



**UNIVERSIDAD DEL AZUAY**  
**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**Identificación bioquímica y evaluación de la capacidad  
bacteriocinogénica de las bacterias ácido lácticas aisladas de  
quesillos artesanales**

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

**Autor:**  
**MARÍA ISABEL MÉNDEZ ROJAS**

**Director:**  
**CLAUDIO ESTEBAN SÁNCHEZ JÁUREGUI**

**CUENCA - ECUADOR**

**2016**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación dedico a los seres más importantes en mi vida, mi familia que son lo mejor que Dios me ha brindado, cada experiencia que he vivido junto a ellos me enseñado que el esfuerzo y la constancia diaria tiene su recompensa, y que la amistad pura y verdadera si existe; a mis amigos que siempre estaban regalándome palabras de aliento, y apoyo en el transcurso del camino, a mi director de tesis Ing. Claudio Sánchez y a mi querida Ing. Ma. Fernanda Rosales que siempre me han estado apoyando y guiando en este proceso, cada uno de estos seres maravillosos de distinta manera llenaron de sueños y alegría mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por todos los días de vida, alegrías y experiencias que me brinda; y por cada una de las personas que ha puesto en mi camino.

Agradezco a mis padres Octavio e Inés, gracias al amor y la bondad de ellos hicieron de mí la persona que soy, ellos son un ejemplo de perseverancia y humildad.

Agradezco a mis hermanos Olga, Carmen, Sergio, Marco, René por cada palabra de aliento que me regalaron en el transcurso del camino, están conmigo en las buenas y en las malas, siempre los tendré en mi corazón.

Agradezco a mi amigo Diego que siempre estaba apoyándome en cada paso y compartiendo un poco de su ciencia, a mi amiga Tania por el apoyo brindado y por estar siempre haciéndonos compañía en cada viaje de aventura, a mi amigo Omar por estar siempre apoyándome e incentivándome a ser cada día mejor.

Agradezco al Ing. Claudio Sánchez gracias por sus palabras de aliento, a la Ing. Ma. Fernanda Rosales por la confianza que ha depositado en mí; a cada uno de ellos gracias por todo el cariño y por compartir sus conocimientos hacia mí persona.

Agradezco a la Universidad del Azuay que fue la institución que en la que eduque, y fue el medio para alcanzar mi sueño, a cada uno de los profesores que dedicaron su tiempo y me ayudaron en mi formación profesional.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|                                                                                                                                                                    |              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| DEDICATORIA .....                                                                                                                                                  | ii           |
| AGRADECIMIENTOS .....                                                                                                                                              | iii          |
| ÍNDICE DE CONTENIDO .....                                                                                                                                          | iv           |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                                                                                                             | vii          |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                                                                                                                             | viii         |
| ÍNDICE DE ANEXOS.....                                                                                                                                              | ix           |
| RESUMEN.....                                                                                                                                                       | x            |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                      | xi           |
| <br><b>CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....</b>                                                                                                                          | <br><b>4</b> |
| 1.1 Bacterias ácido lácticas.....                                                                                                                                  | 4            |
| 1.2 Clasificación de las Bacterias ácido lácticas .....                                                                                                            | 5            |
| 1.2.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas según el género.....                                                                                           | 5            |
| 1.2.2 Clasificación de las bacterias ácido lácticas según el tipo de fermentación: ..                                                                              | 6            |
| 1.2.3 Las bacterias ácido lácticas según la temperatura, se clasifican en:.....                                                                                    | 6            |
| 1.3 Características de las Bacterias ácido lácticas.....                                                                                                           | 7            |
| 1.3.1 Características morfológicas, de agrupación, tipo de fermentación    cantidad<br>de pares de Guanina y citosina en una molécula de ADN (%), de las BAL. .... | 7            |
| 1.4 Condiciones óptimas para el desarrollo de las Bacterias Ácido Lácticas .....                                                                                   | 9            |
| 1.4.1 Temperatura.....                                                                                                                                             | 9            |
| 1.4.2 pH .....                                                                                                                                                     | 9            |
| 1.4.3 Oxígeno en el medio.....                                                                                                                                     | 9            |
| 1.5 Componentes necesarios para medios de crecimiento: .....                                                                                                       | 10           |
| 1.6    Bacterias ácido lácticas presentes en los quesos en estudio .....                                                                                           | 10           |
| 1.6.1 Género Lactobacillaceae .....                                                                                                                                | 10           |

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.6.1.1 El grupo II: <i>Streptobacterium</i> .....                                                      | 11 |
| 1.6.1.2 El grupo III: <i>Betabacterium</i> .....                                                        | 11 |
| 1.7 Acción de los antimicrobianos sobre los microorganismos .....                                       | 11 |
| 1.7.1 Tipo de acción de los antimicrobianos .....                                                       | 12 |
| 1.8 Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias ácido lácticas ..                     | 13 |
| 1.8.1 Agar M17: .....                                                                                   | 13 |
| 1.8.2 Agar MRS: .....                                                                                   | 13 |
| 1.9 Bacteriocinas .....                                                                                 | 13 |
| 1.10 Clasificación de las bacteriocinas.....                                                            | 14 |
| 1.11 Producción de bacteriocinas .....                                                                  | 17 |
| 1.12 Mecanismos de acción de las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas.....                         | 18 |
| 1.12.1 Etapas del Modelo de mecanismo dual de una bacteriocina .....                                    | 19 |
| 1.12.2 Mecanismo de la síntesis de bacteriocinas .....                                                  | 20 |
| 1.13 Aplicación de las bacteriocinas en alimentos .....                                                 | 20 |
| 1.14 Enfermedades de origen alimentario causados por la ingestión de<br>microorganismos patógenos ..... | 21 |
| 1.14.1 Patógenos presentes en los quesos artesanales (quesillos) .....                                  | 21 |

## **CAPITULO II: METODOLOGÍA..... 24**

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 Muestreo: .....                                                                                  | 24 |
| 2.2 Aislamiento de Bacterias ácido lácticas: .....                                                   | 24 |
| 2.3 Identificación de las bacterias ácido lácticas presentes en quesos frescos<br>artesanales: ..... | 28 |
| 2.7 Determinación de actividad bacteriocinogénica.....                                               | 33 |

En este apartado se revisara la inoculación de las BAL en el caldo MRS, para la posterior concentración de extracto crudo (bacteriocina) y medir su capacidad bacteriocinogénica. .... 33

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.8 Determinación de la presencia de productos proteicos en el extracto de Bacterias ácido lácticas..... | 36        |
| 2.8.1 Método de Bradford .....                                                                           | 36        |
| <b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>                                                        | <b>39</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>                                                                                 | <b>46</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                                                                 | <b>47</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1: Modelo de mecanismo dual de una bacteriocina.....                               | 20 |
| Figura 2.1: Muestra de quesillo artesanal .....                                             | 24 |
| Figura 2.2: Eliminación de carga microbiana patógena.....                                   | 26 |
| Figura 2.3: Dilución primaria de las muestras .....                                         | 26 |
| Figura 2.4: Siembra por estriado .....                                                      | 27 |
| Figura 2.5: Plaqueado en cajas petri .....                                                  | 27 |
| Figura 2.6: Cubetas de Kit de tinción de Gram.....                                          | 28 |
| Figura 2.7: Identificación microscópica de BAL.....                                         | 29 |
| Figura 2.8: Colonias de bacterias en agar MRS .....                                         | 30 |
| Figura 2.9: Cámara de incubación API 50 CHL .....                                           | 31 |
| Figura 2.10: API 50 CHL médium.....                                                         | 31 |
| Figura 2.11: Incubación de la Galería API 50 CHL .....                                      | 32 |
| Figura 2.12: Resultado del ensayo de la Galería.....                                        | 33 |
| Figura 2.13: 1. Separación de extracto proteico 2. Neutralización de sobrenadantes<br>..... | 34 |
| Figura 2.14: Concentración de los sobrenadantes neutralizados .....                         | 34 |
| Figura 2.15: Patrón de turbidez #2 MacFarland.....                                          | 35 |
| Figura 2.16: Pruebas de inhibición en discos.....                                           | 36 |
| Figura 2.17: Preparación de la solución de Bradford.....                                    | 37 |
| Figura 2.18: Ecuación lineal del reactivo de Bradford .....                                 | 38 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 2.1: Cronograma de muestreo .....                                                                           | 24 |
| Tabla 2.2: Preparación de las celdas reactivo de Bradford .....                                                   | 37 |
| Tabla 2.3: Resultados de la Lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica .                                | 38 |
| Tabla 2.4: Lectura de concentración de proteína (absorbancia nm) en extracto de<br>Bacterias ácido lácticas. .... | 38 |
| Tabla 3.1: Resultados de bacterias lácticas identificadas.....                                                    | 39 |
| Tabla 3.2: Dimensiones de halos de inhibición .....                                                               | 40 |
| Tabla 3.3: Contenido de proteico de los extractos de Bacteriocinas .....                                          | 41 |



## ÍNDICE DE ANEXOS

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Anexo 1: Purificación: Pruebas de ensayo para eliminación de Gram-negativos .....                 | 51 |
| Anexo 2: Identificación morfológica macroscópica: Muestra contaminada.....                        | 52 |
| Anexo 3: Cámara de reflujo, esterilización con luz UV .....                                       | 52 |
| Anexo 4: Identificación microscópica: <i>Lactobacillus brevis</i> .....                           | 53 |
| Anexo 5: Identificación microscópica: <i>Lactobacillus plantarum</i> .....                        | 53 |
| Anexo 6: <i>Lactococcus lactis</i> .....                                                          | 54 |
| Anexo 7: Identificación Bioquímica de la galería API 50 CHL, <i>Lactobacillus brevis</i> 1 .....  | 54 |
| Anexo 8: Identificación de la galería API 50 CHL, <i>Lactobacillus plantarum</i> 1 .....          | 55 |
| Anexo 9: Identificación de la galería API 50 CHL, <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> 1.. | 55 |
| Anexo 10: TABLA DE IDENTIFICACIÓN DE REACCIONES BIOQUÍMICAS<br>DE LAS GALERÍAS API 50 CHL.....    | 56 |
| Anexo 11: Acción de Bacteriocinas Versus Microorganismos patógenos .....                          | 58 |
| Anexo 12: Diámetro de halos de inhibición.....                                                    | 58 |
| Anexo 13: Reacción colorimétrica de proteína presente en <i>Lactobacillus plantarum</i>           | 59 |

**IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD  
BACTERIOCINOGENICA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS  
AISLADAS DE QUESILLOS ARTESANALES**

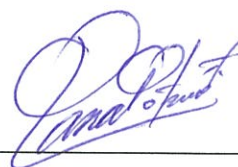
**RESUMEN**

El objetivo del presente trabajo, fue la identificación por pruebas bioquímicas (API 50 CHL) de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de quesos artesanales de la parroquia Bulán-Paute. Una vez identificadas se realizaron extractos crudos de bacteriocinas producidas por las cepas de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis*. Estos ensayos fueron realizados mediante pruebas de inhibición para determinar su capacidad bacteriocinogénica contra bacterias patógenas, dos Gram + (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) y dos Gram- (*Salmonella Entérica*, *Escherichia coli*). Se comprobó que el extracto de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*, formaron halos de inhibición frente a las dos Gram+, dos Gram- y dos Gram+ respectivamente, y el extracto de *Lactococcus lactis* la inhibición resultó positiva frente a *Salmonella Entérica*.

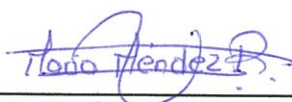
**Palabras clave:** API, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, extracto, Tinción de Gram



Claudio Esteban Sánchez Jáuregui  
**Director del Trabajo de Titulación**



Fausto Tobías Parra Parra  
**Director de Escuela**



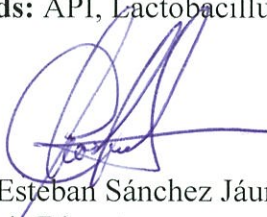
María Isabel Méndez Rojas  
**Autora**

# BIOCHEMICAL IDENTIFICATION AND EVALUATION OF THE BACTERIOCIINOGENIC CAPACITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM ARTISAN FRESH CHEESE

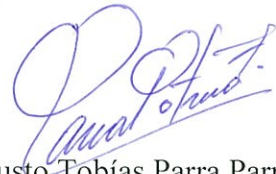
## ABSTRACT

The objective of this study was the identification, through biochemical tests (API 50 CHL), of lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from artisan fresh cheeses produced in the Bulan-Paute parish. Once they were identified, crude extracts of bacteriocins produced by strains of *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* were taken. These tests were conducted by inhibition tests to determine their bacteriocinogenic capacity against pathogenic bacteria; two Gram+ (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) and Gram- two (*Salmonella Enterica*, *Escherichia coli*). It was verified that the extract of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum* formed halos of inhibition against both Gram +, Gram two and two Gram + respectively; and the inhibition in *Lactococcus lactis* extract was positive against *Salmonella Enterica*.

**Keywords:** API, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, Extract, Gram Stain



Claudio Esteban Sánchez Jáuregui  
**Thesis Director**



Fausto Tobías Parra Parra  
**School Director**



María Isabel Méndez Rojas  
**Author**



UNIVERSIDAD DEL  
AZUAY  
Dpto. Idiomas



Translated by,  
Lic. Lourdes Crespo

Méndez Rojas María Isabel

Trabajo de Titulación

Ing. Sánchez Jáuregui Claudio Esteban

Junio 2016.

## **IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BACTERIOCINOGENICA DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AISLADAS DE QUESOS ARTESANALES**

### **INTRODUCCIÓN**

En la actualidad las Bacterias ácido lácticas (BAL) tienen una gran importancia en la innovación tecnológica alimentaria, debido a que producen metabolitos que nos ayudan en la conservación de alimentos, siendo de gran interés las llamadas “bacteriocinas” estos péptidos de origen proteico, contribuyen a la inhibición de microorganismos patógenos involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos.

La elaboración de queso fresco artesanal (Quesillo) en el cantón Paute (parroquia Bulán es la zona donde se realizó el estudio) no tiene un proceso adecuado, debido a que la materia prima no es sometida a un proceso de pasteurización, de manera que la microbiota natural no ha sido destruida; en este tipo de alimentos existe la presencia de microorganismos patógenos, como *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *Listeria*; (INEN, 2012) y de utilidad en la industria alimentaria como es la presencia de BAL silvestres, debido a que no solo contribuyen a darle un sabor característico y propio del producto, sino que generan bacteriocinas (péptidos) que inhiben el crecimiento microbiológico patógenos.

Al aislar y determinar el género de las bacterias Gram-positivas de los quesos artesanales, se pudo confirmar la presencia de BAL silvestres que tienen la capacidad de producir compuestos presumiblemente “bacteriocinas”, que van a ser las que inhiban el crecimiento microbiológico patógeno. En el laboratorio de biotecnología de la Universidad del Azuay cuenta con equipos y técnicas que están al alcance del desarrollo del alumnado, para la aplicación de aislamiento de BAL en medios de crecimiento selectivos, pruebas rápidas miniaturizadas API 50 CHL y pruebas de halos inhibición, que permitieron determinar la presencia y acción de estas BAL que son características de este alimento. Este estudio forma parte del proyecto financiado por la Universidad del Azuay de esta manera contribuye a la investigación e instrucción de cada uno de sus alumnos, desarrollando destrezas en el laboratorio y fomentando la investigación.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar bioquímicamente y evaluar la capacidad antagónica bacteriocinogénica de las BAL aisladas de quesos frescos de Bulán-Paute contra bacterias patógenas seleccionadas.

### **OBJETIVO ESPECÍFICOS**

1. Realizar el muestreo de los quesos de la zona de Bulán – Paute.
2. Aislar las BAL de las muestras en medios de cultivo específicos.
3. Identificar a las bacterias aisladas mediante pruebas miniaturizadas API 50 CHL
4. Evaluar la capacidad antagónica de las bacteriocinas frente a bacterias patógenas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Entérica*.
5. Determinar la presencia de péptidos

## **CAPITULO I**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **Introducción**

En el presente capítulo se recopila la información referente a las clasificaciones y a las principales características de las Bacterias Ácido Lácticas, también hace relación a los metabolitos (Bacteriocinas) producidos por las BAL, en el cual se describe las características principales de las mismas; la explicación de cada una de las bacterias patógenas que están presentes en productos lácteos, en este caso como son los quesos frescos según las INEN (Instituto Ecuatoriano de normalización) y los fundamentos de cada de las técnicas aplicadas.

#### **1.1 Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias del ácido láctico abarcan un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen en común la propiedad metabólica de la producción final de ácido láctico como la mayoría del producto de la fermentación de hidratos de carbono (Mayo, y otros, 2010). Son microorganismos de gran relevancia en la industria alimentaria, la utilización de cultivos iniciadores lácticos se emplean con la intención de aprovechar su metabolismo, con el objetivo de obtener productos característicos y diferenciables dentro de la industria alimentaria. (Academia del Areá de Plantas Piloto de Alimentos, 2004). Actúan como probióticos, protegiendo de infecciones gastrointestinales, modulando la respuesta inmune, aumentando el valor nutritivo de los alimentos, favoreciendo la tolerancia a lactosa, reduciendo la acumulación de compuestos tóxicos o cancerígenos en el alimento, reduciendo los niveles de colesterol en sangre o controlando algunos tipos de cáncer. (Arqués Orobón, 2005)

Shirai y col., (1996) explican que las bacterias ácido lácticas producen componentes antimicrobianos que ayudan a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos, por varios productos finales de la fermentación. Estas sustancias son ácidos como láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de la lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato. La aplicación e importancia en la industria alimentaria de las bacterias ácido lácticas está relacionada con la síntesis de ácido láctico y la tolerancia de las bacterias lácticas a este ácido orgánico y a un pH inferior a 7, se utilizan en la conservación de alimentos: productos lácteos, productos cárnicos, productos vegetales fermentados. Efectivamente, estas condiciones que son soportables por las BAL, no lo son para otros muchos microorganismos alterantes; por lo contrario algunas bacterias ácido lácticas pueden causar algunos problemas en otras industrias produciendo sabores amargos, debido a que las bacterias Lácticas son débilmente proteolíticas y lipolíticas, esto significa que son suaves en cuanto a su tendencia a producir sabores amargos. (Bamforth, 2005)

Por definición tenemos que los organismos probióticos; son organismos vivos, cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable en el huésped. Las bacterias probióticas producen efectos fisiológicos que incluye la reducción del pH en el intestino, producción de algunas enzimas digestivas y vitaminas, producción de sustancias antibacteriales. La concentración sugerida de las bacterias ácido láctica está de  $10^6$ - $10^7$  ufc/g de producto. (Parra Huertas, 2010)

## **1.2 Clasificación de las Bacterias ácido lácticas**

### **1.2.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas según el género**

La clasificación de las bacterias ácido lácticas en géneros diferentes se basa en el principio de la morfología, modo de fermentación de la glucosa ( homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a temperaturas variables, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida alcalina. (Carrera Vega, 2015)



Dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas existen 16 géneros, pero solo 12 son activos en el campo de la alimentación (Bamforth, 2005): *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Cornibacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. (Parra Huertas, 2010)

### 1.2.2 Clasificación de las bacterias ácido lácticas según el tipo de fermentación:

Las bacterias ácido lácticas sintetizan su Adenosin Trifosfato (ATP) en la fermentación láctica de los glúcidos, en algunos de los casos el ácido, es el único producto final (homofermentación) y en otras ocasiones se producen además de etanol, acetato y CO<sub>2</sub> (heterofermentación) (Bamforth, 2005), este proceso se da acuerdo al tipo de metabolismo de cada bacteria láctica. (C.M & J.P, 1995)

- Homofermentativo, donde el ácido láctico representa el 95% del total de productos finales. (Bamforth, 2005)
- Heterofermentativo, donde además del ácido láctico se produce ácido acético, etanol y dióxido de carbono. (Bamforth, 2005)

### 1.2.3 Las bacterias ácido lácticas según la temperatura, se clasifican en:

- Mesófilas: la temperatura ideal de incubación: 20-25 °C, volumen de cultivo líquido 1-2%, tiempo de incubación: 18-20 horas, acidez final 0.8% de ácido láctico. Especies que se encuentra dentro de este grupo: *Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris*, *Lactococcus lactis*, biovariedad *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides subs cremoris*. Estos son utilizados para la elaboración de Kumis, quesos semi-madurados. (Parra Huertas, 2010)
- Termófilas: la temperatura ideal de incubación 40-45 °C, volumen de cultivo líquido 2-3%, tiempo de incubación 2-4 horas, acidez final 0,9% de ácido láctico. Especies que se encuentran dentro de este grupo: *Lactobacillus delbruekii subsp bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*,

*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*. Se utilizan en yogurt y quesos madurados. (Parra Huertas, 2010)

### **1.3 Características de las Bacterias ácido lácticas**

Estas bacterias se caracterizan por ser generalmente Gram-positivas, poseen una pared celular muy gruesa, fermentan los azúcares en diferentes condiciones, son inmóviles, poca actividad proteolíticas y poco lipolíticas, no reducen nitratos, (Academia del Área de Plantas Piloto de Alimentos, 2003), forma de bacilo, de coco (esférico), o de cocobacilo (Bamforth, 2005), generalmente son catalasa-negativas, microaerofílicas o anaerobias facultativas, no formadoras de esporas y con un contenido de Guanina + Citosina en el ADN inferior a 50– 55 mol %. (Arqués Orobón, 2005)

Requieren de purinas y pirimidinas ya formadas, aminoácidos, vitamina B. No poseen el ciclo de los ácidos tricarboxílicos funcional o un sistema de transporte de electrones ligado a un grupo hemo, por lo que utilizan la fosforilación a nivel de sustrato para obtener energía. (Bamforth, 2005).

Las bacterias ácido lácticas tienden a competir por nutrientes y la formación de ácido láctico y acético, con el consiguiente descenso del pH, son los principales mecanismos de antagonismo microbiano. Además, pueden producir otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno, ácido benzoico, isómeros D de aminoácidos, reuterina y bacteriocinas. (Arqués Orobón, 2005)

#### **1.3.1 Características morfológicas, de agrupación, tipo de fermentación cantidad de pares de Guanina y citosina en una molécula de ADN (%), de las BAL.**

##### **1. *Streptococcus*:**

- La morfología celular: Cocos
- Agrupación: en cadenas
- Tipo de fermentación: homofermentativo

- Tienen bajo contenido de Guanina y Citosina en el ADN (34-36 mol%)

**2. *Leuconostoc*:**

- La morfología celular: Cocos
- Agrupación: en cadenas
- Tipo de fermentación: Homofermentativo
- Posee bajo contenido de Guanina y Citosina en el ADN (38-41 mol%).

**3. *Pediococcus*:**

- Morfología celular: Cocos
- Agrupación: en tétradas
- Tipo de fermentación: Homofermentativo
- Posee bajo contenido de Guanina y Citosina en el ADN (34-42 mol%)

**4. *Lactobacillus*:**

**Morfología celular 1: Bacilos**

- Tipo de agrupación: en cadenas
- Tipo de fermentación: homofermentativo
- Posee bajo contenido de Guanina y Citosina en el ADN (32-53 mol%)

**Morfología celular 2: Bacilos**

- Tipo de agrupación: en cadenas
- Tipo de fermentación: heterofermentativo
- Posee bajo contenido de Guanina y Citosina en el ADN (34-53 mol%)

**5. *Enterococcus*:**

- Morfología celular: Cocos
- Tipo de agrupación: en cadenas
- Tipo de fermentación: homofermentativo
- Posee bajo contenido de Guanina y Citosina en el ADN (38-40 mol%)

**6. *Lactococcus*:**

- Morfología celular: Cocos
- Tipo de agrupación: en cadenas
- Tipo de fermentación: homofermentativo
- Posee bajo contenido de Guanina y Citosina en el ADN (38-41 mol%). (Madigan, Martinko, & Parker, 2005)

**1.4 Condiciones óptimas para el desarrollo de las Bacterias Ácido Lácticas****1.4.1 Temperatura**

La mayor parte son mesófilos (25 °C a 30 °C), pero algunos pueden crecer a temperatura de refrigeración (4 °C) o termófilos que desarrollan a temperaturas de hasta 45 °C. (Bamforth, 2005)

**1.4.2 pH**

Una característica fisiológica definitiva de las bacterias ácido lácticas es su elevada tolerancia a los ácidos, permitiéndoles vivir en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos. (Carrera Vega, 2015)

El pH de crecimiento por lo general va de un intervalo de 4,0-4,5, aunque ciertas cepas por lo general pueden tolerar y crecer en pH superior a 9,0 o tan bajos como 3,2. (Bamforth, 2005)

**1.4.3 Oxígeno en el medio**

El carácter microaerófilico de las BAL varía, ciertas especies necesitan condiciones aerobias para desarrollarse en cierto tipo de sustrato. Los anaerobios solo se desarrollan en anaerobiosis estricta. Sin embargo hay ciertos organismos facultativos que tienen la capacidad de alternar su metabolismo oxidativo aerobio con otro fermentativo, y otros que nunca pueden utilizar el O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones, pero que fermentan indistintamente en presencia y en ausencia de aire. Muchas

bacterias tienen un crecimiento óptimo en una atmósfera que contenga del 5 al 10% de CO<sub>2</sub> y también hay la posibilidad de que algunas bacterias no se desarrollan sin este requisito. (Carrera Vega, 2015)

### **1.5 Componentes necesarios para medios de crecimiento:**

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos auxótrofos, es decir, requieren una serie de componentes para su multiplicación como: glucosa y lactosa, además de aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitamina (vitamina B, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico) ya que estos compuestos no pueden ser sintetizados por ellos mismos, siendo de importancia que estos componentes son importantes para que se puedan desarrollar y por lo tanto deben estar presentes en el medio de crecimiento. (Carrera Vega, 2015)

Para el crecimiento de las bacterias lácticas se puede utilizar la leche ya que este es un medio que contiene las características necesarias para un crecimiento satisfactorio y para la proliferación de las mismas. Sin embargo las masas de cereales, los vegetales y la carne son alimentos que al igual que la leche son también excelentes medios de crecimiento y que ayudan a la producción de metabolitos de bacterias lácticas. (Carrera Vega, 2015)

### **1.6 Bacterias ácido lácticas presentes en los quesos en estudio**

#### **1.6.1 Género *Lactobacillaceae***

Los *lactobacillus* son bacterias Gram +, pleomórficas, esporógenas, generalmente inmóviles, citocromo y catalasa -, en su mayoría son aerotolerantes y glucidolíticas. El género *lactobacillaceae* tienen exigencias altamente nutritivas: vitaminas, aminoácidos, etc. Los *lactobacillus*, salvo excepciones, no reducen los citratos. (C.M & J.P, 1995)

#### 1.6.1.1 El grupo II: *Streptobacterium*

Pertenecen al grupo heterofermentativos facultativos. Fermentan las hexosas casi exclusivamente en ácido láctico siguiendo el ciclo de Embdem-Meyerhof y, en condiciones de carencia, producen como otros productos de la fermentación, ácido acético y ácido fórmico. Las pentosas son fermentadas en ácido láctico y acético. Dentro de este grupo se encuentra el *Lactobacillus plantarum*, esta especie presenta características como 37% de GC, libera ácido láctico DL, fermenta compuestos como la Esculina, Amigdalina, Celobiosa, Galactosa, Lactosa, Manitol, Melobiosa, Rafinosa, Ribosa y en ocasiones Arabinosa, Melecitol, y Xilosa, todos estos compuestos son utilizados en la industria agroalimentaria. (C.M & J.P, 1995)

#### 1.6.1.2 El grupo III: *Betabacterium*

Las corresponden al grupo de los lactobacilos heterofermentativos obligatorios. Las hexosas son fermentadas en ácido láctico y acético, etanol y CO<sub>2</sub>. Dentro de las *Betabacterium* encontramos al *Lactobacillus brevis*, presentando una temperatura óptima de crecimiento de 15 °C, tiene 46,4 % GC, produce NH<sub>3</sub> a partir de arginina, tiene la capacidad de fermentación de la Arabinosa, y en ocasiones compuestos como Esculina, Manitol, Melobiosa, Rafinosa, y Xilosa; todos estos utilizados en las industrias agroalimentarias. (C.M & J.P, 1995)

#### 1.6.2 Género *Lactococcus*

Son bacterias Gram positivas y según sus condiciones de crecimiento pueden tener un tamaño entre 0,5-1.5  $\mu$ m, no forman esporas y no tienen movilidad. Tienen un metabolismo fermentativo y producen grandes cantidades de ácido láctico, tienen un crecimiento óptimo a una temperatura de 30 °C. Pero estos pueden crecer a temperaturas de hasta los 10 °C. (Rodríguez Peña & Torres Lozano, 2006)

#### 1.7 Acción de los antimicrobianos sobre los microorganismos

La acción de los antimicrobianos sobre las células de los microorganismos está basada en una gran variedad de efectos individuales, dentro de las que se incluyen mecanismos físicos, fisicoquímicos y reacciones bioquímicas de la célula afectada. Algunas veces

diversos factores individuales pueden producir un efecto tanto acumulativo como de bloqueo. Entre dichos factores se encuentran: (Adarme & Rincones, 2008)

1. Interferencia con la membrana celular, destruyendo su carácter semipermeable, inhibiendo así el intercambio metabólico del microorganismo con el medio.
2. Disminución de las actividades enzimáticas, al afectar la naturaleza de las proteínas o al producirse una inhibición competitiva por combinación del antimicrobiano con el grupo activo de la enzima.
3. Daño en el mecanismo genético. Donde la célula pierde su capacidad de reproducción, algunas veces causa mutaciones que interfieren en su crecimiento.

#### **1.7.1 Tipo de acción de los antimicrobianos**

Los antimicrobianos o conservadores pueden tener al menos tres tipos de acción sobre los microorganismos:

- Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- Daño a la integridad de la membrana.
- Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

Los agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitor más reducido. Del mismo modo algunos antimicrobianos pueden ser directamente microbicidas, mientras que otros actúan como microbiostáticos. (Adarme & Rincones, 2008)

**Metabisulfito de sodio:** el metabisulfito o anhídrido sulfuroso tiene un efecto antimicrobiano que es ejercido contra microorganismos especialmente en los mostos, su espectro de acción incluye mohos, levaduras y bacterias. Es especialmente eficaz en medio ácido. Ayuda a evitar la oxidación de los materiales, de modo que actúa sobre las enzimas llamadas oxidasas; su efecto básicamente radica en la ruptura de los

puentes disulfuro de las proteínas, haciendo que se inactiven las enzimas. (Adarme & Rincones, 2008)

**Sorbato de potasio:** Este conservador se fundamenta en la prioridad de unirse a la superficie de las células microbianas, modificando la permeabilidad de la membrana y al mismo tiempo su metabolismo, pero también se ha sugerido que su estructura de dieno interfiere con el sistema enzimático de las deshidrogenasas de los microorganismos (Acero, 2006) . También se fundamenta que el sorbato inhibe la captación de aminoácidos y el brote de células vegetativas a partir de esporas (Adarme & Rincones, 2008)

## **1.8 Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias ácido lácticas**

**1.8.1 Agar M17:** Este medio de cultivo es apto para la numeración de lactoestreptococos en leche y productos lácteos. Este medio de cultivo actúa mediante la adición  $\beta$ -glicerofosfato sódico de manera que aumenta la capacidad tampón. Este hecho favorece el crecimiento de Streptococos lácticos y el desarrollo de placas mayores de bacteriófagos. (MercK, 1994)

**1.8.2 Agar MRS:** El medio de cultivo MRS, contiene polisorbato, acetato de magnesio y manganeso, sustancias conocidas como factores especiales de crecimiento para lactobacilos así como una base nutritiva abundante y rica. Dado que sólo posee muy escasa selectividad, también puede crecer especies de Pediococos y de Leuconostoc, y otros gémenes acompañantes. (MercK, 1994)

## **1.9 Bacteriocinas**

Las bacteriocinas de bacterias lácticas, en los últimos años han tomado gran importancia dentro de la aplicación en seguridad microbiológica alimentaria, presentando un gran interés para la industria alimentaria por su potencialidad para inhibir a microorganismos patógenos y alterantes de alimentos. (Arqués Orobón, 2005)



Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana, sintetizados ribosómicamente por las bacterias productoras, generalmente, estos péptidos actúan sobre la membrana celular. Existe una gran diversidad de bacteriocinas reportadas en la mayoría de las especies bacterianas, e incluso dentro de una misma especie podrían producirse distintos tipos de bacteriocinas. (Mondragón Preciado, EscalanteMinakata, Osuna Castro, & Ibarra, 2013)

Según Cintas (1995) las bacteriocinas generalmente se caracterizan por ser estables a valores de pH ácidos o próximos a la neutralidad, lo que indica la adaptación de estas sustancias a las condiciones ambientales de los sustratos en los que se desarrollan las bacterias productoras. La termo estabilidad de las bacteriocinas, al igual que sucede con otras proteínas, está íntimamente relacionada con el pH así, pues, se han descrito numerosas bacteriocinas que son más termoresistentes a pH ácidos. (Casas Lara, 2005)

Las bacteriocinas están conformadas por puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres y poseen puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8,6 a 10,4. (Beristan Bauza & López Malo, 2012)

### **1.10 Clasificación de las bacteriocinas**

Las bacteriocinas producto de las bacterias ácido lácticas se clasificaron de acuerdo a su estructura, propiedades físico químicas y propiedades moleculares.

#### **Clase I: *Lanbióticos***

Son péptidos pequeños conformados por 19-38 aminoácidos, poli cíclicos, con un peso molecular menor a 5 kDa (Kilo Dalton), con baja estabilidad térmica y son modificados postraduccionalmente, es decir se produce un cambio químico ocurrido en las proteínas después de su síntesis proteica; por la deshidratación de la serina y la treonina, formando de esta manera ácidos como la dehidroalanina (Dha) y

dehidrobutirina (Dhb), estos residuos, pueden unirse a través de un grupo tioetér a cadenas laterales de cisteína dando lugar a los aminoácidos inusuales como lantionina y  $\alpha$ -metil-lantionina (MeLan). Los lantibióticos son los únicos que se producen en el ribosoma como un prepéptido, que experimenta una modificación postraducciona extensa para formar un péptido activo. (Beristan Bauza & López Malo, 2012)

Los lantibióticos se subdividen en dos grupos, debido a que tienen características estructurales y de modo de acción contra microorganismos, que las diferencia:

- **Clase Ia:** son péptidos elongados en forma de tornillos con moléculas anfipáticas, presentan un peso molecular menor a 4 kDa, flexibles, con carga neta positiva, cuya actividad antimicrobiana se debe a la destrucción de la célula por la despolarización de la membrana citoplasmática. La bacteriocina más representativa de este grupo es la nisina. (Beristan Bauza & López Malo, 2012)
- **Clase Ib:** son péptidos globulares e hidrófobos, con un peso molecular entre 1.8 y 2.1 kDa. Estos presentan características de carga neta negativa o sin carga. Su actividad antimicrobiana está relacionada principalmente con inhibición enzimática. Dentro de este grupo las Bacteriocinas más representativas son: duramicina A, B, C y la cinamisina. (Beristan Bauza & López Malo, 2012).

### **Clase II: No lantibióticos**

Estas bacteriocinas están constituidas por 30 a 60 aminoácidos, con un peso molecular menor a 10 kDa, no contienen aminoácidos modificados, son estables a altas temperaturas y al pH. Este grupo de bacteriocinas es considerado como el mayor subgrupo de bacteriocinas provenientes de las bacterias ácido lácticas, no solo por su gran número, sino también por su actividad antimicrobiana y aplicaciones potenciales. (Beristan Bauza & López Malo, 2012)

**Los *no-lantibióticos* son subdivididos en tres grupos:**

- **Clase *Ila*:** Este grupo se caracteriza por contar con una secuencia amino terminal-Tirosina-Glicina-Asparagina-Glicina-Valina- Xaa-Cisteína donde Xaa (indica cualquier residuo de aminoácido) y contiene uno o dos puentes disulfuro. Tiene una alta actividad antimicrobiana contra la listeria. Solo 3 bacteriocinas de este grupo han sido caracterizadas: Pediocina PA-1, enterocina A y divercina V41. (Beristan Bauza & López Malo, 2012)
- **Clase *Ilb*:** Este grupo está conformado por bacteriocinas con dos péptidos y la actividad antimicrobiana requiere de la presencia de ambos péptidos en proporciones similares, son formadores de poros en la membrana celular. La bacteriocina más representativa de este grupo es la sakacina. (Beristan Bauza & López Malo, 2012)
- **Clase *Ilc*:** Este grupo es el resultado de la unión covalente de sus extremos carboxilo y amino terminal, poseen una estructura cíclica, son termoestables y no modificados después de la traducción. Estos carecen de secuencia amino terminal Tirosina-Glicina-Asparagina-Glicina-Valina-Xaa-Cisteína- que contienen la clase *Ila* y *Ilb*. La enterocina AS-48 producida por enterococcus *Feacelis* es la bacteriocina más representativa de este grupo. (Beristan Bauza & López Malo, 2012)

**Clase *III*:**

Este grupo es denominado “bacteriolisinas”, se caracterizan por tener un elevado tamaño molecular mayor a 30 kDa y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina, acidofi- licina A y lactacinas A y B. (Monroy Dosta, Castro Barrera, Fernández Perrino, & Mayorga Reyes, 2009)

**Clase IV:**

Son Bacteriocinas complejas, estos péptidos constan de una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52). (Monroy Dosta, Castro Barrera, Fernández Perrino, & Mayorga Reyes, 2009)

**Clase V:**

Son Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasericina A. (Monroy Dosta, Castro Barrera, Fernández Perrino, & Mayorga Reyes, 2009)

**1.11 Producción de bacteriocinas**

La producción de bacteriocinas depende del crecimiento y la actividad fisiológica de la cepa productora. En este sentido, aunque la producción de estos péptidos está generalmente asociada a la producción de biomasa. Las principales variables que afectan la producción de bacteriocinas son la temperatura, el pH, la composición del medio de cultivo y la presencia de inductores. La temperatura tiene un efecto importante en la producción de bacteriocinas, existen reportes para valores de temperaturas de incubación entre 20 a 50 °C en la mayoría de los casos se encuentra una coincidencia entre la temperatura óptima de crecimiento y de producción de bacteriocinas, no obstante, algunos autores también han demostrado que la producción de bacteriocinas puede darse en una temperatura alejada de la temperatura óptima de crecimiento. (Londoño, Taborda, López, & Acosta, 2015)

El pH es generalmente mantenido constante para la producción de bacteriocinas, mediante la neutralización de los ácidos producidos durante el proceso de fermentación, esto es realizado utilizando soluciones buffer en el medio de cultivo o adicionando de forma constante una base. Este mantenimiento de las condiciones de pH ha demostrado tener un efecto en la estabilidad, solubilidad y en la adsorción de las bacteriocinas en la membrana citoplasmática y en la superficie de los sistemas de

cultivo, según análisis realizados se concluye que a mayor pH, se pierde la actividad de la bacteriocina. La composición del medio de cultivo, en particular el tipo y las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno tienen un efecto marcado en la producción de bacteriocinas. En diferentes estudios se ha concluido que la glucosa es mejor fuente de carbono que la sacarosa o la fructosa para la producción de bacteriocinas. (Londoño, Taborda, López, & Acosta, 2015)

La aireación es un factor que también puede afectar la producción de bacteriocinas. En algunos casos se da que la presencia de oxígeno puede activar diferentes rutas metabólicas que pueden dar origen a diferentes rendimientos. Es por esto que se encuentran investigaciones en las que se sugiere utilizar condiciones anaeróbicas y otras en las que propone emplear una atmósfera enriquecida con oxígeno (60% O<sub>2</sub>) para incrementar la producción de bacteriocinas. La producción incrementa a medida que se aumenta el porcentaje de saturación de oxígeno de 40 a 80% aunque esta producción generalmente es inferior a la alcanzada en condiciones anaerobias. La producción de bacteriocinas también puede verse afectada por la facilidad con que estas son excretadas al medio de cultivo, para favorecer este aspecto se ha empleado la adición de surfactantes tales como Tween 80 que estimula la secreción de péptidos al influenciar la fluidez de la membrana celular. (Londoño, Taborda, López, & Acosta, 2015)

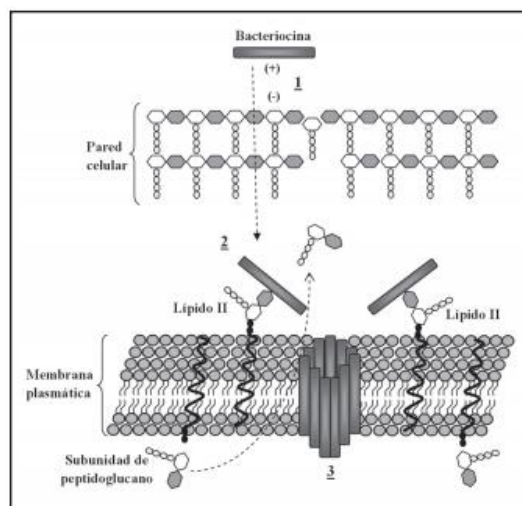
### **1.12 Mecanismos de acción de las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas**

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas tienen 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. Se ha demostrado que los blancos de

acción de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas son la membrana y la pared celular, así como algunas enzimas importantes en el metabolismo de la célula. (López M, Ochoa Z, Santoyo P, Anaya L, & M, 2008)

#### **1.12.1 Etapas del Modelo de mecanismo dual de una bacteriocina**

- **Etapas 1:** 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.
- **Etapas 2:** Posteriormente, la bacteriocina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de péptido-glucano y utiliza esta molécula para anclarse a la membrana celular.
- **Etapas 3:** La bacteriocina cambia su orientación con relación a la membrana y se inserta en esta última, lo que involucra la translocación 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. (López M, Ochoa Z, Santoyo P, Anaya L, & M, 2008)



**Figura 1.1:** Modelo de mecanismo dual de una bacteriocina

**Fuente:** (López M, Ochoa Z, Santoyo P, Anaya L, & M, 2008)

### 1.12.2 Mecanismo de la síntesis de bacteriocinas

La síntesis de las bacteriocinas se produce, generalmente, cuando las bacterias que las sintetizan se encuentran en situaciones de estrés. Como es habitual en las rutas metabólicas de los microorganismos, la síntesis de las bacteriocinas también depende del ecosistema, pH, potencial de óxido-reducción, cantidad de nutrientes, fase de crecimiento, temperatura y oxígeno disponible. Así mismo, son inactivadas por enzimas como la tripsina y la pepsina, las cuales al encontrarse en el tracto digestivo no permiten que las bacteriocinas alteren la microbiota existente en él. (Londoño, Taborda, López, & Acosta, 2015)

### 1.13 Aplicación de las bacteriocinas en alimentos

Las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas son de gran interés en la industria alimentaria, ya que son producto GRAS y pueden ser usadas como bioconservantes. El estudio de éstas se ha realizado en alimentos fermentados, como el queso, en productos cárnicos integrando la bacteriocina en el envase, entre otros. Comúnmente se usan tres métodos de aplicación de la bacteriocina:

1. La inoculación directa de BAL en el alimento para producir bacteriocinas en el producto.
2. Aplicación de la bacteriocina purificada o semipurificada como preservador en el alimento.
3. Uso de un producto previamente fermentado con la producción de la bacteriocina como un ingrediente en un alimento procesado. (Mondragón Preciado, EscalanteMinakata, Osuna Castro, & Ibarra, 2013)

#### **1.14 Enfermedades de origen alimentario causados por la ingestión de microorganismos patógenos**

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), se producen como consecuencia de la ingestión de un microorganismo patógeno, bien con el alimento o con la bebida, seguida del crecimiento de los patógenos y la invasión de tejidos del cuerpo o la liberación de toxinas, o ambas situaciones a la vez. Son numerosos los microorganismos que pueden contaminar los alimentos o las bebidas y causar enfermedades de diversa gravedad, esto se da de una forma directamente proporcional, es decir a mayor contaminación del alimento, el peligro es mucho mayor, y casi todas ellas se asocian a prácticas de higiene deficiente, en alguna de las etapas de la producción o del procesamiento de los alimentos. (Morcillo Ortega, Cortés Rubio, & and García López, 2013)

##### **1.14.1 Patógenos presentes en los quesos artesanales (quesillos)**

**Enterobacteriaceae totales:** La familia Enterobacteriaceae, por lo general son gérmenes de forma bacilar, gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, móviles o inmóviles, que fermentan la glucosa, reducen nitratos a nitritos, son citocromooxidasa negativos y crecen en medios que contienen sales biliares. A esta familia pertenecen diferentes géneros que pertenecen a las Enterobacteriaceae, que son indicadoras de contaminación fecal; en la industria alimentaria son utilizadas para determinar el nivel de calidad sanitaria de alimentos procesados. (Pascual Anderson, 2007)



**Salmonella:** Según Roberts et al., (1996a) Salmonella “Es un bacilo Gram-negativo, pequeño y con gran capacidad de adaptación a ambientes adversos, como altas concentraciones de sal y valores de pH de 4,5 a 9. Los alimentos de origen animal son su principal vehículo. Puede producir gastroenteritis, fiebre tifoidea y septicemia”. (Arqués Orobón, 2005)

**Listeria monocytogenes:** Roberts et al., (1996c) define que “Es un bacilo corto, Gram-positivo, catalasa-positivo, anaerobio facultativo, móvil y no formador de esporas. Es resistente a diversas condiciones medioambientales, pudiendo crecer a temperaturas de entre 1 °C y 45 °C con más del 10% de NaCl o iniciar el crecimiento a pH 4,4. La contaminación de la leche puede originarse a partir de la presencia de *L. monocytogenes* en heces, alimento, cama o superficie de las ubres por mamitis asintomáticas en las vacas o por contaminación postpasteurización. (Pascual Anderson, 2007)

**Staphylococcus aureus:** Según Jablonski Bohach (1997) *S. aureus* es un microorganismo Gram-positivo, catalasa-positivo, posee osmotolerancia, puede crecer en medios que contengan el equivalente a 3,5 M de NaCl y sobrevivir con actividad de agua inferior a 0,86. Núñez (1988) indica, que los quesos de leche cruda pueden resultar contaminados con *S. aureus*. La contaminación por *S. aureus* causa enfermedades como: gastroenteritis. (Arqués Orobón, 2005)

**Escherichia coli:** Es un germen de forma bacilar, casi siempre móvil, gramnegativo. Posee estructura antigénica. La mayoría de las bacterias pertenecientes a la especie *E. coli*, forman parte de la microflora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, encontrándose, habitualmente, en sus heces. Se destruye a temperatura de pasteurización y también durante su almacenamiento en frío, sobre todo a temperatura de congelación, su escasa resistencia hace que no sea un buen indicador de flora patógena. Perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. (Pascual Anderson, 2007)

## **1.15 Fundamentos de las técnicas empleadas**

### **1.15.1 Tinción de Gram**

La afinidad Gram-positiva o Gram-negativa de las bacterias depende de la composición y estructura de la pared celular. Las bacterias Gram-positivas mantienen un color violeta y las bacterias Gram-negativas lo pierden. Esto se debe a que el alcohol decolorante (acetona) desorganiza la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (constituida principalmente por lipoproteínas y lipopolisacáridos) y permite la salida del colorante primario, de modo que los microorganismos quedan desprovistos de color. Al agregar el contracolor estos se tiñen de rojo. (Negroni, 2009)

### **1.15.2 Pruebas Bioquímicas (Sistema API 50 CHL Medium)**

El sistema api 50 CHL Medium, destinado a la identificación del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos. Se pone en suspensión el microorganismo a estudiar en el medio y después se inocula en cada tubo de la galería. Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico y permiten la identificación del microorganismo con la ayuda de un programa informático de identificación. (bioMérieux, 2011)

### **1.15.3 Difusión en agar**

En dicha prueba el compuesto antimicrobiano se adiciona a una capa de agar impregnado en un disco de papel o en un pozo en el agar. El grado de inhibición se observa por una zona de no crecimiento alrededor del disco o pozo, la susceptibilidad de microorganismos indicadores se relaciona con los halos de inhibición (en mm), lo que depende de la velocidad de difusión del compuesto y del crecimiento celular. Los resultados que se obtienen son cualitativos. (Rodríguez Peña & Torres Lozano, 2006)

## CAPITULO II

### METODOLOGÍA

#### Introducción

En este capítulo se describirá cada uno de los métodos aplicados en el laboratorio de Biotecnología, para la aplicación de la metodología se realizó una correcta higienización y esterilización de materiales, equipos y reactivos; la metodología aplicada requiere también una purificación de ambiente del lugar de trabajo, este fue realizado con un equipo de ozonificación, de esta manera evitamos que haya contaminaciones y alteren los resultados de las técnicas realizadas.

#### Materiales y equipos

##### Materiales:

- Guantes estériles
- Cooler
- Gel refrigerante
- Refrigeradora
- Fundas ziploc
- Hisopos estériles
- Envases boeco 100 ml, 250 ml
- Mechero
- Cajas Petri
- Para film
- Kit de tinción de Gram
- Asas bacteriológicas
- Cubetas para la tinción
- Cronómetro
- Puntas micro-pipeta esterilizadas (1000 µl)
- Cajas Petri
- Gradillas para las ampollas
- Agua destilada estéril
- Alcohol

##### Equipos:

- Balanza Analítica Ohaus
- Autoclave
- Incubadora ESCO Isoterm
- Cámara de flujo laminar CSB 120
- Microscopio
- Centrifuga eppendorf 5702R

- Programa informático de identificación ApiwebTM
- Vórtex Genie 2
- Potenciómetro Mettler Toledo
- Espectro fotómetro de absorción atómica

### **2.1 Muestreo:**

El muestreo se realizó por 3 semanas a 3 proveedores. Los quesos tienen la característica de que no son elaborados con leche pasteurizada, la materia prima es cruda y el producto final es envuelto en hojas de achira.

Procedencia del muestreo: los quesos artesanales fueron muestreados en la parroquia Bulán del cantón Paute de la provincia del Azuay.

#### **2.1.2 Procedimiento**

Se tomaron las muestras de quesos directamente de los proveedores y se colocaron en fundas para evitar contaminaciones, en la fase de transporte, las muestras se llevaron en cajas refrigeradas para evitar alteraciones en las muestras.



**Figura 2.1:** Muestra de quesillo artesanal

### 2.1.3 Cronograma de las semanas de muestreo

El muestreo fue realizado por tres semanas, las muestras recolectadas fueron de cuatro proveedores que distribuyen sus productos los días domingos en la mañana.

**Tabla 2.1:** Cronograma de muestreo

| Semanas de Muestreo  | Proveedor 1                  | Proveedor 2 | Proveedor 3 | Proveedor 4 |
|----------------------|------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 21 de junio del 2015 | 1 muestra                    | 1 muestra   | 1 muestra   | 1 muestra   |
| 28 de junio del 2015 | 1 muestra                    | 1 muestra   | 1 muestra   | 1 muestra   |
| 12 de julio del 2015 | 1 muestra                    | 1 muestra   | 1 muestra   | 1 muestra   |
| Total de muestras    | 16 muestras tomadas en total |             |             |             |

## 2.2 Aislamiento de Bacterias ácido lácticas:

La muestra fue tratada en ambientes libres de contaminación y con todas las condiciones de asepsia, la aplicación de temperatura, pH y tiempo son puntos muy importantes en esta fase del proceso de aislamiento.

### 2.2.1 Preparación de medios de cultivo:

A los medios de cultivo se les adiciono un 0,03% de sorbato de potasio para evitar el crecimiento de microorganismos fúngicos, de esta manera se controló la contaminación en los medios de cultivo.

#### Preparación del medio de cultivo M17

- Se disolvió 48,25 gramos de Agar M17 en 950 ml de agua purificada y se preparó una solución de Lactosa al 10%; la lactosa y el agar se esterilizaron por separado a 121 °C por 15 minutos, se esperó que el medio de cultivo baje su temperatura hasta unos 40 °C y se adiciona 0,52% volumen de solución de lactosa al 10%; ya

colocada la solución de lactosa en el medio de cultivo se homogenizó, para que haya un crecimiento homogéneo de los microorganismos.

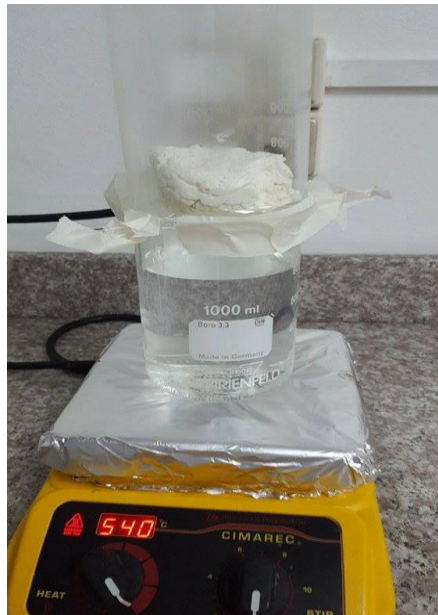
### **Preparación de cultivo MRS**

- Se disolvió 70 gramos de MRS en 1000 ml de agua purificada, se homogenizó y se envió a esterilizar a 121 °C por 15 min.

#### **2.2.1.1 Pre tratamiento de muestras:**

Este pre-tratamiento de las muestras se realizó para la eliminación de microorganismos patógenos.

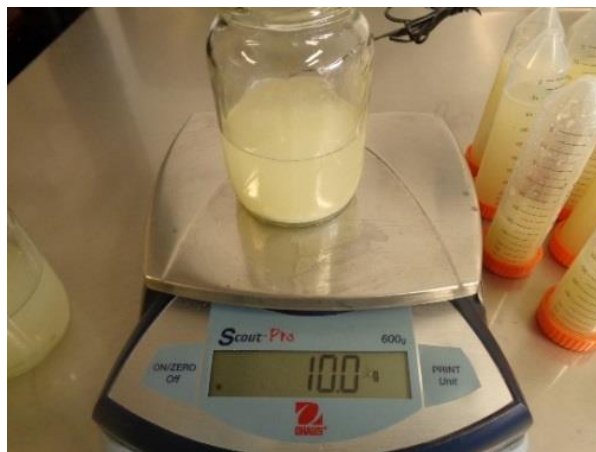
1. Se preparó una solución de meta bisulfito de sodio al 1%, se llevó a ebullición en vaso de precipitación.
2. Las muestras se sostuvieron en un cernidor y se cubrieron con vasos de precipitación.
3. Se dejó a ebullición por 5 minutos de esta manera se formaron vapores que cubrían la muestra.



**Figura 2.2:** Eliminación de carga microbiana patógena

#### **2.2.1.1.1 Preparación de las muestras:**

1. Se pesó 10 gramos de muestra
2. La muestra se coló en 90 ml de agua peptonada y
3. Se homogenizó la muestra.

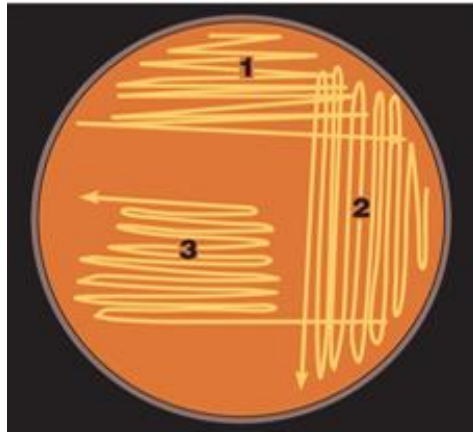


**Figura 2.3:** Dilución primaria de las muestras

### 2.2.1.2 Siembra de muestras en los medios

#### 2.2.1.2.1 Medio de cultivo M17:

Ya gelificado el medio de cultivo se procedió a realizar la siembra por estriado con muestras diluidas en  $10^2$ , se selló con parafilm, se incubó por 24 horas a 30 °C.

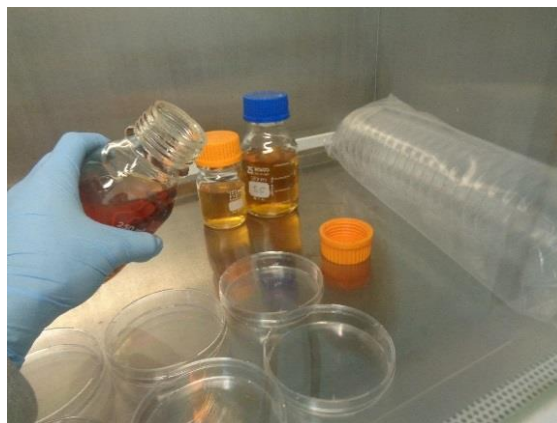


**Figura 2.4:** Siembra por estriado

**Fuente:** <https://verdugokathy.wikispaces.com/Control+de+Calidad+Cepas>

#### 2.2.1.2.2 Medio de cultivo MRS

Se realizó el plaqueado, se esperó a que gelifique el medio de cultivo y se realizó la siembra por estriado con una dilución de las muestras de  $10^2$ , se selló con parafilm y se incubó por 72 horas a 37 °C en anaerobiosis.



**Figura 2.5:** Plaqueteo en cajas petri



### 2.3 Identificación de las bacterias ácido lácticas presentes en quesos frescos artesanales:

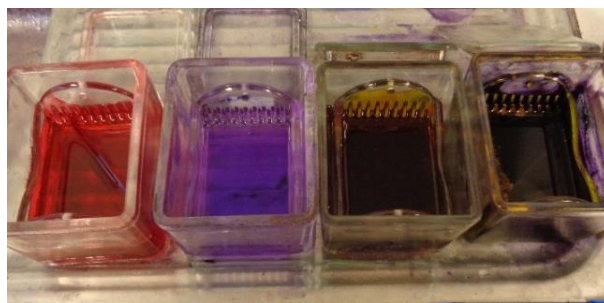
Se realizó una identificación visual de las colonias presentes en los medios de cultivo diferenciándolas según sus características como: el tamaño, el color y la forma de las colonias, con el objetivo de reducir el tiempo en la identificación morfológica y de agrupación.

**2.3.1 Tinción de Gram:** el objetivo en esta técnica es la identificación de las bacterias Gram-positivas.

#### Procedimiento:

##### 2.3.1.1 Preparación de portaobjetos con muestra:

Se tomó una pequeña cantidad de la colonia seleccionada con el asa bacteriológica estéril y se homogenizó con una gota de agua destilada sobre el portaobjetos, ya diluida la muestra de la colonia seleccionada se flameó en un mechero para que la muestra se adhiera al portaobjetos y se procedió a la tinción.



**Figura 2.6:** Cubetas de Kit de tinción de Gram

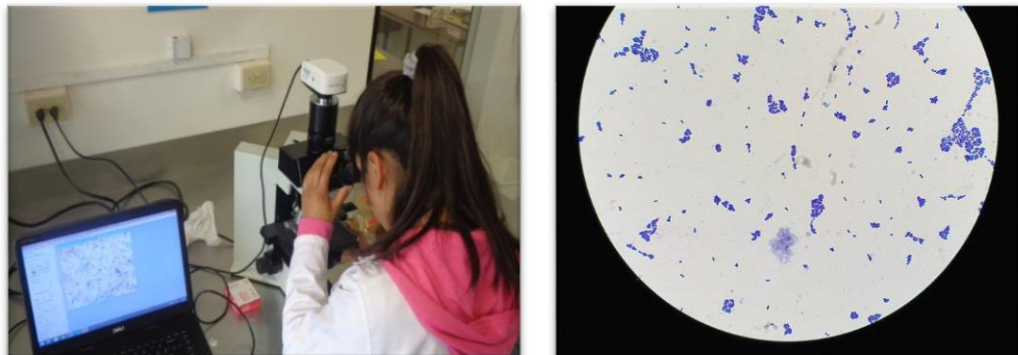
##### 2.3.1.2 Tinción de Gram

1. Se cubrió totalmente el portaobjeto con solución de violeta genciana y se dejó teñir durante 1 minuto, se lavó con abundante agua.
2. Se cubrió totalmente el portaobjetos con solución de lugol durante 1 minuto, se lavó con abundante agua

3. Se cubrió totalmente el portaobjeto con una solución de alcohol acetona por 1 minuto, se lavó con abundante agua.
4. Se cubrió totalmente el portaobjeto con la solución de fucsina durante 1 minuto, se lavó con abundante agua.
5. Se dejó secar la preparación flameando en el mechero, y posteriormente realizar la identificación en el microscopio.

### 2.3.2 Identificación morfológica y de agrupación de las BAL

1. Ya realizada la tinción, el portaobjetos debe ser cubierto con aceite de inmersión, para visualizar con los objetivos 1000 X.
2. Al identificar las bacterias se tuvo en cuenta la morfología y agrupación de las bacterias.



**Figura 2.7:** Identificación microscópica de BAL

### 2.3.3 Purificación de bacterias ácido lácticas silvestres

Se realizó una purificación debido a que hubo contaminación con patógenos (*E. coli* y *S. aureus*).

#### **Procedimiento:**

1. Con un asa bacteriológica esterilizada se recogió a la colonia seleccionada y se pasó a un nuevo medio de cultivo MRS y M17.

2. Se selló la caja y se dejó en incubación (MRS a 37 °C y M17 a 30 °C)



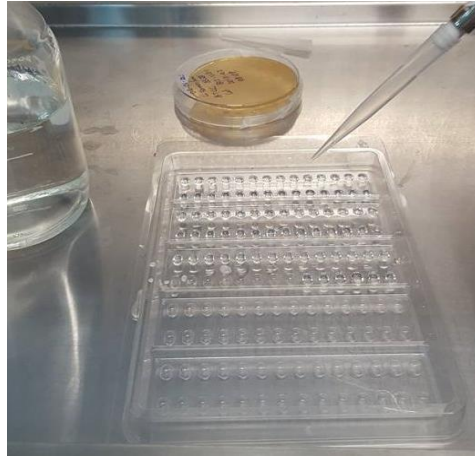
**Figura 2.8:** Colonias de bacterias en agar MRS

## **2.4 Identificación bioquímica de BAL silvestres**

La identificación bioquímica se realizó con pruebas miniaturizadas API 50 CHL Medium.

### **2.4.1 Preparación de las galerías:**

1. Se repartió 0,25 µl de agua ultrapura en los alveolos del fondo de la cámara de incubación, para crear una atmósfera húmeda.
2. Se sacó del embalaje las filas 0-19, 20-39 y 40-49 y se colocaron en el fondo de la cámara de incubación.



**Figura 2.9:** Cámara de incubación API 50 CHL

#### **2.4.2 Preparación del inóculo:**

1. Se verificó que las cepas de los medios de cultivos estén puras.
2. Se colocaron las cepas de las bacterias aisladas en caldo de cultivo MRS.
3. Se tomaron varias colonias del medio de cultivo hasta llegar a una suspensión de turbidez igual al patrón de 2 de McFarland en la ampolla API 50 CHL Medium, el inóculo preparado debe ser utilizado de inmediato.



**Figura 2.10:** API 50 CHL médium

#### **2.4.3 Inoculación de la galería**

1. Se repartió 10  $\mu$ l del preparado de suspensión bacteriana en cada uno de los tubos de la galería con una pipeta estéril, al colocar la suspensión se evitó la formación de

burbujas y no rebasar el límite superior del tubo con el fin de conservar una buena anaerobiosis.

2. Se cubrió los ensayos con aceite mineral, y se incubó la galería a 36 °C.



**Figura 2.11:** Incubación de la Galería API 50 CHL

#### **2.4.4 Lectura de galería:**

1. Se realizó la lectura después de 48 horas de incubación, en el cual se toma como positivos los que dieron el viraje de color de purpura a amarillo y en el caso del tubo N° 25 de purpura a negro.

2. El resultado de los ensayos fueron introducidos en el Software de identificación API.



**Figura 2.12:** Resultado del ensayo de la Galería

## 2.7 Determinación de actividad bacteriocinogénica

En este apartado se revisara la inoculación de las BAL en el caldo MRS, para la posterior concentración de extracto crudo (bacteriocina) y medir su capacidad bacteriocinogénica.

### Procedimiento:

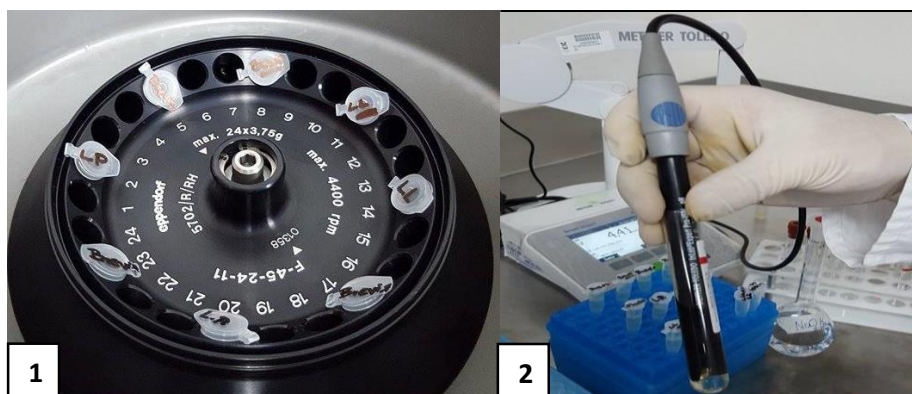
#### Activación de las BAL

1. La activación de las BAL se realizó incubando a las bacterias una temperatura de 37 °C por 72 horas en medio MRS.

#### Separación por centrifugación

2. El caldo con las cepas activadas se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml
3. Se ajustó la centrifuga a 5000 rpm a 4 °C, por un ciclo de 50 minutos cada uno de las cepas, con el objetivo para separar el extracto proteico.

4. Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio evitando generar turbulencia.
5. El sobrenadante obtenido se ajustó a pH 6.6 con una solución de NaOH 0,1N con el fin de descartar el efecto de inhibición por acidez.



**Figura 2.13:** 1. Separación de extracto proteico 2. Neutralización de sobrenadantes

### 2.7.1 Concentración de los sobrenadantes por evaporación:

1. En tubos esterilizados se sirvieron 3 ml de sobrenadante de cada uno de los extractos crudos neutralizados
2. Se llevaron a una estufa a 40 °C, durante 75 horas.
3. Ya cumplido el tiempo establecido, se debe determinar por diferencia de volúmenes, una reducción de un 60 % del volumen inicial. Las muestras se deben conservar a refrigeración a 4 °C.



**Figura 2.14:** Concentración de los sobrenadantes neutralizados



### 1.7.2 Pruebas de inhibición

El método utilizado es el de difusión en agar:

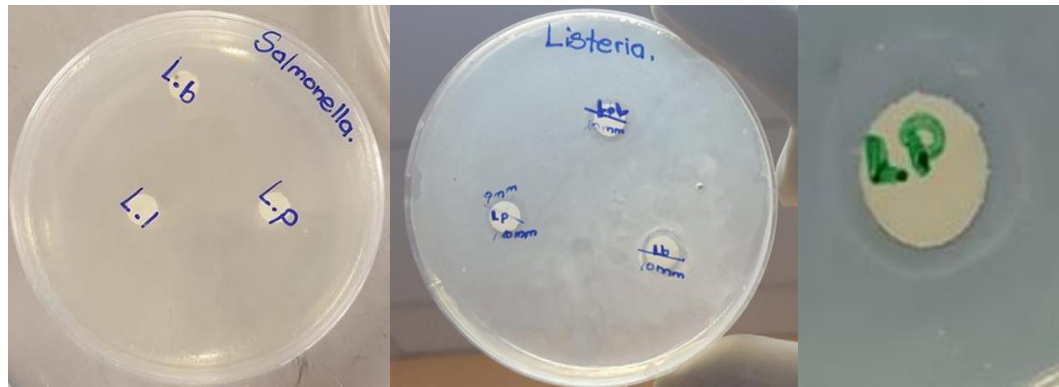
1. Se sembró cultivos indicadores *E.coli*, *S. aureus*, *Salmonella* y *Listeria*, en agar PCA y se incubaron a 37 °C por 24 horas.
2. Se preparó 5 ml de solución salina (CINa al 0,9 %) y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos.
3. Con un hisopo estéril se recogió las colonias de las bacterias patógenas y se prepara en la solución salina con un número de  $6 \times 10^8$  ufc según el patrón #2 de McFarland.



**Figura 2.15:** Patrón de turbidez #2 MacFarland

4. Se colocó 20 ml de agar estéril Mueller Hinton en cada caja y una vez gelificado se realizó una siembra por césped para que las bacterias crezcan sobre toda la placa de modo masivo, la siembra se realizó de cada una de las bacterias *E.coli*, *S. aureus*, *Salmonella* y *Listeria* en una caja petri diferente.
5. Sobre las placas con bacterias patógenas, se colocaron unos discos de 7 mm de diámetro y se adicionó 10 µl del concentrado de sobrenadante de las BAL aisladas (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. lactis*). Se incubó durante 24 horas a 37 °C.
6. Una vez que se cumplió las 24 horas de incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición de cada caja petri, con cada uno de los discos de las cepas de bacterias lácticas inoculadas.





**Figura 2.16:** Pruebas de inhibición en discos

## 2.8 Determinación de la presencia de productos proteicos en el extracto de Bacterias ácido lácticas

### 2.8.1 Método de Bradford

Este método cuantifica la unión de un colorante a una proteína desconocida y la compra contra diferentes cantidades de una proteína estándar, usualmente albúmina de suero bovino (BSA). El complejo colorante-proteína presenta un máximo de absorción a 595 nm. El colorante, en disolución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. (Giraldo, Loango, & Mejía, 2010)

#### Procedimiento:

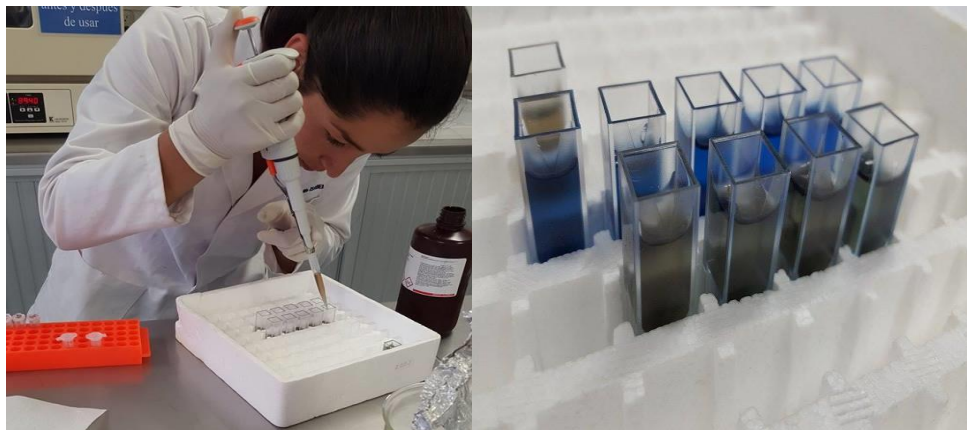
Se preparó una curva estándar a partir de una solución de Suero Patrón (50000 ppm), como blanco se utilizó agua ultra-pura.

1. Se realizó la preparación de cada estándar con una concentración de proteína conocida mezclando un volumen determinado de reactivos, que se indican a continuación en la siguiente tabla:

**Tabla 2.2:** Preparación de las celdas reactivo de Bradford

| TUBO       | Agua ultra-pura (μl) | Suero Patrón (μl) | Muestra Extracto (μl) | Reactivo de Bradford(ml) | Proteína ppm |
|------------|----------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|--------------|
| Blanco     | 600                  | 0                 | 0                     | 2                        | 0            |
| Estándar 1 | 450                  | 150               | 0                     | 2                        | 125          |
| Estándar 2 | 300                  | 300               | 0                     | 2                        | 250          |
| Estándar 3 |                      | 600               | 0                     | 2                        | 500          |

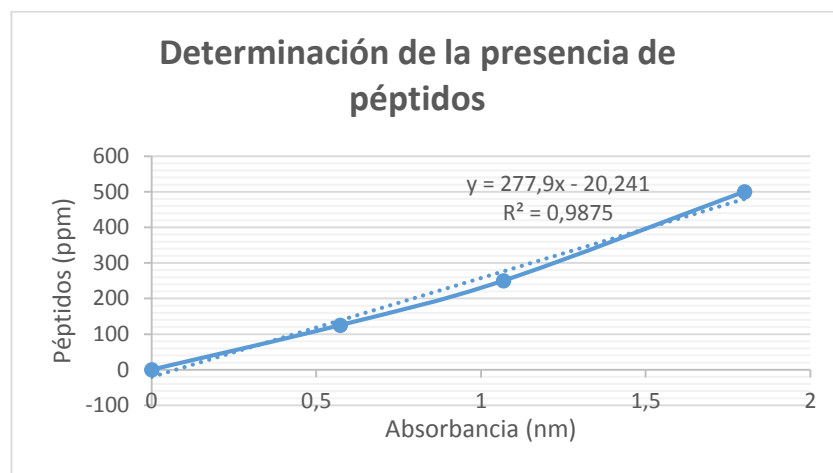
- **Estándar:** Es la preparación de la solución de reactivo de Bradford con una concentración de proteína conocida.

**Figura 2.17:** Preparación de la solución de Bradford

2. Se dejó reposar por 5 minutos para que genere el color del *Comassie Blue G-250* fijándose a la proteína en donde se efectuó un viraje de color a azul, la lectura se realizó a 595 nm.
3. Para la lectura primero se calibró el equipo con el blanco y se realizó las lecturas tanto de los patrones como la de las muestras (extractos).
4. Los resultados de la absorbancia fueron registrados y graficados en el cual se obtuvo la ecuación de la recta. A continuación se presenta los resultados de la lectura del espectrofotómetro y la ecuación lineal del reactivo de Bradford:

**Tabla 2.3:** Resultados de la Lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica

| TUBO       | Lectura de Absorbancia 595 nm | Proteína ppm |
|------------|-------------------------------|--------------|
| Blanco     | 0                             | 0            |
| Estándar 1 | 0,57                          | 125          |
| Estándar 2 | 1,07                          | 250          |
| Estándar 3 | 1,80                          | 500          |

**Figura 2.18:** Ecuación lineal del reactivo de Bradford

5. Ya realizada las lecturas de los patrones, se procedió a realizar la lectura de los extractos obteniendo como resultado los siguientes valores que se describen en la tabla.

**Tabla 2.4:** Lectura de concentración de proteína (absorbancia nm) en extracto de Bacterias ácido lácticas.

| TUBO        | Agua<br>estéril (μl) | Suero<br>Patrón (μl) | Muestra<br>Extracto (μl) | Reactivo de<br>Bradford(ml) | Lectura de<br>Absorbancia<br>595 nm |
|-------------|----------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| L. brevis   | 0                    | 0                    | 600                      | 2                           | 1,04                                |
| L.plantarum | 0                    | 0                    | 600                      | 2                           | 1,56                                |
| L.lactis    | 0                    | 0                    | 600                      | 2                           | 1,08                                |

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### RESULTADOS

##### 3.1 Aislamiento de las bacterias ácido lácticas presente en las muestras en medios de cultivo específicos.

Las bacterias ácido lácticas fueron aisladas y a la vez purificadas. Se aislaron 3 tipos de bacterias ácido lácticas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*, las mismas que son propias del queso artesanal, y le brindan las características organolépticas propias del producto.

##### 3.2 Identificación Bioquímica API 50 CHL Medium

Se obtuvo reacciones positivas y negativas de cada galería, los mismos que fueron introducidos en el programa informático api web, a continuación se indica en la Tabla 3 los resultados obtenidos de acuerdo al catabolismo de las bacterias.

En los Anexos 7, 8 y 9 se visualizan las imágenes del programa informático Api Web con datos de la identificación bacteriana.

**Tabla 3.1:** Resultados de bacterias lácticas identificadas

| Colonia | Cepa identificada                      | Probabilidad<br>% | Nivel de Identificación        |
|---------|----------------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| MRS     | <i>Lactobacillus brevis 1</i>          | 89,9              | Aceptable                      |
| MRS     | <i>Lactobacillus plantarum 1</i>       | 84.2              | Buena identificación de género |
| M17     | <i>Lactococcus lactis ssp lactis 1</i> | 96.5              | Buena                          |

Observaciones: cada medio de cultivo es selectivo para cada género de bacterias, en el momento del resultado, se confirmó medio de cultivo MRS es para *Lactobacillus* y M17 para *Lactococcus* de acuerdo al Manual de Merck.

### 3.3 Evaluación de la capacidad antagónica de las bacteriocinas obtenidas de las BAL frente a bacterias patógenas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

El extracto de las Bacteriocinas actuó formando halos de inhibición, fueron tomados como positivos aquellos halos de inhibición que sobrepasan el diámetro del disco (7 mm). Los valores mayores a 7 mm demostraron inhibición de los patógenos incubados, en la Tabla 3 se expone los resultados positivos y negativos de la zona de inhibición de cada BAL contra bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas presentes en quesos en general.

**Tabla 3.2:** Dimensiones de halos de inhibición

| Patógenos                         | <i>L. brevis</i> | Zona Inhibición | <i>L. plantarum</i> | Zona Inhibición | <i>L. lactis</i> | Zona Inhibición |
|-----------------------------------|------------------|-----------------|---------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <b>Listeria (Gram-positiva)</b>   | 10 mm            | +               | 9 mm                | +               | 10 mm            | +               |
| <b>Salmonella (Gram-negativa)</b> | 10 mm            | +               | 7 mm                | -               | 7 mm             | -               |
| <b>S. aureus (Gram-positiva)</b>  | 9 mm             | +               | 9 mm                | +               | 7 mm             | -               |
| <b>E.coli (Gram-negativa)</b>     | 9 mm             | +               | 7 mm                | -               | 7 mm             | -               |

Se puede verificar los halos de inhibición en el anexo 12, con sus respectivas mediciones.

### 3.4 Método de Bradford:

Esta técnica fue realizada con el objetivo de comprobar las hipótesis de que existe la presencia de péptidos llamados “Bacteriocinas” de esta manera se puede incrementar la posibilidad de que en realidad en la prueba de inhibición hubo acción de bacteriocinas.

La ecuación de la recta Patrón es  $y = 277,9x - 20,241$ ; para esto se despeja  $x$ , con los resultados obtenidos de la lectura de la absorbancia de las muestras de bacterias lácticas y de esta manera se puede calcular la cantidad de proteína que está presente demostrando así la presencia de péptidos.

**Tabla 3.3:** Contenido de proteico de los extractos de Bacteriocinas

| TUBO               | Lectura de Absorbancia<br>595 nm | Proteína<br>(ppm) |
|--------------------|----------------------------------|-------------------|
| <b>L. brevis</b>   | 1,04                             | 268,78            |
| <b>L.plantarum</b> | 1,56                             | 413,28            |
| <b>L.lactis</b>    | 1,08                             | 279,89            |

Se obtuvo la ecuación  $y = 277,9x - 20,241$  en la cual se sustituye la lectura realizada de los extractos de las Bacterias ácido lácticas, a continuación se realiza el cálculo de péptidos presentes en el extracto.

**Y=** Concentración

**X=** lectura de la absorbancia

- Concentración de péptidos presentes en el extracto de **L. brevis**

$$Y=277,9 x - 20,241$$

$$Y= (277,9*1,04)-20,241$$

$$Y= 268,78 \text{ ppm}$$

- Concentración de péptidos presentes en el extracto de ***L.plantarum***

$$Y=277,9 x - 20,241$$

$$Y= (277,9*1,56)-20,241$$

$$Y= 413,28 \text{ ppm}$$

- Concentración de péptidos presentes en el extracto de ***L.lactis***

$$Y=277,9 x - 20,241$$

$$Y= (277,9*1,08)-20,241$$

$$Y= 279,89 \text{ ppm}$$

## DISCUSIÓN

Productos lácteos como los quesos artesanales son alimentos que se distribuyen en el mercado del Cantón Paute sin ningún control de calidad e inocuidad, son elaborados con leche cruda en la que se encuentra diversidad de microorganismos que resultan ser benéficos para el organismo y otros que son causantes de las ETAs. Para obtener un producto con calidad higiénico-sanitaria es necesario que el producto pase por un proceso de pasteurización; sin embargo en este proceso térmico cabe la posibilidad de que haya la destrucción de algunas bacterias y enzimas que son propias de la microbiota natural del quesillo que son los que le brindan las características típicas de los quesillos tradicionales, por tal razón la investigación de los tipos de bacterias que están presentes en este alimento. (Narváez Guillén, 2015)

En el proceso de aislamiento de las BAL hubo interferencias, se presumía que existía contaminación de los medios de cultivo, de que el medio ambiente y los instrumentos de trabajo estaban contaminados, pero tras una serie de análisis en el que se tuvo todas las precauciones microbiológicas se llegó a la conclusión de que las muestras de quesos artesanales estaban contaminados y para esto se realizó un proceso de reducción de contaminantes Gram-negativos, realizando un tratamiento a las muestras antes del proceso de sembrado en el agar, autores como Ramos, et al. (2009), Alvarado Rivas, et al. (2007), Rodríguez Villanueva (2007) no especifican ninguna clase de problema en el proceso de aislamiento.

Para la identificación correcta de la BAL, de las cepas aisladas de las muestras que presentaron una forma redonda y color blanco o cremoso, al realizar la tinción de Gram fueron descartadas aquellas que fueron Gram-negativas. (Narváez Guillén, 2015)

En el agar MRS se observó un mejor crecimiento de *Lactobacillus* a una temperatura de incubación de 37° C en anaerobiosis, con 72 horas de incubación versus una a 30 °C y 110 horas de incubación, con un pH de 5,5, debido a que el crecimiento de los lactobacillus era muy lento (30 °C) y existió un rápido desarrollo de microorganismos



patógenos ya que la contaminación era alta. Según Rodríguez Villanueva (2007), afirma que el agar MRS es efectivo a una temperatura de 32 °C en una atmósfera de anaerobiosis. Pero las colonias aisladas en este son de tipo mesófilas y posiblemente podrían estar entre los géneros: *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Para estudios posteriores se puede realizar ensayos para lograr obtener la mayor cantidad de BAL presentes en el alimento, con la modificación de temperaturas.

En las pruebas miniaturizadas API 50 CHL se realizó un control positivo en el cual se confirmó de cierta manera la efectividad de la identificación.

En el proceso de difusión en agar se debe tomar en cuenta que, cuando se trabaja con pocillos una variable que resulta de gran importancia para hacer que el método realizado sea validado y se certifique que las prácticas realizadas sean de absoluta confianza, por ejemplo variables como el espesor del agar la cual debe ser exactamente de 4 mm. Un agar delgado, permite una mejor difusión de los antibióticos produciendo una falsa sensibilidad, pero también un agar con más de 4 mm de profundidad puede producir una disminución en la migración (difusión) del antibiótico con la consiguiente falsa resistencia. Los medios de cultivos que se utilizaba por lo general eran recién elaborados debido a que se requería evitar cualquier tipo de contaminación por lo general los medios de cultivos deben ser lo más frescos posible, con no más de 7 días de preparados y siempre deben ser guardados en bolsas plásticas selladas y a 4 °C. (Herrera, 1999).

Los extractos producidos fueron determinados como positivos si el halo de inhibición es  $>7$  mm y negativo si el halo es  $\leq 7$  mm, los extractos producidos no pueden entrar en la clasificación sensibles (S), Intermedia (I) y resistentes (R) debido a que para esta clasificación se debe partir de una concentración conocida como es el caso de estudios que se realizan para determinar la efectividad de ciertos antibióticos (medicinas). (Rodero, y otros, 2006) (Picazo, 2000)

Para el método de difusión en agar se trabajó con el estándar #2 de McFarland a diferencia del resto de ensayos que por lo general se realiza al estándar 0,5 de McFarland. (Rodero, y otros, 2006) (Picazo, 2000)

## CONCLUSIONES

- Se aisló las BAL de las muestras en medios de cultivo específicos, fue necesario un tratamiento con conservantes alimentarios, y diluciones seriadas de  $10^2$  de esta manera se redujo el crecimiento de patógenos, se obtuvo como resultado 3 tipos de bacterias lácticas, cada una de ellas fueron diferenciadas en la visualización microscópica según la morfología (cocos y bacilos) y el tipo de agrupación (en cadenas).
- Se identificó a las bacterias aisladas mediante pruebas miniaturizadas API 50 CHL y el software API WEB, identificando a bacterias lácticas silvestres que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*, se confirmó que en el agar MRS se obtuvieron *Lactobacillus brevis* con un 89,9% de probabilidad y el *Lactobacillus plantarum* con una probabilidad de un 84,2%, y en el agar M17 se obtuvo el *Lactococcus lactis* con una probabilidad del 96,5%. Las bacterias del género *Lactobacillus* presentan un porcentaje bajo de probabilidad con relación a la muestra del *Lactococcus*.
- Se evaluó la capacidad antagónica de las bacteriocinas frente a bacterias patógenas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* obteniendo que la bacteriocina del *L.brevis* forma halos de inhibición frente a los cuatro tipos de bacterias patógenas de esta manera se puede concluir que la bacteriocina producida por *L.brevis* actúa contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, de igual manera se analizó el *L. plantarum* en el cual tiene un espectro de acción sobre las bacterias Gram-positivas ( *S. aureus* y *Listeria* ) y por último se determinó que el *L. lactis* forma halos de inhibición frente a Gram-positivos (*Salmonella*).
- Mediante el análisis de proteínas se comprueba la presencia de péptidos, descartando la posibilidad de que la formación de halos por inhibición fuera por ácidos, teniendo como resultado la concentración de estos péptidos 268,78 ppm del *L. brevis*, 413,28 ppm del *L. plantarum* y 279,89 ppm del *L. lactis*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Academia del Área de Plantas Piloto de Alimentos. (2003). Introducción a la Tecnología de Alimentos. México: Limusa. Recuperado el 04 de Noviembre de 2015, de <https://books.google.com.ec>
- Academia del Área de Plantas Piloto de Alimentos. (2004). Introducción a la Tecnología de Alimentos. México: Editorial Limusa. Recuperado el 29 de 11 de 2015, de <https://books.google.com.ec/books>
- Acero, E. (2006). Nayarit: reforma y desarrollo. Nayarit: Ilustrada. Obtenido de [https://books.google.com.ec/books?id=d9f5Gko6V7kC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=d9f5Gko6V7kC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Adarme, T., & Rincones, M. (2008). Evaluación de cuatro antimicrobianos para el control de levaduras contaminantes de un proceso de fermentación de ácido cítrico. Pontificia Universidad Javeriana, 30-32. Recuperado el 28 de Enero de 2016, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis140.pdf>
- Alvarado Rivas, C., Chacón Rueda, Z., Otoniel Rojas, J., Guerrero Cárdenas, B., & López Corcuera, G. (2007). AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE UN QUESO VENEZOLANO AHUMADO ANDINO ARTESANAL. SU USO COMO CULTIVO INICIADOR. Sistema de Información Científica Redalyc, 302-304. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95917314>
- Arqués Orobón, J. L. (2005). Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos. ProQuest ebrary, Universidad Complutense de Madrid, 187. Recuperado el 18 de Junio de 2015
- Bamforth, C. W. (2005). Alimentos, fermentación y microorganismos . España: Blackwell Science .
- Becton, D., & Company. (Febrero de 2005). europe/regulatory. Obtenido de Patrón de turbidez BBL preparado: [http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)\\_es.pdf](http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf)
- Beristan Bauza, S., & López Malo, P. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Temas selectos de Ingeniería en Alimentos, 15. Recuperado el 29 de Septiembre de 2015, de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Beristain-Bauza-et-al-2012.pdf>
- bioMérieux. (2011). api 50 CHL Medium. 7.
- C.M, B., & J.P, L. (1995). Microbiología Alimentaria, 2 Fermentaciones Alimentarias . España: Zaragoza.
- Carrera Vega, M. d. (2015). Evaluación del potencial antimicrobiano de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes muestras de leche. Universidad

- Autónoma Agraria Antonio Narro, 8-10. Recuperado el 10 de Enero de 2016, de  
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6717/63405%20CARRERA%20VEGA,%20MARIA%20DE%20LOS%20ANGELES%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
- Casaus Lara, M. d. (2005). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. España: Universidad Complutense de Madrid.
- Corzo, N., Alonso González, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. Á., Cirici, M., Leis, R., . . . C. (2015). Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. Digital CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), 99-103.
- FAO. (2005). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Obtenido de Inocuidad y calidad de los Alimentos:  
<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/lactoperoxidase/es/>
- García Hurtado, M. (2014). Recepción y almacenamiento de la leche y otras materias primas. INAE0209. Málaga: IC Editorial.
- Giraldo, G., Loango, N., & Mejía, C. (2010). Laboratorio de Bioquímica: Una Visión Práctica. Armenia, Quindío: ELIZCOM S.A.S. Recuperado el 26 de Octubre de 2015, de  
[https://books.google.co.uk/books?id=dAbMDrXcTHsC&pg=PA108&dq=fundamento+metodo+de+bradford&hl=es-419&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.uk/books?id=dAbMDrXcTHsC&pg=PA108&dq=fundamento+metodo+de+bradford&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, 33-41. Recuperado el 20 de 01 de 2016, de  
[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85461999000100010](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010)
- INEN. (2012). Norma general para quesos frescos no madurados . Norma técnica Ecuatoriana , 4. Obtenido de  
<https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1528.2012.pdf>
- Londoño, N., Taborda, M., López, C., & Acosta, L. (2015). BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS. Alimentos Hoy, 4. Recuperado el 06 de Diciembre de 2015, de  
[http://acta.org.co/acta\\_sites/alimentoshoy/index.php/hoy/article/view/356](http://acta.org.co/acta_sites/alimentoshoy/index.php/hoy/article/view/356)
- López M, J. E., Ochoa Z, A., Santoyo P, G., Anaya L, J. L., & M, M. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 53. Recuperado el 19 de Agosto de 2015, de  
<http://www.redalyc.org/pdf/579/57911110007.pdf>

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2005). Brock Biología de los Microorganismos (Vol. 10ma edición ). Southern Illinois University Carbondale: Pearson Educación.
- Mayo, B., Aleksandrak, P. T., María, F., Kowalczyk, M., Álvarez, M. P., & Bardowski, J. (2010). Biotechnology of Lactic Acid Bacteria; Novel Applications. Singapore: Blackwell Publishing.
- MercK, E. (1994). Manual de medios de cultivo. Alemania: Copyright. Recuperado el 10 de Marzo de 2015
- Microbial, N. (Enero-Febrero de 2009). Newsletter Microbial. Obtenido de Newsletter Microbial: [http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter\\_Microbial\\_03.pdf](http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf)
- Mondragón Preciado, G., EscalanteMinakata, P., Osuna Castro, J. A., & Ibarra. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimento. Investigación y ciencia, 1-8. Recuperado el 15 de Diciembre de 2015, de <http://www.redalyc.org>
- Monroy Dosta, M. d., Castro Barrera, T., Fernández Perrino, F. J., & Mayorga Reyes, L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. 10. Recuperado el 22 de Noviembre de 2015, de <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n73ne/bacterio.pdf>
- Morcillo Ortega, G., Cortés Rubio, E., & García López, J. L. (2013). Biotecnología y alimentación. España: UNED -Universidad Nacional de Educación a Distancia . Recuperado el 25 de Junio de 2016, de ProQuest ebrary
- Muñoz de Malajovich, M. A. (2012). Biotecnología (2a. ed.). Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes. Obtenido de <http://www.ebrary.com>
- Narváez Guillén, B. L. (2015). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas del queso de cabra artesanal del sureste de coahuila para su uso como cultivos iniciadores en quesos pasteurizados. México: repositorio.uaaan.mx. Recuperado el 12 de Enero de 2016, de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7773/63816%20NARVAEZ%20GUILLEN%2c%20BLANCA%20LILIANA%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
- Negrón, M. (2009). Microbiología Estomatológica. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 13. Recuperado el 24 de Junio de 2015, de [scielo.org.co](http://scielo.org.co)
- Pascual Anderson, M. d. (2007). Microbiología alimentaria; metodología analítica para alimentos y bebidas. España: Ediciones Díaz de Santos. Recuperado el 28 de Junio de 2016, de <http://www.ebrary.com>

- Picazo, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 4-12. Recuperado el 23 de Diciembre de 2016, de [http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos\\_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf](http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf)
- Ramos, B., Bucio, A., Bautista, C., Aranda, E., & Izquierdo, F. (2009). AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PARA LA ELABORACIÓN DE QUESO CREMA TROPICAL. *Sistema de Información Científica Redalyc*, 162-163. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=15421079005>
- Rodero, L., Córdoba, S., Vivot, W., Campo, M., Corfield, P., Olgún, C., . . . Whonet, R. (2006). Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp. *Revista argentina de microbiología*. Recuperado el 2 de Enero de 2016, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412006000300012](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412006000300012)
- Rodriguez Peña, J. A., & Torres Lozano, L. M. (2006). Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de Bacterias Acido lacticas presentes en suero costeño. Bogota: Universidad de la Sabana .
- Rodriguez Peña, J., & Torres Lozano, L. (2006). Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. Bogota: Universidad de la Sabana, Facultad de Ingenieria .
- Rodríguez Villanueva, G. (2007). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS A PARTIR DE LECHE CRUDA Y QUESO PAIPA ELABORADO EN LOS MUNICIPIOS DE PACHO (CUNDINAMARCA) Y BELEN (BOYACA). Bogotá: Universidad de la Salle. Obtenido de <http://prepository.lasalle.edu.cobitstreamhandle10185674913992026.pdfsequence=1>
- Rodriguez, A., & Torres, M. (2006). Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de Bacterias Ácido Lácticas aisladas de suero costeño . Bogota: Universidad de la Sabana.
- Rojas, C., & Vargas, P. (Abril-Junio de 2008). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*, 21(2), 8. Obtenido de [http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/106/105](http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/106/105)

## ANEXOS

### Anexo 1: Purificación: Pruebas de ensayo para eliminación de Gram-negativos

| Medio de Cultivo                                                                                     | Contaminación con Gram-negativos | Descripción de las colonias                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| MRS                                                                                                  | +                                | Forman colonias pequeñas, las colonias son dispersas, cremosas, el olor es un poco ácido. |
| MRS antibióticos<br>(Amoxicilina,<br>Acromaxfenicol,<br>Tetraciclina,<br>Fluconazol,<br>Acronistina) | +                                |                                                                                           |
| MRS sorbato y meta<br>bisulfito de sodio al 3%,<br>en anaerobiosis                                   | -                                |                                                                                           |
| M17                                                                                                  | +                                | Forman colonias pequeñas, dispersas, blancas, el olor es un poco ácido.                   |
| M17 antibióticos<br>(Amoxicilina,<br>Acromaxfenicol,<br>Tetraciclina,<br>Fluconazol,<br>Acronistina) | +                                |                                                                                           |
| M17 sorbato y meta<br>bisulfito de sodio al 3%,                                                      | -                                |                                                                                           |

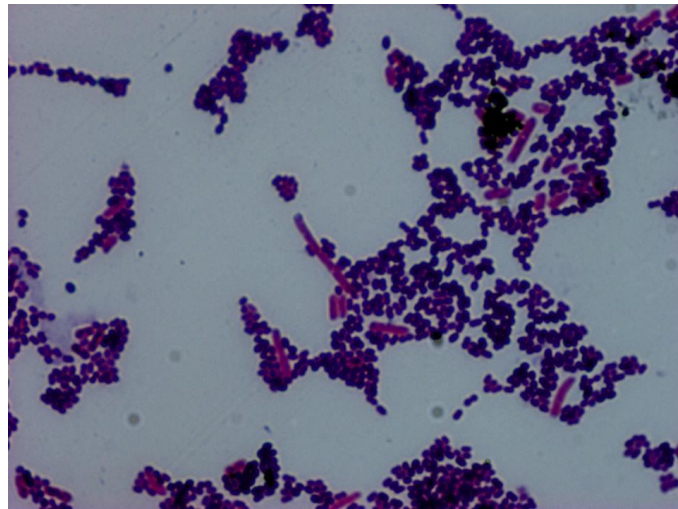
❖ Contaminado con Gram-negativos (+)

❖ Contaminación parcial (-)

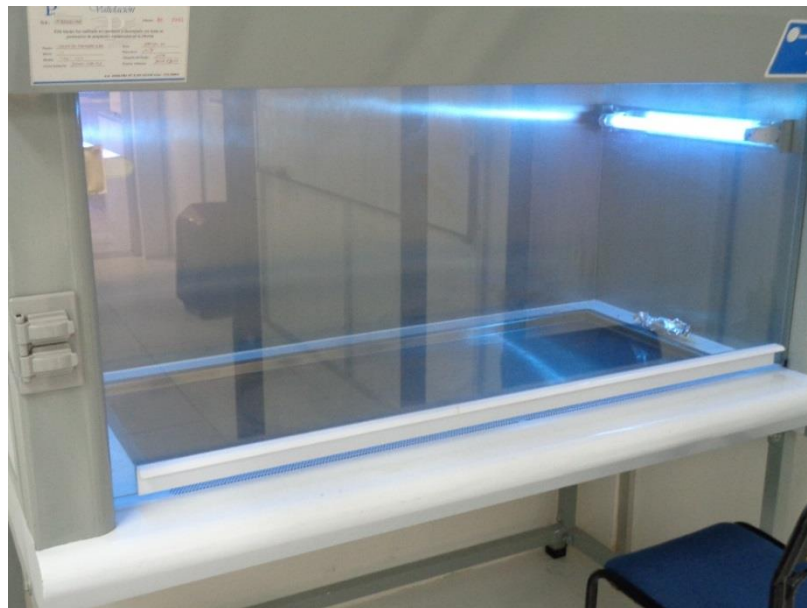


**Observaciones:** se realizó varios ensayos con diferentes sustancias a diferentes concentraciones, el cual el objetivo era eliminar a las bacterias Gram-negativas, teniendo buenos resultados con conservantes alimentarios.

**Anexo 2:** Identificación morfológica macroscópica: Muestra contaminada



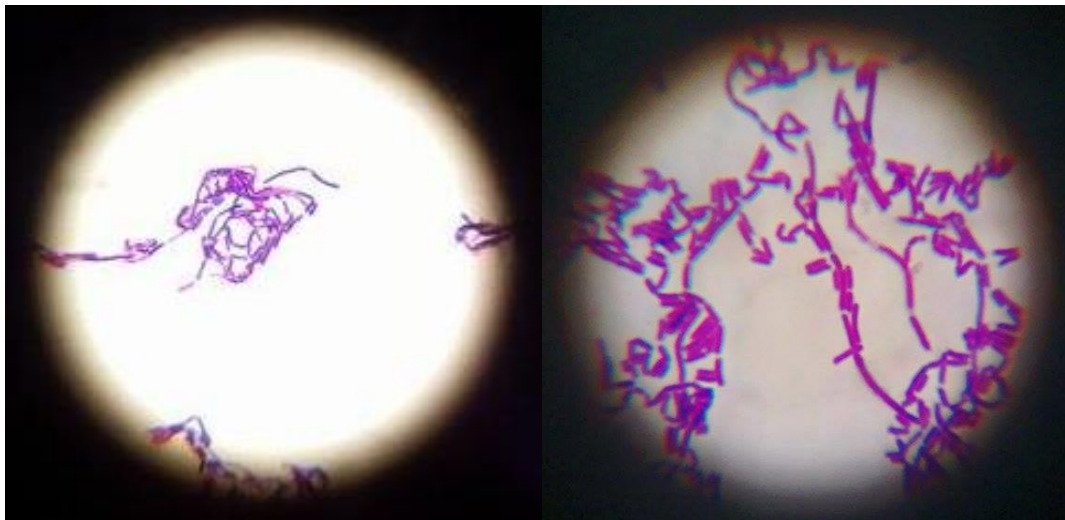
**Anexo 3:** Cámara de reflujo, esterilización con luz UV



**Anexo 4:** Identificación microscópica: *Lactobacillus brevis*



**Anexo 5:** Identificación microscópica: *Lactobacillus plantarum*





**Anexo 8:** Identificación de la galería API 50 CHL, *Lactobacillus plantarum* 1

| BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO |                                                 |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| Galería                           | API 50 CHL V5.1                                 |  |  |  |  |  |  |
| Perfil                            | -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- |  |  |  |  |  |  |
| Nota                              |                                                 |  |  |  |  |  |  |

| Taxón significativo              | % ID | T    | Pruebas en contra |         |         |  |
|----------------------------------|------|------|-------------------|---------|---------|--|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 1 | 84.2 | 0.7  | TRE 96%           | MLZ 92% |         |  |
| <i>Lactobacillus brevis</i> 1    | 11.7 | 0.68 | SOR 14%           | TUR 14% | GHT 85% |  |

| Taxón siguiente               | % ID | T    | Pruebas en contra |           |          |         |
|-------------------------------|------|------|-------------------|-----------|----------|---------|
| <i>Lactobacillus pentosus</i> | 3.8  | 0.51 | GLY 75%           | DXYL 100% | TRE 100% | RAF 75% |

| Pruebas complementarias(s)     | GLUCOSA <sub>g</sub> |  |  |  |
|--------------------------------|----------------------|--|--|--|
| <i>Lactobacillus brevis</i>    | +                    |  |  |  |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | -                    |  |  |  |

**Anexo 9:** Identificación de la galería API 50 CHL, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* 1

|                        |                           |                          |                            |                           |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>API 50 CHL V5.1</b> | <a href="#">Impresora</a> | <a href="#">Exportar</a> | <a href="#">Nuevo test</a> | <a href="#">Modificar</a> |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|

|                                                                                        |                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| REFERENCIA                                                                             | FECHA                                 |
| <input type="text"/>                                                                   | <input type="text" value="17/12/15"/> |
| COMENTARIO                                                                             |                                       |
| MEDIO DE CULTIVO M17 <input type="button" value="▲"/> <input type="button" value="▼"/> |                                       |

| BUENA IDENTIFICACION |                                                 |  |  |  |  |  |  |
|----------------------|-------------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| Galería              | API 50 CHL V5.1                                 |  |  |  |  |  |  |
| Perfil               | -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- |  |  |  |  |  |  |
| Nota                 |                                                 |  |  |  |  |  |  |

| Taxón significativo                           | % ID | T    | Pruebas en contra |        |  |  |
|-----------------------------------------------|------|------|-------------------|--------|--|--|
| <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> 1 | 96.5 | 0.75 | MEL 13%           | TAG 9% |  |  |

| Taxón siguiente                  | % ID | T    | Pruebas en contra |         |        |        |
|----------------------------------|------|------|-------------------|---------|--------|--------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 1 | 2.5  | 0.55 | SOR 78%           | MLZ 92% | AMD 7% | TAG 7% |

**Anexo 10:** TABLA DE IDENTIFICACIÓN DE REACCIONES BIOQUÍMICAS  
DE LAS GALERÍAS API 50 CHL

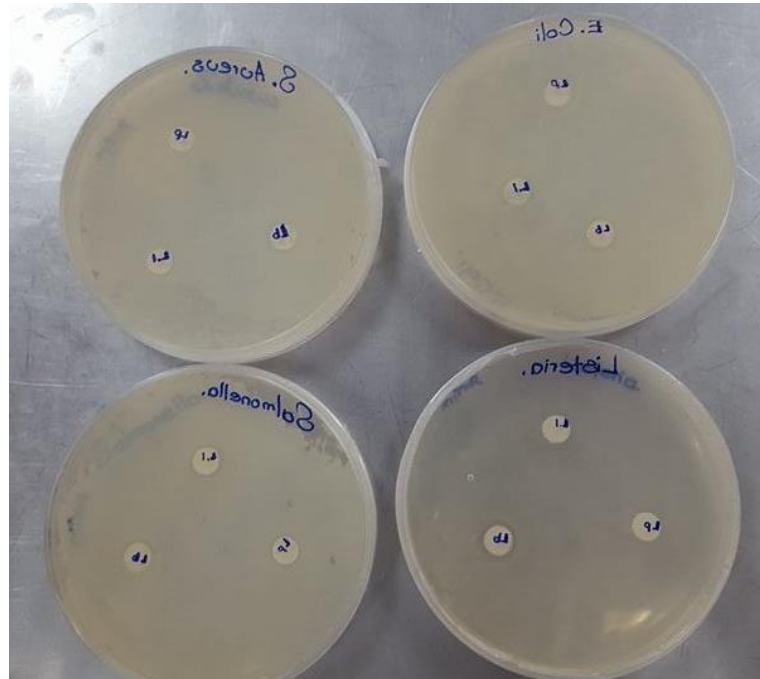
% de reacciones positivas después de 48 h

- Los valores marcados con **color verde** son aquellos sustratos que dieron positiva en la identificación de BAL.

| # pocillo | Sustrato                 | Lactobacillus<br>brevis 1 | Lactobacillus<br>plantarum 1 | Lactococcus<br>lactis ssp lactis 1 |
|-----------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| 0         | Control                  |                           |                              |                                    |
| 1         | GLYcerol                 |                           | 1                            | 1                                  |
| 2         | ERYthrol                 |                           |                              |                                    |
| 3         | D-ARAbinose              |                           |                              | 5                                  |
| 4         | L-ARAbinose              | 71                        | 74                           | 30                                 |
| 5         | RIBose                   | 71                        | 92                           | 95                                 |
| 6         | D-XYLose                 | 56                        | 2                            | 40                                 |
| 7         | L-XYLose                 |                           |                              |                                    |
| 8         | ADOnitol                 |                           |                              |                                    |
| 9         | β-Methyl-D-<br>Xyloside  | 1                         |                              |                                    |
| 10        | GALactose                | 99                        | 92                           | 90                                 |
| 11        | GLUcose                  | 99                        | 100                          | 100                                |
| 12        | FRUctose                 | 99                        | 100                          | 100                                |
| 13        | MaNosE                   | 99                        | 100                          | 100                                |
| 14        | SorBosE                  |                           | 2                            |                                    |
| 15        | RHAMnose                 |                           | 33                           |                                    |
| 16        | DULcitol                 |                           |                              |                                    |
| 17        | INOsitol                 |                           |                              |                                    |
| 18        | MANitol                  | 28                        | 99                           | 50                                 |
| 19        | SORbitol                 | 14                        | 78                           | 5                                  |
| 20        | 1-Methyl-D-<br>Mannoside |                           | 55                           | 1                                  |

|    |                      |    |     |     |
|----|----------------------|----|-----|-----|
| 21 | 1-Methyl-D-Glucoside | 14 | 33  | 22  |
| 22 | N-Acetyl-Glucosamine | 99 | 100 | 100 |
| 23 | AMYgdaline           | 99 | 94  | 75  |
| 24 | ARButin              | 99 | 99  | 85  |
| 25 | ESCulin              | 83 | 99  | 90  |
| 26 | SALicin              | 99 | 99  | 85  |
| 27 | CELLobiose           | 99 | 99  | 95  |
| 28 | MALtose              | 85 | 100 | 95  |
| 29 | LACtose              | 71 | 99  | 90  |
| 30 | MELibiose            | 57 | 94  | 13  |
| 31 | Sucrose              | 81 | 88  | 50  |
| 32 | 32. TREhalose        | 71 | 96  | 90  |
| 33 | 33. INUlin           | 28 | 0   | 1   |
| 34 | MeLeZitose           | 14 | 92  |     |
| 35 | RAFFinose            | 42 | 74  | 9   |
| 36 | Starch               |    | 7   | 50  |
| 37 | GLYcoGen             |    | 7   |     |
| 38 | XyLiTol              |    |     |     |
| 39 | GENTiobiose          | 99 | 98  | 81  |
| 40 | D-TURanose           | 14 | 62  |     |
| 41 | D-LYXose             | 14 |     |     |
| 42 | D-TAGatose           |    | 7   | 9   |
| 43 | D-FUCose             |    |     |     |
| 44 | L-FUCose             |    |     |     |
| 45 | D-ARabitol           | 28 | 36  |     |
| 46 | L-ARabitol           | 14 |     |     |
| 47 | GlucoNaTe            | 85 | 62  | 30  |
| 48 | 2-Keto-Gluconate     | 20 |     |     |
| 49 | -Keto-Gluconate      | 14 |     |     |

**Anexo 11:** Acción de Bacteriocinas Versus Microorganismos patógenos



**Anexo 12:** Diámetro de halos de inhibición





**Anexo 13:** Reacción colorimétrica de proteína presente en *Lactobacillus plantarum*

