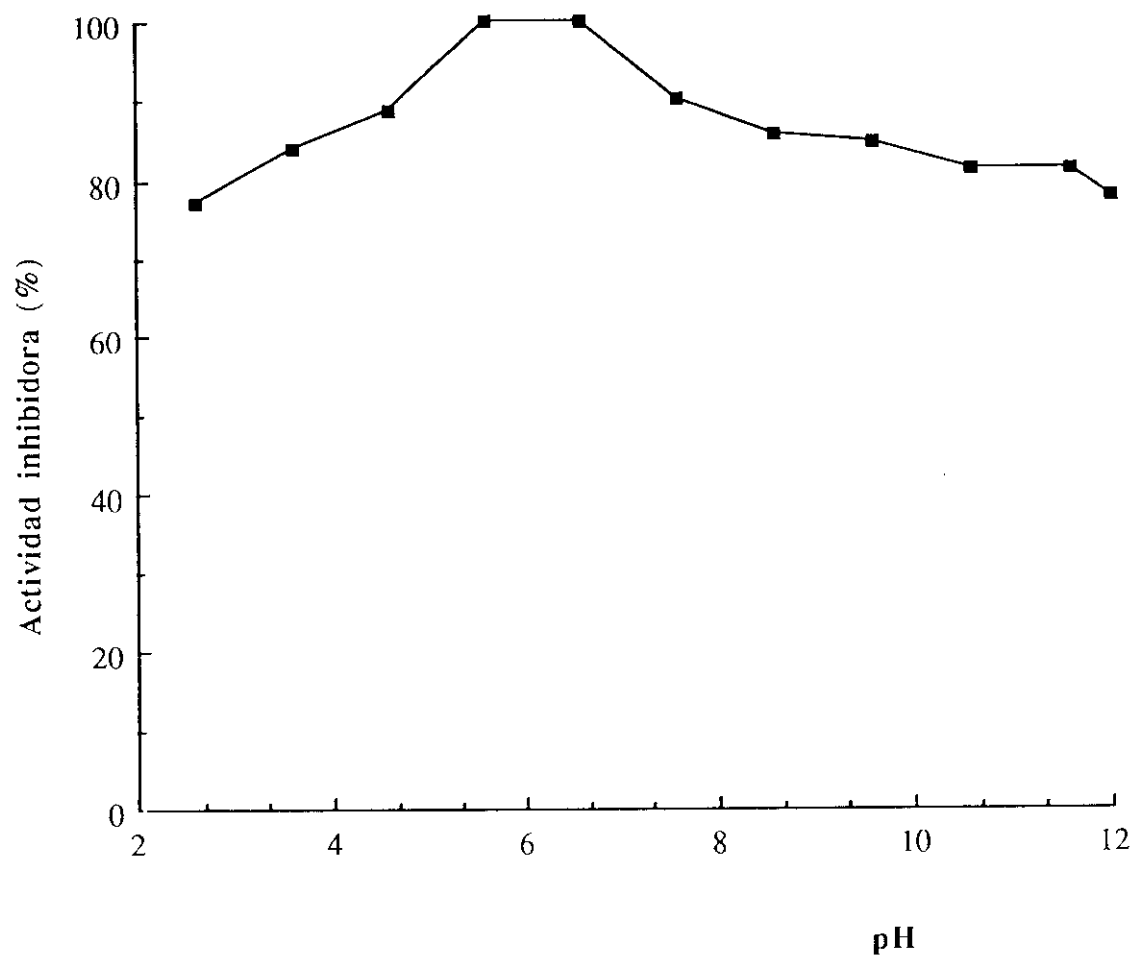


Figura 4. 38. - Efecto del pH en la actividad de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148.

Esta termorresistencia también se manifestó cuando las temperaturas de calentamiento fueron de 121, 135 y 150 °C.

2.- A las temperaturas empleadas, la inactivación de la sustancia antimicrobiana se ajustó, con ligeras variaciones, a ecuaciones cinéticas de primer orden, mientras los parámetros de termodestrucción "D", " $t_{1/2}$ " y "Z" se calcularon, como se describe en la sección III. 2. 9. 5. 3. 2. , a partir de los resultados de termodestrucción (figura 4. 39).

Los valores "D" a 80, 100, 121, 135 y 150 °C, calculados asumiendo una cinética de inactivación de primer orden, fueron de 285,7, 119, 23,8, 17,4 y 15,2 minutos respectivamente. Los valores " $t_{1/2}$ ", calculados para las mismas temperaturas, fueron de 198, 82,5, 16,5, 12,05 y 10,6 minutos respectivamente. Finalmente, 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, se calculó el valor "Z"; dicho valor, procedente de la recta comprendida entre 121 y 150 °C, fué de 153,4 °C.

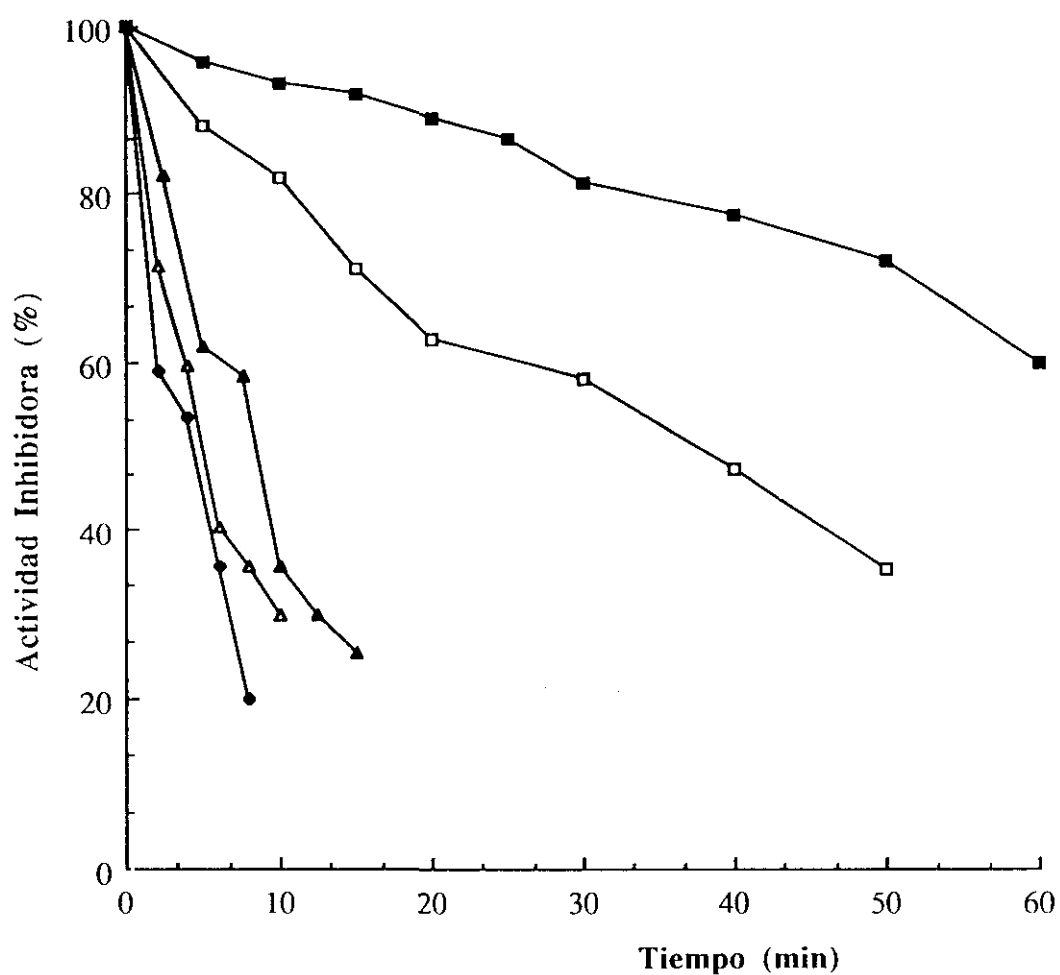


Figura 4. 39.- Resistencia térmica de la actividad antimicrobiana parcialmente purificada de *Lactobacillus sake* 148 tras su calentamiento a 80 °C (■), 100 °C (□), 121 °C (▲), 135 °C (△) y 150 °C (◆).

IV. 8. 4. - Determinación del peso molecular por cromatografía de filtración en Sephadex G-50

El peso molecular aparente de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148, se determinó sometiénolo a una nueva cromatografía de filtración en un gel de Sephadex G-50. Como se describe en la sección III. 2. 9. 5, la representación gráfica de los eluatos cromatográficos de marcadores de peso molecular estándar, en función del logaritmo de sus pesos moleculares, permite determinar el peso molecular de una proteína problema por interpolación en la gráfica de la fracción cromatográfica que la contiene.

La cromatografía se realizó en las condiciones descritas en la sección III. 2. 9. 5, y su resultado se refleja en la tabla IV. 9. En dicha tabla se muestran el peso molecular en daltons, su logaritmo y las fracciones de elución de los compuestos estándar y de la actividad antimicrobiana de *L. sake* 148. El peso molecular de la sustancia inhibidora, obtenido por interpolación gráfica de los resultados obtenidos (fig. 3. 7), fué de 4.640 daltons.

IV. 8. 5. - Determinación del peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

Para confirmar el peso molecular de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148, determinado por cromatografía de filtración, se utilizaron las técnicas de electroforesis en geles de poliacril- amida 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).

Tabla IV. 9. - Determinación del peso molecular de la actividad antimicrobiana parcialmente purificada de *Lactobacillus sake* 148, por cromatografía de filtración en Sephadex G-50

Compuesto	Fracción de elución n°	Logaritmo del peso molecular	Peso molecular (Daltons)
α -quimotripsinógeno	27	4,40	25.000
RNAse pancreático	32	4,14	13.700
Actividad antimicrobiana	43	3,67	4.640
Vitamina B ₁₂	55	3,13	1.355

IV. 8. 5. 1. - Electroforesis según la técnica de Swank y Munkres (1971)

Esta técnica permite separar cadenas peptídicas de pequeño tamaño molecular gracias a la incorporación de urea a los geles de poliacrilamida. Con tal fin separador, 50, 100 y 200 µg de la actividad inhibidora parcialmente purificada de *L. sake* 148 se sometieron a un análisis electroforético en geles de SDS-poliacrilamida-urea, según la técnica descrita en la sección III. 2. 9. 6. 1.

No obstante, una vez teñidos los geles no se apreció ninguna banda proteica en los lugares en los que se habían depositado las soluciones que contenían la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada. Considerando que la falta de bandas proteicas nítidas en los geles podía ser consecuencia de una falta de poder separador del gel con urea o de un fallo del método de tinción de los geles, se recurrió a la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS según la técnica de Laemli (1970).

IV. 8. 5. 2. - Electroforesis en geles de 20% poliacrilamida con SDS (Laemli, 1970)

Aunque esta técnica electroforética tiene un menor poder de resolución en los péptidos de bajo peso molecular que la de Swank y Munkres, al utilizar el método de tinción de Merrill y col. (1981), a base de nitrato de plata, facilita la tinción de las proteínas. Esta tinción aplicada a las proteínas de los geles de poliacrilamida con SDS, es 10-50 veces más sensible que la del azul brillante de Coomassie.

Siguiendo la técnica descrita en la sección III. 2. 9. 6. 2, se aplicaron en electroforesis 5, 10 y 15 µg de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148. En la figura 4.40 se indican los resultados obtenidos. Como puede observarse, no se detectan bandas proteicas definidas en los lugares de los geles en los que se depositó la sustancia

antimicrobiana parcialmente purificada. Sólo en el frente electroforético se puede distinguir una banda de tinción difusa. La densidad de esta banda aumenta a medida que crece la concentración de sustancia antimicrobiana parcialmente purificada depositada en el correspondiente pocillo.

IV. 8. 6.- Determinación de la composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada

La utilización de la técnica de detección de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), descrita en la sección III. 2. 9. 7, así como el estudio comparativo de los cromatogramas del hidrolizado ácido de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada y de los aminoácidos patrón, dió lugar a los resultados que se reflejan en la tabla IV. 10. De ella se deduce que:

1.) La sustancia antimicrobiana posee 14 aminoácidos distintos, de los que 13 se corresponden a los siguientes: ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, treonina, alanina, prolina, valina, tirosina, metionina, leucina, fenilalanina y lisina; el decimotercero, que eluía entre el ácido glutámico y la glutamina, no pudo identificarse al no corresponder a ninguno de los aminoácidos empleados como patrón.

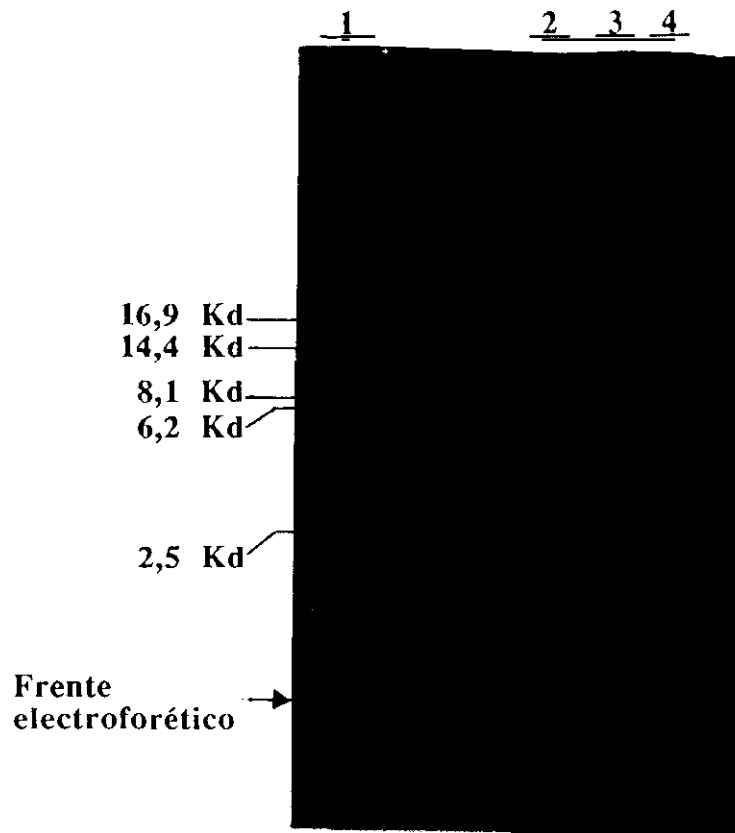


Figura 4. 40.- Electroforesis por SDS-PAGE de la actividad antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148. Líneas: 1, marcadores de peso molecular standard (de arriba a abajo, 16.949, 14.404, 8.159, 6.214 y 2.512 daltons); 2, 3 y 4 corresponden, respectivamente a 15, 10 y 5 µg de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada.

Tabla IV. 10.- Composición aminoacídica de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148

Aminoácido	Contenido (nmol)	Residuos por molécula (probable)
Acido aspártico	7,7	4
Acido glutámico	10,9	6
No Identificado*	7,1	3 (4)
Glicina	8,6	4 (5)
Histidina	1,9	1
Treonina	4,3	2
Alanina	8,4	4
Prolina	11,6	6
Tirosina	21,9	1
Valina	5,9	3
Metionina	2,1	1
Leucina	4,5	2
Fenilalanina	1,5	1
Lisina	4,8	2 (3)

* Peso molecular asignado igual a la media del de los aminoácidos empleados como patrón.

2.) La sustancia antimicrobiana es muy rica en aminoácidos de carácter hidrofóbico; (alanina, leucina, valina, fenil alanina, metionina y prolina) que constituyen el 50% de la molécula. Los más frecuentes son prolina (6 residuos/molécula), ácido glutámico (6) y glicina (4-5), y los menos histidina (1), treonina (2), metionina (1), leucina (2) y fenil-alanina (1). El aminoácido que no pudo identificarse eluye en una posición muy próxima de la glicina, y en cada molécula hay unos 3-4 residuos (asumiendo un peso molecular medio de 130).

3.) La sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 posee unos 40 a 43 aminoácidos por molécula, lo que da idea de su pequeño tamaño molecular (5047); ello se corresponde bastante bien con el peso molecular obtenido por cromatografía de filtración en Sephadex G-50 (4640), pero no con su comportamiento en la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (2500).

IV. 9 .- Mecanismo de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de *Lactobacillus sake* 148

Cuando a los medios MRS, APT y BHI incubados con unas 5×10^5 ufc/ml de diversos microorganismos indicadores (sección III. 2. 10) se les adicionan 0,5 ml de sobrenadantes de *L. sake* 148 libres de células, debidamente concentrados, se detiene el crecimiento de las bacterias sensibles (tabla IV. 11), pero no disminuye el número de ufc/ml. Sin embargo, la adición de 0,5 ml de un cultivo de *L. sake* 23, carente de actividad inhibidora, no afecta al desarrollo de estos microorganismos indicadores. Los resultados obtenidos indican que la actividad antimicrobiana de *L. sake* 148 posee un mecanismo de acción bacteriostático.

IV. 10. - Concentración inhibidora mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148

La concentración inhibidora mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148 frente a diversos microorganismos indicadores, se determinó de la manera descrita en la sección III. 2. 11. Los resultados se muestran en la tabla IV. 12. Como se ve, la CIM varía entre 1 y 18 mg/ml, dependiendo de los microorganismos indicadores utilizados.

Tabla IV. 11.- Efecto de los sobrenadantes concentrados de *Lactobacillus sake* 148 y 23, antagonista (T) y no antagonista (C) respectivamente, en el desarrollo a 32 °C de algunos microorganismos indicadores.

Microorganismo ^a			log ufc/ml			
			0h	4h	8h	16h
<i>Lactobacillus fermentum</i>	285	T	5,3	5,3	5,4	5,5
		C	5,5	6,8	8,7	9,8
<i>Lactobacillus curvatus</i>	726	T	5,6	5,6	5,7	6,1
		C	5,6	6,9	8,5	9,8
<i>Carnobacterium divergens</i>	LV13	T	5,7	5,7	5,3	5,4
		C	5,6	6,9	8,7	9,5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	395	T	5,7	5,8	5,9	6,4
		C	5,7	6,9	8,9	9,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	5105	T	5,8	5,8	5,7	5,7
		C	5,7	6,9	8,9	9,3
<i>Listeria monocytogenes</i>	7973	T	5,3	5,2	5,7	5,7
		C	5,3	6,8	8,7	9,1
<i>Listeria monocytogenes</i>	LI5 sv 1/2	T	5,8	5,7	5,9	6,2
		C	5,8	6,9	8,9	9,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	Scott A	T	5,8	5,7	5,9	6,1
		C	5,8	6,9	8,8	9,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	T91	T	5,5	6,9	8,8	9,5
		C	5,4	6,8	8,7	9,4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	E20	T	5,7	6,1	6,9	8,2
		C	5,8	6,3	7,1	8,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	137	T	5,3	5,1	5,6	6,3
		C	5,2	6,9	8,9	9,2

Tabla IV. 11. (continuación)

Microorganismo ^a			log ufc/ml			
			0h	4h	8h	16h
<i>Staphylococcus aureus</i>	371	T	5,2	5,3	5,3	6,5
		C	5,3	6,7	8,7	9,8
<i>Clostridium botulinum</i>	551	T	4,9	4,8	4,9	4,9
		C	4,9	5,0	5,7	6,3
<i>Clostridium perfringens</i>	376	T	5,1	5,2	5,3	6,4
		C	5,1	5,3	7,7	9,3

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

Tabla IV. 12.- Concentración Inhibidora Mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148, en diversos microorganismos indicadores.

Microorganismo indicador	Concentración Inhibidora Mínima (mg/ml)
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT285	1
<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	2
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC5105	9
<i>Listeria monocytogenes</i> LI5 sv 1/2	9
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	9
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI137	9
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI349	18
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI361	18
<i>Clostridium botulinum</i> 551	4
<i>Clostridium perfringens</i> 376	4

IV.11.- Caracterización inmunológica parcial de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148

IV. 11. 1.- Análisis por inmunodifusión en geles de agarosa, de los inmunoseros de conejos cuando se emplea como antígeno la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148

La sustancia antimicrobiana exocelular parcialmente purificada de *L. sake* 148, se obtuvo como se describe en la sección III. 2. 12 de este trabajo. Antes de inocularla a los conejos se comprobó por inmunodifusión en geles de agarosa que los sueros de los conejos no originaban líneas de precipitación visibles al enfrentarse con la sustancia.

Durante la inmunización de los animales se realizaron 4 sangrías parciales para comprobar la producción de anticuerpos frente al extracto antigénico, así como para determinar la presencia o ausencia de reacciones cruzadas con otros componentes procedentes del medio MM-triptosa (concentrado 20 veces por liofilización); lo mismo se comprobó con el sobrenadante libre de células de un cultivo de *L. sake* 148 en medio MM-triptosa y con el mismo sobrenadante concentrado 20 veces por liofilización. No obstante, en ningún caso se detectaron líneas de precipitación.

IV. 11. 2.- Detección de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148 por técnicas inmuno-enzimáticas (ELISA)

IV. 11. 2. 1.- Detección por la técnica del ELISA indirecto clásico

Antes de la inoculación de los conejos con el extracto antigénico de interés, se comprobó que ninguno de ellos presentaba reactividad inmunológica al someter una muestra de su suero al ELISA indirecto que se describe a continuación.

IV. 11. 2. 1. 1.- Evaluación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo

Para garantizar que la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148 saturaba el fondo de los pocillos de las placas de ELISA, se diluyeron 100 µg del extracto antigénico citado en 1 ml de tampón PBS. Con idénticos fines, y como extracto antigénico control, se empleó el medio MM-triptosa liofilizado a la concentración de 1 mg de proteína por ml de tampón PBS.

Como conjugado se utilizó uno comercial, anti-IgG de conejo, obtenido de cabras y marcado con peroxidasa de rábano (Nordic). Para establecer la dilución de trabajo de este conjugado, se siguieron las indicaciones del fabricante y el criterio aplicado para la elección del antígeno, es decir, garantizar la presencia de conjugado en exceso. La dilución elegida fué la 1/1000.

IV. 11. 2. 1. 2.- Determinación de la respuesta inmunológica de los conejos frente al extracto antigénico inoculado

Durante la inmunización de los conejos se realizaron varias sangrías parciales para comprobar que producían anticuerpos frente al extracto antigénico inoculado, y que no se originaban reacciones cruzadas frente al extracto antigénico control. En la figura 4. 41 se muestran los resultados procedentes de esta determinación. De la figura se desprende que:

1.) En las sangrías parciales efectuadas a los 21 y 42 días de la primera inoculación antigénica no aumenta significativamente la respuesta inmunológica de los conejos frente a los antígenos de interés.

2.) En las sangrías realizadas a los 63 y 84 días de la primera inoculación la respuesta inmunológica de los conejos aumentó significativamente, haciéndolo también pero ligeramente en la sangría final que tuvo lugar a los 91 días de la inoculación inicial.

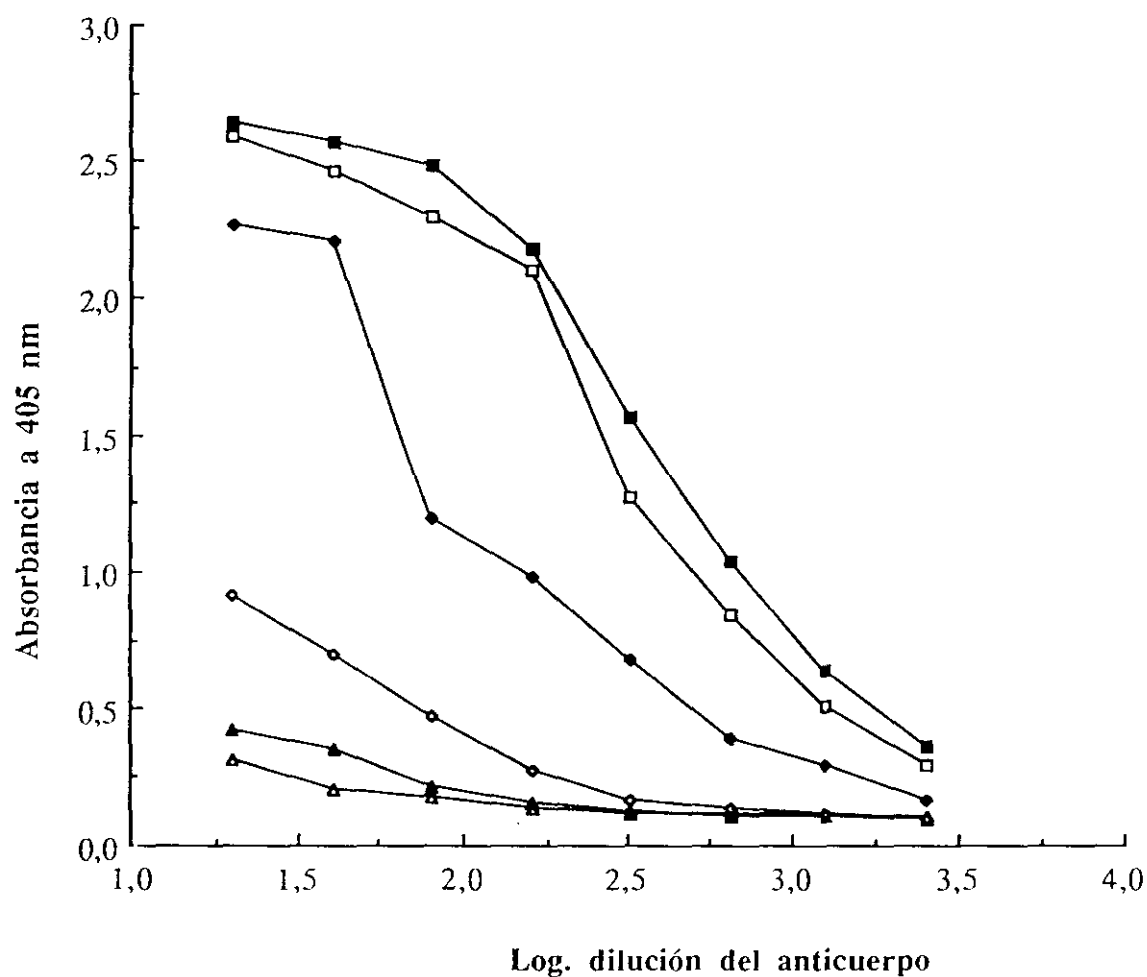


Figura 4. 41.- Detección inmunológica por un ELISA indirecto, de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148 a los 0 (Δ), 21 (▲), 42 (◇), 56 (◆), 84 (□) y 91 (■) días de inoculación en conejo. Concentración del antígeno 100 $\mu\text{g/ml}$. Dilución del conjugado 1/1000.

IV. 11. 2. 2.- Detección de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 en el medio de cultivo MM-triptosa

La misma técnica del ELISA indirecto empleada para determinar la respuesta inmunológica de los conejos inmunizados con la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148, se utilizó para evaluar la presencia de dicha sustancia en el medio de cultivo MM-triptosa.

IV. 11. 2. 2. 1.- Determinación de la concentración idónea de los reactivos que intervienen en el ensayo

Las indicaciones del fabricante, junto con los resultados de experiencias preliminares, permitieron establecer como dilución de trabajo del conjugado la de 1/1000.

Una vez ajustada la concentración de trabajo del conjugado, se procedió a establecer la más idónea para el inmunosuero (cuya concentración inicial de proteína era de 20 mg/ml). Para ello, en un ensayo previo, se determinó la dilución del inmunosuero más apta para diferenciar la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada disuelta en tampón PBS, de la disuelta en medio MM-triptosa (figura 4. 42). De los resultados obtenidos se desprende que los componentes del medio de cultivo interfieren en la detección de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148, si bien el inmunosuero disuelto 16 veces en tampón PBST es el que mejor detecta dicha sustancia en el medio de cultivo de MM-triptosa.

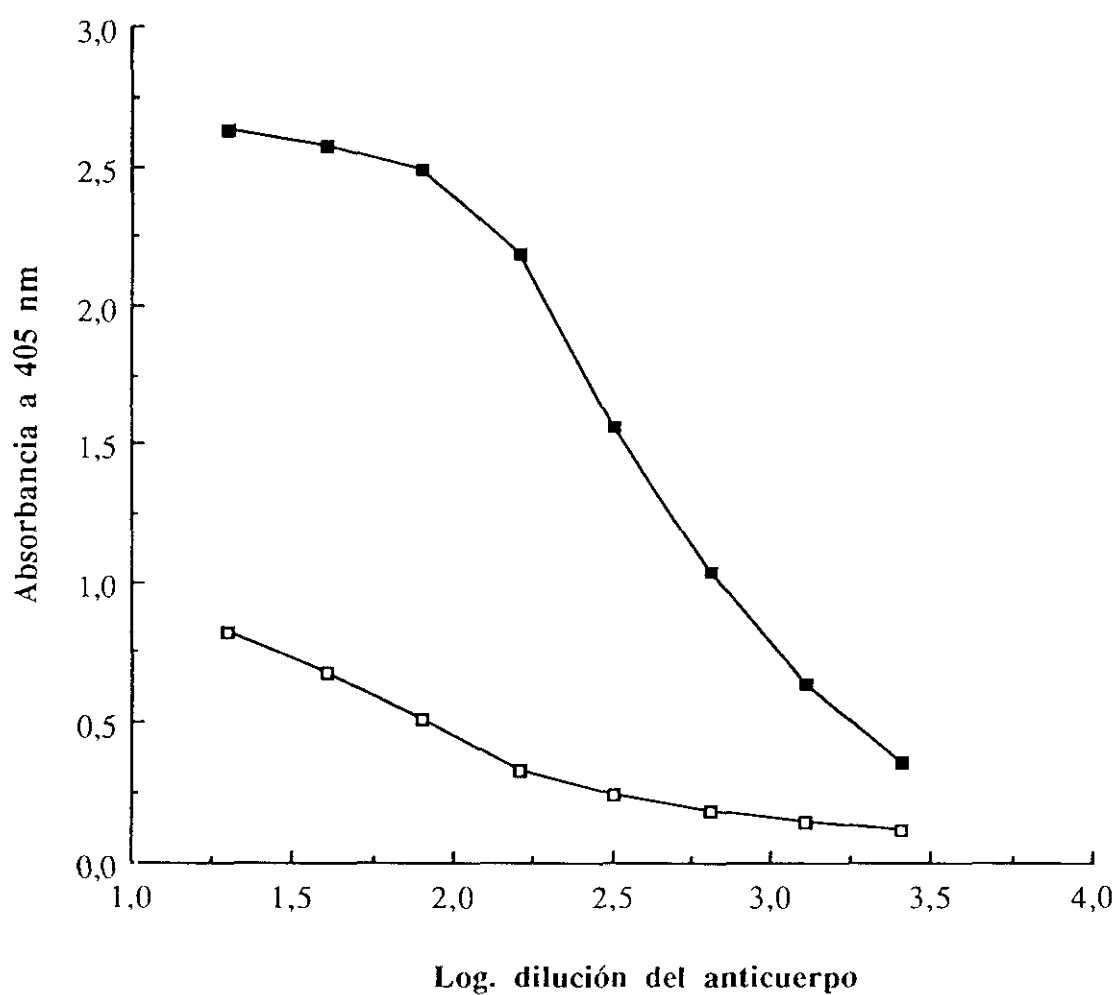


Figura 4. 42 .- ELISA indirecto de la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148 en tampón PBS (■) y en medio de MM-triptosa (□). El resto de los parámetros como en la figura 4. 41.

Posteriormente, se realizó un ensayo para detectar la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148 cultivado en medio de MM-triptosa. Los resultados del ELISA indirecto de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 en tampón PBS, en medio de MM-triptosa y en el sobrenadante libre de células de un cultivo de este microorganismo realizado en medio de MM-triptosa se muestran en la figura 4.43. De los resultados obtenidos se deduce que:

1.- Cuando la bacteriocina parcialmente purificada de *L. sake* 148 se disuelve en tampón PBS se puede detectar la presencia de hasta 6 µg de proteína por cada pocillo de la placa de ELISA.

2.- Sin embargo cuando se emplea el ELISA indirecto para detectar la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 crecido en medio de cultivo MM-triptosa, los inmunoseros empleados no detectan dicha sustancia.

Dada la imposibilidad de detectar la sustancia antimicrobiana en medio de MM-triptosa y con la finalidad de aumentar la sensibilidad del ELISA indirecto, se optó por mejorar la sensibilidad del ensayo mediante la utilización de anticuerpos conjugados a la biotina.

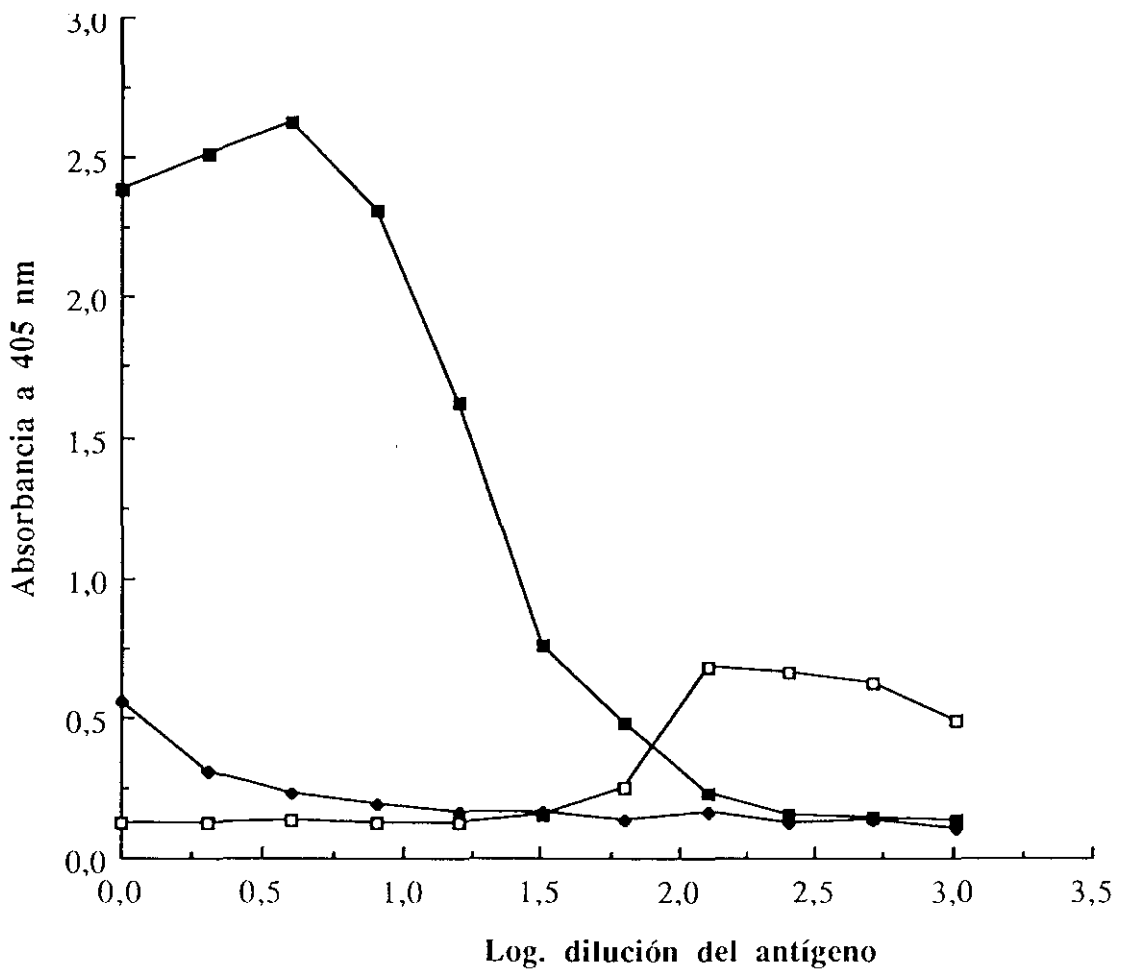


Figura 4. 43.- ELISA indirecto de la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148 en tampón PBS (■), en medio de MM-triptosa (□) y en el sobrenadante de un cultivo de *L. sake* 148 en MM-triptosa (◆). Dilución del anticuerpo 1/160. Dilución del conjugado 1/1000.

IV. 11. 3.- Detección de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 mediante un ELISA indirecto con el sistema de amplificación biotina-avidina

El empleo de esta técnica con los mismos extractos antigénicos y en las mismas condiciones no mejoró los resultados ya que, paralelamente a la mejora observada en la detección de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada, se aprecia también una mayor interacción de los anticuerpos biotinizados con los extractos antigénicos empleados como control (figura 4. 44). Se concluyó por lo tanto, que en el medio de MM-triptosa, a pesar de tener una composición muy sencilla, existen compuestos que, de una forma u otra, interfieren con la detección inmunológica de la actividad antimicrobiana.

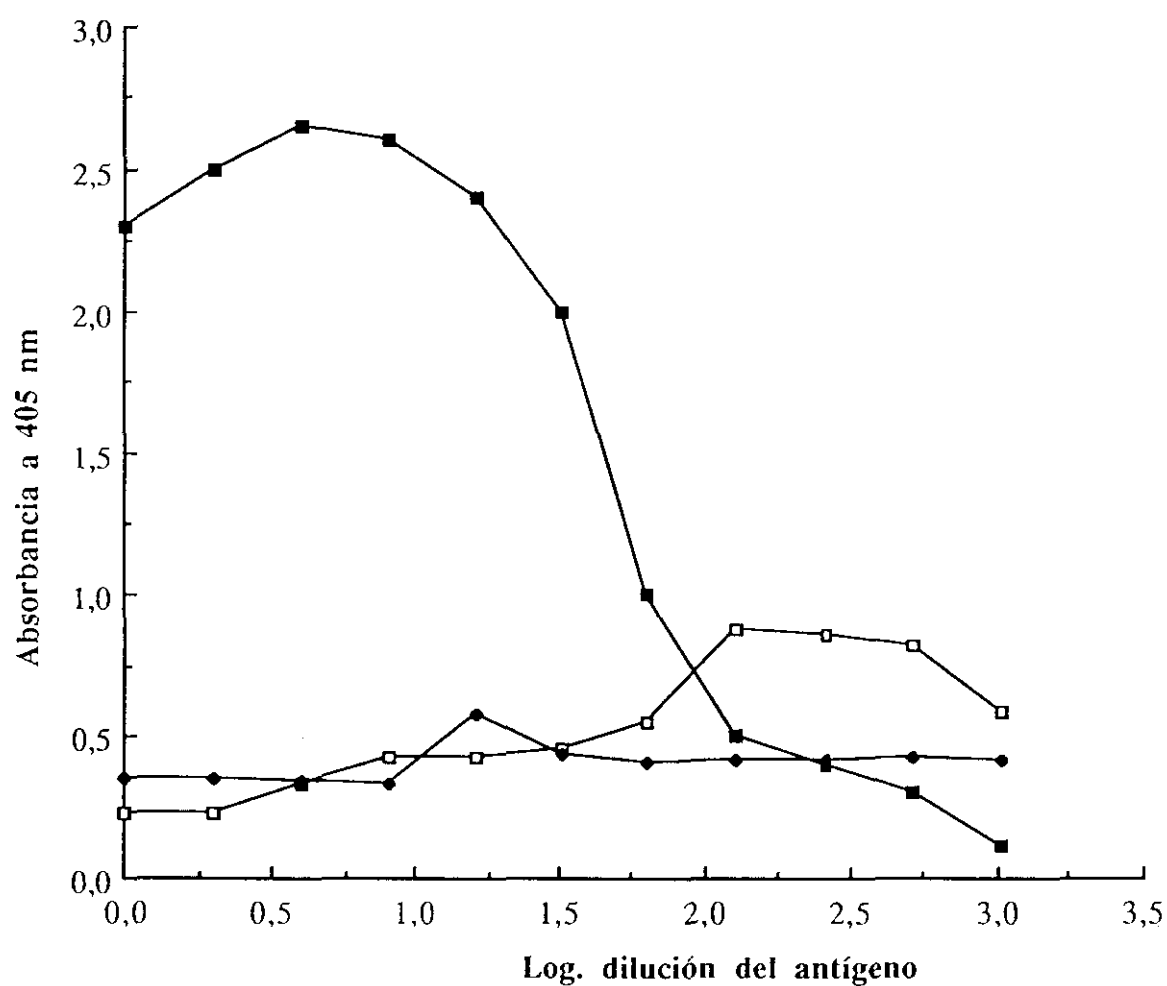


Figura 4. 44.- ELISA indirecto de la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148 en tampón PBS (■), en medio de MM-triptosa (□) y en el sobrenadante libre de células de un cultivo de *L. sake* 148 desarrollado en el medio de MM-triptosa (◆). Dilución del anticuerpo biotinizado 1/160. Dilución del conjugado 1/3000.

CAPITULO V

DISCUSION

V. 1. - Aislamiento de bacterias lácticas de embutidos crudos curados

Para la realización de este trabajo, que pretende el aislamiento y caracterización parcial de bacterias lácticas utilizables para mejorar la calidad higiénica de la carne y sus productos, primero se procedió al aislamiento de estas bacterias de embutidos crudos curados. La elección de estos productos como fuente de bacterias lácticas se debe a que las que contienen están mejor adaptadas a la ecología bacteriana de la carne y los productos cárnicos que las aisladas de otras fuentes, como leche, productos lácteos y hortalizas (Schillinger y Lücke, 1989).

Además las bacterias lácticas son, invariablemente, el grupo microbiano predominante en la mayoría de los productos cárnicos y en las carnes envasados a vacío, constituyendo 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, 1984; Korkeala y Mäkelä, 1989).

De otra parte, los recuentos de bacterias lácticas respecto del microbiano total obtenidos por otros investigadores (Lücke, 1986; Holley y col., 1988) durante la maduración de los embutidos crudos madurados, coinciden con los nuestros (Tabla IV. I); en ambos casos se ha visto que la mayor parte de la microflora cárnica está constituida por bacterias lácticas.

El número de bacterias lácticas al final de la maduración de las muestras estudiadas (aproximadamente $8-9 \times 10^8$ ufc/g de embutido) concuerda con los resultados señalados por otros investigadores para el bacon (Cavett, 1963), los embutidos crudos madurados (Egan, 1983) y las carnes envasadas al vacío (Hitchener y col., 1982; Egan, 1983). En muchos productos cárnicos, estas bacterias constituyen el principal componente de su microflora debido a la supresión del desarrollo de otros grupos microbianos por mecanismos de antagonismo microbiano no bien evaluados (Reuter, 1981).

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

V. 2. 1. - Elección de las pruebas de antagonismo microbiano

V. 2. 1. 1. - Pruebas directas de antagonismo microbiano

El antagonismo microbiano puede evidenciarse de diversas maneras. En los estudios preliminares, las pruebas de antagonismo se realizaron utilizando generalmente medios de cultivo sólidos e implicaron la detección de la inhibición del crecimiento que ejercía el microorganismo analizado (activo) en el microorganismo indicador (pasivo) (Tagg y col., 1976).

Las dos pruebas enpleadas con este propósito son la directa o simultánea y la indirecta o diferida. La concentración del microorganismo indicador es importante en 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 ampliamente 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). En ella, una gota del cultivo del microorganismo a evaluar se deposita en un medio de cultivo sólido, previamente inoculado con el microorganismo indicador. Entre las variantes de este procedimiento se incluye el empleo de pocillos excavados en el medio sólido que se rellenan con una cantidad conocida del cultivo del microorganismo a evaluar (Sabine, 1963; Tagg y McGiven, 1971; Tagg y col., 1976; Silva y col., 1987; Harris y col., 1989; Rodriguez y col., 1989).

Otra modificación de gran utilidad es la siembra por picadura de los microorganismos a estudiar en placas cuya superficie se ha sembrado con el microorganismo indicador (DeKlerk, 1967; Gagliano y Hinsdill, 1970; Davey y Richardson, 1981; Barefoot y Klaenhammer, 1983).

Fredericq (1948) fué el primero en utilizar las pruebas diferidas de antagonismo. En este caso, el microorganismo a evaluar 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 pruebas diferidas más empleada 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). Con esta prueba y para resaltar más la acción de las sustancias inhibidoras difusibles de los cultivos, se inactivan las células del microorganismo productor con calor (Geis y col, 1983; Ahn y Stiles, 1990a) o, mejor aún, con vapores de cloroformo (Kekéssy y Piguet, 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; además el cloroformo residual de los medios de cultivo puede originar resultados erróneos (Kekéssy y Piguet, 1970).

Otra alternativa, cuando se sospecha 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 Piguet, 1970) o el 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 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 obtenidas. Otra ventaja de este método es el aumento de la sensibilidad, puesto que entre el microorganismo estudiado y las cepas indicadoras únicamente se interpone una capa fina de agar; esto, además, excluye la inhibición debida a bacteriófagos, que son microorganismos no difusibles (Tagg y McGiven, 1971). Por todo ello, se eligió este método para la realización de las pruebas de antagonismo, tanto directo como diferido, de las 180 bacterias lácticas aisladas y seleccionadas de los embutidos crudos curados (sección IV. 1).

V. 2. 1. 2. - Antagonismo de los sobrenadantes libres de células

Cuando en las pruebas de antagonismo microbiano se emplean cultivos no es fácil identificar la causa del mismo (Tagg y col., 1976). En la identificación de bacterias lácticas productoras de sustancias antagonistas difusibles es importante excluir de los ensayos no sólo a los microorganismos productores de tales sustancias, sino también a otros metabolitos con actividad inhibidora.

Las sustancias que en las pruebas de antagonismo bacteriano poseen una 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 por filtración por filtros de 0,22 o 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; Mørtvedt y Nes, 1990), o dializando los sobrenadantes por membranas que permiten la difusión de sustancias de un tamaño molecular menor de 6000 daltons. La diálisis puede ir precedida de una precipitación de los sobrenadantes con sulfato amónico (Bhunia y col., 1987; González y Kunka, 1987; Ray y col., 1989). El precipitado, constituido fundamentalmente por proteínas, se reconstituye y dializa. No obstante, la mayoría de los autores prescinden de esta precipitación (Andersson, 1986; Andersson y col., 1988; Harris y col., 1989; Schillinger y Lücke, 1989; Daeschel y col., 1990; Ahn y Stiles, 1990b).

El efecto del peróxido de hidrógeno de los sobrenadantes puede evitarse incubando los cultivos en anaerobiosis (Schillinger y Lücke, 1989), 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. (1983), 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, estando muy difundidos los métodos "de

la gota" (Geis y col., 1983; Ray y col., 1989; Carminati y col., 1989; Ahn y Stiles, 1990a) y la disposición de los sobrenadantes en pocillos abiertos en las placas (Joerger y Klaenhammer, 1986; Ahn y Stiles, 1990a). Otro método muy empleado cuando se investigan bacterias lácticas bacteriocinogénicas, consiste en colocar los sobrenadantes en papeles de filtro estériles. Los discos de papel de filtro, impregnados con el sobrenadante, 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 sobrenadante (Abdel-Bar y col., 1987; Bhunia y col., 1987; Bhunia y col., 1988; Rodríguez y col., 1989). La segunda opción ha sido la utilizada en este trabajo, lo que permite comparar la actividad inhibidora de los diversos sobrenadantes analizados.

V. 2. 2. - Actividad inhibidora de los cultivos de las bacterias lácticas seleccionadas

Tanto las 180 bacterias lácticas examinadas en primera instancia, como las 24 seleccionadas con posterioridad de entre las primeras, manifestaron actividad inhibidora frente a alguno de los microorganismos indicadores empleados (figuras 4. 6 a 4. 29). La actividad inhibidora generalmente es mayor cuando los microorganismos a evaluar se siembran 24 horas antes que los microorganismos indicadores, algo en lo que nuestros resultados coinciden con los de Ahn y Stiles (1990a).

La sensibilidad de los microorganismos indicadores a la actividad inhibidora de las bacterias lácticas analizadas es variable, lo que demuestra que dicha actividad es característica de cada cepa y no de la especie bacteriana (Schillinger y Lücke, 1989; Daeschel y col., 1990).

Los resultados obtenidos por otros investigadores que han evaluado la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas varían bastante. Al igual que nosotros, Kozak y col. (1978) observaron que las 47 cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* que estudiaron, eran activas

frente a otras dos cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* y frente a una de *L. lactis* subsp. *cremoris*. El mismo resultado obtuvieron Ahn y Stiles (1990a) al examinar la actividad inhibidora de 10 cepas de diversos géneros de bacterias lácticas frente a 10 indicadores que también eran bacterias lácticas.

El 63 % de las 52 cepas de *L. acidophilus* analizadas por Barefoot y Klaenhammer (1983), inhibieron el desarrollo de diversas cepas de *L. leichmanni*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* y *L. 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 cepas de *L. monocytogenes*. De otra parte, únicamente el 15 % de las 79 cepas de *Lactobacillus* sp. examinadas por Rammelsberg y Radler (1990) inhibieron una, al menos, de las 9 cepas indicadoras de *L. brevis*, *P. damnosus* y *Leuc. oenus* ensayadas. El porcentaje de cepas inhibidoras registrado por Davey y Richardson (1981) fue aún menor, ya que sólo el 7 % de las 150 cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* analizadas, inhibieron el desarrollo de varias cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* y *L. lactis* subsp. *lactis*.

Schillinger y Lücke (1989), al evaluar 142 cepas de *L. sake*, 4 de *L. plantarum* y 75 de *L. curvatus*, observaron que el 13, el 75 y el 1 %, respectivamente, eran activas frente, al menos, uno de los 31 microorganismos indicadores empleados; estos resultados contrastan con los de Ahn y Stiles (1990a) y con los nuestros, ya que en nuestro caso prácticamente todas las cepas aisladas manifiestan actividad inhibidora sobre varios indicadores, contraste que llama poderosamente la atención si se tiene en cuenta que en los tres trabajos las bacterias lácticas proceden de una fuente común, los embutidos crudos madurados.

Lo expuesto anteriormente ofrece una idea de la dificultad que presenta el establecer la actividad inhibidora de las bacterias lácticas, lo que se agrava por la escasa uniformidad en las

condiciones de trabajo y por la diversidad de microorganismos indicadores empleados. No obstante, las bacterias lácticas analizadas en los trabajos citados son especialmente activas frente a otras bacterias lácticas y nunca, o de forma excepcional, frente a las bacterias Gram-negativas.

V. 2. 3. -Actividad inhibidora de los sobrenadantes libres de células

La actividad inhibidora de los sobrenadantes libres de células se estableció sólo en los aislados más activos. Los sobrenadantes libres de células de los cultivos de nuestras 24 bacterias lácticas seleccionadas, una vez concentrados, mostraron una actividad antimicrobiana variable dependiendo de la cepa y del indicador empleado (tabla IV. 1); fueron especialmente sensibles las bacterias lácticas empleadas como indicadores.

Quizá sea conveniente recordar que las bacterias lácticas activas seleccionadas, se aislaron durante la maduración de un lote de embutidos; en cada muestreo se seleccionaron 30 colonias. Esto significa, por ejemplo, que las cepas 24 y 29 procedían de la masa cárnica original, la 31 y 46 del embutido en segundo día de maduración y, así sucesivamente, hasta la cepa 180 que se aisló el último día (35) de maduración. De la observación de la tabla IV. 1, se concluye que es posible aislar bacterias lácticas productoras de sustancias antimicrobianas, distintas de los ácidos orgánicos o del agua oxigenada, en cualquier momento de la maduración e, incluso, a partir de la masa cárnica inicial. Algunas de las cepas evaluadas mostraron actividad frente a varias cepas de *L. monocytogenes* y *S. aureus*, microorganismos productores de toxiinfecciones alimentarias.

La actividad inhibidora de las bacterias lácticas frente a otras de su mismo grupo y a menudo estrechamente relacionadas entre sí, 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; Mørtvedt y Nes, 1990; Ahn y Stiles, 1990a; Ahn y Stiles, 1990b). Sin embargo, son mucho más escasos los estudios que demuestran que las bacterias lácticas inhiben el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos Gram-positivos, como *S. aureus* (Andersson, 1986; Andersson y col., 1988; Bhunia y col., 1988) y *L. monocytogenes* (Bhunia y col., 1988; Carminati y col., 1989; Schillinger y Lücke, 1989; Harris y col., 1989; Spelhaug y Harlander, 1989; Ahn y Stiles, 1990b). La mayor parte de los autores citados coinciden en señalar que las bacterias Gram-negativas son insensibles a las sustancias antibacterianas producidas por las bacterias lácticas estudiadas. Quizá la excepción mejor conocida a este respecto la constituyan las cepas de *L. lactis* productoras de nisina (Hurst, 1981). En general, la actividad antimicrobiana es muy heterogénea y depende de cada cepa en particular (Harris y col., 1989).

V. 2. 4. - 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 ser, en ningún caso, atribuible al peróxido de hidrógeno. La capacidad de algunas bacterias lácticas de producir peróxido de hidrógeno es una propiedad indeseable, especialmente si en las emulsiones cárnicas existe un alto contenido de oxígeno, si se emplea mucha grasa en la formulación del embutido o si la actividad de los enzimas que degradan el peróxido de hidrógeno es pequeña (Schillinger y Lücke, 1987a). En estos casos, la presencia en la carne y productos cárnicos de microorganismos productores de peróxido de hidrógeno produce alteraciones del 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 el 50 % de las cepas de *L. sake* de origen cárnico producían peróxido de hidrógeno y, de ellas, la mayoría lo hacía muy

débilmente. La falta de una buena selección de las bacterias lácticas autóctonas explica, en parte, el que *L. plantarum*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* sean los microorganismos más empleados como cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos y no *L. sake* o *L. curvatus*, que son especies mucho más competitivas (Lücke y Hechelmann, 1987).

V. 3. - Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana

Cuando se aíslan bacterias lácticas y en particular lactobacilos, de la carne y productos cárnicos, no es posible clasificarlos adecuadamente siguiendo los sistemas de identificación empleados clásicamente, ya que éstos se basan en las propiedades de microorganismos procedentes de otras fuentes (Orla Jensen, 1919; Rogosa, 1970; Sharpe, 1979). Hasta muy recientemente, las cepas difíciles de identificar se englobaron bajo la denominación de "estreptobacterias o lactobacilos atípicos" (Thornley y Sharpe, 1959; Reuter, 1975; Sharpe, 1979). No obstante, como sugirió Ingram (1975), el término de "estreptobacterias atípicas" es poco afortunado ya que las bacterias lácticas de origen cárnico no son menos típicas que las demás, en todo caso lo serán los criterios de identificación y clasificación, debido a la ignorancia de las propiedades de las especies de origen cárnico.

Con el transcurso del tiempo se han realizado diversos intentos de identificar y clasificar las estreptobacterias 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 grupos innecesariamente complicados y arbitrarios (Shaw y Harding, 1984). No obstante, en 1987, Schillinger y Lücke elaboraron un esquema de identificación rápida de lactobacilos de origen cárnico, basado en sus características fisiológicas, la mayor parte de las cuales son fácilmente determinables. Este esquema, que se muestra en la figura 5. 1, incluye especies

recientemente caracterizadas, como *L. sake*, *L. curvatus*, *C. piscicola* y *C. divergens*, por lo que la hemos utilizado 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 se trata de bacilos homofermentativos, que crecen a 15 °C, no fermentan el manitol, pero si la ribosa, sacarosa y trealosa por lo que, siguiendo el esquema de la figura 5. 1, los clasificamos tentativamente como *L. sake*; las características descritas coinciden con las señaladas por Kandler y Weiss (1986) y por Champomier y col., (1987) para esta misma especie.

En nuestro caso, ninguna de las cepas aisladas crece en medio MRS de pH 3,9. Schillinger y Lücke (1987b) han señalado que aproximadamente el 11% de las cepas de *L. sake* no crecen a dicho pH. A este respecto conviene destacar que los lactobacilos incluidos en las "estreptobacterias atípicas" son menos acidificantes y acidotolerantes que los demás (Reuter, 1975; Reuter, 1981).

Todas las cepas analizadas crecieron a una concentración de cloruro sódico del 7%, a excepción de la número 77, lo que coincide con los resultados de Champomier y col. (1987), Schillinger y Lücke (1987b), Mørtnvedt y Nes (1990) y Rodríguez (1991). Sin embargo, ninguna de las cepas estudiadas se desarrolló cuando la concentración de cloruro sódico fué del 10%. Existen discrepancias en cuanto a la capacidad de *L. sake* de desarrollarse a esta concentración de cloruro sódico, ya que mientras Schillinger y Lücke (1987b) indican que el 93 % de 131 cepas de *L. sake* crecen a esta concentración, Champomier y col. (1987) mantienen que se trata de una característica excepcional.

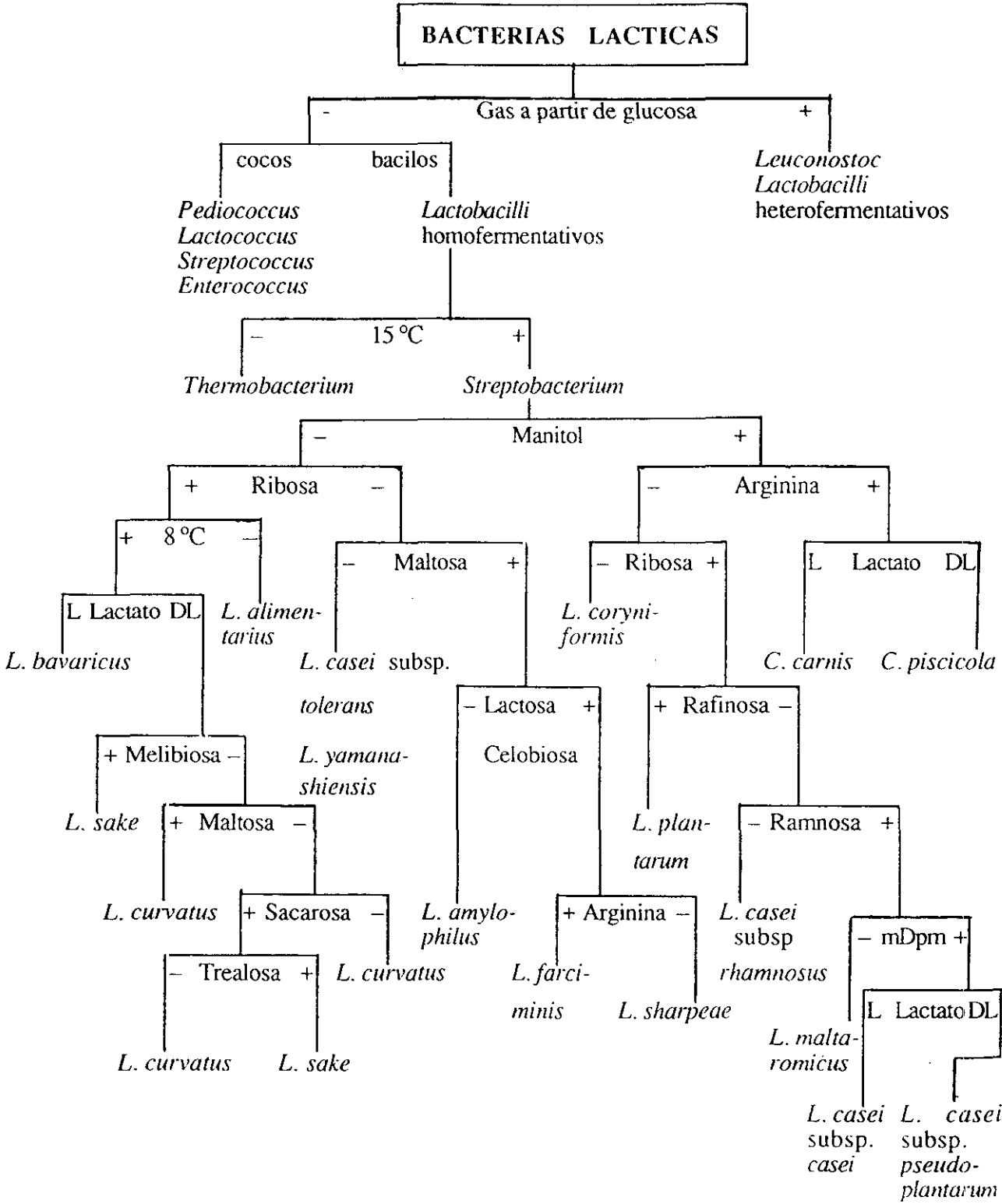


Figura 5. 1. - Esquema de identificación rápida de bacterias de origen cárnico.
Fuente: Schillinger y Lücke (1987b).

Las cepas de *L. sake* analizadas muestran una capacidad variable de hidrolizar la arginina, pues mientras las cepas 90 y 148 producen amoníaco a partir de dicho aminoácido, las cepas 31, 77, 177 y 180 no lo producen (tabla IV. 2). Schillinger y Lücke (1987b), observaron que la mayoría de las cepas de *L. sake* poseían esta capacidad, lo que concuerda con los resultados de Champomier y col. (1987). Sin embargo, resulta curioso que Kandler y Weiss (1986) describan a *L. sake* como incapaz de hidrolizar la arginina, ya que la cepa que consideraron tipo, la *L. sake* ATCC15521, carece de esta capacidad. Reuter (1981) y Rodríguez (1991), concuerdan con nuestros resultados en que la capacidad de hidrolizar la arginina varía de unas cepas de *L. sake* y de *L. curvatus* a otras.

La capacidad de algunos lactobacilos de producir ácido sulfhídrico es una característica tecnológica perjudicial, ya que su proliferación en los alimentos acarrea su deterioro (Egan, 1983). Ninguna de las cepas que hemos ensayado producía ácido sulfhídrico en ninguno de los medios estudiados (tabla IV. 2). No obstante, Schillinger y Lücke (1987b), observaron en el 50 % de las cepas de *L. sake* analizadas la producción de ácido sulfhídrico.

Las cepas de *L. sake* comparten características básicas que las diferencian de otras especies de lactobacilos. Sin embargo, poseen otras propiedades en las que la variabilidad entre cepas es la nota predominante. Las discrepancias entre la cepa tipo y las propiedades de las de origen cárnico explican las dificultades de muchos investigadores para identificar sus aislamientos (Reuter, 1981). En este sentido, la fermentación de la arabinosa, amigdalina, esculina, arbutina, salicina, celobiosa, maltosa y lactosa, que en la descripción de *L. sake* en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandler y Weiss, 1986) se admiten como pruebas de identificación, variaron en las 13 cepas de esta especie que analizaron Champomier y col. (1987). Quizás esto justifique la variabilidad de nuestras cepas en lo que concierne a fermentación de azúcares.

Que todos nuestros aislados se hayan identificado como *L. sake* no es sorprendente, ya que algunos investigadores han observado que esta especie puede convertirse en la predominante a las temperaturas de maduración normalmente empleadas en Europa en la elaboración de los embutidos crudos (Lücke, 1986; Schillinger y Lücke, 1987a). Lücke y Hechelmann (1987) apoyan esta observación al confirmar el predominio natural de *L. sake* y *L. curvatus* en embutidos europeos madurados tradicionalmente.

Holy y Holzapfel (1988) también han observado que entre las bacterias lácticas aisladas de carne de vacuno, envasada a vacío y almacenada a temperaturas de refrigeración, hay un fuerte predominio de *L. sake*, constituyendo *L. sake*, *L. curvatus* y *L. bavaricus* casi el 80 % del total de bacterias lácticas identificadas. Conviene recordar que *L. bavaricus* se diferencia de *L. sake* en que carece de racemasa (Kandler y Weiss, 1986a). Asimismo, Montel y col. (1989) consideran a *L. sake* como la bacteria láctica más abundante en la carne de vacuno. Korkeala y Mäkelä (1989), utilizando el esquema de clasificación de Schillinger y Lücke (1987b), han establecido que *L. sake* es la bacteria láctica mayoritaria de los productos cárnicos envasados a vacío. Hastings y col. (1986) también han observado que *L. sake* es la especie predominante en la carne picada de vacuno irradiada (5 KGy), adjudicando a esta especie 100 de las 113 cepas aisladas.

Globalmente consideradas, y de acuerdo con numerosos estudios anteriores, las "estreptobacterias atípicas" también han constituido el grupo bacteriano más numeroso del bacon (Cavett, 1963), de una gran variedad de productos cárnicos (Reuter, 1975) y de las carnes envasadas a vacío (Mol y col., 1971; Reuter, 1975; Kitchell y Shaw, 1975; Hitchener y col., 1982; Holzapfel y Gerber, 1986). Su presencia se ha considerado deseable, ya que contribuyen al aumento de la vida útil de los productos citados (Egan, 1983). Recientemente, y como contribución a una mejor comprensión de la clasificación de las bacterias lácticas de origen cárnico, Champomier y col. (1987) han comprobado que los 6 grupos de lactobacilos

aislados de productos cárnicos por Laban y col. (1978) y la mayoría de los integrantes del grupo II de Shaw y Harding (1984), encajan perfectamente en la descripción tipo de *L. sake*.

Actualmente *L. sake* y *L. curvatus* se consideran microorganismos psicrotrofos, siendo de entre las bacterias lácticas los que crecen a las temperaturas más bajas (Reuter, 1981; Kandler y Weiss, 1986). Esta característica se refleja en todas las cepas analizadas, ya que todas ellas se desarrollan a 4 °C (tabla IV. 2). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Schillinger y Lücke (1987b) y Champomier y col. (1987), dado que el 99 % de las cepas de *L. sake* estudiadas por los primeros, y todas las ensayadas por los segundos, crecieron a 4 °C. Por el contrario, sólo el 50 % de las cepas de *L. plantarum* se desarrollan, y débilmente, a esta temperatura (Reuter, 1981; Schillinger y Lücke, 1987b). Hasting y Holzapfel (1987) han observado que ninguna de la 100 cepas de *L. sake* aisladas de carne radurizada se desarrollaban ni a 4 °C ni a 8 °C. Quizás esta anomalía se deba a alteraciones de la fisiología celular de los lactobacilos provocadas por la irradiación.

De nuestras cepas de *L. sake* únicamente las 148 y 177 se desarrollan a 45 °C. La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha, coinciden en señalar que la mayor parte de las cepas de *L. sake* no se desarrollan a 45 °C (Reuter, 1975; Champomier y col., 1987; Hasting y Holzapfel, 1987; Korkeala y Mäkelä, 1989) o lo hacen muy débilmente (Reuter, 1981). Sin embargo, Schillinger y Lücke (1987b) han observado que el 87 % de las cepas de *L. sake* y el 77 % de las de *L. curvatus*, crecen a dicha temperatura. La mayoría de las cepas de *L. plantarum* sí se desarrollan a 45 °C (Reuter, 1981; Schillinger y Lücke, 1987b).

La temperatura óptima de crecimiento de las bacterias lácticas constituye un parámetro de gran importancia tecnológica en la elección de cultivos iniciadores cárnicos. Así, mientras *P. acidilactici* se desarrolla bien a temperaturas superiores a 40 °C, las temperaturas óptimas de crecimiento de *P. pentosaceus* y *L. plantarum* se sitúan entre 30 y 35 °C, siendo las de *L.*

sake y *L. curvatus* algo menores (Lücke y Hechelmann, 1987). En un estudio comparativo de las bacterias lácticas normalmente incluidas en los cultivos iniciadores cárnicos (*L. sake*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*), Schillinger y Lücke (1989) comprobaron que *L. sake* era la especie que se desarrolla más rápidamente y con mayores recuentos en una mezcla cárnica mantenida a 20 °C; su mayor rapidez de desarrollo fué especialmente significativa respecto de los lactobacilos "nativos" de un lote control al que no se le había adicionado ningún cultivo iniciador.

V. 4.- Espectro antimicrobiano de los sobrenadantes libres de células de las cepas de *L. sake* seleccionadas, una vez neutralizados y concentrados

El conocimiento exacto del espectro antimicrobiano de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas es muy importante, ya que su empleo podría inhibir el desarrollo de las bacterias lácticas que se utilizan como cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos. En este sentido, Hammes y col. (1990) observaron que cepas de *L. curvatus* y *L. sake*, productoras de sustancias inhibidoras no inhibían únicamente a las bacterias contaminantes, como *S. aureus*, sino que también afectaban a microorganismos que se emplean corrientemente como cultivos iniciadores como *L. plantarum* o *Micrococcus varians*. Por tanto, el conocimiento de las propiedades antimicrobianas de las bacterias lácticas, facilitará la selección de las cepas que formen parte de un cultivo iniciador, de forma que se minimicen los riesgos sanitarios provenientes los productos cárnicos.

Los sobrenadantes libres de células, neutralizados y concentrados, de 4 cepas de *L. sake* (77, 90, 148 y 180), ejercieron una actividad antagonista diversa en distintos microorganismos indicadores (tabla IV. 1). El espectro antimicrobiano de cada una de las cepas es significativamente distinto, lo que induce a suponer que las sustancias antimicrobianas son distintas entre sí. Este aspecto ya había sido observado por Bhunia y col. (1988), quienes

comprobaron que algunas cepas de *Lactobacillus sake* eran más activas que otras frente a diversos microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos.

La actividad antimicrobiana de las cepas de *L. sake* estudiadas no se limita a especies bacterianas filogenéticamente próximas, como parece ser la situación predominante en las sustancias inhibidoras producidas por el género *Lactobacillus* (Andersson y col., 1988; Schillinger y Holzapfel, 1990; Toba y col., 1991), sino que también afecta a microorganismos Gram-positivos, patógenos y alterantes de los alimentos de gran interés en la industria cárnica como los pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Staphylococcus* y *Clostridium*. También es importante destacar que las cepas ensayadas no inhiben el desarrollo de *S. carnosus* ni de *M. varians*, microorganismos cuya presencia en los alimentos no sólo es beneficiosa sino deseable, ya que son los responsables de reacciones químicas que influyen beneficiosamente en la calidad higiénica y en las características organolépticas de los alimentos.

Algunos investigadores han observado la reducción de los nitritos y el enrojecimiento de los embutidos se suprimen cuando se utiliza como iniciador un cultivo compuesto de cepas de *L. sake* antagonistas de *M. varians* (Hammes y col., 1990). La resistencia de *S. carnosus* y *M. varians*, microorganismos utilizados como cultivos iniciadores comerciales, frente a la acción antimicrobiana de las cepas de *L. sake* que hemos aislado en este trabajo es muy importante, ya que permite su empleo en los cultivos iniciadores al garantizar la calidad higiénica de los alimentos sin inhibir reacciones bacterianas deseables.

Por otro lado, la posibilidad de inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* es muy interesante, sobre todo si se tiene en cuenta que este microorganismo crece en un intervalo de temperaturas muy amplio (1-45 °C) y en presencia de un 10 % de NaCl (Seelinger y Jones, 1986); además permanece viable durante el procesado y almacenamiento de algunos alimentos fermentados (Juntilla y col., 1989), proliferando en sustratos cuyo pH es ligeramente menor

de 5,6 (Conner y col., 1986); no obstante, es relativamente sensible a los medios más ácidos (Rodríguez, 1991).

Los alimentos pueden contaminarse durante su elaboración y manipulación con *S. aureus* que, posteriormente, puede desarrollarse y, si son cepas enterotoxigénicas, producir toxinas (Smith y Palumbo, 1981), que pueden originar brotes de intoxicaciones alimentarias. La actividad antimicrobiana de las cepas de *L. sake* analizadas frente a *S. aureus* enterotoxigénico permite suponer que su empleo, junto a otros factores de seguridad (Hammes y col., 1990), podría aumentar mucho la calidad higiénica de los alimentos y disminuir la incidencia de estas toxiinfecciones alimentarias.

El crecimiento y producción de toxinas por *C. botulinum* se previene mediante la adición a los alimentos de nitratos y nitritos; sin embargo, su incorporación a los alimentos está limitado por su posible conversión en nitrosaminas, compuestos que son cancerígenos. Smith y Palumbo (1981) comprobaron que las bacterias lácticas previenen el crecimiento y producción de toxinas de *C. botulinum*, únicamente cuando el sustrato contiene glucosa y nitritos. Recientemente (CFR, 1988), la "Food and Drugs Administration" ha permitido la utilización de la nisina como antagonista de *C. botulinum* en algunos alimentos. Por ello, la capacidad de nuestras cepas de *L. sake* de inhibir el desarrollo de *C. botulinum*, resulta esperanzadora en cuanto a su posible utilización como inhibidor del desarrollo de este patógeno en los alimentos. Asimismo, la utilización de las cepas aisladas en este trabajo o las sustancias inhibidoras elaboradas por ellas, permitirían disminuir los niveles de nitritos habitualmente empleados en algunos derivados cárnicos.

Se sabe poco sobre el efecto de las bacterias lácticas en *C. perfringens*. Baran y Stevenson (1975) demostraron que este microorganismo supervivía en los embutidos crudos madurados de pavo, elaborados con *P. cerevisiae* como cultivo iniciador. Aunque no se

conoce bien la persistencia o destrucción de *C. perfringens* durante el procesado, almacenamiento y distribución de muchos productos cárnicos, es posible hipotetizar que las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas aisladas en nuestro trabajo dificultarían el desarrollo de este patógeno.

La sensibilidad de las listerias a sustancias antagonistas de especies del género *Lactobacillus* no es sorprendente, ya que estos dos géneros están estrechamente relacionados (Wilkinson y Jones, 1977; Seelinger y Jones, 1986; Rhuland y Fiedler, 1987). Además, se han publicado numerosos trabajos que confirman la actividad antimicrobiana de diversos lactobacilos sobre *L. monocytogenes* (Harris y col., 1989; Schillinger y Holzapfel, 1990; Harding y Shaw, 1990). Sin embargo, en los trabajos publicados, la actividad antagonista se limita a otros lactobacilos y listerias, siendo muy rara su actividad frente a otros patógenos Gram-positivos como *S. aureus* (Andersson, 1986; Talarico y col., 1988). Hasta ahora, no tenemos constancia de que existan cepas de *L. sake* cuyo espectro antimicrobiano sea tan amplio como el de las cepas que se han aislado en este trabajo.

El espectro antimicrobiano de estas cepas es similar al mostrado por cepas del género *Pediococcus*. Sin embargo, la síntesis de sustancias antimicrobianas por especies de origen cárnico pertenecientes a este género se limita únicamente a *P. acidilactici* H con actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram-positivos como *C. perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* y dos especies Gram-negativas, *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas putida* (Bhunia y col., 1988).

Por lo que respecta a los lactococos la nisina producida por *Lactococcus lactis* inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* (Bhunia y col., 1988) y especies del género *Clostridium* dificultando, además, la germinación de las esporas de *C. botulinum* (Daeschel, 1989). Sin embargo, es inactiva frente a microorganismos Gram-negativos, hongos o levaduras.

El amplio espectro de acción de las cepas de *L. sake* estudiadas en este trabajo y, de la cepa 148 en particular, permite concebir esperanzas sobre el futuro empleo de estos microorganismos como agentes conservadores de ciertas carnes y productos cárnicos, ya que es precisamente la especificidad mostrada por las bacterias lácticas la que ha limitado el empleo de estos microorganismos como cultivos iniciadores o protectores (Hastings y Stiles, 1991). No obstante, antes de estimular su utilización en la industria cárnica, se necesita conocer si los resultados de inhibición obtenidos "in vitro" son reproducibles en un sistema cárnico experimental.

V. 5.- Efecto de la composición del medio de cultivo en la producción de actividad inhibidora

Una vez seleccionado el microorganismo con mayor actividad antimicrobiana y con unas características de crecimiento más favorables, se necesita establecer las condiciones óptimas de producción de su actividad para acometer su purificación con las mejores garantías de éxito. Para ello se seleccionó la cepa *L. sake* 148, cuyo intervalo de temperaturas de crecimiento es muy amplio (4-45 °C) y cuyo sobrenadante cultural presenta una actividad antimicrobiana comparable, sino superior, al de las otras cepas de *L. sake* aisladas.

Tagg y col. (1976) ya señalaron que ciertos componentes del medio de cultivo podrían ser críticos en la producción de ciertas bacteriocinas. Sin embargo, existen pocos trabajos sobre el efecto de los distintos nutrientes en la producción de compuestos antagonistas por las bacterias lácticas (Reddy y Ranganathan, 1983; Batish y col., 1990; Biswas y col., 1991); en la mayor parte de los casos no se ha llegado, a resultados concluyentes. Algunas cepas productoras de sustancias antimicrobianas pierden esta capacidad cuando crecen en medios líquidos y la recuperan cuando lo hacen en medios sólidos o semisólidos, tal es el caso de la lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1983) y de la propionicina PLG-1 (Lyon y Glatz,

1991). Contrariamente a los resultados obtenidos por éstos investigadores, *L. sake* 148 mostraba actividad inhibidora tanto en medios sólidos como líquidos.

De los resultados obtenidos en este trabajo (tabla IV. 5), debe destacarse la ausencia de actividad antagonista cuando *L. sake* 148 se desarrollaba en medios de cultivo semidefinidos suplementados con hidrolizados de proteínas lácteas (caseinas). No sucede así cuando el suplemento es un hidrolizado de proteínas cárnicas (peptona o extracto de carne), a pesar de que la actividad antagonista es fácilmente mensurable y cuantificable. La producción óptima acaece en el medio complejo MRS. Esta última observación concuerda con la de McGroarty y Reid (1988) acerca de la producción de bacteriocinas por *L. casei* sp. *rhannosus* y *L. acidophilus* 76. Los resultados obtenidos refuerzan la teoría de Schillinger y Lücke (1989) según la cual las bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos, serían más adecuadas para asegurar la calidad higiénica de la carne y productos cárnicos que las procedentes de otros productos.

Tampoco se detectó la actividad antimicrobiana en *L. sake* 148 cuando éste se desarrollaba en caldo de APT sin suplementar. Sin embargo, cepas *Carnobacterium piscicola* (Ahn y Stiles, 1990a) y *Leuconostoc gelidum* (Hastings y Stiles, 1991), aisladas de productos cárnicos envasados al vacío, sintetizan bacteriocinas en caldo de APT. Lo mismo ocurrió en el medio BHI, que es un caldo de cultivo complejo de cuya composición forman parte hidrolizados de cerebro y corazón bovino. En este caso resulta muy difícil explicar la ausencia de actividad antagonista, tanto en el medio sin modificar como en el suplementado con diversos extractos cárnicos, dada la extraordinaria riqueza nutritiva de este medio.

Las diferencias observadas en la producción de actividad antimicrobiana dependiendo de la fuente proteica, se justificarían por la variación en algún componente específico (posiblemente aminoacídico) o por la existencia de mecanismos reguladores de origen

genético, estimulados o reprimidos por componentes del extracto proteico. Esto último explicaría la falta de actividad inhibidora de *L. sake* 148 al crecer en el caldo BHI, tanto suplementado como sin suplemento. Morishita y col. (1974), demostraron que algunos mutantes de *L. casei* sintetizaban determinados aminoácidos en medios carentes de los mismos; dicha capacidad la perdían cuando crecían en medios complejos. De los resultados obtenidos se deduce que sería conveniente estudiar más profundamente estos posibles mecanismos reguladores, con el fin de predecir la posible inhibición o represión de la actividad antagonista de *L. sake* 148, cuando éste se desarrolle en la carne o en sus productos.

V. 6.- Parámetros cinéticos y producción de la actividad inhibidora de *L. sake* 148 a diversas temperaturas

L. sake 148 se desarrolló a 4, 8, 16, 25 y 32 °C, tanto en medio complejo MRS como en medio mínimo MM con triptosa (tabla IV. 6), obteniéndose unos parámetros de crecimiento similares a los encontrados por otros investigadores con cepas de *L. sake* y otras bacterias lácticas de origen cárnico (Rodríguez, 1991).

Según Daeschel y col. (1990) la producción de bacteriocinas por las bacterias lácticas puede iniciarse en cualquier etapa del crecimiento, tanto en su comienzo (fase logarítmica) como al final (fase estacionaria). La actividad antagonista de *L. sake* 148 es detectable y cuantificable al poco tiempo de iniciarse su crecimiento en todas las temperaturas ensayadas (fig. 4. 30 a 4. 34). Estos resultados coinciden con los de la mayor parte de los trabajos publicados (Gálvez y col., 1986; Ahn y Stiles, 1990b; Hastings y Stiles, 1991) en los que la producción de sustancias inhibidoras parece ser una propiedad asociada al crecimiento.

Como ya señalaron Ahn y Stiles (1990b), la producción de bacteriocinas en la fase inicial del crecimiento bacteriano podría favorecer el predominio de la cepa productora en una

población bacteriana mixta con bacterias sensibles. Asimismo, la detección de la actividad antagonista al comienzo del crecimiento indica que no corresponde a un metabolito secundario. La disminución de la actividad durante la fase estacionaria (fig. 4. 34), podría deberse a la acción de enzimas proteolíticos endo o exocelulares, a que la sustancia responsable de la actividad se convierte en otros metabolitos o a su inestabilidad ante el aumento de la acidez del medio de crecimiento.

El incremento de la actividad antibacteriana al hacerlo la temperatura se debe, al parecer, al mayor desarrollo celular, ya que la actividad aumenta a medida que la temperatura se aproxima a la óptima de crecimiento de *L. sake* 148. Hasting y Stiles (1991) comprobaron que la producción de bacteriocinas por *Leuconostoc gelidum* es directamente proporcional a la masa celular del cultivo microbiano. Es de destacar que *L. sake* 148 producía actividad antimicrobiana a todas las temperaturas ensayadas.

La producción de la actividad antagonista a temperaturas de refrigeración, contribuiría a dificultar el desarrollo de los microorganismos alterantes y patógenos en los alimentos refrigerados.

V. 7.- Caracterización bioquímica parcial de la actividad antimicrobiana de *L. sake* 148

Una vez establecidas las condiciones óptimas de crecimiento y de producción de la actividad antimicrobiana de *L. sake* 148, el siguiente paso consistió en intentar su purificación, con el fin de separar la entidad activa de otros productos o restos celulares y de las proteínas del medio de cultivo. Hay que reconocer que el medio complejo MRS no es el más indicado para iniciar la purificación de la actividad antagonista de *L. sake* 148, ya que los sobrenadantes procedentes de este medio contienen una concentración elevada de proteínas y péptidos (Barefoot y Klaenhammer, 1984), lo que no sucede con el medio mínimo con triptosa

que, siendo un medio semidefinido sencillo, permite la síntesis de la actividad antimicrobiana de *L. sake* 148 (tabla IV. 6).

Debido a la heterogeneidad de las bacteriocinas, sus protocolos de purificación se han diseñado empíricamente para cada una de ellas.

Barefoot y Klaenhammer (1984), tras emplear sin éxito la cromatografía de intercambio iónico, purificaron la lactacina B creando condiciones disociantes (urea 8M) antes de someterla a ultracentrifugación y a cromatografía de filtración en geles. Los resultados obtenidos indicaron que el peso molecular de la bacteriocina parcialmente purificada era de 6.500 daltons. Sin embargo, cuando la lactacina B parcialmente purificada se sometió a electroforesis en poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) no se apreciaron bandas en los geles, a pesar de teñirlos con reactivos de plata, que es un proceder de gran sensibilidad para la detección de las bandas de proteínas en los geles. Dos años más tarde, Joerger y Klaenhammer (1986) también purificaron la helveticina J por cromatografía de filtración en geles que llevaban dodecil sulfato sódico (SDS) como agente disociante. El peso molecular de la bacteriocina purificada fue de unos 37.000 daltons.

De otra parte, Rammelsberg y Radler (1990) han encontrado dificultades al intentar purificar la brevicina 37 y la caseicina 80, utilizando los procedimientos de purificación proteica tradicionalmente empleados. Dichos investigadores han observado, asimismo, que la concentración de los sobrenadantes por liofilización origina una pérdida importante de la actividad antimicrobiana.

En contraste con la utilización de las técnicas cromatográficas de filtración en geles, empleadas en la purificación de bacteriocinas producidas por lactobacilos, la purificación de la pediocina PA-1 (Gonzalez y Kunka, 1987) y de la pediocina AcH (Bhunja y col., 1988),

producidas por pediococos, se ha realizado por cromatografía de intercambio iónico. El peso molecular de la pediocina PA-1 parcialmente purificada (16.500 daltons) se determinó por cromatografía de filtración en geles, mientras que el de la pediocina AcH (2.700 daltons) se estimó por SDS-PAGE.

En nuestro trabajo, la purificación de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148, se realizó concentrando los sobrenadantes por liofilización y separando las proteínas por cromatografía de filtración en geles. Utilizamos la urea (a una concentración 1M) como agente disociante de los posibles agregados proteicos, formados por la sustancia antimicrobiana consigo misma o con otros componentes del medio del cultivo (figuras 4. 35 a 4. 37). El proceso de purificación se tradujo en un aumento poco apreciable de la actividad inhibidora específica (7 veces) y en una baja recuperación de la actividad inhibidora original (8 %) (tabla IV. 7). Los resultados obtenidos confirman que, según se ha observado en otras ocasiones, las bacteriocinas son, a veces, bastante resistentes a su purificación por las técnicas standar de separación de proteínas (Rammelsberg y Radler, 1990). La concentración de las muestras por liofilización antes de someterlas a cromatografía de filtración, posiblemente afecta negativamente a la actividad antimicrobiana.

La pérdida de actividad, que a menudo es grande, producida durante la purificación constituye un problema corriente en las bacteriocinas originadas por las bacterias lácticas (Tagg y col., 1976).

Barefoot y Klaenhammer (1984) y Joerger y Klaenhammer (1986), únicamente lograron recuperar el 0,4 % de la actividad inhibidora inicial de la lactacina B y el 4 % de la helveticina J. Sin embargo, mientras la purificación final de la lactacina B fué de 3.222 veces y la de la helveticina J de 837 veces, la purificación final de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 es mucho menor. De ello se deduce que el método de purificación empleado es poco

eficaz, por lo que conviene desarrollar otros más potentes.

La sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 parece que se sintetiza en forma de polipéptido de pequeño tamaño molecular como lo demuestra que, en los experimentos de filtración en geles de Sephadex G-150 fino, G-75 y G-50 (figuras 4. 35 a 4. 37), se eluye lejos del volumen de vacío, volumen en el que se encuentran las moléculas de un tamaño molecular mayor que el diámetro de poro del gel. En este aspecto, la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 difiere de la lactocina 25 (Upreti y Hinsdill, 1973), lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1984), helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986), lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991), propionicina PLG-1 (Lyon y Glatz, 1991) y la bacteriocina de *L. sake* 449 (Rodríguez, 1991), que se aislaron primero, bien como agregados proteico-polisacáridos complejos (partículas globulares parecidas a las micelas) o bien como grandes agregados protéicos, que se separaron más tarde utilizando diversas técnicas analíticas.

Una vez realizada la purificación parcial de la actividad antimicrobiana conviene realizar su caracterización físico-química. Uno de los criterios básicos para que una sustancia antimicrobiana se considere una bacteriocina es que sea un componente proteico biológicamente activo (Tagg y col., 1976), lo que se determina por su sensibilidad a diversos enzimas proteolíticos. En la tabla IV. 8 se muestra el efecto de diversos enzimas proteolíticos, lipolíticos y amilolíticos, en la actividad antimicrobiana exocelular parcialmente purificada de *L. sake* 148. En ella se observa que los enzimas inespecíficos, como la papaína, proteasa II y proteasa XIV, anulan la actividad inhibidora, mientras que otros enzimas más específicos la disminuyen mucho; de ahí se deduce que la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 posee una estructura proteica biológicamente activa.

Además, su resistencia a la acción de los enzimas lipolíticos y amilolíticos indica que en su composición no entran a formar parte elementos lipídicos ni hidrocarbonados y, si lo

hacen, no influyen en su actividad antimicrobiana.

La sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148 es muy estable en un amplio intervalo de valores de pH (fig. 4. 38), mostrando su mayor actividad a valores de pH comprendidos entre 5,6 y 6,6; cuando el pH se situaba entre valores extremos (2,6-4,6; 10-12) la actividad disminuía ligeramente (sin superar nunca el 20%).

Gonzalez y Kunka (1987), comprobaron que la pediocina PA-1 producida por *P. acidilactici* era estable entre valores de pH de 4 y 7, si bien mostraban ligeras pérdidas de actividad a pH de 2,3 y 10. Bhunia y col. (1988) establecieron el intervalo de pH al que la pediocina AcH era activa entre pH 2,5 y 10 y observaron una pérdida total de la actividad cuando el pH era mayor de 10.

La nisina, producida por *L. lactis* es inactiva cuando el pH es superior a 7 (Hurst, 1981; Liu y Hansen, 1990). La propionicina PLG-1 permanece estable a valores de pH entre 3 y 9, con ligeras pérdidas de actividad a pH de 3-4 (Lyon y Glatz, 1991).

La gran estabilidad frente al pH mostrada por la bacteriocina de *L. sake* 148 es muy importante de cara a su posible utilización como agente antimicrobiano, tanto en los alimentos fermentados como en otros productos alimenticios.

La resistencia al tratamiento térmico es una característica muy extendida entre las bacteriocinas, no obstante, el criterio seguido para determinar la estabilidad de estas sustancias varía bastante, ya que esta propiedad depende del grado de purificación de las bacteriocinas y de otros factores como pH, fuerza iónica y presencia de moléculas termoprotectoras (Tagg y col., 1976). La existencia de bacteriocinas termosensibles es menos corriente, aunque entre éstas se encuentran la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986), la caseicina 80

(Rammelsberg y Radler, 1990), la bacteriocina sintetizada por *L. delbrueckii* sp *lactis* (Toba y col., 1991) y la propionicina PLG-1 (Lyon y Glatz, 1991). La bacteriocina producida por *L. sake* 148 es muy termoestable (fig. 4. 39), pareciéndose en esto a las bacteriocinas de *L. acidophilus*, (Barefoot y Klaenhammer, 1983; Muriana y Klaenhammer, 1987), *L. helveticus* (Upreti y Hinsdill, 1973; Joerger y Klaenhammer, 1986), *L. plantarum* (West y Warner, 1988; Daeschel y col., 1990), *L. sake* (Schillinger y Lücke, 1989; Mørvedt y Ness, 1990) y *L. brevis* (Rammelsberg y Raedler, 1990).

La gran termoestabilidad de la bacteriocina de *L. sake* 148 le confiere ventajas en cuanto a su posible utilización en alimentos higienizados por el calor, ya que permanece biológicamente activa tras los tratamientos de pasteurización y esterilización a los que se someten éstos productos.

La determinación del peso molecular aparente de la bacteriocina de *L. sake* 148 mediante filtración en geles de Sephadex G-50, dió un peso molecular de 4640 daltons (tabla IV. 9). La elución de esta bacteriocina en un solo pico de bajo peso molecular no es corriente, dada la baja concentración del agente disociante empleado (urea 1M en el tampón de disolución y urea 0,1M en el de elución). Lo corriente es que las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas formen agregados de alto peso molecular (Muriana y Klaenhammer, 1991; Rodríguez, 1991).

El peso molecular de las bacteriocinas de las bacterias lácticas es muy variable, con moléculas grandes, como la helveticina J cuyo peso molecular es de 37.000 daltons (Joerger y Klaenhammer, 1986), la caseicina 80 de un peso molecular entre 40.000 y 42.000 daltons (Rammelsberg y Raedler, 1990) y la bacteriocina de *L. sake* 449 de unos 30.000 daltons (Rodríguez, 1991). No obstante, tal y como ocurre con la bacteriocina de *L. sake* 148, la mayor parte presentan un peso molecular relativamente pequeño, menor de 10.000 daltons. En

este grupo se incluyen: nisina (Hurst, 1981), diplococina (Davey y Richardson, 1981), lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1984), pediocina AcH (Bhunia y col., 1988), lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991), lactocina S (Mørtvedt y col., 1991) y carnocina UI49 (Stoffels y col., 1992). Cuando las bacteriocinas forman agregados moleculares es difícil determinar su peso molecular mediante técnicas de filtración en geles, por lo que se recurre a la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS), con o sin urea.

Sin embargo, la utilización de la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, con o sin urea, para determinar el peso molecular de la bacteriocina de *L. sake* 148 dió resultados negativos cuando la tinción se realizó con Azul Brillante de Coomassie (Laemmli, 1970). Esto no es extraño, ya que Muriana y Klaenhammer (1991) obtuvieron el mismo resultado al determinar el peso molecular de la lactacina F con este colorante. Por otra parte, Davey y Richardson (1981) y Stoffels y col. (1992), observaron la existencia de una banda difusa asociada al frente electroforético al determinar el peso molecular de la diplococina y la carnocina UI49 respectivamente. Cuando Barefoot y Klaenhammer (1984) utilizaron nitrato de plata como agente tintorial para determinar el peso de la lactocina B obtuvieron, igual que nosotros (fig. 4. 40), una banda de tinción difusa 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); de otra parte, 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 menor de 1 nanogramo de proteína (Merril y col., 1981). Además, la falta de bandas proteicas en los geles indica que la muestra se encuentra libre de otras proteínas contaminantes, lo que facilita la determinación de la composición aminoacídica de las bacteriocinas parcialmente purificadas.

Al comparar la composición aminoacídica de la bacteriocina de *L. sake* 148, obtenida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la de otras bacteriocinas de peso molecular semejante, se obtiene la tabla V.I. De esta tabla se desprende que, al igual que la lactocina S de *L. sake* L45 (Mørtvedt y col., 1991), la bacteriocina de *L. sake* 148 tiene en su composición un 50% de aminoácidos apolares, presentando ambas, además, una cierta similitud en su composición cualitativa pero no cuantitativa, de aminoácidos. De la observación de la tabla también se desprende que la bacteriocina de *L. sake* 148 difiere de otras como la nisina, subtilina y diplococina (Davey y Richardson, 1981), lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991) o la carnocina UI49 (Stoffels y col., 1992)

La mejor conocida de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas es la nisina, de la que no sólo se conoce su composición de aminoácidos sino, además, la disposición de los mismos en la cadena peptídica. Una característica fundamental que diferencia a la nisina, subtilina, epidermina (Allgaier y col., 1986), gallidermina (Kellner y col., 1988), Pep5 (Kellner y col., 1989), lactocina S (Mørtvedt y col., 1991) y carnocina UI49 (Stoffels y col., 1992) de otras bacteriocinas como la diplococina y la lactacina F es la presencia, en las tres primeras, de aminoácidos modificados postranslacionalmente como la dehidroalanina, dehidrobutirina, lantionina y beta-metil lantionina. Esto determina que se haya propuesto el nombre de "lantibióticos" para aquellas bacteriocinas que, como la nisina, posean tales aminoácidos (Muriana y Klaenhammer, 1991).

En el cromatograma obtenido al analizar por HPLC el hidrolizado de la bacteriocina de *L. sake* 148 (resultados no mostrados), también se observa la presencia de un pico cromatográfico que no se corresponde con ninguno de los patrones empleados.

Tabla V.1.- Composición aminoacídica de diversas bacteriocinas.

Composición probable por molécula							
Aminoácido	Bacteriocina de <i>L. sake</i> 148	Nisina ^a	Subtilina ^a	Diplococina ^a	Lactacina F ^b	Lactocina S ^c	Carnocina UI49 ^d
Ac. aspártico	4	1	1	4	3	1	1
Treonina	2	—	—	2	5	1	—
Serina	—	1	—	5	2	—	1
Ac. glutámico	6	—	3	6	2	1	3
Prolina	6	1	1	3	3	2	3
Glicina	4-5	3	2	9	10-11	1	4
Alanina	4	2	1	4	8	7-8	4-5
Cisteina	—	—	—	—	2-3	—	—
Valina	3	1	1	3	4	4-5	3-4
Metionina	1	2	—	1	1	1	—
Leucina	2	—	—	—	—	4	2
Isoleucina	—	3	1	1	2-3	—	3-4
Tirosina	—	—	—	1	1-2	2	1
Fenilalanina	1	—	1	1	1	1	2
Histidina	1	2	—	1	1	2	—
Lisina	2-3	3	3	3	1-2	2	3
Arginina	—	—	—	2	2	—	2
Triptofano	—	—	1	1	—	—	—
Omitina	—	—	—	1	—	—	—
Metilantionina	—	1	1	—	—	2	1-2
β-metilantionina	—	4	4	—	—	—	—
Dehidrobutirina	—	1	1	—	—	—	—
Dehidroalanina	—	2	2	—	—	—	—
No identificado	3-4	—	—	—	—	—	—
Σ residuos	40-43	29	27	51	47-53	31-32	32-35
Peso molecular	4.460	3.350	3.320	5.300	2.700	<13.700	4.500-5.000

^a Datos de Davey y Richardson (1981)

^b Datos de Muriana y Klaenhammer (1991)

^c Datos de Mørtvedt y col. (1991)

^d Datos de Stoffels y col. (1992)

En nuestro caso fué imposible determinar con exactitud la identidad de este aminoácido, sin embargo, su elución en la columna cromatográfica, en una posición muy próxima a la glicina, coincide con los resultados obtenidos al analizar, por el mismo sistema de HPLC, la lactocina S (Mørtvedt y col., 1991) y la carnocina UI49 (Stoffels y col., 1992). Estos autores demostraron que la lantionina eluye precisamente en esta posición, por lo que no es descabellado plantear la hipótesis de que el aminoácido no identificado de la bacteriocina de *L. sake* 148 fuera la lantionina, lo que la convertiría, por definición, en un lantibiótico.

Si bien conviene conocer los aminoácidos que conforman la sustancia inhibidora, también tiene un gran interés saber la localización o secuencia de dichos aminoácidos en la estructura proteica. El conocimiento de la secuencia facilitaría la elucidación de los determinantes antigénicos de esta bacteriocina, así como su clonación, mediante técnicas de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en vectores genéticos de interés. Tanto la secuenciación como el estudio de los determinantes, forman parte del esquema de trabajo futuro a desarrollar como continuación del actualmente en curso. La caracterización completa de la bacteriocina de *L. sake* 148 y el estudio genético de los mecanismos responsables de su síntesis, permitirán conocer la relación existente entre su estructura y su mecanismo de acción, sus relaciones estructurales con las bacteriocinas producidas por otras bacterias lácticas y, por último, la biología molecular de la producción de bacteriocinas en el género *Lactobacillus*.

V. 8. - Mecanismo de acción de la bacteriocina producida por *L. sake* 148

La sustancia inhibidora elaborada por *L. sake* 148 se aparta ligeramente de la definición que Tagg y col. (1976) dieron de las bacteriocinas, al considerarlas como proteínas o complejos proteicos con acción bactericida en especies bacterianas filogenéticamente relacionadas con la cepa productora; esto no se cumple en la bacteriocina de *L. sake* 148 que,

como hemos visto, posee acción bacteriostática en todos los microorganismos indicadores estudiados (Tabla IV.11).

La primera característica, su naturaleza proteica, se cumple en todas las bacteriocinas de las bacterias lácticas descritas hasta la fecha. La segunda, su limitado espectro de acción, ya fué cuestionado por Klaenhammer (1988), quién propuso la división de las bacteriocinas de las bacterias lácticas en dos tipos: 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) y F (Muriana y Klaenhammer, 1991), la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1975), la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1985), la sakacina A (Schillinger y Lücke, 1989), y la lactocina S (Mørtved 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 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. botulinum* y *C. perfringens*. Pertenecen a este grupo la nisina, la pediocina AcH y la sustancia antimicrobiana objeto de este trabajo, producida por *L. sake* 148.

En la tercera característica citada por Tagg y col. (1976), el mecanismo de acción bactericida, es donde mayor es la discrepancia con los resultados de este trabajo. Efectivamente, tal y como se aprecia en los recuentos microbianos realizados después de tratar varios cultivos de diversos microorganismos sensibles con un sobrenadante neutralizado y concentrado de *L. sake* 148 (tabla IV. 11), el mecanismo de acción de esta bacteriocina es bacteriostático.

La acción bactericida descrita para las bacteriocinas se produce en dos etapas (Tagg y col., 1976). En la primera, la bacteriocina se une a receptores específicos situados en la superficie de los microorganismos sensibles. Esta unión altera la permeabilidad de su

membrana; en la segunda etapa de su mecanismo de acción se provoca la ruptura de la membrana y la muerte celular. Esta acción bifásica se ha comprobado mediante examen microscópico, al apreciarse cambios morfológicos y posterior lisis celular en las bacterias sensibles a la nisina (Hurst, 1981), plantaricina SIK-83 (Andersson y col., 1988) y lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991).

La acción de la nisina se atribuye a su elevada hidrofobicidad, lo que le permite interaccionar con la membrana bacteriana y originar poros en la misma aumentando su permeabilidad y provocando la muerte celular por estallido (Hurst, 1981). Esta acción, similar al efecto surfactante de ciertas moléculas hidrofóbicas, es también la causante de la acción bactericida de la lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991).

En ocasiones se puede apreciar un efecto bactericida sin que se produzca la lisis celular, lo que ocurre en el caso de la pediocina AcH, cuyo mecanismo de acción ha sido estudiado en profundidad por Bhunia y col. (1991). Esta sustancia ejerce su actividad en varias etapas: (1) inicialmente se une a receptores inespecíficos de la pared celular, posiblemente ácido lipoteicoico; (2) cuando se saturan estos receptores se une a receptores específicos, originando alteraciones funcionales en la membrana que (3), provocan la pérdida de iones potasio y la entrada en la célula de moléculas de pequeño tamaño; además, la bacteria pierde 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 se debería a la falta o inaccesibilidad de los receptores específicos y (6) la resistencia de las bacterias Gram-negativas estaría motivada por la carencia tanto de receptores específicos, como inespecíficos. La lactacina B, que tiene acción bactericida, tampoco origina alteraciones en la permeabilidad de la membrana ni lisis celular (Barefoot y Klaenhammer, 1984).

Las lactostrepcinas (Dobrzanski y col., 1982), lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1983), helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1985), sakacina A (Schillinger y Lücke, 1989), bacteriocina de *Leuconostoc gelidum* (Harding y Shaw, 1990), plantaricina A (Daeschel y col., 1991) y carnocina UI49 (Stoffels y col., 1992), junto con las citadas nisina, lactacina F, plantaricina SIK-83 y pediocina AcH son algunas de las bacteriocinas que, como la mayor parte de las producidas por las bacterias lácticas, poseen un mecanismo de acción bactericida independientemente del mecanismo íntimo que conduce a la muerte bacteriana.

El efecto bacteriostático de la bacteriocina de *L. sake* 148 contrasta con el bactericida de la sakacina A, producida por otra cepa de *L. sake* (Schillinger y Lücke, 1989). 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 son idénticas entre sí.

Sin embargo esta acción bacteriostática no es única dentro de las bacterias lácticas, ya que este carácter se ha descrito en la lactocina 27 de *L. acidophilus* (Upreti y Hinsdill, 1975), aunque en algunos casos se ha observado un efecto bactericida sobre cepas de *L. monocytogenes* (Raccach y col., 1989); el efecto bacteriostático también se ha descrito en lactobacilos de origen cárnico identificados como *L. sake* (Ahn y Stiles, 1990a) y en *Leuconostoc gelidum* (Hastings y Stiles, 1991).

Incluso el efecto bactericida atribuido a la pediocina AcH podría no ser tan evidente a tenor de la observación de 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 de, únicamente, 0,8 unidades logarítmicas en el recuento de microorganismos viables efectuado una hora después de dicha adición. En los recuentos realizados a las 3, 5, 7 y 11 horas posteriores, se observa una recuperación, mientras posteriormente se mantienen los valores

obtenidos al inicio del experimento (3×10^7 ufc/ml). Mientras tanto, el cultivo control continúa su crecimiento normal hasta alcanzar valores de 2×10^9 ufc/ml. Hasting y Stiles (1991) obtuvieron resultados similares a los anteriormente señalados y, a pesar de todo, adjudicaron un mecanismo de acción bacteriostático a la bacteriocina producida por *Leuconostoc gelidium* UAL187.

Los resultados de Bhunia y col. (1988) contrastan con los claramente bactericidas de Schillinger y Lücke (1989) quienes, empleando un procedimiento idéntico al nuestro y, muy similar al de Bhunia y col. (1988), comprobaron que los recuentos del microorganismo indicador (cuya población inicial era de 5×10^5 ufc/ml), disminuía 3,5 unidades logarítmicas dos horas después de añadir el sobrenadante libre de células, neutralizado y concentrado de *L. sake* Lb706; en recuentos posteriores fué imposible detectarlo. Por otra parte, Bhunia y col. (1991) señalan, que la bacteria indicadora 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.

Realmente, es difícil aceptar que ninguna de las cepas que emplemos como microorganismos indicadores fuera sensible y que la bacteriocina de *L. sake* 148 ejerciera una acción bactericida en otras cepas sensibles; por ello y, a diferencia de Bhunia y col. (1988), consideramos que la sustancia inhibidora ejerce una acción bacteriostática ya que detiene el crecimiento de los microorganismos sensibles, disminuyendo su vitalidad y no su viabilidad, algo que no ocurre en las experiencias de Schillinger y Lücke con *L. sake* LB706.

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 o la producida por *L. sake* 148, difieren en alguna de las propiedades atribuidas a las bacteriocinas clásicas (Klaenhammer, 1988). En la tabla V. 1 se señalan algunas propiedades de las bacteriocinas mejor conocidas, lo que permite comparar las coincidencias y diferencias de nuestra bacteriocina parcialmente caracterizada y las de aquellas caracterizadas por otros investigadores.

Nuestros resultados, junto a otros que ponen de manifiesto el efecto bacteriostático de algunas bacterias lácticas (Upreti y Hinsdill, 1975; Raccach y col., 1989; Ahn y Stiles, 1990a; Hastings y Stiles, 1991), explicarían porqué persiste pero no se desarrolla *Listeria monocytogenes* en carne fresca de bovinos y en la carne y productos cárnicos de pollo en presencia de una flora láctica competitiva Buchanan y col., (1989), Johnson y col., (1988); también explicaría el que Shelef (1989) haya observado que *L. monocytogenes* no se desarrolla durante la maduración de embutidos elaborados con carne de bovinos.

La concentración inhibidora mínima de la sustancia antagonista parcialmente purificada de *L. sake* 148 en los diversos microorganismos ensayados (tabla IV. 12), oscila entre 1 y 18 mg/ml, siendo las cepas de *S. aureus* FRI349 y FRI361 las más resistentes a su acción inhibidora. Los resultados obtenidos sugieren, una vez más, la posible utilidad de las bacterias lácticas y de sus bacteriocinas como factores de seguridad de la carne y de los productos cárnicos.

Tabla V.1.- Características de algunas bacteriocinas de las 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>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

V. 9.- Propiedades antigénicas de las bacteriocina de *L. sake* 148

El conocimiento de las propiedades inmunológicas de las bacteriocinas es interesante por varios motivos. Primero, para determinar su seguridad para el consumidor, esto es, que no le provoque reacciones alérgicas o indeseables. De otra parte, la obtención de anticuerpos frente a las bacteriocinas permitiría su detección y cuantificación en las carnes y productos cárnicos. Asimismo, los anticuerpos específicos facilitarían la purificación a homogeneidad de la sustancia antimicrobiana por técnicas de cromatografía de afinidad, lo que permitiría su purificación en un solo paso, evitando la utilización de otros procedimientos de separación proteica menos eficaces.

El primer aspecto, la salud del consumidor, parece garantizado ya que el carácter proteico de la sustancia estudiada, 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. Posiblemente esta característica es común a todas las bacteriocinas de las bacterias lácticas, prueba de ello es que una de éstas sustancias cuyas propiedades antigénicas no son del todo conocidas, la nisina, es la única bacteriocina autorizada en muchos países para su uso en alimentos de consumo humano, ya que se ha demostrado que no origina reacciones tóxicas en el consumidor (Hurst, 1981). Igualmente la bacteriocina de *L. sake* 148 carece de propiedades alérgicas, ya que su inoculación a los animales de experimentación no les produce reacciones alérgicas ni tóxicas.

En cuanto al segundo aspecto ennumerado, las características antigénicas de las bacteriocinas, no está suficientemente estudiado ni siquiera en las sustancias mas ensayadas; no obstante, se sabe que ciertas bacteriocinas de algunas bacterias Gram-negativas poseen propiedades antigénicas (Gagliano y Hinsdill, 1970; Tubylewicz, 1970; Tagg y col., 1976).

Unicamente Bhunia y col. (1990), han evaluado la antigenicidad de la pediocina AcH de *P. acidilactici*, llegando a la conclusión de que la inoculación de esta sustancia a ratones y conejos no genera la síntesis de anticuerpos neutralizantes. La explicación de este fracaso inmunógeno habría que buscarla, según dichos autores, en el pequeño tamaño molecular de ésta sustancia (2700 Da) que la haría comportarse como un hapteno; en que las técnicas de inmunización o los adyuvantes empleados no fueron los adecuados o en que el número de animales de experimentación utilizados fué pequeño.

Además, la calidad del antígeno no era la mas indicada para estas experiencias, ya que emplearon una bacteriocina parcialmente purificada cuya fracción activa (de 2700 daltons) iba acompañada de, al menos, 2 proteínas de alto peso molecular visibles por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).

Coincidiendo con nuestros resultados, Bhunia y col. (1990), mediante un sistema inmunoenzimático (ELISA) indirecto, observaron una respuesta inmunológica frente a la pediocina AcH parcialmente purificada; tal respuesta la atribuyeron a las proteínas de alto peso molecular, pero sin actividad inhibidora, presentes en la muestra inoculada. En nuestro caso, la respuesta inmunológica no puede atribuirse a compuestos proteicos de elevado peso molecular, ya que la electroforesis en geles de poliacrilamida (fig. 4. 40) demuestra claramente que la preparación estaba libre de sustancias de este tipo.

De los resultados obtenidos, parece deducirse que la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148 presenta cierta acción inmunógena, ya que el título de anticuerpos obtenido en cada una de la sangrías parciales es superior a la anterior (fig. 4. 41). Además, dicha sustancia puede identificarse y diferenciarse del antígeno empleado como control, cuando ambos se disuelven en tampón de PBS (fig. 4. 42). Sin embargo, fué imposible la detección de dicha sustancia cuando se añadió al medio de cultivo MM-triptosa

debido, posiblemente, a la interferencia provocada por alguno de sus componentes. De los resultados obtenidos puede concluirse, al igual que hicieron Bhunia y col. (1990), que la bacteriocina de *L. sake* 148 no es detectable mediante el ELISA indirecto cuando se encuentra disuelta en un medio de cultivo, por lo que quizás sería necesario desarrollar una técnica más sensible que evitara las interferencias citadas.

En cualquier caso, la respuesta inmunológica de los animales de experimentación fué muy pequeña lo que pudo ser debido, aparte del tamaño de la partícula, a otros condicionantes ya citados por Bhunia y col. (1990), como: a) que el número de animales inmunizados no fuera suficiente para permitir la generalización de las conclusiones; b) que los adyuvantes, vías y protocolos de inmunización no fueran los más adecuados o c) que el tamaño de la sustancia, sea incapaz de generar una respuesta en el organismo receptor. En este caso sería necesario incrementar la potencia inmunógena conjugándola con sustancias que le otorguen esta capacidad como, por ejemplo, con la seroalbúmina bovina (BSA).

Las interferencias con otros componentes del medio podrían evitarse empleando otras variantes del método ELISA. Pero quizá fuera más efectiva la obtención de anticuerpos monoclonales que, al ser más específicos que los policlonales empleados en este trabajo, evitarían reacciones indeseables con otros compuestos.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

1).- Las 180 bacterias lácticas seleccionadas durante la maduración de un lote de embutidos crudos presentaron actividad inhibidora directa, variable y cuantificable, frente a diversos microorganismos indicadores. De ellas, 20 manifestaron actividad antimicrobiana exocelular; dichas cepas se aislaron en todas las etapas del proceso de maduración, desde la masa cárnica inicial hasta el producto final listo para su consumo.

2).- Las 6 cepas con mayor actividad inhibidora se identificaron como *Lactobacillus sake*. Todas se desarrollaron a 4 y 15 °C, pero sólo las cepas 148 y 177 lo hicieron a 45 °C. El espectro antimicrobiano de las 4 cepas con mayor actividad inhibidora sugiere que las sustancias inhibidoras son diferentes, ya que la sensibilidad de los distintos microorganismos indicadores es variable dependiendo de la cepa de *L. sake* productora.

3).- *L. sake* 148 es capaz de desarrollarse y producir actividad antimicrobiana cuantificable a 4, 8, 16, 25 y 32 °C. La producción de esta sustancia depende de la composición 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.

4).- Cuando la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148, se purifica por liofilización y cromatografía de filtración en geles, aumenta muy poco su actividad inhibidora específica (7 veces), siendo muy pequeña la recuperación de la actividad inhibidora original (8%).

5).- La sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 148 tiene naturaleza proteica, es estable a valores de pH comprendidos entre 2,6 y 12, resistente al calor y bacteriostática frente a los microorganismos sensibles, características que comparte con otras bacteriocinas de las bacterias lácticas. La fracción activa de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada por cromatografía de filtración en geles, reveló que tiene un peso

molecular de 4.640 daltons. La sustancia parcialmente purificada se compone de 13 aminoácidos; además, y por cromatografía HPLC, se aprecia un pico que pertenece a un aminoácido distinto de los utilizados como patrones. Esta compuesto desconocido eluye junto a la glicina, lo mismo que el aminoácido lantionina.

6).- Consideramos que la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 148 es bacteriostática, ya que detiene el crecimiento de los microorganismos sensibles, pero no su viabilidad. Su concentración inhibidora mínima varía entre 1 y 18 mg/ml, dependiendo de los microorganismos ensayados.

7).- La inoculación de la sustancia antimicrobiana a los animales de experimentación (conejos) originó una respuesta inmunógena débil. El desarrollo y puesta a punto de un ELISA indirecto no permitió la detección de la bacteriocina parcialmente purificada en un medio de cultivo semidefinido (medio de MM-triptosa).

8).- Las características físico-químicas de la bacteriocina producida por *L. sake* 148 y su acción antimicrobiana frente a bacterias patógenas Gram-positivas de gran interés en la industria alimentaria, hacen concebir esperanzas sobre la posible utilidad de las bacterias lácticas o de sus bacteriocinas, como factores de seguridad tanto en la carne y productos cárnicos como en otros sustratos alimentarios diversos.

CAPITULO VII

TRABAJO FUTURO

Las cepas de *L. sake* con actividad antimicrobiana exocelular aisladas y caracterizadas parcialmente, pueden ser de gran utilidad en la inhibición del desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos de la carne y productos cárnicos, así como de otros alimentos. Sin embargo, las condiciones de un sustrato alimentario sólido como la carne, son distintos de las que se dan en los medios de cultivo líquidos. Por ello, la síntesis y la actividad de las sustancias antimicrobianas de las bacterias lácticas descritas, deben examinarse en sistemas alimentarios reales, máxime teniendo en cuenta la incapacidad de *L. sake* 148 de producir la actividad antimicrobiana cuando se desarrolla en diversos medios de cultivo. En consecuencia, parece conveniente acometer estudios tendentes a aclarar los mecanismos responsables de la estimulación o represión de la síntesis o actividad de estas sustancias antimicrobianas.

El empleo de cepas bacteriocinogénicas de *L. sake*, como cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos, presupone tanto la prevención del desarrollo de microorganismos indeseables, como una mayor homogeneidad del proceso fermentativo. Por ello, el desarrollo y puesta a punto de sistemas novedosos de transformación genética de las bacterias lácticas, como la electroporación, permitiría introducirles genes que codifiquen propiedades de importancia tecnológica. Gracias a la tecnología del ADN recombinante, los determinantes genéticos de la producción de bacteriocinas y de la resistencia a las mismas podrían utilizarse como marcadores genéticos o como genes de interés para la producción de bacteriocinas como aditivos alimentarios. De aquí que constituya un objetivo prioritario de nuestro trabajo futuro el estudiar, con la máxima amplitud posible, las características genéticas de los determinantes que codifican la producción de bacteriocinas en las cepas de *L. sake* de interés.

Otra línea de investigación que sería importante desarrollar en el futuro es la determinación de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina de *L. sake* 148, ya que el conocimiento de su estructura proteica permitiría elucidar el papel que ésta desempeña en su

mecanismo de acción, favorecería el estudio de los determinantes genéticos responsables de su síntesis y regulación y, por último, permitiría comparar las relaciones existentes entre estructura-actividad en las distintas bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas.

De otra parte, el bajo poder inmunógeno mostrado por la bacteriocina de *L. sake* 148 dificulta su detección en los alimentos por métodos inmunoenzimáticos (ELISA), este aspecto es fundamental, ya que uno de los requisitos que es más importante cumplir para que se autorice la adición de esta bacteriocina a los alimentos es, precisamente, que se pueda detectar y cuantificar después de incorporarse a los mismos. Por este motivo, se pretende mejorar la capacidad antigénica de esta sustancia empleando métodos de inmunización alternativos, entre los que se incluiría su conjugación a otras moléculas e, incluso, la obtención de anticuerpos monoclonales específicos. Es necesario desarrollar y poner a punto otras variantes de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) empleadas en el presente trabajo para permitir la detección y cuantificación de la sustancia antimicrobiana de interés en diversos sustratos alimentarios. Asimismo, los anticuerpos específicos podrían permitir la purificación a homogeneidad de la sustancia antimicrobiana, por cromatografía de afinidad, lo que permitiría su purificación en un solo paso y evitaría la utilización de otros procedimientos de separación proteica menos eficaces.

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.
- 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, 8: 2503-2510.
- ALLGAIER, H., JUNG, G., WERNER, R. G., SCHNEIDER, U. y ZÄNHER, H. (1985). Elucidation of the structure of epidermin, a ribosomally synthesized tetracyclic heterodetic polypeptide antibiotic. **Angew. Chem.** 24: 1051-1053.
- 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 (1986). **Int. Journal System. Bacteriol.** 36: 354-356.
- AXELSSON, L. T., CHUNG, T. C., DOBROGOSZ, W. J. y LINDGREN, S. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microb. Ecol. Health Dis.**, 2: 131-136.
- BAIRD-PARKER, A. C. (1980). Organic acids. En : "**Microbial Ecology of Foods**", vol. 1 pp.126-135. I.C.M.S.F. (ed.). Academic, New York.
- BARAN, W.L. y STEVENSON, K.E. (1975). Survival of selected pathogens during processing of a fermented turkey susage. **J. Food Sci.** 40: 618-620.
- 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.
- BATISH, V. K., LAL, R. y GROVER, S. (1990). Studies on environmental and antinutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus*. **R. Food Microbiol.**, 7: 199-206.
- BEAVER, R. W., WILSON, D. M., JONES, H. M. y HAYDON, K. D. (1986). Aminoacid analysis in feeds and feedstuffs using precolumn phenyl- isothiocyanate derivatization and liquid chromatography - preliminary study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 70, 3: 425-428.
- BERG, R. W., SANDINE, W. E. y ANDERSON, A. W. (1981). Identification of a growth stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco*. **Appl. Environ. Microbiol.** 42: 786-788.
- BEUCHAT, L. R. Y GOLDEN, D.A. (1989). Antimicrobial occurring naturally in foods. **Food Technol.**, 43:134-142.
- 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.

- 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, 4: 1265-1267.
- BJÖRCK, L. (1985). The lactoperoxidase system. En: "**Natural Antimicrobial Systems**", pp. 18-30. IDF., 41 Square Vergote, 1040, Brussels.
- BONNARD, C., PAPERMASTER, D. S. y KRAEHENBUHL, J. PL (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.
- BOTAZZI, V. (1988). An introduction to rod-shaped lactic acid bacteria. **Biochemie**, 70: 303-315.
- BOTAZZI, V., VESCOVO, M. y DELLAGLIO, F. (1973). Microbiology of Grana cheese. IX. Characteristics and distribution of *Lactobacillus helveticus* biotypes in natural whey cheese starter. **Sci. Tech. Latt.-casear.**, 24: 23-39.
- BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. y SMITH, N. R. (1975). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 7th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 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 GIBSON, N. E. (1974). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 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.
- CALVET, J. J. (1968). The effects of newer forms of packaging on the microbiology and storage life of meats, poultry and fish. **Prog. Ind. Microbiol.**, 7: 77-85
- CARLSSON, J., IWAMI, Y. y YAMADA, T. (1983). Hydrogen peroxide excretion by oral

streptococci and effects on lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. **Infect. Immun.**, 40: 70-80.

CARMINATI, D. GIRAFFA, G. y BOSSI, M. (1989). Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Protect.**, 52, 9: 614-617.

CAVETT, J. J. (1963). A diagnostic key for identifying the lactic acid bacteria of vacuum packed bacon. **J. Appl. Bacteriol.**, 26: 453-470.

CFR. (1988). Nisin preparation; Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. **Code of Federal Regulations, Title 21, Section 184**. U. S. Govt. Print. Office, Washington, D. C.

CHASSY, B. M. y THOMPSON, J. (1983). Regulation and characterization of the galactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Lactobacillus casei*. **J. Bacteriol.** 154: 1204-1214.

CHAMPOMIER, M. C., MONTEL, M. C. GRIMONT, F. y GRIMONT, P. A. D. (1987). Genomic identification of meat lactobacilli as *Lactobacillus sake*. **Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.** 138: 751-758.

CHICHESTER, D. F. y TANNER, F. W. (1972). Antimicrobial food additives. En: **"Handbook of Food additives"** 2nd. ed., pp. 115-150. T. E. Furia (ed.). Chem. Rubber Pub. Co., Cleveland, Ohio.

CLARK, D. S. y TAKACS, J. (1980). Gases as preservatives. En: **"Microbial Ecology of Foods"**, pp. 170-180. Silliker, J. H. (ed.). Academic Press, London.

COLLINS, E. B. y ARAMAKI, K. (1980). Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.**, 63: 353-357.

COLLINS, M. D. y JONES, D. (1981). The distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. **Microbiol. Rev.** 45: 316-354.

- 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.
- CONNER, D. E., BRACKETT, R. E. y BEUCHAT, L. R. (1986). Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. **Appl. Environ. Microbiol.** 52: 59-63.
- CONE, D. K. (1982). A *Lactobacillus* sp. from diseased female rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Newfoundland, Canada. **J. Fish. Dis.** 5: 479-485.
- DAESCHEL, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technol.**, 43: 164-167.
- 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, 6: 1538-1541.
- 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.
- DAINTY, R. H. (1986). Chemical changes associated with microbial growth on meat stored at chill temperatures. **32nd. Europ. Meet. Meat Res. Workers.** Ghent, Belgium, 1: 179-186.
- DAVEY, G. P. (1984). Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. **Appl. Environ. Microbiol.** 45: 205-211.
- DAVEY, G. P. y RICHARDSON, B. C. (1981). Purification and some properties of diplococcin in *Streptococcus cremoris* 346. **Appl. Environ. Microbiol.**, 41: 84-89.

- DAVIDSON, P. M., POST, L. S., BRANEN, A. L. y McCURDY, A. R. (1983). Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. En: "**Antimicrobials in Foods**", pp. 371-390. A. I. Branen and P. M. Davidson (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York.
- DAVIS, J. G. (1975). The microbiology of yoghurt. En: "**Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods**", pp. 245-263. J. G. Carr, C. V. Cutting and G. C. Whiting (eds.). Academic Press, London.
- DAWSON, R. M. C., ELLIOTT, D. C., ELLIOTT, W. H. y JONES, K. M. (1969). En "**Data for biochemical research**" 2nd ed., pp. 484-485. Oxford University Press, Ely House, London.
- 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.
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M. y SHARPE, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Appl. Bact.**, 23: 130-135.
- DENT, V. E. y WILLIAMS, R. A. D. (1982). *Lactobacillus animalis* sp. nov., a new species of *Lactobacillus* from the alimentary canal of animals. **Zentralbl. Bakterirol. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. C** 3: 377-386.
- DE KLERK, H. C. (1967). Bacteriocinogeny in *Lactobacillus fermenti*. **Nature**. London 214: 609.
- DE KLERK, H. C. y GOETZEE. (1961). Antibiosis among lactobacilli. **Nature**. London 192: 340-341.
- DE KLERK, H. C. y SMITH, J. A. (1967). Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. **J. Gen. Microbiol.** 48: 309-316.
- DE VRIES, W., KAPTEIJN, W. M. C., van DER BEEK, E. G. y STOUTHAMER, A. H. (1970) Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* 13 in batch cultures and in continuous cultures. **J. Gen. Microbiol.** 63: 333-345.

- DOBZANSKI, W. T., BARDOWSKI, J., KOZAK, W. y ZAJDEL, J. (1982). Lactostreptocins: bacteriocins of lactic *Streptococci*. En "**Microbiology**", pp. 225-229. D. Schlessinger (ed.). A. S. M., Washington, D. C.
- DZIEZAK, J. D. (1986). Preservatives: Antimicrobial agents. **Food Technol.**, 40, 9: 104-125.
- EGAN, A. F. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. **Antonie van Leeuwenhoek**, 49: 327-336.
- EKLUND, T. (1984). The effect of carbon dioxide on bacteria growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. **Int. J. Food Microbiol.**, 1: 179-185.
- FAO/IAEA/WHO Expert Committee. (1977). Wholesomeness of irradiated foods. Food and Agric. Org./Int. Atomic Energy Agency/World Health Org., **Tech. Rep. Ser. 604**. World Health Org., Geneva Switzerland.
- FELTON, E. A., EVANS, J. B. y NIVEN, C. F. R. Jr. (1953). Production of catalase by the pediococci. **J. Bact.** 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., ETHELLES, J. L. y COSTILOW, R. N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. **Appl. Microbiol.**, 30: 1040-1042.
- FOOSTER, E. M., NELSON, F. E., SPECK, M. L., DOLTSCH, R. N. y OLSON, J.-C. (1957). En: "**Dairy Microbiology**", pp. 106-107. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NY.
- FREDERICQ, P. (1948). Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. **Rev. Belge. Pathol. Med. Expt.** 19 (suppl. 4)1-107.

- FRIEND, B. A., FIEDLER, J. M. y SHAHANI, K. M. (1983). Influence of culture selection on the flavor, antimicrobial activity, β -galactosidase and B-vitamins of yogurt. **Milchwissenschaft** 38: 133-136.
- GAGLIANO, V. J. y HINS DILL, R. D. (1970). Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. **J. Bacteriol.**, 104: 117-125.
- GALVEZ, A., MAQUEDA, M., VALDIVIA, E., QUESADA, A. Y MONTOYA, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. **Can. J. Food Microbiol.**, 32: 765-771.
- GARVIE, E. I. (1986a). Genus *Leuconostoc*. En: "**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**", vol. 2., pp. 1071-1075. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.). Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- GARVIE, E. I. (1986b). 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.
- GARVIE, E. I., FARROW, J. A. E. y PHILLIPS, B. A. (1981). A taxonomic study of some strains of streptococci which grow at 10 °C but not at 45 °C including *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. C** 2: 151-165.
- GEIS, A., SINGH, J. y TEUBER, M. (1983) Potential of lactic *Streptococci* to produce bacteriocin. **Appl. Environ. Microbiol.**, 45, 3: 205-211.
- GIBBS, P. A. (1987). Novel uses for lactic acid fermentation. **J. Appl. Bacteriol.** (Symp. Suplem.): 515-585.
- GONZALEZ, C. F. y KUNKA, B. S. (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acililactici*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 53, 10: 2534-2538.
- GÖTZ, F., ELSTENER, E. F., SEDEWITZ, B. y LENGFELDER, E. (1980). Oxygen utilization by *Lactobacillus plantarum*. II. Superoxide and superoxide dismutation.

- Arch. Microbiol. 125: 215-220.
- GRATIA, A. (1946). Techniques sélectives pour la recherche systématique des germes antibiotiques. C. R. Sciences Soc. Biol. Paris 140: 1053-1055.
- HAMMES, W. P., BANTLEON, A. y MIN, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiol. Rev., 87: 165-174.
- HARDIE, J. M. (1986). Genus *Streptococcus*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", vol. 2., pp. 1043-1071. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.). Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 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.
- 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 Protec., 52, 6: 384-387.
- 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., HOLZAPFEL, W. H. y NIEMAND, J. G. (1986). Radiation resistance of *Lactobacilli* isolated from radurized meat relative to growth and environment. Appl. Environ. Microbiol., 52, 4: 898-901.
- HAYS, G. L. y REISTER, D. W. (1952). The control of "off-odour" spoilage in frozen concentrated orange juice. Fd. Technol. Champaign., 6: 386-389.
- HENSEL, R. U., MAYR, U., STETTER, K. O. y KANDLER, O. (1977). Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. I. Purification and kinetics of the allosteric L-lactic acid dehydrogenase from *L. casei* ssp. *casei* and

- Lactobacillus curvatus* . Arch. Microbiol. 112: 81-93.
- 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.
- HOLMBERG, K. y HALLANDER, H. O. (1973). Production of bactericidal concentrations of hydrogen peroxide by *Streptococcus sanguis*. Arch. Oral Biol. 18: 423-434.
- HOLY, A. V. y HOLZAPFEL, W. H. (1988). The influence of extrinsic factors on the microbiological spoilage pattern of ground beef. Int. J. Food Microbiol., 6: 269-280.
- 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. Fleischwurstch., 68, 2: 194-201.
- HOLZAPFEL, W. H. y GERBER, E. S. (1983). *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L(+)-lactate. Syst. Appl. Microbiol. 4: 522-534.
- HOLZAPFEL, W. H. y GERBER, E. S. (1986). Predominance of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake* in the spoilage association of vacuum packaged meat products. Abstr. 32nd Eur. Meet. Meat Research, pp. 26 Ghent.
- HUEPPE, F. (1884). Milchsäurebazillus syn. *Bacterium acidi lactici*. Zopf. Mitt. Kaiserl. Gesundheitsamt., 2: 337-340.
- HURST, A. (1981). Nisin. Adv. Appl. Microbiol., 27: 85-123.
- ICMSF. (1980). En: "Microbial Ecology of Foods. Vol. 1. Factors Affecting Life and Death of Microorganisms." Intl. Commission on Microbiological Specifications for Foods. Academic Press, New York.
- 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 proprieties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol.**, 44: 525-531
- JAY, J. M. (1986). En: "**Modern food Microbiology**" (3rd ed.), pp. 275. Van Nostrand Reinhold, New York.
- 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.
- JOHNSON, J. L., DOYLE, M. P. AND CASSENS, R. G. (1988). Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. **Int. J. Food Microbiol.**, 6: 243-247.
- JUNTILLA, J., HIRN, J., HILL, P. y NURMI, E. (1989). Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermented sausage. **J. Food Protec.** 52:158-161.
- KANDLER, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. **J. Microbiol. Serol.** 49: 209-224.
- KANDLER, O. (1984). Current taxonomy of lactobacilli. **Ind. Microbiol.** 25: 109-123.
- KANDLER, O. y KUNATH, P. (1983). En: Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List. nº 11, **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 33: 672-674.
- 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.
- KATAGIRI, H., KITAHARA, K. y FUKAMI, K. 1934. The characteristics of the lactic acid bacteria isolated from moto, yeast mashs of saké manufacture. IV. Classification of the lactic acid bacteria. **Bulletin of the Agricultural Society (Japan)**. 10: 156-157.

- KELLNER, R., JUNG, G., HÖRNER, T., ZÄHNER, H., SCHNELL, N., ENTIAN, K.-D. y GÖTZ, F. (1988). Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur. J. Biochem.* 177:53-59.
- KELLNER, R., JUNG, G., JOSTEN, M., KALETTA, C., ENTIAN, K.-D. y SAHL, H.-G. (1989). Pep5: structure elucidation of a large lantibiotic. *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.* 28:616-619.
- KEKESSY, D. A. y PIGUET, J. D. (1970). New method for detecting bacteriocin production. *Appl. Microbiol.*, 20: 282-283.
- KING, A. D. Jr. y NAGEL, C. W. (1975). Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Food Sci.*, 40: 362-366.
- 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.
- KNOX, K. W. y HALL, E. A. (1964). The relationship between the capsular and cel wal polysaccharides of strains of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*. *J. Gen. Microbiol.* 37: 433-438.
- KNOX, K. W. y WICKEN, A. J. (1973). Immunological properties of teichoic acids. *Bacteriol. Rev.*, 37: 215-257.
- KODAMA, R. (1952). Studies on lactic acid bacteria. Lactolin, a new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria. *J. Antibiot.*, 5: 72.
- 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.

- KUTTNER, A. G. (1966). Production of bacteriocins by group A streptococci with special reference to the nephritogenic types. **J. Exp. Med.** 124: 279-291.
- LABAN, P., FAURE, C., RAMET, F. Y LARPENT, J. P. (1978). Lactobacilli isolated from french saucisson (taxonomic study). **Zbl. Bakt.**, 1: 105-111.
- LAEMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.
- LAW, B. A. y KOLSTAD, J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, 49: 225-245.
- LEDWARD, D. A., NICOL, D. J. y SHAW, M. K. (1971). Microbiological and colour changes during aging of beef. **Food Technol. Austral.**, 23: 30-35.
- LINDGREN, S. E. y DOBROGOSZ, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **F.E.M.S. Microbiol. Rev.**, 87: 149-164.
- LIU, W. y HANSEN, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 56, 8: 2551-2558.
- LONDON, J. (1976). The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. **Ann. Rev. Microbiol.**, 30: 279-301.
- LÜCK, E. (1976). Sorbic acid as food preservative. **Intl. Flavors Food Add.**, 7, 3: 122-123.
- LÜCKE, F. K. (1986). Microbiological processes en the manufacture of dry sausages and raw ham. **Fleischwirstsch.**, 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.

- MARKWELL, M. A. K., HAAS, S. M., BIEBER, L. L. y TOLBERT, N. E. (1978). A modification of the Lowry prodedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, 87: 206-210.
- 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.
- McGROARTY, J. A. y REID, G. (1988). Detection of a lactobacillus substance that inhibits *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, 34: 974-978.
- 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.
- MOLIN, G. y TERNSTROM, A. (1982). Numerical taxonomy of psychophilic pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 1249-1264.
- MONTEL, M. C., TALON, R. y CHAMPOMIER, M. C. (1989). Identification of some lactic acid bacteria from meat. *Proc. 35th Int. Cong. of Meat Science and Technology*, vol. 2, pp. 299-301. Conpenhagen.
- MOON, N. J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Bacteriol.*, 55: 453-460.
- MORISHITA, T., FUDADA, T., SHIROTA, M. y YURA, T. (1974). Genetic basis of nutritional requeriments in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* 120: 1078-1084.
- MØRTVEDT, C. I. y NES, I. F. (1990). Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 1601-1607.
- MØRTVEDT, C. I., NISSEN-MEYER, J., SLETTER, K. y NES, I. F. (1991). Purification and aminoacid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1829-1834.

- 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*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 114-121.
- 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.
- OBAFEMI, A. y DAVIES, R. (1986). The destruction of *Salmonella typhimurium* in chicken exudate by different freeze-thaw treatments. **J. Appl. Bacteriol.**, 60: 381-384.
- OKADA, S., SUZUKI, Y. y KOZAKI, M. (1979). A new heterofermentative *Lactobacillus* specie with meso-diaminopimelic acid in peptidoglycan, *Lactobacillus vaccinosเตอร์cus* , Kozaki and Okada sp. nov. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 25: 215-221.
- ORDOÑEZ, J. A. (1979). Random number sampling method for estimation of lactic acid bacteria. **J. Appl. Bacteriol.**, 46: 351-353.
- ORLA-JENSEN, S. (1919). "**The Lactic Acid Bacteria**". Andr. Fred. Host and Son., Copenhagen.
- OUCHTERLONY, Ö. (1949). Antigen-antibody reactions in gels. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 26: 507.
- 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. (1981). Control of *Staphylococcus aureus* in dry sausage by a newly developed meat starter culture and phenolic-type antioxidants. **J. Food Protect.**, 44: 665-668.
- 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.
- RAY, S. K., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1989). Bacteriocin plasmids of *Pediococcus acidilactici*. **J. Ind. Microbiol.**, 4: 163-171.
- 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 Protec.**, 46: 514-517.
- 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.
- RHEE, S. K. y PACK, M. Y. (1980). Effect of environmental pH on chain length of *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Bacteriol.** 144: 1125-1136.

- 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.
- 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.
- ROGERS, L. A. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Bacteriol.**, 16: 321.
- 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.
- RUBIN, H. E. (1978). Toxicological model for a two-acid system. **Appl. Environ. Microbiol.**, 36: 623-624.
- RUBIN, H. E., NERAD, T. y VAUGHAN, F. (1982). Lactic acid inhibition of *Salmonella typhimurium* in yoghurt. **J. Dairy Sci.**, 65: 197-199.
- RHULAND, G. J. y FIEDLER, F. (1987). Occurrence and biochemistry of lipoteichoic acids in the genus *Listeria*. **Syst. Appl. Microbiol.**, 9: 40-46.
- SABINE, D. B. (1963). An antibiotic-like effect of *Lactobacillus acidophilus*. **Nature**, 199: 811-816.
- SANDINE, W. E. (1988). New nomenclature of the non-rod-shaped lactic acid bacteria. **Biochem.** 70: 519-522.
- 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.
- SCHLEIFER, K. H. y KANDLER, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. **Bacteriol. Rev.** 36: 407-477.
- 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.
- SEELINGER, H. P. R. y JONES, D. (1986). Genus *Listeria*. En: "**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**", vol. 2., pp. 1235-1245. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds.). Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- SHAHANI, K. M., VAKIL, 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. (1970). Cell wall and cell membrane antigens used in the classification of lactobacilli. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 20: 509-518.
- SHARPE, M. E. (1979). 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.
- SHARPE, M. E. (1981). The genus *Lactobacillus*. En "**The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria**", pp. 1653-1679. Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schelegel (eds.). Springer, New York.

- SHARPE, M. E. y FRANKLIN, J. G. (1962). Production of hydrogen sulphide by lactobacilli isolated from Cheddar cheese. **Proc. XVI Intern. Dairy Congr.**, Copenhagen, 8.
- SHARPE, M. E. GARVIE, E. I. y TILBURY, R. H. (1972). Some slime forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. **Appl. Microbiol.** 23: 389-397.
- SHARPE, M. E., LATHAM, M. J., BARVIES, E. I., ZIRNGIBL, J. y KANDLER, O. (1973). Two new species of *Lactobacillus* isolated from the bovine rumen, *Lactobacillus ruminis* sp. nov. and *Lactobacillus vitulinus* sp. nov. **J. Gen. Microbiol.** 77: 37-49.
- SHAW, B. G. y HARDING, C. D. (1984). A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. **J. Appl. Bacteriol.**, 56: 25-40.
- SHAW, B. J. y LATTY, J. B. (1982). A numerical taxonomic study of *Pseudomonas* strains from spoiled meat. **J. Appl. Bacteriol.**, 52: 219-228.
- SHAW, B. J. y LATTY, J. B. (1984). A study of the relative incidence of different *Pseudomonas* groups on meat using a computer assisted identification technique employing only carbon source tests. **J. Appl. Bacteriol.**, 57: 59-67.
- 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 Protect.**, 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.

- SIMONDS, J., HANSE, P. A. y LAKSHAMANAN, S. (1971). Deoxyribonucleic acid hybridization among strains of lactobacilli. **J. Bacteriol.** 107: 382-384.
- SKINNER, F. A. y HUGO, W. B. (1976). En: "**Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes**". Symp. Series 5, Soc. for Appl. Bacteriol. Academic Press, New York.
- SMITH, J. L. y PALUMBO, S. A. (1981). Microorganisms as food additives. **J. Food Protect.**, 44: 936-955.
- SPECK, M. L. y RAY, B. (1977). Effects of freezing and storage on microorganisms in frozen foods: A review. **J. Food Protect.**, 40: 333-340.
- SPELHAUG, S. R. y HARLANDER, S. K. (1989). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. **J. Food Protect.**, 52: 856-862.
- SRIRANGANATHAN, N., SEILDER, R. J., SANDINE, W. E. y ELLIKER, P. R. (1973). Cytological and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization studies on *Lactobacillus* isolated from San Francisco sour dough. **Appl. Microbiol.** 25: 461-470.
- 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. Environ. Microbiol.**, 58: 1417-1422
- SU, T. L. (1949) Antibiotic producing organisms in faeces and sewage. **Br. J. Exp. Pathol.** 30: 466-473.
- SWANK, R. T. y MUNKRES, K. D. (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. **Anal. Biochem.**, 39: 462-477.
- SYKES, G. (1965). En: "**Disinfection and sterilization**", 2nd ed., p. 27. J. B. Lippincott (Ed.), Philadelphia.

- 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. (1976). Bacteriocins or Gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** 40: 722-756.
- TALARICCO, T. L. y DOBROGOSZ, W. J. (1990). Purification and characterization of glycerol dehidratase from *Lactobacillus reuteri*. (1990). **Appl. Environ. Microbiol.**, 56: 1195-1197.
- TALARICCO, 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.
- TANAKA, N., TRAISMAN, E., PLATINGA, P., FINN, L., FLOM, W., MESKE, L. y GUGGISBERG, J. (1986). Evaluation of factors involved in antibotulinal properties of pasteurized process cheese spread. **J. Food Protect.**, 49: 526-530.
- THOMAS, T. D., ELLWOOD, D. C. y LONGYEAR, V. M. C. (1979). Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. **J. Bacteriol.** 138: 109-117.
- THORNLEY, M. J. y SHARPE, M. E. (1959). Microorganisms from chicken meat related to both lactobacilli and aerobic sporeformers. **J. Appl. Bacteriol.**, 22: 368-376.
- TOBA, T., YOSHIOKA, E. y ITOH, T. (1981). Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. **Letters Appl. Microbiol.**, 12: 43-45.
- TORRICELLI, A. (1959). Sterilization of empty containers for food industry. En: "**Ozone Chemistry and Technology**", pp. 375-376. H. A. Leedy (Ed.). Adv. in Chem. Series 21, Am. Chem. Soc., Washington, D. C
- TRAMER, J. (1966) Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. **Nature**. London. 211: 204-205.

- TUBYLEWICZ, H. (1970). Antigenic properties of the bacteriocin preparations obtained from Type A *Clostridium perfringens* strains. **Bull. Polish Academy Sci. (Biol.)**, 18: 253-257.
- 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., GEIS, A., KOK, J. y VENEMA, G. (1989). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. **App. Environ. Microbiol.** vol 55. 5: 1187-1191
- 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, 2: 492-498.
- VANKOVA, J. (1957). Motile catalase producing strains of *Lactobacillus delbrueckii*. **Nature**, London, 179: 204.
- VICENT, J. G., VEOMETT, R. C. y RILEY, R. F. (1959). Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. **J. Bacteriol.** 78: 477-484.
- WEST, C. A. y WARNER, P. J. (1988). Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. **FEMS Microbiol. Lett.**, 49: 163-165.
- WEISS, N., SCHILLINGER, U., LATERNSE, M. y KANDLER, O. (1981). *Lactobacillus sharpeae* sp. nov. and *Lactobacillus agilis* sp. nov., two new species of homofermentative, meso-diaminopimelic acid-containing lactobacilli isolated from sewage. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. C** 2: 242-253.
- WHITING, G. C. (1975). Some biochemical and flavour aspects of lactic acid bacteria in ciders and other alcoholic beverages. En: "**Lactic Acid Bacteria in Beverages**

- and Foods"**, pp. 69-85. J. G. Carr, C. V. Cutting and G. C. Whiting (eds.). Academic Press, London.
- WHITTENBURY, J. R. (1964). Hydrogen peroxide formation and catalase activity of the lactic acid bacteria. **J. Gen. Microbiol.** 35: 13-26.
- WILLIAMS, R. A. D. (1975). A review of biochemical techniques in the classification of lactobacilli. En: "**Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods**", pp. 351-367. J. G. Carr, C. V. Cutting and G. C. Whiting (eds.). Academic Press, London.
- WILKINSON, B. J. y JONES, D. (1977). A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, 98: 399-421.