



Departamento de Posgrados

“Caracterización bioquímica del extracto crudo de bacteriocina obtenido de una bacteria ácido láctica aislada de suero de queso”

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:
“Magíster en Gestión de la Calidad y Seguridad Alimentaria”**

Autora: Mariana Elizabeth Saá Cruz

Directora: Ing. María Fernanda Rosales Medina, Mg.

Cuenca- Ecuador

2016

DEDICATORIA

A mi esposo René y mi hija Renata por todo su cariño y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A la Ing. María Fernanda Rosales, por su guía, aporte y apoyo como Directora del presente trabajo.

Al Ing. Vladimiro Tobar Solano, por su invaluable asesoría en el análisis estadístico de esta tesis.

A la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay y la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, por facilitar el acceso a la infraestructura, equipos, reactivos y demás requerimientos para llevar a cabo la parte práctica del estudio.

A todos los miembros del Proyecto VLIR IUC de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca por el apoyo operacional y motivacional durante el desarrollo de mi trabajo.

RESUMEN

En el presente estudio se empleó una cepa nativa de *Lactococcus lactis* aislada del suero residual de quesillos de la zona de Bulán-Paute de la región Austro del Ecuador, a partir de la cual, se obtuvo un extracto crudo al que se le evaluó la actividad inhibitoria frente a cepas de bacterias patógenas indicadoras, antes y después de someterle a distintos tratamientos de caracterización bioquímica que incluyeron estabilidad térmica, condiciones de pH y acción de enzimas.

La actividad inhibitoria se evaluó por el método de difusión en pozo, encontrándose que tanto el extracto crudo como el sometido a los distintos tratamientos de caracterización, mostraron actividad inhibitoria *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. No se evidenció ninguna actividad frente a *S. Enteritidis* y *E. coli*.

El compuesto responsable de la inhibición presentó estabilidad al tratamiento térmico, a las condiciones ácidas de pH y no fue sensible a la acción de las enzimas empleadas, sin descartar que se trate de una bacteriocina autóctona con potencial uso en el control de microorganismos patógenos de interés en alimentos.

PALABRAS CLAVE:

BAL (bacterias ácido lácticas), difusión en pozo, actividad inhibitoria, extracto crudo, bacteriocina

ABSTRACT

A *Lactococcus lactis* native strain isolated from residual whey of fresh cheese manufactured in the Bulán-Paute area of South Ecuador was used for the present research. The inhibitory activity of the crude extract from the mentioned strain was evaluated against strains of indicator pathogenic bacteria before and after being subjected to various biochemical characterization treatments, which included thermal stability, pH conditions and enzyme action.

The inhibitory activity was evaluated by the well-diffusion method, which demonstrated that both the crude extract as well as the one subjected to different characterization treatments, showed in-vitro inhibitory activity when compared to *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. However, no activity was demonstrated against *S. enteritidis* and *E. coli*.

The compound responsible for inhibitory activity was stable to heat treatment, acid pH conditions, but was not sensitive to the action of the enzymes used, without excluding that this can be a native bacteriocin with potential use in controlling pathogenic microorganisms in food.

KEYWORDS: LAB (Lactic acid bacteria), Well-Diffusion, Inhibitory Activity, Crude Extract, Bacteriocin


UNIVERSIDAD DEL
AZUAY
Dpto. Idiomas


Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Bacterias ácido lácticas.....	1
1.2 Bacteriocinas de BAL.....	2
1.3 Modo de acción de las bacteriocinas	4
1.4 Objetivos e hipótesis del trabajo de investigación	6
1.4.1 Objetivo general	6
1.4.2 Objetivos específicos	6
1.4.3 Hipótesis de investigación experimental.....	6
2. CAPÍTULO 1: MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
2.1. Área de estudio	7
2.2. Cepas empleadas	7
2.3 Obtención del extracto crudo neutralizado	7
2.4 Pruebas de caracterización	8
2.4.1 Tratamiento enzimático.....	8
2.4.2 Tratamiento térmico	8
2.4.3 Tratamiento por pH	8
2.5 Determinación de la actividad inhibitoria	8
2.6 Análisis estadístico	9
3. CAPÍTULO 2: RESULTADOS.....	10
3.1 Evaluación de la actividad inhibitoria del extracto crudo neutralizado.....	10
3.2 Evaluación de la actividad inhibitoria del extracto crudo sometido a diferentes tratamientos de caracterización bioquímica.....	11
3.2.1 Estabilidad térmica.....	11
3.2.2 Estabilidad frente al pH	12
3.2.3 Sensibilidad frente a enzimas	12

3.3	Análisis estadístico ANOVA	13
3.4	Comparaciones post hoc – prueba de Tukey	16
3.5	Gráficos de perfil de la interacción.....	19
4.	CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN	23
5.	CONCLUSIÓN	25
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
7.	ANEXOS	29
	ANEXO I.....	29
	ANEXO II.....	30
	ANEXO III.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas de BAL	3
Tabla 2. Valor del pH inicial del pool de extracto antes de ajustarlos a pH 6,5 para todos los tratamientos	10
Tabla 3. Modelo factorial completo mixto del ANOVA con interacciones hasta tercer nivel.	13
Tabla 4. Modelo factorial final del ANOVA: componentes del modelo que contribuyen a la variación de la variable dependiente representada por el diámetro de los halos de inhibición en milímetros.....	15
Tabla 5. Tabla resumen del procedimiento de Tukey: comparaciones múltiples	16
Tabla 6. Tabla resumen del procedimiento de Tukey: subconjuntos homogéneos.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo del mecanismo de acción dual de la nisina	5
Figura 2. Prueba de inhibición por duplicado del control positivo (ciprofloxacina 5ug/mL) y del control negativo (caldo MRS) frente a las cepas indicadoras <i>S. aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. Enteritidis</i> y <i>E. coli</i>	11
Figura 3. Prueba de inhibición por duplicado del extracto crudo neutralizado frente a las cepas indicadoras <i>S. aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. Enteritidis</i> y <i>E. coli</i>	11
Figura 4. Prueba de inhibición por duplicado del extracto crudo neutralizado sometido a los diferentes tratamientos de caracterización bioquímica frente a las cepas indicadoras <i>S. aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	12
Figura 5. Prueba de inhibición por duplicado del extracto crudo neutralizado sometido a los diferentes tratamientos de caracterización bioquímica frente a las cepas indicadoras <i>S. Enteritidis</i> y <i>E. coli</i>	13
Figura 6. Gráfico de perfil del Tratamiento (Tt) por Día para <i>Listeria monocytogenes</i> (Lm). 19	
Figura 7. Gráfico de perfil del Tratamiento (Tt) por Día para <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa)... 20	
Figura 8. Gráfico de perfil de los Microorganismos (Mo) por Tratamiento (Tt) para el Día=a21	
Figura 9. Gráfico de perfil de los Microorganismos (Mo) por Tratamiento (Tt) para el Día=b21	
Figura 10. Gráfico de perfil del Tratamiento (Tt) por los Microorganismos (Mo) para el Día=a	22
Figura 11. Gráfico de perfil del Tratamiento (Tt) por los Microorganismos (Mo) para el Día=a	22

Mariana Elizabeth Saá Cruz

Trabajo de graduación

Directora: Ing. María Fernanda Rosales

Abril 2016

“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL EXTRACTO CRUDO DE BACTERIOCINA OBTENIDO DE UNA BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA AISLADA DE SUERO DE QUESO”

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha identificado un interés creciente sobre varios aspectos del ámbito de la seguridad alimentaria y el consumo de alimentos con un efecto beneficioso para la salud (Banerjee, Dora, & Chowdhury, 2013), dentro de este contexto, el uso de sustancias naturales ha tomado gran importancia en los últimos años en el campo de la biopreservación de alimentos, debido a la continua presión de disminuir el uso de aditivos y conservantes químicos por los posibles efectos adversos que pueden causar en la salud del consumidor (de Souza Barbosa et al., 2015).

Las metodologías de biopreservación más comúnmente utilizadas en alimentos, implican el uso de las bacterias ácido lácticas (BAL) y sus metabolitos, mediante la aplicación de cepas productoras de sustancias antagonistas denominadas cepas biopreservantes, la utilización de preparaciones como extracto crudo de bacteriocinas, licor fermentado o concentrados obtenidos mediante el crecimiento de cepas de BAL en medios de cultivo específico y especialmente la adición de sustancias antagonistas puras o semipuras como las bacteriocinas (Chen & Hoover, 2003; Leite et al., 2015). El empleo de estos métodos de preservación ofrece un potencial beneficio a la industria, siendo una alternativa en el diseño de estrategias combinadas para la conservación, que podrían actuar como una barrera adicional para reducir la adición de preservantes químicos y disminuir la intensidad del tratamiento térmico, resultando en alimentos preservados naturalmente, con mejores propiedades nutricionales y organolépticas. (Gálvez, Abriouel, López, & Omar, 2007).

1.1 Bacterias ácido lácticas

Son un grupo de microorganismos que tienen en común ciertas características metabólicas como la producción de ácido láctico, casi siempre como producto final de la fermentación de los carbohidratos (Carr et al., 2002). Las BAL son organismos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, ácido tolerantes y anaerobios facultativos. A excepción de unas pocas especies, las BAL son microorganismos no patógenos. Las especies más

comunes corresponden a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, and *Leuconostoc*. Según sus características bioquímicas, estas bacterias se clasifican en homofermentativas, cuyo único producto final de fermentación es el ácido láctico y en heterofermentativas, aquellas que producen además del ácido láctico, etanol, acetato y dióxido de carbono (Monroy et al., 2009).

Las BAL se encuentran en una gran variedad de nutrientes, incluyendo la leche y los productos lácteos, vegetales, cereales, carne y productos de carne, etc. Muchas especies se utilizan para la fabricación y conservación de alimentos. Las actividades enzimáticas de las BAL contribuyen al desarrollo de las propiedades organolépticas, reológicas y nutricionales finales de los productos fermentados (Leroy and de Vuyst, 2004).

1.2 Bacteriocinas de BAL

Las bacteriocinas son compuestos que se corresponden a un grupo heterogéneo de sustancias de síntesis ribosomal y origen peptídico, biológicamente activas y que tienen propiedades antimicrobianas o inhibidoras contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora. (Ouwehand & Vesterlund, 2004). En la tabla 1 se puede observar una clasificación de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas.

Las bacteriocinas se caracterizan también por ser sustancias con una marcada estabilidad frente a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su procesamiento; además debido a su naturaleza peptídica, su degradación se lleva a cabo por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal y no son activas frente a células eucarióticas, asegurándose su inocuidad al ser consumidas. En la actualidad, hay muchos aspectos sobre estos compuestos que no se han caracterizado por completo, lo que abre el campo para múltiples investigaciones biotecnológicas (Agaliya & Jeevaratnam, 2013; Karpiński & Szkaradkiewicz, 2013).

El interés por las mismas deriva del hecho de que son producidas por organismos que se encuentran en los alimentos y por esta razón podrían ser consideradas como "naturales" y por lo tanto más admisibles que los conservadores químicos. La nisina, por ejemplo, es un lantibiótico (Cotter et al., 2005a), que tiene la peculiaridad de presentar en la molécula aminoácidos inusuales, mayoritariamente lantionina (Lan) y β -metil-lantionina (MeLan) y ha sido aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en los alimentos como un ingrediente seguro e inocuo (Perin & Nero, 2014). De esta manera en los últimos años se le ha considerado como sustancia GRAS (Generally Recognized As Safe) y tiene un gran número de aplicaciones sin producir efectos secundarios; por tal motivo, existe la necesidad de caracterizar otras BAL y sus metabolitos con mayor potencial bioconservante (Abbasilasi et al., 2012; Chopra, Singh, Kumar Jena, & Sahoo, 2015).

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas de BAL

Clase	Características	Subclase	Microorganismo productor	Bacteriocina
Clase I: Lantibióticos	Péptidos pequeños (< 5 KDa) Termoestables Activos a nivel de la membrana Péptidos que contienen β -Lantionina Modificados postraduccionalmente	I A: Péptidos lineales y catiónicos	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Nisina A Nisina Z Epidermina Lactocina S Lacticina 481
		I B: Péptidos globulares e hidrófobos	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces cinamomeus</i>	Mersacidina Cinamicina
Clase II: No lantibióticos	Péptidos pequeños (< 10 KDa) No lineales No modificados postraduccionalmente Termoestables Actúan a nivel de la membrana	II a: Potente actividad inhibitoria frente a la <i>Listeria</i>	<i>Leuconostoc gelidum</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus bavaricus</i> <i>Carnobacterium piscicola</i>	Leucocina A Pediocina PA-1 Mesenterocina Y105 Acidocina A Enterocina A Sakacina A Curvacina A Bavaricina A Pisicolicina 126
		II b: Compuesto por dos péptidos	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Lactococcina G Lactococcina M Lactocina 705 Lactacina F Leucocina A Plantaricina A Plantaricina S Plantaricina EF Plantaricina JK
		II c: Requieren un péptido líder	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Carnobacterium piscicola</i> <i>Carnobacterium divergens</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Acidocina B Carnobacteriocina A Divergina A Enterocina P
Clase III	Péptidos grandes (>30 kDa) Termolábiles		<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticina J Enterolisina A Helveticina V-1829
Clase IV	Bacteriocinas complejas, una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glusídicas		<i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Leuconostoc</i> <i>paramesenteroides</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	Circularina A Leuconocinas S Lactocina
Clase V	De estructura circular No modificadas postraduccionalmente		<i>Streptococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> LA39	Enterocina AS-48 Gasericina A

Fuente: (Marcos et al., 2013; Díez Aldama, 2011).

Las bacteriocinas de algunas BAL juegan un papel vital en las estrategias de prevención contra los patógenos transmitidos por los alimentos y se han identificado ciertos tipos con actividad bactericida contra algunos microorganismos Gram positivos y Gram negativos de interés, como por ejemplo, cepas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* enterohemorrágica (Devi, Ramaswamy, & Halami, 2014; Yang, Lin, Sung, & Fang, 2014). Se ha encontrado que algunas cepas de BAL tienen la capacidad de producir múltiples bacteriocinas, condición que podría incrementar el rango de inhibición contra algunos microorganismos (Furtado, Todorov, Landgraf, Destro, & Franco, 2014; Zendo, 2013).

Aparte de sus usos en la preservación de los alimentos, las bacteriocinas también han sido descritas como una alternativa en la aplicación de la terapia antibiótica con el fin limitar el posible desarrollo de la resistencia a estos fármacos (Allen, Trachsel, Looft, & Casey, 2014). Sin embargo, su uso en la aplicación terapéutica aún no ha sido totalmente definido y no se encuentran comercialmente viables (Field, Cotter, Hill, & Ross, 2015).

1.3 Modo de acción de las bacteriocinas

Las bacteriocinas de BAL poseen características esenciales para llevar a cabo su actividad antimicrobiana, independientemente del blanco celular. Estas incluyen una carga neta positiva, que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas; la hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, y la flexibilidad que le permite a la bacteriocina realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno de interacción con la membrana. Estas características varían de molécula a molécula, no obstante, todas son importantes para la actividad antimicrobiana (Jenssen, Hamill & Hancock, 2006).

La formación de poros en la membrana citoplásmica de células sensibles es un mecanismo de acción común, presentado por las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (González et al., 2003). En este proceso las bacteriocinas actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática del microorganismo sensible a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños, pérdida de iones K, ATP o la alteración de la fuerza motriz de protones (fuente de energía celular) necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (González et al., 2003). La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida potencial de membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas originando finalmente la inhibición o muerte celular (Vázquez et al., 2009).

Se han descrito bacteriocinas que poseen un mecanismo de acción dual; por ejemplo, la nisina (Figura 1).

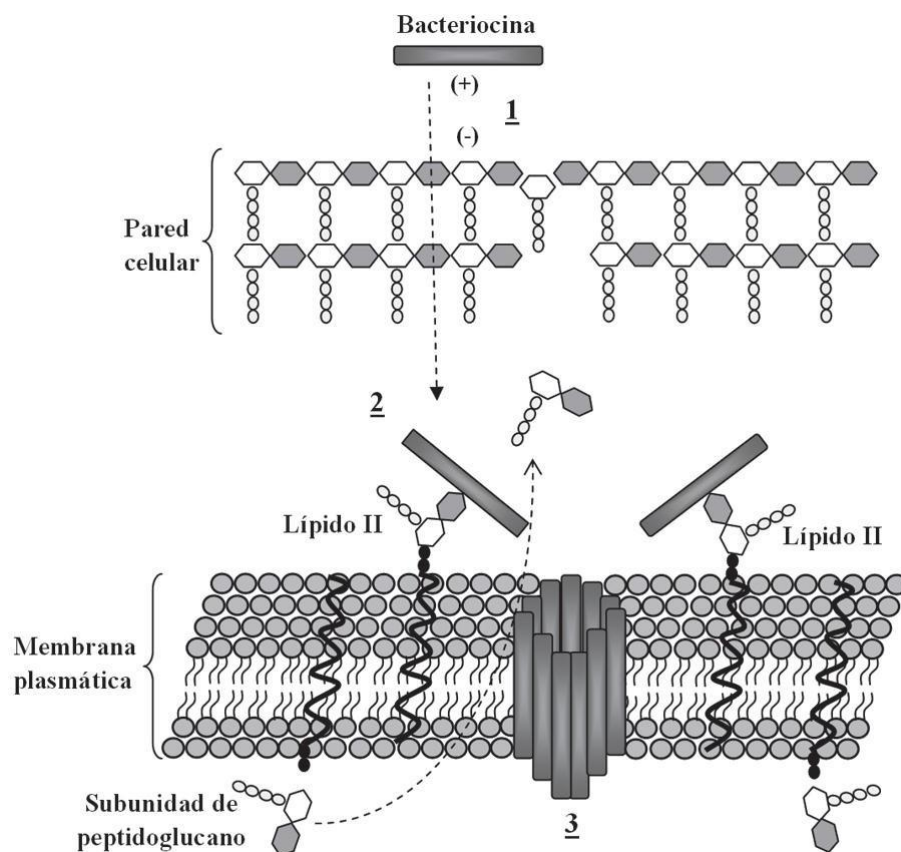


Figura 1. Modelo del mecanismo de acción dual de la nisina

Fuente: (Breukink *et al.*, 1999)

El modelo más aceptado que muestra el mecanismo de acción dual de la nisina propone que inicialmente la bacteriocina se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular (Figura 1, etapa 1). Posteriormente, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano y utiliza esta molécula para anclarse a la membrana celular (Figura 1, etapa 2). Luego, la bacteriocina cambia su orientación con relación a la membrana y se inserta en esta última, lo que involucra la traslocación de su extremo carboxilo terminal a través de la membrana. Finalmente, la unión de diversos péptidos en el sitio de inserción provoca la formación de un poro transmembranal que permite la salida de moléculas importantes como aminoácidos y ATP, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular (Figura 1, etapa 3) (Breukink *et al.*, 1999).

1.4 Objetivos e hipótesis del trabajo de investigación

A pesar de los numerosos estudios que se han realizado sobre las aplicaciones de las BAL y sus metabolitos en la industria de los alimentos (Perez, Zendo, & Sonomoto, 2014), en Ecuador no se han encontrado estudios con datos relativos a la actividad antagónica frente a microorganismos patógenos de extractos crudos de BAL autóctonas, por lo que se considera de gran utilidad realizar estudios de aislamiento, caracterización y evaluación de cepas de BAL y sus metabolitos en productos propios del país.

En este trabajo se ha realizado una caracterización del comportamiento bioquímico del extracto crudo, obtenido de una cepa nativa de BAL aislada del suero de quesos que se producen en la zona de Bulán-Paute, ubicada en la región del Austro del Ecuador, con la finalidad de encontrar una cepa con potenciales aplicaciones y características propias de la zona.

1.4.1 Objetivo general

Caracterizar el comportamiento bioquímico del extracto crudo de bacteriocina obtenido de una cepa nativa de BAL aislada del suero de queso frente a distintos parámetros.

1.4.2 Objetivos específicos

- Obtener el extracto crudo de bacteriocina de la cepa de BAL aislada del suero de queso.
- Determinar la actividad antagónica del extracto crudo de bacteriocina frente a diferentes tratamientos térmicos.
- Determinar la actividad antagónica del extracto crudo de bacteriocina frente a diferentes condiciones de pH.
- Determinar la actividad antagónica del extracto crudo de bacteriocina en función de su sensibilidad frente a diferentes enzimas.

1.4.3 Hipótesis de investigación experimental

“El extracto crudo de la cepa nativa de BAL aislada del suero de queso exhibe actividad inhibitoria frente a bacterias patógenas”.

“El tratamiento del extracto crudo con enzimas, temperatura y pH influye en la respuesta de la actividad inhibitoria frente a bacterias patógenas”.

CONCLUSIÓN

El extracto crudo neutralizado obtenido de la cepa nativa de BAL aislada de suero de quesos, *Lactococcus lactis*, exhibió actividad inhibitoria *in vitro* frente a dos microorganismos patógenos empleados como cepas indicadoras, los cuales fueron *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Para el caso de *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli*, no se evidenció actividad inhibitoria alguna.

Se determinó que la actividad inhibitoria del extracto crudo neutralizado permanece aunque con ligera disminución en la variable de respuesta (diámetro del halo de inhibición en milímetros), luego de ser sometido a distintos tratamientos de caracterización bioquímica, con lo cual se estableció que el compuesto responsable del efecto inhibitorio presenta estabilidad térmica, estabilidad en pH ácido y que no fue sensible a la acción hidrolítica de las enzimas empleadas, sin descartar que se trate de un compuesto de naturaleza proteica.

Finalmente se puede mencionar que el efecto inhibitorio observado en el extracto crudo obtenido de la cepa nativa de *Lactococcus lactis*, no se debe a la acción de ácidos orgánicos y que en función del comportamiento bioquímico descrito, se sugiere que la sustancia responsable de la inhibición se trate posiblemente de una bacteriocina de BAL autóctona con un potencial uso para el control de microorganismos patógenos que son vehiculizados por alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. A. T., Ramanan, R. N., Vakhshiteh, F., Mustafa, S., ... Ariff, A. B. (2012). Isolation of *Pediococcus acidilactici* Kp10 with ability to secrete bacteriocin-like inhibitory substance from milk products for applications in food industry. *BMC Microbiology*, 12(1), 1.
- Agaliya, P. J., & Jeevaratnam, K. (2013). Molecular characterization of lactobacilli isolated from fermented idli batter. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1199–1206.
- Allen, H. K., Trachsel, J., Looft, T., & Casey, T. A. (2014). Finding alternatives to antibiotics: Finding alternatives to antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1323(1), 91–100. <http://doi.org/10.1111/nyas.12468>
- Banerjee, S. P., Dora, K. C., & Chowdhury, S. (2013). Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish: Bacteriocin from *Lb. brevis* FPTLB3. *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 17–25. <http://doi.org/10.1007/s13197-011-0240-4>
- Breukink E., Wiedemann I., Van Kraaij C., Kuipers O. P., Sahl H. G., Kruijff B. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 286(5448): 2361–2364.
- Carr, F.J., Chill, D., and Maida, N. (2002) The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol* 28, 281 – 370.
- Chen, H., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 82–100.
- Chopra, L., Singh, G., Kumar Jena, K., & Sahoo, D. K. (2015). Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Scientific Reports*, 5, 13412. <http://doi.org/10.1038/srep13412>
- Cristóbal, R. L. C. (2008). Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias.
- De Souza Barbosa, M., Todorov, S. D., Ivanova, I., Chobert, J.-M., Haertlé, T., & de Melo Franco, B. D. G. (2015). Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiology*, 46, 254–262. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.004>
- Devi, S. M., Ramaswamy, A. M., & Halami, P. M. (2014). In situ production of pediocin PA-1 like bacteriocin by different genera of lactic acid bacteria in soymilk fermentation and evaluation of sensory properties of the fermented soy curd. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3325–3332. <http://doi.org/10.1007/s13197-012-0870-1>
- Díez Aldama, L. (2011). Tesis doctoral. Efectos de agentes enológicos y pediocina PA-1 sobre las bacterias lácticas del vino. Logroño, España: Universidad de la Rioja.
- Estrada Maldonado, A. C., Gutiérrez Ramírez, L. A., & Montoya Campuzano, O. I. (2005). In vitro EVALUATION OF THE BACTERICIDAL EFFECT OF NATIVE STOCKS OF

- Lactobacillus sp. AGAINST Salmonella sp. AND E. coli. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 58(1), 2601–2609.
- Field, D., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2015). Bioengineering Lantibiotics for Therapeutic Success. *Frontiers in Microbiology*, 6. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01363>
- Furtado, D. N., Todorov, S. D., Landgraf, M., Destro, M. T., & Franco, B. D. (2014). Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp: *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: Evaluation of the probiotic potential. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 1047–1054.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 51–70. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>
- González Martínez, B. E., Gómez Treviño, M., & Jiménez Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN Revista de salud pública y nutrición*, 4(2).
- Jenssen H., Hamill P., Hancock E.W.R. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3):491-511.
- Karpiński, T. M., & Szkaradkiewicz, A. K. (2013). Characteristic of bacteriocines and their application. *Pol J Microbiol*, 62(3), 223–235.
- Leite, A. M. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F., Mayo, B., & Delgado, S. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3622– 3632. <http://doi.org/10.3168/jds.2014-9265>
- Leroy, F., and de Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 15, 67 – 78.
- López, J. E., Ochoa Z., A., Anaya L., J. L., Martínez T., M., & Medina M., E. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas*, 39(3), 49-57.
- Marcos Balciunas, E., Castillo Martínez, F. A., Dimitrov, S. T., Gombossy de Melo Franco, B. D., & De Souza Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32, 134 - 142.
- Martínez Fernández, B. (1996). Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: nisina Z y lactococina 972. Retrieved from <http://digital.csic.es/handle/10261/8416>
- Monroy Dosta, M. d., Castro Barrera, T., Fernández Perrino, F. J., & Mayorga Reyes, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73, 63 - 72.

- Ouwehand, A. C., & Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 139, 375–396.
- Perin, L. M., & Nero, L. A. (2014). Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiology*, 14(1), 1.
- Rodríguez Peña, J. A., & Torres Lozano, L. M. (2012). *Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño*. Retrieved from <http://intellectum.unisabana.edu.co/handle/10818/4749?locale-attribute=en>
- Sinche, F., Fernández, A., Salazar, L., Recalde, R., Gallegos, S., Lino, A., ... Muñoz, M. (2005). Estudio morfológico y funcional de las células circulantes de la concha prieta *Anadara similis*. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 18(1). Retrieved from <http://rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/223>
- Vásquez, S. M., Suárez, H., & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64–71.
- Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C. T., & Fang, J.-Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>
- Zendo, T. (2013). Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(5), 893–899