



**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS**

Aislamiento y purificación de bacteriocinas a partir de *Lactobacillus plantarum* para su uso como conservantes en carne de res.

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN ALIMENTOS**

Autora:
JOSSELYN SAMANTHA BRAVO PULLA

Directora:
MARÍA ALICIA PEÑA GONZÁLEZ

Co director:
MARÍA FERNANDA ROSALES MEDINA

Cuenca – Ecuador

Enero, 2021

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios y a mi mamá por ser quien me ha acompañado y guiado durante toda mi vida. Por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me ha dado, por haberme formado como una mujer de bien, y por ser quien me dio la vida y me enseño a vivirla siendo mi ejemplo a seguir y por su infinita paciencia. A mis abuelos, tía y hermana por darme todo su cariño, apoyarme y estar conmigo en las buenas y en las malas

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de graduación primeramente quiero agradecer a Dios por guiarme hasta llegar donde he llegado, por iluminarme siempre, por hacer mi sueño realidad y por haberme dado la vida.

A la Universidad del Azuay por abrirme las puertas y darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional.

A las ingenieras María Alicia Peña y María Fernanda Rosales por la confianza, enseñanza y motivación depositada en mí para poder realizar el presente trabajo de graduación y durante toda mi formación profesional.

Al ingeniero Diego Montero por su constante ayuda y su infinita paciencia durante toda mi vida universitaria; por su apoyo incondicional y sus sabios consejos.

Y, por último, me gustaría agradecer a mis amigos y amigas en especial a Anabel, Carolina, Melisa, Daniela, Karen, Juan Javier, Ronaldo y Agustín quienes son como hermanos para mí, los cuales me han motivado durante mi formación profesional y jamás me han abandonado.

Son varias las personas que han formado parte de mi vida a las que me gustaría agradecerles por sus consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí y por todo lo que me han brindado.

RESUMEN

Se caracterizó la actividad bacteriocinogénica del sobrenadante concentrado que contiene bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* (SCLB), sobre las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, a través de pH, enzimas y temperatura de refrigeración. Mediante electroforesis de proteínas, se determinó el peso molecular de ~6 kDa para los péptidos más abundantes en el SCLB. Posteriormente, se evaluó la extensión de la vida útil de carne de res fresca mediante la aplicación de SCLB y empacado al vacío, durante 15 días de almacenamiento en refrigeración a 4°C analizando los atributos sensoriales y desarrollo microbiológico en el tiempo. Para estimar la vida de anaquel se utilizó una ecuación cinética de primer orden con los datos de crecimiento microbiano, dando un resultado de 13 días. Se presentó un efecto bactericida el día nueve, disminuyendo los conteos de enterobacterias en las muestras de carne con SCLB. En apariencia, color y aroma se observó una disminución en el valor de aceptación a medida que avanza el tiempo de almacenamiento con diferencias significativas entre tratamientos, alcanzando el mejor puntaje el tratamiento con SCLB.

PALABRAS CLAVE: bacteriocinas, *Lactobacillus plantarum*, carne de res, biopreservación.



Ing. Ma. Fernanda Rosales M.
Coordinadora de Escuela
Ingeniería en Alimentos



Ing. María Alicia Peña G.
Directora de Tesis



Josselyn Samantha Bravo Pulla
Autora

ABSTRACT

The bacteriocinogenic activity of the concentrated supernatant containing bacteriocins produced by *Lactobacillus Plantarum* (SCLB) was characterized on the pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*, through pH, enzymes, and refrigeration temperature. Also, by employing electrophoresis, the molecular weight of ~6 kDa for the most abundant peptides in the SCLB. Subsequently, the extension of the shelf life of fresh beef was evaluated through SCLB application and vacuum packaging, during 15 days of refrigerated storage at 4°C analyzing the sensory attributes and microbiological development in time. A first-order kinetic equation was used to estimate shelf life with microbial growth data, giving a result of 13 days. A bactericidal effect was presented on day nine, decreasing the counts of enterobacteria in meat samples with SCLB. Regarding appearance, color and aroma a decrease in the acceptance value was observed as the storage time progresses with significant differences between treatments, reaching the best score the treatment with SCLB.

KEY WORDS: bacteriocins, *Lactobacillus plantarum*, beef, biopreservation.



Ing. Ma. Fernanda Rosales M.
Coordinadora de Escuela
Ingeniería en Alimentos



Ing. María Alicia Peña G.
Directora de Tesis

Josselyn Samantha Bravo Pulla
Autora

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	<i>i</i>
AGRADECIMIENTOS.....	<i>ii</i>
RESUMEN.....	<i>iii</i>
PALABRAS CLAVE: bacteriocinas, <i>Lactobacillus plantarum</i>, carne de res, biopreservación.....	<i>iii</i>
ÍNDICE DE CONTENIDOS	<i>v</i>
ÍNDICE DE TABLAS.....	<i>vii</i>
ÍNDICE DE ANEXOS.....	<i>ix</i>
INTRODUCCIÓN.....	10
CAPÍTULO I	12
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
1.1. Contaminación de la carne	12
1.2. Biopreservación de alimentos.....	12
1.3. Bacteriocinas	13
1.4. Aplicación de las bacteriocinas en la biopreservación de carnes y productos cárnicos	14
CAPITULO II	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1. Producción de bacteriocina a partir de <i>Lactobacillus plantarum</i>	16
2.2. Concentración del sobrenadante de <i>Lactobacillus plantarum</i>	16
2.3. Obtención de sobrenadantes concentrados, semi purificación y estimación de peso molecular	16
2.3.1. Semi purificación de los sobrenadantes concentrados de <i>Lactobacillus plantarum</i> 16	16
2.3.2. Cuantificación de proteínas presente en el sobrenadante concentrado 17	17
2.3.3. Electroforesis de los precipitados concentrados semi purificados de <i>Lactobacillus plantarum</i>	17
2.3.4. Revelado de gel de electroforesis.....	18
2.4. Caractetización de los péptidos bioactivos de <i>Lactobacillus plantarum</i> . 18	18
2.4.1. Activación de bacterias patógenas.....	18
2.4.2. Determinación de la capacidad antagónica de los sobrenadantes concentrados	18
2.4.3. Evaluación de la actividad bacteriocinogénica de los sobrenadantes concentrados de <i>Lactobacillus plantarum</i> a través de distintos tratamientos.....	19
2.4.3.1. Tratamiento de pH	19
2.4.3.2. Tratamiento de temperatura	19
2.4.3.3. Tratamiento enzimático.....	19
2.5. Aplicación de la bacteriocina en carne	20

2.5.1.	Preparación de la muestra.....	20
2.5.2.	Análisis microbiológicos de la carne de res.....	20
2.5.3.	Evaluación sensorial	20
2.5.4.	Determinación del tiempo de vida útil de la carne de res fresca	21
CAPÍTULO III		22
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....		22
3.2.	Estimación del peso molecular de los péptidos presentes en el precipitado concentrado y semi-purificado de <i>Lactobacillus plantarum</i>	22
3.3.	Capacidad antagónica del sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a dos bacterias patógenas.....	23
3.4.	Actividad bacteriocinogénica del sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i> . 24	
3.4.1.	Estabilidad frente a pH.....	24
3.4.2.	Estabilidad frente a enzimas	25
3.4.3.	Estabilidad frente a la temperatura.....	26
3.5.	Análisis de la bacteriocina en la carne.....	27
3.5.1.	Análisis microbiológicos	27
3.5.2.	Ánalisis Sensorial.....	28
3.6.	Determinación del tiempo de vida útil de la carne de res fresca.....	30
CONCLUSIONES.....		31
BIBLIOGRAFÍA.....		32
ANEXOS		34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas producidas por BAL.....	13
Tabla 2. Patrones de Albúmina para cuantificación por método de Bradford (Bradford, 1976).....	17
Tabla 3. Distribución y volumen de carga de PCSP de las muestras en el gel de poliacrilamida	18
Tabla 4. Preparación de enzimas	19
Tabla 5. Cantidad de enzimas y sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i>	20
Tabla 6. Análisis Sensorial	21
Tabla 7. Cuantificación de proteínas del sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i> y muestra control MRS por el método de Bradford	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel BoltTM 8% Bis-Tris Plus de electroforesis con el precipitado concentrado y caldo MRS precipitado concentrado. Ladder: SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Estándar	23
Figura 2. Capacidad antagónica del sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i> y control positivo de cloranfenicol. *SCLB: sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i>	24
Figura 3. Efecto de pH en la actividad bacteriocinogénica del sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i>	25
Figura 4. Efecto de las enzimas en la actividad bacteriocinogénica del sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i> *SCLB: sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i>	26
Figura 5. Efecto del sobrenadante de <i>Lactobacillus plantarum</i> a 4 ± 1 °C.....	26
Figura 6. Cambios en la microbiología en carne fresca de res, durante 15 días de almacenamiento al vacío con agua estéril (CAE), ácido láctico (CAL) y sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i> (BAC) en enterobacterias totales (UFC/g).	27
Figura 7. Cambios sensoriales en carne fresca durante 15 días de almacenamiento con agua estéril, ácido láctico y sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i> . *CAE: Control agua estéril, CAL: Control ácido láctico, BAC: sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i>	29
Figura 8. Curva de predicción de la vida útil de la carne de res fresca con el sobrenadante concentrado de <i>Lactobacillus plantarum</i>	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Saturación con sulfato de amonio	34
Anexo 2. Ficha de catación para evaluación sensorial de la carne	34
Anexo 3. Curva de patrones de Suero de Albúmina Bovina (BSA)	35