



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos

Trabajo de graduación previo a la obtención de título de:

INGENIERA EN ALIMENTOS

Autora:

KARLA ALEXANDRA CRESPO NARVÁEZ

Directora:

MARÍA FERNANDA ROSALES MEDINA

Co-director:

RODRIGO SEBASTIAN CAROCA CÁCERES

Cuenca – Ecuador

2018

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios y a mi madre, quien ha sido el motor y pilar fundamental de mi vida, por ser la persona incondicional que me apoyo en cada paso, por inculcarme valores y enseñarme a superarme todos los días, teniendo en ella el claro ejemplo de que todo se puede conseguir en la vida. A mis hermanos Adrián, Jhoanna y mi sobrina Paulina, por demostrarme siempre su cariño, por estar en las buenas y malas, por cada día motivarme, por sus palabras y compañía para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios en cada paso que he dado a lo largo de este camino, por la sabiduría que me ha brindado y porque todo lo que creí imposible lo hace posible para seguir cumpliendo mis metas.

A la Ingeniera María Fernanda Rosales por la confianza depositada en mi persona al dirigir y guiarme en el presente trabajo de graduación.

Al Doctor Rodrigo Caroca por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico durante todo este proceso y en especial por su paciencia a lo largo de todo este proceso.

Al Doctor Piercosimo Tripaldi, Ingeniero Andrés Pérez, Ingeniero Diego Montero e Ingeniera Johanna Tacuri por su constante ayuda y apoyo durante toda la realización de mi tesis.

A la Universidad del Azuay por abrirme las puertas y por el aporte económico invaluable en la realización del presente trabajo, a cada uno de los profesores que dedicaron su tiempo y me ayudaron en mi formación profesional.

A mis tíos y primos, personas muy importantes en mi vida desde niña, por sus consejos constantes y por alentarme día a día a seguir adelante.

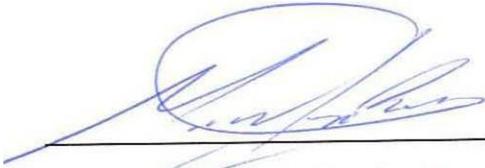
A mis amigos y amigas de la infancia en especial Erika y Dalila que siempre han estado presentes en cada paso, por la paciencia que me han tenido en todos estos años, por brindarme positivismo y tranquilidad.

Gracias a todos aquellos que forman parte de mi vida y que de una u otra forma han hecho de este camino universitario sea un poco más ligero.

RESUMEN

Se caracterizó la actividad bacteriocinogénica de los sobrenadantes concentrados (ABSC) provenientes de *Lactobacillus plantarum* strain gp108 y *Enterococcus faecium*, bacterias aisladas de quesos artesanales de la zona austral del Ecuador. La ABSC resistió a los tratamientos térmicos (50 °C, 70°C y 95 °C) y fue estable a pH entre 5 a 7. El tratamiento con proteasas eliminó la ABSC, no así con catalasa. Mediante electroforesis se determinó un peso molecular de ~3.5 kDa para los péptidos más abundantes en los sobrenadantes. La presencia de estos péptidos más la sensibilidad a proteasas, sugiere que la ABSC está dada por bacteriocinas.

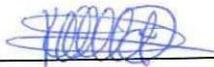
PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, actividad bacteriocinogénica, bacteriocinas.



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



Ing. Ma. Fernanda Rosales M.
Directora de Tesis



Srta. Karla Crespo Narváez
Autora

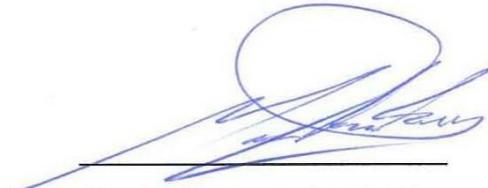
ABSTRACT

The bacteriocinogenic activity of concentrated supernatants (BACS) from *Lactobacillus plantarum* strain gp108 and *Enterococcus faecium* were characterized. These bacteria were isolated from artisanal cheeses from the south of Ecuador. BACS withstood thermal treatments (50 °C, 70 °C and 95 °C) and was stable at a pH between 5 and 7. Protease treatment eliminated BACS, but catalase treatment did not. A molecular weight of ~3.5 kDa was determined for the most abundant peptides in the supernatants through electrophoresis. The presence of these peptides and the sensitivity to proteases suggested that the BACS was given by bacteriocins.

KEYWORDS: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, bacteriocinogenic activity, bacteriocins.



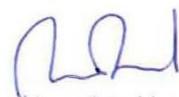
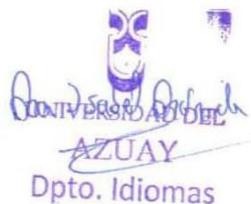
Ing. Ma. Fernanda Rosales M.
Food Engineering
Faculty Coordinator



Ing. Ma. Fernanda Rosales M.
Thesis Director



Karla Crespo Narváez
Author



Translated by
Ing. Paul Arpi

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN	iii
PALABRAS CLAVE: <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , actividad bacteriocinogénica, bacteriocinas.	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS	5
1.1. Activación de BAL	5
1.2. Concentración de los sobrenadantes de las BAL.....	5
1.3. Obtención de sobrenadantes concentrados semi purificación y estimación de peso molecular	5
1.3.1. Cuantificación de proteínas presente en los sobrenadantes	5
1.3.2. Semi purificación de los sobrenadantes concentrados.....	6
1.3.3. Diálisis en los precipitados concentrados semi purificados.....	6
1.3.4. Electroforesis de los precipitados concentrados semi purificados	7
1.3.5. Revelado de gel de electroforesis	7
1.4. Evaluación de la actividad bacteriocinogénica y capacidad antagónica de los sobrenadantes concentrados	7
1.4.1. Activación de BAL y concentración de los sobrenadantes de BAL	8
1.4.2. Activación de bacterias patógenas	8
1.4.3. Determinación de la capacidad antagónica de los sobrenadantes concentrados.....	8
1.4.4. Determinación de la actividad bacteriocinogénica.....	9
1.4.4.1. Tratamiento con pH.....	9
1.4.4.2. Tratamiento térmico	9
1.4.4.3. Tratamiento enzimático	9
1.5. Análisis estadístico.....	10
CAPITULO II.....	11
RESULTADOS	11
2.1. Cuantificación de proteínas (Bradford)	11

2.2. Estimación de peso molecular de los precipitados concentrados semi purificados	11
2.3. Capacidad antagónica de los sobrenadantes concentrados frente a bacterias patógenas.....	12
2.4. Actividad bacteriocinogénica de los sobrenadantes concentrados.....	14
2.4.1. Estabilidad frente a pH	14
2.4.2. Estabilidad térmica	16
2.4.3. Estabilidad frente a enzimas	17
CAPITULO III.....	20
DISCUSIONES	20
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFIA	24
ANEXOS	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de patrones de Albumina para cuantificación por método de Bradford (Bradford, 1976)	6
Tabla 2. Distribución y volumen de carga de PCSP dializados en el gel de poliacrilamida....	7
Tabla 3. Volumen de sobrenadante concentrado mezclado con bacterias patógenas.....	8
Tabla 4. Preparación de enzimas	9
Tabla 5. Volumen de enzimas y sobrenadante concentrado.....	10
Tabla 6. Cuantificación de proteínas de los sobrenadantes y muestra control MRS por Bradford.....	11
Tabla 7. Test de Fisher aplicado a la capacidad antagónica de SC1	13
Tabla 8. Test de Fisher aplicado a la capacidad antagónica del SC2.....	13
Tabla 9. Test de Fisher aplicado sobre el efecto del pH del SC1	15
Tabla 10. Test de Fisher aplicado sobre el efecto del pH del SC2.....	15
Tabla 11. Test de Fisher aplicado sobre el efecto de la temperatura del SC1	16
Tabla 12. Test de Fisher aplicado sobre el efecto de la temperatura del SC2.....	17
Tabla 13. Test de Fisher aplicado en el efecto de las enzimas del SC1	18
Tabla 14. Test de Fisher aplicado en el efecto de las enzimas del SC2.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel Bolt™ 8% Bis-Tris Plus de electroforesis con muestras de precipitados concentrados dializados. M: Ladder Mark12™ Unstained Standard, C: muestra control de Nisina E234 de 0,6 mg (30 µL), B1: PCSP dializado de <i>L. plantarum</i> strain gp108 (30 µL), B2: PCSP dializado de <i>E. faecium</i> (30 µL).....	12
Figura 2. Capacidad antagonica del sobrenadante concentrado de <i>L. plantarum</i> strain gp108 (SC1). 10% - 50%: porcentaje de volumen de SC1 con respecto al volumen total, antibiótico: control positivo (cloranfenicol 5 µg/mL).	12
Figura 3. Capacidad antagonica del sobrenadante concentrado de <i>E. faecium</i> (SC2). 10%-50%: porcentaje de volumen de SC2 con respecto al volumen total, antibiótico: control positivo (cloranfenicol 5 µg/mL).....	13
Figura 4. Efecto del pH en la actividad bacteriocinogénica del sobrenadante concentrado de <i>L. plantarum</i> strain gp108 (SC1)	14
Figura 5. Efecto del pH en la actividad bacteriocinogénica del sobrenadante concentrado de <i>E. faecium</i> (SC2).....	15
Figura 6. Efecto de la temperatura en la actividad bacteriocinogénica del sobrenadante concentrado de <i>L. plantarum</i> strain gp108 (SC1)	16
Figura 7. Efecto de la temperatura en la actividad bacteriocinogénica del sobrenadante concentrado de <i>E. faecium</i> (SC2)	16
Figura 8. Efecto de las enzimas en la actividad bacteriocinogénica del sobrenadante concentrado de <i>L. plantarum</i> strain gp108 (SC1)	17
Figura 9. Efecto de las enzimas en la actividad bacteriocinogénica del sobrenadante concentrado de <i>E. faecium</i> (SC2)	18

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Saturación de sulfato de amonio 29
Anexo 2. Curva de patrones de BSA 30

Karla Alexandra Crespo Narváez

Trabajo de Graduación

María Fernanda Rosales Medina/ Rodrigo Caroca Cáceres

Julio, 2018

**Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica
aisladas de quesos frescos**

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial varios grupos poblacionales presentan sensibilidad a diversos compuestos químicos que se usan en los alimentos, siendo estos los aditivos alimentarios que ayudan alargar la vida útil de un producto y a su vez evitar la proliferación de microorganismos. (Castellano et al, 2008). La ingesta de estos componentes ha causado severas molestias en los consumidores a lo largo de los años, debido que se ha asociado con intoxicaciones o alergias, por lo tanto, la población se ha limitado con ciertos alimentos. Según la AEPNAA (Asociación Española de Personas con Alergia a Alimentos y Látex) se estima que entre un 5-10% de urticarias crónicas en población adulta se deben, al menos en parte, a algún tipo de reacción adversa a aditivos.

Los agentes microbiológicos y las enfermedades de transmisión alimentaria que provocan los alimentos contaminados con algún microorganismo son un problema de salud pública en varios países. Este hecho motiva la búsqueda de metodologías alternativas para conservar los alimentos (Fuente & Eleaz, 2010). Existe una demanda importante por parte de los consumidores en alimentos naturales o que sean mínimamente procesados y sin conservadores sintéticos. Generalmente la población considera que muchos productos procesados presentan una calidad nutricional baja y que los aditivos sintéticos son peligrosos para la salud. Como resultado de estas demandas, se tiene gran interés en desarrollar alimentos con agentes antimicrobianos naturales, los cuales deben ser inocuos, cumplir con los parámetros de calidad y seguridad de las normativas aplicables para estos y además presentar un alto espectro de efectividad contra microorganismos (Beristain et al, 2012)

Bacteriocinas: características y modo de acción

Las bacterias obtenidas de alimentos de origen lácteo, llamadas bacterias ácido lácticas (BAL), tienen gran importancia dentro de la industria alimentaria, debido a su capacidad para controlar microorganismos patógenos y alterantes (González et al, 2003). Esto se da gracias a que estas bacterias pueden producir compuestos de diferente naturaleza con actividad bacteriocinogénica, entre los que se encuentran: peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, reuterina y bacteriocinas (Olvera & C, 2015).

Las bacteriocinas se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores debido a que ejercen acción antibacteriana. Estas representan un gran potencial consiguiendo reemplazar a los conservadores químicos, ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios. Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares (González et al, 2003). Estas moléculas son compuestos de naturaleza peptídica, sintetizadas ribosomalmente, estables en rangos amplios de pH y algunas son resistentes a tratamientos térmicos (Chen & Hoover, 2003). Las bacteriocinas han sido clasificadas dependiendo de los microorganismos productores, peso molecular, propiedades físicas, entre otros. Se dividen en 5 clases: clase I o lantibióticos son péptidos de muy bajo peso molecular (<5kDa), resistentes a altas temperaturas y con aminoácidos no comunes en su estructura; la clase II son péptidos pequeños termoestables (<10kDa), sin aminoácidos modificados en su estructura; la clase III son péptidos termolábiles de alto peso molecular (>30 kDa); la clase IV son péptidos grandes y de estructura compleja asociados a carbohidratos y lípidos y la clase V son péptidos con una estructura que no posee modificaciones post traduccionales (Heredia et al, 2017)

Entre los mecanismos de acción de las bacteriocinas se destacan varias características esenciales, como la formación de poros en la membrana citoplasmática de células sensibles permitiendo la salida de compuestos pequeños como iones de K o ATP. Las bacteriocinas poseen una carga neta positiva que favorece su interacción con la carga negativa de la membrana de las bacterias Gram-negativas (Cleveland et al, 2001). La hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, así como su flexibilidad, que le permite realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno de interacción con la membrana. A pesar de que estas características varían de molécula a molécula, todas son importantes para la actividad antimicrobiana (López et al, 2008).

Producción y purificación de bacteriocinas

Es necesario contar con grandes volúmenes de cultivos antes de iniciar la producción de bacteriocinas y se requieren condiciones de crecimiento bien definidas. Por ejemplo, es importante elegir una composición y pH correctos del medio de cultivo y también es clave un control de adecuado de temperatura (Moreira dos Santos, 1999). Las bacteriocinas son secretadas al medio extracelular junto con otras proteínas, lo que hace necesario su purificación. El propósito de este proceso es retener la mayor cantidad de proteína funcional con el menor número de contaminantes. Durante la purificación y subsiguiente almacenamiento de la proteína, pueden ocurrir muchos procesos que afecten su calidad como la desnaturalización. Uno de los métodos de purificación de proteínas más comúnmente utilizados es la precipitación selectiva con sulfato de amonio. Esta es una sal altamente soluble y de bajo costo, lo que favorece su uso al representar una alternativa económica para la purificación. (Bollag, 1996). Debido a la dificultad de la purificación de bacteriocinas, algunos investigadores trabajan con el extracto crudo que las contiene. Antes de evaluar la capacidad bactericida de las bacteriocinas presentes en el extracto crudo, es importante la

neutralización de este, para inhibir la acción de los ácidos orgánicos ahí presentes (Vásquez & Suárez, 2008). Para evaluar la cantidad y la calidad de la proteína deben realizarse ciertos análisis como es el caso de la electroforesis (Ritchie, 2012).

Electroforesis de proteínas

Las cantidad y calidad de las bacteriocinas pueden ser evaluadas por medio de electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio). La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la determinación del PM (peso molecular) de las subunidades de proteínas. Mediante SDS-PAGE se analizan las cadenas proteicas individuales, en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y, por ende, se ha distendido toda la cadena proteica. Bajo estas condiciones la migración de las moléculas obedece fundamentalmente a su PM. (Pérez & García, 2001).

La electroforesis de proteínas se realiza en cámaras verticales, emplea geles de acrilamida de dos capas a diferente concentración de acrilamida. El gel superior tiene un tamaño de poro grande y se prepara con un amortiguador. Estas condiciones proporcionan un ambiente para que las proteínas recubiertas con SDS se concentren. La adición de SDS a los geles de poliacrilamida es opcional; cuando se hace, mantiene a las proteínas en estado extendido y además confiere carga, lo que facilita la movilidad electroforética de la proteína mediante el gel y permite que la movilidad dependa exclusivamente de su masa molecular.

Por otro lado, el gel de resolución es un gel de poliacrilamida de poro pequeño (3 - 30% de monómero de acrilamida). En este las macromoléculas se separan de acuerdo con su tamaño. El gel se prepara con un amortiguador de Tris/HCl con pH de 8.8. Para la electroforesis se utiliza diferentes tipos de buffer: el buffer de corrida es de la misma composición y pH que el buffer con el que se prepara el gel de resolución, este proporciona el medio para la transmisión de la corriente eléctrica y mantiene el pH sin variaciones mientras se realiza la corrida; el buffer de carga es un amortiguador, tiene como fin brindar peso, densidad y color a la muestra, lo que facilita su depósito en el pocillo y evita su salida del gel, también permite, además, monitorear el corrimiento de la muestra en el gel. Así mismo, otro elemento importante son los marcadores de peso molecular, estos son una mezcla de moléculas de proteínas de tamaño conocido que permiten determinar por comparación el tamaño de las moléculas (proteínas) contenidos en las muestras sometidas a electroforesis (López de la Mora & Sandoval, 2013).

La tinción del gel de electroforesis contiene una disolución de un colorante que se une de manera específica a los componentes de la muestra y precipita a los componentes separados en la posición en la que se encuentren. La tinción con Coomassie se usa para la determinación de proteínas cuando estas son abundantes (García Pérez, 2000).

Actividad inhibitoria: método turbidimétrico

El efecto de distintos factores físico-químicos sobre la actividad de una bacteriocina no sólo tiene el fin de caracterizarla, sino también sirve para inferir su posible aplicación industrial, ya que las temperaturas, variaciones de pH, entre otros factores, son algunas de las condiciones que debe resistir una bacteriocina para ser útil como agente inhibidor de microorganismos no deseados en procesos alimenticios (Farías, 1996). La actividad bacteriocinogénica y capacidad antagonista de las bacteriocinas se evalúa a través de pruebas de inhibición *in vitro* por métodos como la difusión de pozos y también por medio de densidad óptica (DO). Diferentes tipos de bacterias, independientemente del tamaño celular, se pueden medir por medio de la espectrofotometría. Esto quiere decir que, en soluciones, la absorbancia es directamente proporcional al peso seco, independientemente del tamaño celular del microorganismo. El método turbidimétrico tiene la ventaja de estimar de manera rápida el crecimiento de una población microbiana, entonces, la turbidez se determina por la DO que puede ser expresada como absorbancia (Acebo & Hernández, 2013). A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula fotoeléctrica. La metodología es útil con suspensiones de densidad microbiana baja y con cultivos en donde los microorganismos son unicelulares y con un tamaño de unos cuantos micrómetros, características que les permiten mantenerse suspendidos y homogéneamente distribuidos (Acebo & Hernández, 2013).

Problemática y objetivos

En nuestra localidad existen pocos estudios sobre péptidos bioactivos (bacteriocinas) generados por las BAL autóctonas, por lo tanto, no se ha logrado hallar datos completos de caracterización sobre estos compuestos. En vista de este antecedente, se considera importante realizar estudios a fondo sobre este tema ya que aportaría información relevante sobre el potencial bacteriocinogénico de las cepas aisladas de alimentos de origen lácteo producidos en nuestra zona. Además, las potenciales bacteriocinas identificadas, podrían ser evaluadas por su capacidad para controlar el crecimiento de bacterias patógenas y/o alterantes de los alimentos. Este trabajo tiene como objetivo obtener péptidos bioactivos semi purificados a partir de cepas nativas de BAL aisladas de quesos que se producen en la zona del Austro del Ecuador específicamente Bulán-Paute y llevar a cabo su caracterización bioquímica.

CONCLUSIONES

Los sobrenadantes concentrados obtenidos de cepas seleccionadas de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos de la zona del Austro del Ecuador específicamente Bulán-Paute, correspondientes a *L. plantarum* strain gp108 y *E. faecium*, fueron caracterizados bioquímicamente, se evaluó la capacidad antagónica y la actividad bacteriocinogénica por medio de tratamientos térmicos, estabilidad de pH y acción de enzimas.

Se determinó que *L. plantarum* strain gp108 y *E. faecium* secretan péptidos, los mismos que se encuentran en una concentración de 301,72 µg/mL y 323,02 µg/mL y a su vez se estimó que estos compuestos secretados son de bajo peso molecular (~3,5 kDa). Por lo tanto, se concluye que se trata de proteínas llamadas bacteriocinas ya que se ha reportado que estos son los tamaños esperados para este tipo de compuestos producidos por las BAL.

Los SC de *L. plantarum* strain gp108 y *E. faecium* mostraron efecto antagónico a diferentes concentraciones tanto para las bacterias Gram negativas y Gram positivas. *E. coli* y *S. aureus* mostraron ser más sensibles a estos compuestos. En cuanto a la actividad bacteriocinogénica se observó que estos compuestos permanecen estables a pH 5 a 7, son termoestables y frente a la acción enzimática se evidenció que los compuestos secretados por estas BAL son de naturaleza proteica.

Por lo tanto, los SC son de naturaleza proteica con un peso molecular bajo perteneciendo a los no lantibióticos. Estos péptidos pueden ser usados en procesos previos a ciertos tratamientos en la industria de los alimentos para reducir cargas bacterianas y de esta manera evitar tratamientos bruscos, así mismo pueden ser una opción atractiva como conservadores naturales para el desarrollo de alimentos mínimamente procesados. En cuanto a la toxicidad se podrían realizar estudios posteriores sobre este tema para poder determinar si los compuestos producidos por este tipo de bacterias ácido lácticas son generalmente considerados como seguros para poder ser utilizados en la industria alimenticia.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarado, C., & Díaz R., C. (2009). Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera. *Revista Salud Pública y Nutrición* , 1-35. Obtenido de Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes: <http://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/viewFile/230/212>
- Vallejo, M., Ledesma, P., & Rogelio M., E. (2013). Caracterización parcial de enterocinas producidas por una cepa de *Enterococcus faecium* aislada de leche ovina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 1315-2556.
- Acebo G., D., & Hernández G. , A. (2013). Los métodos tubidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*.
- AEPNAA. (s.f.). *Aditivos. Reacciones adversas a los aditivos alimentarios*. Obtenido de Asociación española de personas con alergia a alimentos y latex : <https://www.aepnaa.org/ver/aditivos>
- Ahmadova , A., Todorov , S., Choiset , Y., Rabesona , H., Mirh, T., Kuliyevev , A., . . . Haertlé , T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control* 30, 631-641.
- Alvarado R., C., & Díaz R., C. (2009). EFECTO ANTAGÓNICO DE *Lactobacillus plantarum* AISLADO DE PASTIZAL DE FINCA LECHERA. *Revista Salud Pública y Nutrición* .
- Amortégui D. , J. (Junio de 2012). *Purificación y caracterización de bacteriocinas producidas por dos cepas nativas de Lactobacillus plantarum* . Obtenido de Universidad de Javeriana. Facultad de Ciencias : <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11844/AmorteguiDiazJairoEmmanuel2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Aymerich , T., Garriga , J., Ylla, J., Vallier, J., Monfort , J., & Hugas, M. (2000). Aplicación de enterocinas como bioconservantes contra *Listeria innocua* en productos cárnicos. *Revista de Protección de Alimentos*, 721-726.
- Barbosa, I. A. (2000). *PURIFICACION POR METODOS TRADICIONALES, POR ADSORCION ESPECIFICA Y ESTABILIDAD DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR Enterococcus Faecium UQ1* . Obtenido de UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO : <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/5053/1/R1004381.pdf>
- Beristain Bauza, S., Palou, E., & Lopez Malo, A. (2012). Bacteriocinas: Antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 64-78.
- Bhunja, A., Johnson , M., & Ray, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 261-268.
- Bollag , M., Edelstein , S., & Rozycki, M. (1996). *Protein methods*. Nueva York.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 248-254.
- Castellano , P., Belfiore , C., Fadda , S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 483-499.

- Chen, H., & Hoover, D. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 82-100.
- Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I., & Hernández, P. (2001). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, 281-305.
- Cleveland, J., Montville, T., Nes, I., & Chikindas, M. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology - Elsevier*, 1-20.
- Cotter, P., D., & C. Ross, R. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews*, 777-787.
- Cristóbal D., R. (2008). *Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias*. Obtenido de Universidad Nacional Mayor de San Marcos : http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/235/Cristobal_dr.pdf?sequence=1
- Ennahar, E., Sashihara, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 85-106.
- Fuente Salcido, N., & Eleaz, J. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria Revista Científica Multidisciplinaria*, 43-52.
- García Pérez, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnostico*, 31-41.
- Garriga, M., Hugas, M., Pascual, M., Aymerich, M., & Monfort, J. (2002). Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. *Food Microbiology*, 519-528.
- Giraffa, G., Neviani, E., & Torri, T., G. (1994). Antilisterial activity by enterococci in a model predicting the temperature evolution of Taleggio, an Italian soft cheese. *Journal of Dairy Science*, 1176-1182.
- González, B., Arca, P., Mayo, B., & Suárez, J. (1994). Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Applied and Environmental Microbiology (AEM)*, 2158-2163. Obtenido de *Environ Microbiol.*; 60 (6): 2158-2163.
- González Martínez, B., Gómez Treviño, M., & Jiménez Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*.
- González, B., Arca, P., Mayo, B., & Suarez, J. (1994). Detection, Purification, and Partial Characterization of Plantaricin C, a Bacteriocin Produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain of Dairy Origin. *Applied and Environmental Microbiology (AEM)*, 2158-2163.
- Grande, M., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., N. B., O., Maqueda, M., . . . Galvéz, A. (2006). Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 185-194.
- Granum, P., & Lund, T. (1977). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett.*, 157-223.
- Harris, E., & Angal, S. (1994). Protein purification methods a practical approach. *Oxford University Press*, 317.
- Harris, E., & Angal, S. (1994). Protein purification methods: A practical approach. *Oxford University Press*. . En *Biochemistry and Molecular Biology Education* (págs. 39-40).

- Harshada , M., & Prakash, T. (2012). Antimicrobial Activity Studies of Bacteriocin Produced by Lactobacilli Isolates from Carrot Kanji. *Journal of Biological Sciences*, 6-10.
- Heredia Castro, P., Hernández Mendoza, A., González Córdova , A., & Vallejo Cordoba , B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340–346.
- Herranz S., C. (Octubre de 2001). *Caracterización bioquímica y genética de enterocinas producidas por las cepas de Enterococcus faecium de origen cárnico: Optimización de la producción molecular de la acción de la enterocina P de Enterococcus faecium P13*. Obtenido de Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos): <http://eprints.ucm.es/5250/1/T24943.pdf>
- Hu, H., Moake , M., & Worobo, R. (2006). Genetic characterization of antimicrobial peptides. En K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto, & R. Levin , *Food Biotechnology* (págs. 1349-1478). Florida: Segunda edición, CRC Press.
- Jaramillo G., D., Meléndez, A., & Sánchez M., O. (2010). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.*, 193-209.
- Jiménez D., R., Ríos S. , R., Desmazeaud , M., Ruiz B., J., & Piard , J. (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by Lactobacillus plantarum LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1416-1422.
- Jimenez D., R., Rios S., R., Ruiz B., J., Desmazeaud, M., & Piard , J. (1993). Plantaricin S ant T two new bacteriocins produced by Lactobacillus plantarum LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1416-1424.
- Johnson, M. (2016). Cuantificación de proteínas. *Revista Journal Labome*.
- Lee , N., & Paik , H. (2001). Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of Lactococcus lactis NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Microbiology*, 17-24.
- Lee, N. K., Paik, & H. D. (2001)). Partial characterisation of lactocin NK24, a newly identified bacteriocin of Lactococcus lactis NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Microbiology* , 17-24.
- López de la Mora , D., & Sandoval R., A. (2013). *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Capítulo 13. Electroforesis*. McGraw-Hill.
- López M. , J., Ochoa Z., A., Santoyo P., G., Anaya L., J., Medina M., E., Martínez T., M., & Loeza L. , P. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 49-57.
- Mackay, C., Arendse , V., & Hastings , J. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology*, 34: 1-16.
- Manual de usuario de espectrofotometro Evolution 60 Flexible UV-Vis.* (s.f.). Obtenido de https://www.upc.edu/sct/es/documents_equipment/d_156_id-636.pdf+&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=ecno
- Martínez F., B. (1996). *Bacteriocinas de Lactococcus lactis aislados de quesos asturianos: Nisina Z y Lactococina 972*. Obtenido de Universidad de Oviedo. CSIC - Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA): <http://digital.csic.es/handle/10261/8416>

- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R., & Manicardi, G. (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 93-198.
- Monroy Dosta, M., Castro Barrera, T., Fernandez Perrino, F., & Mayorga Reyes, L. (2009). Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ResearchGate*, 63-72.
- Montalbán L., M., Sánchez H., M., Valdivia, E., Martínez B., M., & Maqueda, M. (2011). Are bacteriocins underexploited? novel applications for old antimicrobials. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 1205-1220.
- Moreira dos Santos, W. (1999). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp 347, de origen carníco. *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*.
- Moreno, M., Baert, B., Denayer, S., & Cornelis, P. (2008). Characterization of the amylovorin locus of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, producer of a bacteriocin active against *Pseudomonas aeruginosa*, in combination with colistin and pyocins. *Research Letter*, 199-206.
- Morgan S., A., Hill, C., Ross, R., Marx, S., Hartmeier, W., & Arendt, E. (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. *International Journal of Food Microbiology*, 241-249.
- Nes, I., Dzung, B., Håvarstein, L., & Brurberg, M. (1996). Biosynthesis of bacteriocins of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70-113.
- Nettles, C., & Barefoot, S. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 338-356.
- Núñez, G., Cayré, M., Castro, M., & Garro, O. (2002). *Efectividad y modo de acción de nisina sobre Lactobacillus fructivorans*. Obtenido de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Ciencias Exactas. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/08-Exactas/E-004.pdf>
- Oh, S., H., & W., W. (2000). Caracterización y purificación de una bacteriocina producida por un posible cultivo probiótico, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*, 2747-2752.
- Olsen, E. (1986). *Métodos Ópticos de Análisis*. Barcelona: Ed. Reverté.
- Olvera García, M., & C. E., M. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *Revista de la SMBB (Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería)*, 25-27.
- Parente, E., & Hill, C. (1992). Inhibition of *Listeria* in buffer, broth, and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Journal of Food Protection*, 503-508.
- Pastrana, L., P. Guerra, N., & López C., M. (2007). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Estado de arte y producción a partir de efluentes de la industria alimentaria. En *Avances en seguridad alimentaria* (pág. 254). España: Altaqa.
- Pérez, H., & García, M. (2001). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Revista Universo Diagnóstico*, 1-4.
- Piard, J., & Desmazeaud, M. (1992). Inhibiting factor produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 113-142.
- Ritchie, C. (17 de Noviembre de 2012). *Purificación de proteínas*. Obtenido de Research. Labome: <http://www.labome.es/method/Protein-Purification.html>

- Rodriguez P., J., & Torres L., L. (2006). *evaluacion de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de bacterias acido lacticas aisladas de suero costeño*. Obtenido de Universidad de la sabana: <http://intellectum.unisabana.edu.co/handle/10818/4749?locale-attribute=en>
- Ruiz M., K., Ortega F., D., Hoyos C., J., & Torres, G. (2016). Selección de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico de interés en el sector piscícola. *Agronomía Colombiana* , 1009-1012.
- Saá C., M. (2016). *Caracterización bioquímica del extracto crudo de bacteriocina obtenido de una bacteria ácido láctica aislada de suero de queso*.
- Sahl , H., & Bierbaum , G. (1998). Lantibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-Positive bacteria . *Annual Review of Microbiology*, 41-79.
- Skoog, D., & West, D. (1989). *Análisis Instrumental*. México: Ed. Interamericana.
- Suma, K., Misra , M., & Varadaraj, M. (1998). Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium . *International Journal of Food Microbiology*, 17-25.
- Tagg, J., Dajani, A., & Wannamaker, L. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriology Reviews*,, 722–756.
- Todorov , S., & Dicks , L. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolates from molasses produces bacteriocins active against Gram negative bacteria . *Enzyme and Microbial Technology* , 318-326 .
- Todorov , S., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., Leblanc, J., & Franco, B. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) - from isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, 1351-1363.
- Tulini F., L., Gomes B., C., & De Martinis E., C. (2011). Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* 130 isolated from mozzarella cheese. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 155-159.
- Vásquez, M., & Suárez, H. (2008). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. . *Revista Chile de Nutricion* , 64-71.
- Vélez Zea, J., Gutiérrez Ramírez, L., & Montoya Campuzano, O. (2015). Evaluación de la actividad bactericida de bacterias ácido lácticas aisladas en Calostro de Cerdas Frente a *Salmonella typhimurium*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 7481-7486.
- Vidal Salgado, L., & Vargas Hernández, C. (2014). Medición de la absorbancia óptica de soluciones acuosas mediante la instrumentación virtual y el control. *Scientia Et Technica*, 49-53.
- Willey , J., & Donk , W. (2007). Lantibiotics: Peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology*, 477-501.
- Yang , R., & Ray , B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology Journal* , 281-291.
- Zapata , S., Muñoz , J., Montoya O., I., Ruiz O., S., & Gutiérrez P., A. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y su caracterización parcial de su bacteriocina. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 75-82.

ANEXOS

Anexo 1. Saturación con sulfato de amonio

Con el fin de determinar los gramos necesarios para alcanzar el porcentaje de saturación con sulfato de amonio para precipitar las proteínas presentes en los sobrenadantes, se utilizó la página web (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>), un programa en línea donde se calculó la cantidad exacta de este químico sin la necesidad de usar ecuaciones o formulas extras para la precipitación siguiendo los siguientes pasos como se muestra a continuación:

Anexo 1. Saturación de sulfato de amonio

<p><i>EnCor Biotechnology Inc. 540, 4949 SW 41st Blvd. Gainesville Florida 32608 Tel (352) 372 7022 Fax (352) 372 7066</i></p>	
<p>Calculador de sulfato de amonio:</p>	
<p>La precipitación con sulfato de amonio es un medio simple y efectivo de fraccionar las proteínas. Se basa en el hecho de que a altas concentraciones de sal se supera la tendencia natural de las proteínas a no agregarse, ya que las cargas superficiales se neutralizan. La neutralización de carga significa que las proteínas tenderán a unirse, formar grandes complejos y, por lo tanto, son fáciles de precipitar mediante centrifugación suave. Dado que cada proteína comenzará a agregarse a una concentración de sal característica, este enfoque proporciona una forma simple de enriquecimiento para proteínas particulares en una mezcla, y se usa, por ejemplo, para aislar inmunoglobulinas de sueros. Es bastante fácil llevar una preparación al 50% de saturación simplemente agregando un volumen igual de sulfato de amonio saturado. Es más problemático hacer soluciones de mayor porcentaje de saturación ya que puede que tenga que agregar grandes volúmenes de sulfato de amonio saturado. Por lo general, es más fácil agregar Sulfato de Amonio sólido a su muestra, pero calcular cuánto agregar lleva bastante tiempo. El siguiente programa calcula la cantidad de sulfato de amonio sólido que necesita agregar a un volumen específico de una solución para obtener un porcentaje de saturación específico a una temperatura específica;</p>	
<p>Seleccione la temperatura a la que está</p>	
<p>trabajando (25 °C es el valor predeterminado):</p> <p> <input type="radio"/> 0 °C <input type="radio"/> 4 °C <input type="radio"/> 10 °C <input type="radio"/> 20 °C <input checked="" type="radio"/> 25 °C </p>	
<p>Ingrese el volumen de inicio de la solución en mls:</p>	<input type="text"/>
<p>Saturación porcentual deseada Sulfato de amonio:</p>	<input type="text"/>
<p>Ingrese el porcentaje de inicio de saturación de sulfato de amonio:</p>	<input type="text"/>
<p><input type="button" value="Presione para Calcular"/></p>	

Anexo 2. Curva de patrones de BSA

