

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Producción de bacteriocinas por cepas de lactobacillus
aisladas de chicha de jora**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Elena Luzgarda Quillama Polo

ASESOR

Dolores Bazalar de Valdivia

Lima – Perú

1998

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(UNIVERSIDAD DEL PERU, DECANA DE AMERICA)

ESCUELA DE POST-GRADO

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
UNIDAD DE POST-GRADO



PRODUCCION DE BACTERIOCINAS POR CEPAS DE
LACTOBACILLUS AISLADAS DE CHICHA DE JORA

TESIS

PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE MAGISTER EN
MICROBIOLOGIA

ELENA LUZGARDA QUILLAMA POLO

LIMA - PERU

1998

JURADO EXAMINADOR

R-D-N° 114-UPG-FFB-98

- PRESIDENTE :** Dr. Gerardo Gamarra Ballena
Profesor Principal.
Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM
Director del Instituto de Microbiología
- ASESORA :** Dra. Dolores Bazalar de Valdivia
Profesora Principal.
Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM
Coordinadora de la Maestría de Microbiología
- MIEMBROS :** Dra. Luisa Negrón Ballarte
Profesora Principal.
Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM
Unidad de Post-Grado
- Dra. Augusta Córdova Rivera
Profesora Principal.
Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM
Unidad de Post-Grado
- Mg. Pablo Bonilla Rivera
Profesor Principal.
Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM
Unidad de Post-Grado

DEDICATORIA

A mi querido padre
Juan Crisóstomo
Quillama Molina por su
comprensión, ejemplo
de trabajo y amor
paternal.

A mis hermanos Hugo, América,
J. Guillermo, Elías y Rosa por el
cariño y afecto que me brindan y
en especial a mi sobrinita Angela
Miluska por su nobleza y amor
incondicional.

A las comunidades de Chalhuanca
(Apurímac) e Illimo y Mórrope
(Lambayeque) por el apoyo que me
brindaron y por preservar la
tecnología nativa de la elaboración
de la Chicha de Jora, en cuya
fuente se encuentra el mundo
misterioso de los microorganismos
silvestres.

Al Bqco. Sergio Pasteris y a la Dra. Marta Elena Farias por su amistad e invaluable apoyo científico durante mi estadía en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA).

Mi profunda gratitud a los biólogos Ramsés Salas, Enrique Escobar y Vania Mallqui por sus aportes científicos y apoyo profesional en la purificación de la bacteriocina.

A mis alumnos Wilber Pineda, José Rivera, Elizabeth Sarmiento, Zuleyka Vicente y Erika Limas por su participación y apoyo incondicional durante el desarrollo de la parte experimental del proyecto.

A mi colega Ruth García por su confianza y en especial por su amistad y apoyo profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por las facilidades brindadas.

Mi agradecimiento a todos los profesionales que trabajan en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM por su paciente colaboración y amistad.

Al Consejo Superior de Investigaciones (C.S.I.) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por el financiamiento brindado.

AGRADECIMIENTOS

Mi profunda gratitud a la Dra. Dolores Bazalar de Valdivia, por su asesoramiento, estímulo y orientación oportuna.

A la Dra. María Cristina Manca de Nadra, mi reconocimiento y eterna gratitud por contribuir con mi formación científica y humana y por su permanente guía desde CERELA (Tucumán - Argentina).

Mi agradecimiento a la Dra. Juana María Coha González, por su permanente estímulo, valiosas sugerencias y constante apoyo.

CONTENIDO

Resumen	1
1. Introducción	3
2. Generalidades sobre bacterias lácticas productoras de sustancias antimicrobianas	5
2.1. Bacterias lácticas: Habitat. Características morfológicas	5
2.2. Clasificación de bacterias lácticas en base a las rutas metabólicas	5
2.3. Producción de sustancias inhibitorias por bacterias lácticas	6
2.4. Bacteriocinas	6
2.4.1. Clasificación de bacteriocinas	6
2.4.2. Principales bacteriocinas sintetizadas por bacterias lácticas	7
2.4.3. Espectro de inhibición	7
2.4.4. Propiedades bioquímicas	9
2.4.5. Mecanismos de acción	11
2.4.6. Aspectos genéticos en la producción de bacteriocinas	12
2.5. Estudios históricos de las sustancias inhibitorias producidas por bacterias lácticas	14
3. Materiales y Métodos	20
3.1. Material Biológico: Cepas bacterianas	20
3.2. Condiciones de Cultivo	20
3.3. Caracterización de las sustancias antimicrobianas producidas por cepas de Lactobacillus	21
3.3.1. Efectos de la tripsina, pepsina, catalasa y neutralización con hidróxido de sodio	21
3.3.2. Sensibilidad a diferentes temperaturas, pH y solventes orgánicos	21
3.4. Purificación parcial de la bacteriocina producida por la cepa Lactobacillus plantarum 5N	22
3.4.1. Precipitación con sulfato de amonio	23
3.4.2. Concentración por liofilización	23
3.4.3. Estimación de la concentración de proteínas y determinación de la actividad inhibitoria	23
3.4.4. Cromatografía en gel de filtración	24

3.4.5. Caracterización de la bacteriocina producida por <i>Lactobacillus plantarum</i> 5N por electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio	24
4. Resultados	26
4.1. Caracterización de las sustancias antimicrobianas producidas por cepas silvestres de <i>Lactobacillus</i> aisladas de chicha de jora	26
4.2. Sensibilidad a diferentes temperaturas y pH de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de <i>Lactobacillus</i>	26
4.3. Determinación de la actividad inhibitoria de las bacteriocinas sintetizadas por cepas de <i>Lactobacillus</i>	26
4.4. Caracterización de la bacteriocina producida por la cepa seleccionada <i>Lactobacillus plantarum</i> 5N	27
4.4.1 Determinación de la máxima producción de la sustancia antimicrobiana.	27
4.4.2. Determinación de la concentración de proteínas de la sustancia antimicrobiana producida por <i>Lactobacillus plantarum</i> 5N	27
4.4.3. Actividad inhibitoria del sobrenadante concentrado por liofilización (fracción 2)	28
4.4.4. Sensibilidad de la sustancia antimicrobiana producida por <i>Lactobacillus plantarum</i> 5N a diferentes temperaturas, pH y solventes orgánicos	28
4.4.5. Estimación del peso molecular por electroforesis	28
5. Discusión	29
6. Conclusiones	31
7. Recomendaciones	32
8. Referencias Bibliográficas	33
9. Anexos	43

RESUMEN

Para determinar la capacidad de producción de bacteriocinas por cepas de ***Lactobacillus*** aisladas de Chicha de Jora, los sobrenadantes de los cultivos activos fueron tratados independientemente con hidróxido de sodio 2 N, catalasa 1 mg/ml, pepsina 2 mg/ml y tripsina 2 mg/ml. Asimismo fueron tratados con solventes orgánicos y sometidos a diferentes temperaturas y pH por 60 minutos.

La separación de la bacteriocina sintetizada por ***Lactobacillus plantarum*** 5N, se realizó por los métodos de precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación y por concentrado por liofilización. El producto activo obtenido, fue purificado por cromatografía en gel de filtración Sephadex G-100 y el peso molecular fue estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

La actividad inhibitoria tanto de las cepas parcialmente caracterizadas como de la cepa seleccionada ***Lactobacillus plantarum*** 5N, se realizó en los medios Man Rogosa Sharpe, Luria y Caldo Cerebro Corazón agarizados al 1.5%, a pH 6.5 y pH 7.0 respectivamente, utilizando cepas indicadoras Gram positivas y Gram negativas.

De 14 cepas productoras de sustancias inhibitorias, 9 cepas de ***Lactobacillus*** fueron bacteriocinogénicas, de las cuales 3 mostraron una notable sensibilidad frente a la tripsina y pepsina, y mayor estabilidad a 100°C por una hora a pH 3.0, 7.0 y 10.0. La sustancia antimicrobiana producida por ***Lactobacillus plantarum*** 5N, resultó además ser estable frente a etanol al 25% y a cloroformo al 10 y 20% respectivamente.

De esta forma, se logró detectar por primera vez, cepas nativas de ***Lactobacillus*** productoras de bacteriocinas a partir de chicha de jora, siendo la mejor cepa ***Lactobacillus plantarum*** 5N por revelar una sustancia de naturaleza proteica de aproximadamente 6.2 kDa e inhibir tanto a bacterias taxonómicamente afines y bacterias patógenas contaminantes de alimentos Gram positivas.

SUMMARY

In order to determinate the bacteriocins production ability of ***Lactobacillus*** strains isolated from Chicha de Jora, the active culture supernatans were treated independently with NaOH 2 N, 1 mg/ml catalase, 2 mg/ml pepsin and 2 mg/ml trypsin. Also they were treated with organic solvents and were submitted to different temperatures and pH for 60 minutes.

The separation of the synthesized bacteriocin from ***Lactobacillus plantarum*** 5N, was realized by precipitation method with ammonium sulfate at 60% of saturation and by concentrate by lyophilization.

The obtained active product was purified by Sephadex G-100 filtration gel chromatography and the molecular weight was estimated by sodium dodecyl sulphate poliacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

The inhibitory activity so much of strains partially characterized as of strain selected ***Lactobacillus plantarum*** 5N, was realized in the mediums Man Rogosa Sharpe, Luria and Brain-Heart broth agarized at 1.5%, to pH 6.5 and 7.0 respectively, using Gram-positive and Gram-negative strains as indicators.

From 14 strains producer of inhibitory substances, 9 ***Lactobacillus*** strains were bacteriocinogenic, of those which 3 showed a remarkable sensibility to trypsin and pepsin, and major stability at 100°C for 1 hour to pH 3.0, 7.0 and 10.0. The antimicrobial substance produced by ***Lactobacillus plantarum*** 5N, also resulted be stable in front of ethanol at 25% and chloroform at 10-20% respectively.

In this way, it was achieved to detect for the first time, native strains of ***Lactobacillus*** producers of bacteriocins, isolated from chicha de jora, being the best strain ***Lactobacillus plantarum*** 5N by revealing a nature substance proteic of approximately 6.2 kDa and to inhibit so much to bacteria taxonomically related and bacteria pathogenic food pollutans positive Gram.

1. INTRODUCCION

La Chicha de Jora, es una bebida autóctona del Perú y se remonta a la época pre-hispánica. Los antiguos peruanos sin saber el rol que desempeñaban los microorganismos en las fermentaciones naturales, han transmitido de generación en generación, la técnica de su elaboración. Esta bebida es preparada y consumida en la actualidad por la mayoría de los pobladores de las zonas costeras y andinas del Perú.

La chicha de jora se obtiene por fermentación natural, para su elaboración se utiliza el mosto de maíz germinado, este sustrato, constituye un nicho ecológico especial y reúne condiciones únicas tanto para el crecimiento de las levaduras, así como para el desarrollo de las bacterias lácticas silvestres de rol metabólico y trófico aún no revelados.

La mayoría de los estudios en relación a flora microbiana de la chicha de jora, han sido orientados a la búsqueda de levaduras como responsables de la fermentación alcohólica y muy poco se ha investigado sobre la taxonomía, fisiología y capacidad de interacción de las bacterias lácticas silvestres de la chicha de jora con otros microorganismos que comparten el mismo nicho ecológico.

En bebidas similares de otros países, se ha reportado que varias especies de levaduras y bacterias lácticas benéficas contribuyen a la calidad final de las bebidas. Las levaduras se encargan de la fermentación alcohólica y las bacterias lácticas de la fermentación maloláctica, así como también de los aromas y sabores característicos que le otorgan a los alimentos y bebidas fermentadas y de la preservación de los mismos, por la capacidad que tienen de producir sustancias antimicrobianas como los ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, etc.), peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.

La importancia del estudio de las cepas de *Lactobacillus* sintetizadoras de sustancias antimicrobianas principalmente bacteriocinas, radica en confrontar el principio activo de las cepas silvestres provenientes de bebidas fermentadas como la chicha de

jora, con otras cepas indicadoras emparentadas, eventualmente susceptibles y advertir el efecto inhibitorio o letal por la disminución o falta de crecimiento de la cepa blanco.

El hallazgo y la selección de cepas nativas de **Lactobacillus** productoras de bacteriocinas es prometedor, debido a que éstas pueden ser utilizadas como aditivo natural durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos y bebidas fermentadas de interés en la industria alimentaria.

En base a estas consideraciones y con el fin de establecer criterios básicos en la búsqueda de nuevas cepas nativas de bacterias lácticas asociadas a fermentaciones naturales con potencialidades de producir sustancias biológicamente activas, se ha propuesto los siguientes objetivos:

- Identificar y caracterizar la naturaleza de las sustancias inhibitorias producidas por cepas de **Lactobacillus** aisladas de chicha de jora.
- Seleccionar las mejores cepas nativas de **Lactobacillus** productoras de bacteriocinas con propiedades antimicrobianas de amplio espectro.
- Evaluar la actividad inhibitoria de la bacteriocina parcialmente purificada sintetizada por la cepa seleccionada de **Lactobacillus** contra cepas sensibles taxonómicamente afines y patógenas contaminantes de alimentos.

2. GENERALIDADES

2.1. Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son microorganismos muy versátiles, se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido aisladas a partir de fermentaciones espontáneas de una variedad de alimentos y bebidas alcohólicas como vinos, sidras, productos lácteos, frutas y jugos de frutas, encurtidos, ensilados, aceitunas verdes, productos cármicos y marinos, granos de cereal y otros (Sneath, P.H.A. y col., 1986). Estos organismos son capaces de crecer bajo diferentes condiciones ambientales y juegan un rol importante en muchas fermentaciones de productos alimentarios de consumo y como probióticos para humanos y animales (Bottazzi, V.1988).

Las bacterias lácticas están constituidas por los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, y recientemente por *Carnobacterium*. Se caracterizan por ser bacilos o cocos Gram positivos, no formadores de esporas, no móviles, catalasa negativos, microaerófilos, crecen óptimamente a 30° C y son exigentes en sus requerimientos nutricionales (Sneath, P.H.A. y col., 1986).

2.2. Clasificación de las bacterias lácticas en base a las rutas metabólicas

Dependiendo de la ruta de fermentación de las hexosas, las bacterias lácticas están divididas en dos grupos fisiológicos: homofermentativas y heterofermentativas. Las homofermentativas degradan las hexosas vía glicólisis, produciendo ácido láctico como producto principal, mientras que las heterofermentativas utilizan la vía de las pentosas fosfato para dar ácido láctico, ácido acético, CO₂ y/o etanol (Sneath, P.H.A. y col., 1986; Mc Donald, L.C. y col., 1987; Zuñiga, M. y col., 1993).

2.3. Producción de sustancias inhibitorias por bacterias lácticas

Las bacterias lácticas producen una serie de sustancias antimicrobianas responsables de la estabilidad de los alimentos fermentados. La capacidad de las bacterias lácticas para producir ácidos orgánicos, con el consiguiente descenso de pH, es el principal factor de inhibición en los productos fermentados. Otros productos del metabolismo de bacterias lácticas, como el peróxido de hidrógeno, el diacetilo y la reuterina, pueden contribuir de forma general a la conservación de estos productos (Requena, T. y Peláez, C. 1995). Además las bacterias lácticas pueden producir sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica conocidas como bacteriocinas (Tagg, J.R. y col., 1976; Hanlin, M.B. y col., 1993; Jack, R.W., 1995).

2.4. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son moléculas activas de naturaleza proteica, en algunos casos son compuestos heterogéneos, incluyen lípidos, carbohidratos o combinaciones de proteínas. Estas sustancias son producidas por un amplio rango de bacterias lácticas con un modo de acción bactericida contra un limitado rango de organismos taxonómicamente afines. La biosíntesis ocurre durante o al final de la fase exponencial de crecimiento y son productos de excreción celular. Los principales criterios utilizados para definir bacteriocinas son: espectro pequeño de actividad, modo de acción bactericida y naturaleza proteica (Klaenhammer, T.R., 1988; Carminati, D. y col., 1989; Samellis, J. y col., 1994; Piard, J.C. y Desmazeaud, M.J., 1992; Wang, J.K., 1993).

2.4.1. Clasificación de bacteriocinas

La mayoría de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas están clasificadas en 4 grupos basados en las características genéticas y bioquímicas.

- I. Lantibióticos, péptidos pequeños, actúan a nivel de membrana (< 5 KDa), contiene aminoácidos inusuales como lanthionina, β -metil lanthionina y residuos deshidratados. Ejemplo: Nisina, Lactacin 481, Carnocin V149 y Lactacin 5.
- II. Péptidos activos de membrana, estables al calor, carecen de lanthionina (< 10 KDa), ejemplo Pediocin PA-1, Lactococcin A, B, M; Leucocin A, Sakacin A, Curvacin A.
- III. Proteínas lábiles al calor (> 30 KDa), ejemplo Helvetecin G, Acidophilucin A, lactocins A y B.
- IV. Bacteriocinas complejas, compuesto de proteínas, más uno o más residuos químicos (lípidos, carbohidratos) ejemplo: Plantaricin S, Leucocin S, Lactocin 27 (Klaenhammer, T.R., 1993; Holo, H., 1995; Axelsson, L. y Holck, A., 1995).

2.4.2. Principales bacteriocinas sintetizadas por bacterias lácticas

En las tablas 1, 2, 3 y 4 se muestra un resumen de las principales bacteriocinas caracterizadas, procedentes de bacterias lácticas.

2.4.3. Espectro de inhibición

La mayoría de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas son activas únicamente frente a especies bacterianas relacionadas taxonómicamente. La nisina por ejemplo, es una bacteriocina producida por algunas cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, y presenta un amplio espectro de inhibición (Tabla 1), además es activa frente a un extenso rango de microorganismos Gram positivos, que incluye *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Listeria* (Carminati, D. y col., 1989), también inhiben el desarrollo de esporas de *Clostridium* y *Bacillus* (Scott, V.N. y Taylor, S.L., 1981). La nisina es la Bacteriocina de bacterias lácticas mejor caracterizada, y hasta el momento la única que se comercializa para su uso como aditivo alimentario (Delves-Broughton, J., 1990; Stoffels, G., 1992; Vaughan, E.E., 1994).

La lacticina 481, lantibiótico producido por *L. lactis* ssp. *lactis* CNRZ 481 (Tabla 1), inhibe a *Cl. tyrobutyricum*, además es activa frente a muchas especies de bacterias lácticas (Piard, J.C. y col., 1992).

Las pediocinas, bacteriocinas producidas por cepas de *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, también se caracterizan por tener un amplio espectro de acción. La pediocina PA-1 (= Ach) es activa frente a microorganismos Gram positivos como lactobacilos, leuconostoc, enterococos, pediococos, propionibacterias, *Bacillus* spp., *Brochotrix*, *Clostridium* y *Listeria* spp. (Bhunja, A.K. y col., 1988; Strasser de Saad, A.M. y Manca de Nadra, M.C. 1993; Strasser de Saad, A.M. y col., 1995; Piva, A.F. y Headon, D.R., 1994). Entre los microorganismos patógenos, destaca la inhibición frente a *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Cl. perfringens*, y *S. aureus* (Pucci, M.J. y col., 1988). Asimismo, inhibe la germinación y desarrollo de esporas de *Cl. laramie*, *Cl. botulinum* E y *B. stearothermophilus* (Kalchayanand, N. y col., 1989).

Se ha descrito también la inhibición, frente a *L. monocytogenes*, con leucocina A, leucocina S, mesenterocina Y105 (Héchar, Y. y col., 1992), sakacinas A y P (Schillinger, U. y col., 1991) y curvacina A (Tichaczek, P.S. y col., 1992).

La susceptibilidad de las bacterias Gram negativas a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas es mucho más limitada. De acuerdo con Klaenhammer (1988), en los casos descritos de actividad frente a bacterias Gram negativas se requiere una purificación de la bacteriocina. Se ha descrito que la nisina y la pediocina PA-1 (= Ach) presentan actividad inhibitoria frente a microorganismos como *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Aeromonas*, pero el efecto no se observa a menos que se altere el componente lipopolisacárido de la membrana externa de estos microorganismos (Bhunja, A.K. y col., 1991; Spelhaug, S.R. y Herlander, S.K., 1989; Gonzales, S.N. y col., 1996).

Las bacteriocinas que poseen un amplio espectro de inhibición, presentan un importante valor como aditivos alimentarios al ser activas frente a microorganismos que alteran la calidad de los alimentos y/o patógenos presentes. Además, la acción combinada de dos o más bacteriocinas puede reforzar considerablemente su acción inhibitoria. Hanlin, M.B. y col. (1993) observaron que la viabilidad de cepas de bacterias lácticas, *L. monocytogenes* y *Clostridium* spp. disminuía al añadir combinadas pediocinas ACh y nisina, en comparación a la adición de cada una de ellas por separado. Por otro lado, la utilización de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas activas frente a microorganismos del mismo grupo, favorecería el desarrollo de estas cepas añadidas en los cultivos iniciadores en competición con la flora láctica presente (Daeschel, M.A., 1989; Héchar, Y. y col., 1992).

2.4.4. Propiedades bioquímicas

Las bacteriocinas de bacterias lácticas presentan una serie de propiedades bioquímicas comunes, como son sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas y tolerancia a elevadas temperaturas y a bajo pH.

Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimotripsina) y algunas de origen gástrico, como la pepsina (Tablas 1, 2, 3 y 4). Esta característica es muy interesante con respecto a la utilización de bacteriocinas en productos alimentarios, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidas como compuestos activos y sin causar, por tanto, los riesgos relacionados con el uso de antibióticos (Lloyd, A.G. y Drake, J.P., 1975).

La nisina, además de ser inactivada por α -quimotripsina y la pancreatina puede ser inactivada por determinadas enzimas específicas o nisinasas producidas por algunas cepas de *L. brevis*.

Se han descrito otras bacteriocinas sensibles a enzimas no proteolíticas, como la plantaricina B que se inactiva por una lipasa y por una α -amilasa, la plantaricina S que se inactiva por enzimas glicolíticas, lipolíticas y fosfolipolíticas (Jiménez-Díaz, R. y col., 1990) y la leuconocina S que se inactiva por una amilasa (Lewus, C.B. y col., 1992). Estas observaciones indican que la zona activa de estas bacteriocinas presenta una composición heterogénea (Klaenhammer, T.R., 1993).

La termotolerancia de las bacteriocinas de bacterias lácticas es generalmente elevada, aunque puede reducirse significativamente después de su purificación. Esta característica de termorresistencia parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Por otro lado, algunas bacteriocinas son termolábiles, poseen mayor peso molecular y probablemente una estructura molecular más compleja. Dentro de este grupo están las bacteriocinas pertenecientes a la clase III definida por Klaenhammer, T.R. (1993), que incluye helveticina J y V-1829, acidofilucina A, caseicina 80 y lactacinas A y B, cuyas características de termosensibilidad se resumen en la tabla 2. La termoresistencia generalizada de las bacteriocinas permite que permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche (63°C, 30 min; 72°C, 15 s), lo que supondría una ventaja adicional para su utilización en productos pasteurizados (Piard, J.C. y Desmazeaud, M.J., 1992; Holzapfel, W.H. y col., 1995).

Las bacteriocinas de bacterias lácticas son generalmente estables a pH ácido o neutro (Piard, J.C. y Desmazeaud, M.J., 1992). La máxima solubilidad y estabilidad de la nisina es a pH 2, disminuyendo estas propiedades conforme aumenta el pH (Hurst, A., 1981). Las lactoestreptocinas también son estables a pH entre 5.6 y 5.0, y se inactivan reversiblemente a pH igual o mayor a 6.0. La estabilidad a pH ácido o neutro de las bacteriocinas indica una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen (Piard, J.C. y Desmazeaud, M.J., 1992; Jay, J.M., 1982).

2.4.5. Mecanismo de acción

La formación de poros en la membrana citoplasmática de células sensibles parece ser un mecanismo de acción común presentado por las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (Klaenhammer, T.R., 1993). La nisina y algunos péptidos de la clase II, como lactococinas A, B y G, lactacina F y pediocina PA-1, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática mediante la formación de poros o canales. Parece ser que la estructura secundaria de estas bacteriocinas juega un papel importante en su actividad. La estructura de estos péptidos, α -hélice o β -laminar, formaría dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica, descrita para las lactococinas A y B, lactococina G y sakacina A (Holck, A. y col., 1992). Esta estructura explicaría la formación de poros a partir de un mecanismo descrito por Ojcius, D.M. y Young, J.D.E. (1991). Según este mecanismo, la naturaleza anfótera de la molécula permitiría la formación de oligómeros que atravesarían la membrana formando poros, en los que el lado apolar de la molécula se situaría próxima a los lípidos de la membrana, y el lado polar miraría al centro del poro. Como consecuencia se observa, en general, una pérdida de iones K^+ , ATP y en algunos casos, aminoácidos y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando finalmente la muerte celular (Bruno, M.E.C. y Montville, T.J., 1993). La homología en la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de la pediocina PA-1, estudiada por Nieto-Lozano, J.C. y col. (1992), y la de leucocina A y curvacina A y sakacina P (Tichaczek, P.S. y col., 1994), sugiere, según Nieto-Lozano, J.C. y col. (1992), que esta zona es la responsable directa de la actividad de estas bacteriocinas o está, al menos, implicada en la especificidad bacteriocina-célula sensible.

Por otro lado, mientras que muchas bacteriocinas parecen presentar regiones anfóteras que contribuyen a la formación de poros, la especificidad en el espectro de

acción de estos compuestos puede estar regida por la presencia de zonas variables en las bacteriocinas (Ojcius, D.M. y Young, J.D.E., 1991). Las lactococinas A y B forman poros en protoplastos de las células sensibles, pero no en liposomas derivados de fosfolípidos de estas células, lo cual parece indicar la necesidad de receptores específicos de naturaleza protéica asociados en la membrana citoplasmática. Sin embargo, la adsorción de nisina y pediocina AcH a la membrana celular, no parece estar mediada por receptores proteicos de la bacteriocina, sino por constituyentes aniónicos de la pared celular de microorganismos Gram positivos, como son los ácidos teicoico, teicurónico y lipoteicoico (Bhunja, A.K. y col., 1991), polisacáridos acídicos o fosfolípidos. La actividad inhibitoria de nisina y pediocina AcH (= PA-1) descrita en bacterias Gram negativas que han sufrido un choque subletal que altera la membrana por ejemplo, choque osmótico, tratamiento con EDTA, etc., podría ser debido al parcial deterioro causado en la estructura de lipopolisacárido de la pared celular de estas bacterias, que actúa de barrera para la entrada de pequeñas moléculas hidrofóbicas (Ray, B., 1994).

2.4.6. Aspectos genéticos en la producción de bacteriocinas

En general, los fenotipos producción de bacteriocina (Bac^+) e inmunidad a la bacteriocina producida (Inm^+) están ligados genéticamente. El fenotipo Inm^+ es una característica específica al tipo de bacteriocina producida y debe considerarse diferente del fenotipo mostrado por la resistencia natural de una cepa o especie a una bacteriocina (Klaenhammer, T.R., 1993; Bhunja, A.K., 1991; Fremaux, C.H. y Cenatiempo, Y., 1995).

Ambos fenotipo, Bac^+ e Inm^+ , muestran una alta frecuencia de pérdida espontánea o por acción de agentes curantes de plásmidos. Este fenómeno sugiere una localización plasmídica de los caracteres responsables de la producción de bacteriocinas, que se ha demostrado de forma general para lactococos, leuconostocs y pediococos.

En la Tabla 5 se muestra la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de diferentes precursores de bacteriocinas. Todas ellas muestran en común una zona de

procesado de la prebacteriocina situado detrás de dos residuos de glicina en la molécula precursora. Este hecho parece indicar, que existe un mecanismo común de maduración de bacteriocinas hidrofóbicas y de bajo peso molecular en bacterias lácticas.

Se ha descrito para la lactococina A, pediocina PA-1 y, probablemente, lactococinas B y M la presencia de dos genes, además del gen estructural y de inmunidad, necesarios para la producción de bacteriocina activa. La estructura de las proteínas deducidas de la secuencia nucleotídica de estos genes muestra una alta homología con la de proteínas implicadas en la secreción, independiente de secuencia señal, de determinadas proteínas producidas por bacterias Gram negativas. De acuerdo con los resultados experimentales observados para la caracterización de la lactococina A, Kok, J. y col. (1993) proponen el siguiente modelo de producción y secreción de este tipo de bacteriocinas: la bacteriocina se produce como un precursor a partir del cual se libera la región N-terminal en algún estadio durante la secreción del péptido al exterior. Esta secreción requiere al menos dos proteínas, una proteína translocadora de membrana, ATP-dependiente, que proporcionaría la energía necesaria para la secreción y maduración, y otra proteína que estaría anclada en la membrana relacionada con el sistema de transporte para secreción de proteínas (Muriana, P.M. y Klaenhammer, T.R., 1991; Nettles, C.G. y Barefoot, S.F., 1993).

En otras bacteriocinas, como la lactococina G y la lactocina F, se ha descrito la presencia de dos genes estructurales que codifican para dos péptidos, cuya acción complementaria es necesaria para su actividad inhibitoria (Klaenhammer, T.R., 1993; Gonzales, S.N. y Kunka, B.S., 1987; Leer, R. y col., 1995).

2.5. Estudios históricos de las sustancias inhibitorias producidas por bacterias lácticas

En 1925 A. Gratia, descubrió por primera vez que una cepa de *E. coli* V producía una sustancia capaz de inhibir muy enérgicamente el cultivo de otra cepa de *E coli* ϕ . Los estudios para caracterizar dicha sustancia lo condujeron a afirmar que se trataba de un agregado molecular que podía atravesar los filtros, que era incapaz de regenerarse y que no era afectada por una variedad de agentes físicos y químicos. Siete años más tarde continuó el estudio del antagonismo bacteriano y puso en claro procedimientos para aislar cepas inhibitorias, susceptibles y resistentes, purificar el principio activo, inducir su producción, detectar las variaciones del poder inhibitorio, etc.

Un colaborador suyo, P. Fredericq retomó el tema con el objeto de establecer si se trataba de un caso particular, o si por el contrario el antagonismo estaba presente en otras especies bacterianas, logrando demostrar que la habilidad para producir sustancias inhibitorias, era una propiedad de muchas cepas bacterianas tanto Gram negativas como Gram positivas (García, H.G. y col., 1988).

Desde ese entonces, los descubrimientos en el área se sucedieron sin interrupción, reportando nuevas bacteriocinas.

Los estudios en relación a la producción de sustancias antimicrobianas sintetizadas por bacterias lácticas, cobra mayor importancia a raíz del hallazgo de la nisina, polipéptido producido por *Streptococcus lactis*, caracterizada por contener aminoácidos inusuales como la lanthionina y β -methyllanthionina, de peso molecular 3,500 (Jarvis, B. y Farr, J., 1971).

En Pretoria (Sud Africa), (de Klerk, H.C., 1967) realizaron estudios sobre las propiedades de una bacteriocina producida por *Lactobacillus fermenti* 466, la

bacteriocina se obtuvo a partir de cultivos de 12 horas en Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) y se purificó por cromatografía en columna. La bacteriocina en estudio resultó siendo soluble en agua, resistente a 96°C por 30 minutos, sensible a la tripsina, parcialmente sensible a la pepsina y no fue afectada con la lisozima. Químicamente lograron demostrar que la sustancia antimicrobiana estaba conformada por carbohidratos (4 azúcares), proteína (16 aminoácidos) y lípido con pequeñas cantidades de hexosamina y fósforo.

En Kiel (Alemania), (Geis, A. y col., 1983), lograron aislar bacteriocinas a partir de cultivos de *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lactis*, determinando que la máxima producción del principio activo, se daba durante la fase exponencial de crecimiento, y se detenía cuando entraba a la fase estacionaria. Demostraron también que las sustancias eran sensibles a enzimas proteolíticas, resistentes al calor (100°C por 30 minutos) y a pH 4.5 y 7.0. Las bacteriocinas fueron parcialmente purificadas por precipitación con sulfato de amonio a concentraciones saturadas y mostraron un efecto inhibitorio muy limitado. La mayoría de los *Streptococcus lactis* y unos pocos miembros del género *Clostridium*, *Leuconostoc*, y *Pediococcus* fueron inhibidos, más ninguna bacteria Gram negativa fue afectada.

En Wyoming (USA), (Bhunja, A.K. y col., 1988) aislaron un péptido de acción antimicrobiana designado como Ach, a partir del sobrenadante de un cultivo de 16 horas de *Pediococcus acidilactici* H, y fue purificado por cromatografía de intercambio iónico, previamente las proteínas fueron precipitadas con sulfato de amonio al 70%. El peso molecular fue determinado por SDS-PAGE, resultando un PM de 2,700 daltons. La pediocina Ach fue sensible a las enzimas proteolíticas como tripsina, proteasas IV, XIV, K, papaína, quimotripsina y ficina y resultó ser resistente al calor y a solventes orgánicos, además su actividad se mantuvo en un amplio rango de pH. La pediocina Ach mostró inhibición contra varias bacterias patógenas contaminantes de alimentos incluyendo

Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Listeria monocytogenes y su acción fue bactericida.

En Kulmbach (República Federal Alemana), (Schillinger, U. y Lücke, F.K., 1989) aislaron 221 cepas de ***Lactobacillus*** a partir de carnes y productos cárnicos. 19 cepas de ***Lactobacillus sake***, 3 cepas de ***Lactobacillus plantarum*** y una cepa de ***Lactobacillus curvatus*** mostraron actividad inhibitoria contra otros lactobacilos. ***Lactobacillus sake*** Lb706 fue seleccionada por su capacidad de inhibir varias bacterias lácticas y ***Listeria monocytogenes***. Su naturaleza proteica, su limitado espectro de inhibición y el modo de acción bactericida indicaron que esta sustancia era una bacteriocina a la que designaron sakacin A.

En Mainz (República Federal Alemana), (Rammelsberg, M. y Radler, F., 1990) aislaron 79 cepas del género ***Lactobacillus*** de plantas y material fermentado. Del total de cepas, 12 inhibieron a 3 cepas indicadoras: ***Lactobacillus brevis***, ***Pediococcus damnosus*** y ***Leuconostoc oenos***. La actividad antimicrobiana de ***Lactobacillus brevis*** B37 y ***Lactobacillus casei*** B80, fue producida por un péptido detectable en los caldos de cultivo. La bacteriocina brevicin 37 de ***Lactobacillus brevis*** B37, resultó activa contra varias bacterias lácticas y ***Nocardia coralina***, mientras que la bacteriocina caseicin 80 de ***Lactobacillus casei*** B80 inhibió solo una cepa de ***Lactobacillus casei***. Asimismo constataron que la brevicina 37 era estable a 121°C, por una hora, mientras que la caseicina 80 fue estable a 60°C; pero ambas bacteriocinas perdieron estabilidad bajo condiciones de alcalinidad.

En Madrid (España), (Sobrino, O.J. y col. 1991), demostraron la actividad antimicrobiana de ***Lactobacillus sake*** 148 aislada de salchichas fermentadas. La actividad de la sustancia antimicrobiana era sensible al tratamiento con papaína y proteasa XIV, resistente al calor (100°C por 10 minutos) y a refrigeración. Asimismo lograron demostrar que inhibía el crecimiento solo de las bacterias indicadoras Gram

positivas incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Listeria monocytogenes*.

En Vandoeuvre (Francia), (Mathieu, F. y col., 1993) reportaron que de 165 cepas aisladas de *Leuconostoc* spp, solo una, *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides* FR52, produjo una bacteriocina, denominada mesenterocin 52. Esta bacteriocina ejerció un efecto inhibitorio frente a otras cepas de *Leuconostoc* y varias cepas de *Enterococcus* y *Listeria* spp. Asimismo pudieron observar que la bacteriocina mesenterocin 52 no mostró actividad contra *Lactococcus* ni *Lactobacillus*. Fue también sensible a una proteasa a pH 7 y mostró una estabilidad relativa a 100°C por 15 minutos, pero a pH 4.5 tuvo una mayor estabilidad.

En Sevilla (España), Jimenez-Diaz, R. y col. (1993) probaron la actividad antagónica y sensibilidad de 26 cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de aceitunas verdes fermentadas, usando la prueba de difusión en agar, 4 de estas cepas produjeron compuestos antimicrobianos con un espectro de actividad variable, siendo *L. plantarum* LPCO10 la cepa que mostró un espectro de inhibición más amplio, ya que inhibió a 13 de las 26 cepas indicadoras, incluyendo a competidores naturales de *L. plantarum* y bacterias relacionadas y no relacionadas taxonómicamente afines. Además, el compuesto inhibitorio mostró actividad contra *Propionibacterium* sp, *Clostridium tyrobutyricum* y *Enterococcus faecalis*; sin embargo los bacilos contaminantes, las cepas patógenas de *Listeria monocytogenes* y las bacterias Gram negativas no fueron afectadas. La sustancia antimicrobiana fue sensible a las enzimas proteolíticas (α quimotripsina, tripsina, ficina, pronasa E, proteinasa K, termolisina y subtilopeptidasa A), esta sustancia pudo ser clasificada como una bacteriocina, llamada plantaricin S, también fue sensible a enzimas glicolíticas y lipolíticas, por lo que se consideró como una glicoproteína. La bacteriocina era Termoestable (100°C por 60 minutos) activa en un rango de pH de 3.0 a 7.0.

En Atenas (Grecia) Samelis, J. y col. (1994) aislaron una cepa denominada ***Lactobacillus sake*** 251 a partir de salchichas secas fermentadas. Esta cepa, cultivada en caldo MRS liberó un factor antimicrobiano que se diferenciaba de los ácidos orgánicos y el peróxido de hidrógeno. La sustancia era proteína, termoestable (100°C por 20 minutos), e inhibía a las bacterias lácticas de origen cármico. Esto sugirió que era una bacteriocina de espectro limitado, llamado sakacin B, con un modo de acción bactericida. Su secreción se dio durante la fase logarítmica tardía y fue estable en un rango de pH de 2 a 9, sakacin B fue parcialmente precipitada y no se detectaron aminoácidos inusuales. Por electroforesis SDS-PAGE se confirmó que era un péptido hidrofóbico, se estimó que el peso molecular de sakacin B fue 6.3 KDa.

En Nagoya (Japón) (Kato, T. y col., 1994), lograron obtener una sustancia antimicrobiana producida por ***Lactobacillus plantarum*** NRIC 149 y fue identificada como bacteriocina en base a su espectro inhibitorio pequeño, naturaleza proteica y modo de acción bactericida. La bacteriocina designada como plantaricin-149, fue producida durante la fase logarítmica por la cepa productora y fue más activa a pH 5.0. La masa molecular del plantaricin-149 fue estimada en 2.2 kDa por SDS-PAGE.

En Osloveien (Noruega) (Axelsson, L. y Holck, A., 1995) están realizando estudios genéticos y han logrado demostrar que la producción e inmunidad de la sakacin A están asociados con un plásmido de 60 Kb presente en ***Lactobacillus sake*** Lb706. Hasta ahora, dos genes están involucrados en la producción e inmunidad de la sakacin A y han sido identificados: El gen estructural sak A y sak B. La sakacin A es una bacteriocina antilisteria, pequeña y estable al calor.

En Lima (Perú) (Quillama, E. y col, 1996), lograron seleccionar por primera vez cepas nativas de ***Lactobacillus*** productoras de sustancias inhibitorias así como cepas silvestres de ***Lactobacillus*** indicadoras o sensibles a partir de chicha de jora procedente de Chalhuanca (Apurímac) e Illimo y Mórrope (Lambayeque). De los resultados obtenidos

solo, ***Lactobacillus plantarum*** 1A, mostró un efecto inhibitorio frente a 3 cepas indicadoras taxonómicamente afines ***Lactobacillus plantarum*** 2A, ***Lactobacillus vitulinus*** 6₁₃ y ***Lactobacillus buchneri*** 10.

TABLA 1: Características de las bacteriocinas producidas por *Lactococcus* spp.

Bacteriocina	Microorganismo productor	Espectro inhibición	Características	Referencias
Nisina	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Bacterias Gram positivas	3500 Da. Termoestable (100° C, 10 min) Resistente a pronasa, tripsina y pepsina y sensible a quimotripsina y pancreatina. Estable a pH ácido, hasta pH 6.8. Determinantes genéticos codificados en un transposón conjugativo (70 kb)	Jarvis y Mahoney (1969) Hurst (1981) Spelhaug y Harlander (1989) Liu y Hansen (1990) Horn et al. (1991) Gireesh et al. (1992)
Lacticina 481	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CNRZ 481	Bacterias lácticas <i>Cl. tyrobutyricum</i>	2900 Da. Termoestable (100°C, 60 min) Sensible a quimotripsina, pronasa, proteinasa K y cuajo. Determinantes genéticos transmisibles por conjugación	Piard et al. (1990 y 1992)
Diplococina	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 346	<i>Lactococcus</i> spp.	5300 Da. Termoestable (100°C, 60 min) a pH 5.0 sin purificar. Sensible a quimotripsina, tripsina, pronasa y pepsina. Determinantes genéticos en plásmido (83 kb)	Davey (1984) Davey y Richardson (1981)
Lactoestrepquinas	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> y <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>L. helveticus</i> <i>Leuconostoc</i> spp.	Termoestable (121°C, 10 min). Estables a pH inferior a 5. Sensibles a tripsina, pronasa, quimotripsina y lipasas.	Kozac et al (1978)
Lactococina A	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> y <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	3400 da. Termoestable (100°C, 30 min) Sensible a tripsina. Determinantes genéticos en plásmido	Scherwitz et al. (1983) Holo et al (1991) Van Belkum et al. (1989)
Lactococinas B y M	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 9B4	No determinado	Determinantes genéticos en plásmido (60 Kb)	Van Belkum et al. (1989 y 1992)

TABLA 2: Características de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* spp.

Bacteriocina	Microorganismo productor	Espectro inhibición	Características	Referencias
Lactacina B	<i>L. acidophilus</i> N2	<i>Lactobacillus</i> spp.	8100 Da. Termoestable (121° C, min) Resistente a pronasa, y proteinasa K. Determinantes genéticos en cromosoma.	Barefoot y Klaenhammer (1983 y 1984)
Acidofilucina A	<i>L. acidophilus</i> LAPT1060	<i>Lactobacillus</i> spp.	Termosensible (60°C, 10 min). Sensible a tripsina, y actinasa.	Toba et al. (1991)
Acidocina 8912	<i>L. acidophilus</i> TK8912	<i>Lactobacillus</i> spp.	Termoestable (120°C, 20 min). Determinantes genéticos en plásmido (15.8 kb)	Kanantani et al. (1992)
Lactocinas 27	<i>L. helveticus</i> LP27	<i>L. helveticus</i> <i>L. acidophilus</i>	Complejo proteína-lipopolisacárido (12.4 kDa). Termoestables (100°C, 60 min). Sensible a pronasa y tripsina. Determinantes genéticos en cromosoma.	Upreti y Hinsdill (1973 y 1975)
Helveticina J	<i>L. helveticus</i> 481	<i>L. helveticus</i> <i>L. bulgaricus</i>	37000 Da. Termosensible (100°C, 30 min) Sensible a pronasa, tripsina y pepsina, proteinasa K y subtilisina. Determinantes genéticos en cromosoma.	Joerger y Klaenhammer (1986 y 1990)
Helveticina V-1829	<i>L. helveticus</i> V-1829	<i>L. helveticus</i> <i>L. bulgaricus</i>	Termosensible (50°C, 30 min). Sensible a proteinasa K, tripsina y pronasa. Determinantes genéticos en cromosoma.	Vaughan et al. (1992)
Lactacina F	<i>L. johnsonii</i> VPI11088	<i>Lactobacillus</i> spp <i>E. faecalis</i>	6300 Da. Termoestable (121°C, 15 min). Sensible a proteinasa K, tripsina y subtilisina. Determinantes genéticos en episoma.	Muriana y Klaenhammer (1987 y 1991)

TABLA 2 (Continuación) : Características de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* spp.

Bacteriocina	Microorganismo productor	Espectro inhibición	Características	Referencias
Brevicina 37	<i>L. brevis</i> 37	Pediococos Leuconostocs Lactobacilos	Termoestable (121° C, 60 min). Activa entre pH 2 y 10 Sensible a pronasa E, tripsina y cloroformo.	Rammelsberg y Radler (1990)
Caseicina 80	<i>L. casei</i> B80	<i>L. casei</i>	4000 Da. Termosensible (60°C, 10 min). Estable a pH inferior a 5. Sensible a pronasa E, tripsina y pepsina.	Rammelsberg et al. (1990)
Curvacina A	<i>L. curvatus</i> LTH1174	Lactobacilos <i>Listeria</i> spp. <i>E. faecalis</i>	3000-5000 Da. Termoestable (100°C, 30 min). Sensible a tripsina y proteinasa K.	Tichaczek et al. (1992)
Plantaricina A	<i>L. plantarum</i> C-11	Bacterias lácticas	Termoestables (100°C, 30 min). Sensible a proteasas.	Daeschel et al. (1990)
Plantaricina S	<i>L. plantarum</i>	Bacterias lácticas <i>Propionibacterium</i> <i>Cl. tyrobutyricum</i>	Glicoproteína. Termoestable (100°C, 60 min) Sensible a proteasas, amilasa y lipasa. Determinantes genéticos en plásmido.	Jiménez-Díaz et al. (1990)
Sakacina A	<i>L. sake</i> 706	Lactobacilos Leuconostoc Enterococos <i>L. monocytogenes</i>	4308 Da. Termoestable (100°C, 20 min). Sensible a tripsina y pepsina. Determinantes genéticos en plásmido (60 kb).	Schillinger y Lucke (1989) Holck et al. (1992)
Sakacina P	<i>L. sake</i> LTH673	Lactobacilos <i>L. monocytogenes</i>	3000-5000 Da. Termoestable (100°C, 30 min). Sensible a proteinasa K y tripsina.	Tichaczek et al. (1992)
Lactocina S	<i>L. sake</i> L45	Lactobacilos Leuconostocs Pediococos	Termoestable (100°C, 60 min). Sensible a proteasa y tripsina. Determinantes genéticos en plásmido (50 kb).	Mortvedt et al. (1991)

TABLA 3: Características de las bacteriocinas producidas por *Leuconostoc* spp.

Bacteriocina	Microorganismo productor	Espectro inhibición	Características	Referencias
Mesenterocina Y105	<i>L. mesenteroides</i> ssp. Mesenteroides	<i>L. monocytogenes</i>	3666 Da. Estable (60° C, 120 min) Sensible a pronasa, proteinasa K, tripsina y quimotripsina.	Héchar et al. (1992)
Leuconocina S	<i>L. paramesenteroides</i> OX	Bacterias lácticas <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>Cl. botulinum</i>	Dos glicoproteínas (2000 y 10000 Da) Termosensible (60°C, 30 min) Sensible a α -amilasa, quimotripsina, tripsina, pronasa E y proteinasa K	Lewus et al. (1992)
Leucocina A	<i>L. gelidum</i> UAL187	Bacterias lácticas <i>L. monocytogenes</i>	3900 Da. Estable a 60°C, 30 min. Sensible a quimotripsina, tripsina, papaína y pepsina. Inactiva a pH > 7. Determinantes genéticos en plásmido (11.7 kb)	Harding y shaw (1990) Hastings et al. (1991)

TABLA 4: Características de las bacteriocinas producidas por *Pediococcus* spp.

Bacteriocina	Microorganismo productor	Espectro inhibición	Características	Referencias
Pediocina PA-1 (= Ach)	<i>P. acidilactici</i>	Bacterias lácticas Propionibacterias <i>Brochothrix</i> spp. <i>S. aureus</i> <i>Cl. perfringens</i> <i>Cl. botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i>	4500 Da. Termoestable (100° C, 60 min) Sensible a pepsina, papaína, quimotripsina, tripsina, proteinasa K y proteasa. Determinantes genéticos en plásmido (9.3 kb)	González y Kunka (1987) Bhunja et al. (1988) Henderson et al. (1992) Nieto-Lozano et al. (1992)
Pediocina A	<i>P. pentosaceus</i> FBB61	Bacterias lácticas <i>S. aureus</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>L. monocytogenes</i>	Termoestable (100°C, 60 min) Sensible a pronasa. Determinantes genéticos en plásmido (15.7-20.4 kb)	Daeschel y Kleanhammer (1985) Graham y McKay (1985)

TABLA 5: Comparación de la secuencia de aminoácidos en la región amino-terminal de diferentes precursores de bacteriocinas. El asterisco muestra la posición de procesamiento de las bacteriocinas

Bacteriocina	Precursor	Región N-terminal		Referencia
Lactococina A	75 aa	21-MKNQLNFNIVSDEELSEANGG*	KLTF	Holo et al. (1991)
Lactococina B	68 aa	21-MKNQLNFNIVSDEELAEVNGG	SLQY	Van Belckum et al. (1992)
Lactococina M	69 aa	21-MKNQLNFEILSDEELQGINGG	IRGT	Van Belckum et al. (1991 a)
Lactacina F	75 aa	18-MKQFNLYLSHKDLAVVGG	RNNW	Muriana y Klaenhammer (1991)
Pediocina PA-1	62 aa	18-MKKIEKLTEKEMANIIGG	KYYG	Henderson et al. (1992)
Leucocina A	61 aa	24-MMNMKPTFSYEQLDNSALEQVGG	KYYG	Hasting et al. (1991)
Sakacina A	59 aa	18-MMMVKELSMTELQTITGG	ARSY	Holck et al. (1992)

Símbolos de los Aminoácidos:

A = Alanina, B = Asparragina o Acido aspártico, C = Cisteína, D = Acido aspártico, E = Acido glutámico, F = Fenilalanina, G = Glicina, H = Histidina, I = Isoleucina, K = Lisina, L = Leucina, M = Metionina, N = Asparragina, P = Prolina, Q = Glutamina, R = Arginina, S = Serina, T = Treonina, V = Valina, W = Triptofano, Y = Tirosina, Z = Glutamina o Acido glutámico

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Material Biológico: Cepas bacterianas

Las cepas de *Lactobacillus* productoras de sustancias inhibitorias fueron obtenidas de la colección de cultivos stock, mantenidos por el Laboratorio de Fisiología, Genética y Ecología Microbiana del Departamento Académico de Microbiología y parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. Las cepas utilizadas durante el ensayo fueron: *Lactobacillus plantarum* 1A, 5N, 6₂, 9, 9A y 12B; *Lactobacillus fermentum* 3₁; *Lactobacillus collinoides* 3₂ y 5M; *Lactobacillus agilis* 3₅; *Lactobacillus delbrueckii* 5B y *Lactobacillus acidophilus* 8N, 9₁ y 9₇, todas aisladas de chicha de jora de 3 a 4 días de fermentación procedentes de los lugares de Illimo y Mórrope (Lambayeque) y Chalhuanca (Apurimac) por Quillama y Liendo (1996).

Como cepas indicadoras o sensibles se utilizaron *Lactobacillus brevis* 10, *Lactobacillus vitulinus* 11C y *Lactobacillus plantarum* 12A aisladas de chicha de jora; *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Escherichia coli* ATCC 11299 de la colección americana de cultivos tipo Rockville, MP. EUA; *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*, aisladas de aguas y alimentos contaminados de la colección del Laboratorio de Fisiología, Genética y Ecología Microbiana del Departamento Académico de Microbiología y parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM.

3.2. Condiciones de Cultivo

Las cepas de *Lactobacillus* fueron reactivadas en caldo Man Rogosa Sharpe pH 6.5 e incubadas en condiciones de microaerofilia a 30°C durante 18 a 24 horas (D.O. = 20 - 30). Las cepas patógenas *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Escherichia coli* ATCC 11299, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* se reactivaron en caldo Luria pH

7, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* en caldo cerebro corazón (BHI) pH 7 y se incubaron a 37°C durante 24 horas (D.O. = 0.6) (Esquema 1 y 2).

3.3. Caracterización de las sustancias antimicrobianas producidas por cepas de *Lactobacillus*

Para determinar la naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas productoras, se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos a una densidad óptica de 30 (aproximadamente 18 a 24 horas de incubación) que coincidió con la finalización de la fase de crecimiento exponencial y los cultivos de las cepas indicadoras a una D.O. = 0.60 (aproximadamente 6 a 8 horas de incubación) (Olsen, A. y Jacobsen, M., 1995; Fariás, M.E. y col. 1994).

3.3.1. Efectos de la tripsina, pepsina, catalasa y neutralización con hidróxido de sodio

El sobrenadante de cada cepa productora después de centrifugar a 3,500 rpm por 30 minutos se filtró en membrana millipore 0.22 μ , luego fue dividido en 5 fracciones de 4 ml, siendo:

A = sobrenadante de la cepa productora (control).

B = sobrenadante tratado con hidróxido de sodio 2N para neutralizar el pH.

C = sobrenadante neutralizado y tratado con 1 mg/ml de catalasa

D = sobrenadante neutralizado y tratado con 1 mg/ml de catalasa y 2 mg/ml de pepsina.

E = sobrenadante neutralizado y tratado con 1 mg/ml de catalasa y 2 mg/ml de tripsina.

El método que se siguió para la detección de los halos de inhibición fue el de difusión en pocillo descrito por Barnby-Smith, F.M. y col. (1989) (Esquemas 1 y 2) y (Anexos 18 y 19).

3.3.2. Sensibilidad a diferentes temperaturas, pH y a solventes orgánicos

Para conocer la estabilidad de las sustancias inhibitorias producidas por las cepas productoras de *Lactobacillus*, las pruebas se realizaron en 2 etapas: En la primera, los sobrenadantes de cada cepa productora fueron ajustados a pH 3.0, pH 7.0 y pH 10.0 \pm 0.1 y sometidos a diferentes temperaturas 80°C, 90°C y 100°C por 20 minutos, seguido de un enfriamiento a temperatura ambiental.

En la segunda etapa, para comprobar si el extracto crudo designado como plantaricin ChJPe obtenido por liofilización a partir de un cultivo de la cepa seleccionada de *Lactobacillus plantarum* 5N, mantenían estabilidad, la sustancia en mención, se dividió en 10 partes de 4 ml, la que fue tratada a diferentes temperaturas y pH anteriormente mencionadas, así como a diferentes concentraciones de solventes orgánicos: etanol al 25% y cloroformo al 20 y 25%.

La determinación de la actividad inhibitoria de las sustancias antimicrobianas presente en los sobrenadantes de las cepas productoras, se realizó por el método de difusión en pocillos descrito por Bamby-Smith, F.M. y col. (1989), utilizando como cepa indicadora *Lactobacillus plantarum* 12A por ser la más sensible. En el segundo caso, se utilizó 4 cepas indicadoras *Lactobacillus plantarum* 12A, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*, igualmente por ser las más susceptibles (Esquema 3 y 4).

3.4. Purificación parcial de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* 5N

A 300 ml de caldo MRS pH 6.5 se inoculó 18 ml de un cultivo activo de 12 horas, el cual fue incubado durante 24 horas a 30°C. El cultivo obtenido se centrifugó a 3,500 rpm por 30 minutos y el sobrenadante fue filtrado por membrana millipore 0.22 μ (micras), luego se dividió en 2 fracciones de 100 ml. (Bhunja, A.K., 1988; Samelis, J. y col. 1994; Thompson, J.K. y col. 1996).

3.4.1. Precipitación con sulfato de amonio

Para concentrar y purificar parcialmente la bacteriocina sintetizada por la cepa productora, se añadió a 100 ml del sobrenadante obtenido, sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% de saturación a temperatura ambiente y en constante agitación. Al finalizar el proceso, se observó la formación de un material flotante como lípido, el cual al ser centrifugado a 3,500 rpm por 30 minutos se mantuvo. La película superficial recuperada fue dializada con buffer fosfato 0.020 M pH 7, el extracto crudo obtenido fue designado como plantaricin ChJPe y luego se preservó a 4°C (fracción 1) (Jimenez-Diaz, R. y col. 1993; Larsen, A.G. y col. 1993).

3.4.2. Concentración por liofilización

Para concentrar la bacteriocina presente en el sobrenadante previamente procesado, ésta se separó en 4 frascos estériles de 25 ml, los cuales fueron congelados a -40°C por 12 horas y concentrados por liofilización al día siguiente por 20 horas en un liofilizador Labconco. Al finalizar el proceso, se obtuvo un concentrado crudo de 5 ml en cada frasco (Fracción 2).

3.4.3. Estimación de la concentración de proteínas y determinación de la actividad inhibitoria

Para comprobar si realmente la sustancia antimicrobiana de la fracción 2 era de naturaleza proteica, se estimó la concentración de proteínas de las 2 fracciones (1 y 2) obtenidas tanto por precipitación con sulfato de amonio como por concentración por liofilización, mediante el método de Bradford (Anexo 4). Una vez determinada la concentración de proteínas se procedió a verificar la actividad inhibitoria de ambos extractos crudos por el método de difusión en pocillo, utilizando como cepas indicadoras *Lactobacillus plantarum* 12A, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

3.4.4. Cromatografía en gel de filtración

Se procedió a aplicar 1 ml del extracto crudo (fracción 2) a una columna de Sephadex G-100, seguidamente se recogió 0.5 ml de eluido en tubos Eppendorf de microcentrífuga y luego se procedió a estimar la actividad inhibitoria de todas las fracciones. Los eluidos que mostraron actividad inhibitoria fueron guardados a 4°C.

3.4.5. Caracterización de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* 5N por electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio

Para la caracterización de la bacteriocina parcialmente purificada (Fracción 2) se utilizó los eluidos que dieron mayor actividad inhibitoria. El gel de corrida fue preparado a partir de una solución stock de acrilamida y NN'bis acrilamida y fue polimerizado por la adición de tetra etil metil etilen diamida (TEMED) y por sulfato de amonio (APS) (Anexos 5 y 6).

La muestra conteniendo 0.1 µg/µl de proteína fue incubada a 65°C por 20 minutos con buffer de muestra (anexo 7) antes de ser aplicado al gel. La corrida electroforética se llevó a cabo durante 50 minutos mediante una fuente de poder marca Hoefer, primero por 5 minutos a 20 miliamperios (mA) y voltaje constante, y luego a máximo de amperaje y 200 voltios por 45 minutos, en un sistema de buffers (anexo 8) (Laemmli, U.K. 1970).

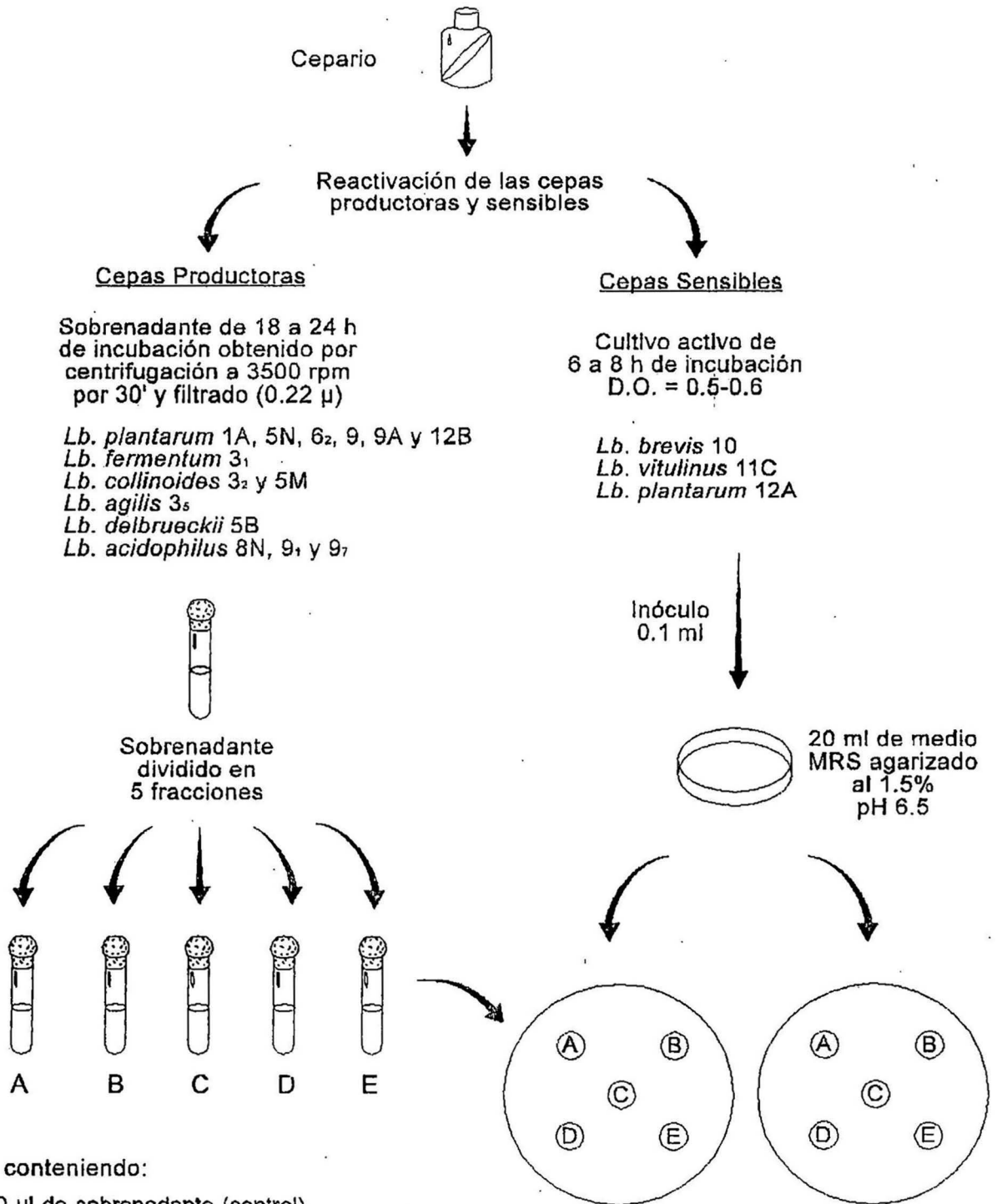
El gel para ser coloreado, se trató con solución fijadora por toda la noche utilizando un agitador automático Hoefer (Anexo 9). La solución fijadora se retiró lavando con varios cambios de agua destilada y luego se colocó el gel en la solución de nitrato de plata por 10 minutos en agitación suave (Anexo 10). Seguidamente se lavó el gel con agua destilada y las bandas de proteínas fueron visualizadas después de la acción de la solución de revelado por 10 minutos (Anexo 11), finalmente se lavó nuevamente con agua destilada con varios cambios, eliminando totalmente la solución de revelado (Maniatis, T. y col., 1989).

Para determinar el peso molecular de la banda de proteína encontrada, se utilizó el siguiente estándar:

BRL Gibco (Protein Molecular Weight Standards, Low range)

	Dalton
- Ovoalbúmina	43,000
- Anhidrosa carbónica	29,000
- β Lactoglobulina	18,400
- Lisosima	14,300
- Inhibidor de la tripsina bovina	6,200
- Insulina	2,300 - 3,400

ESQUEMA N° 1: CARACTERIZACION PARCIAL DE LA NATURALEZA DE LAS SUSTANCIAS INHIBITORIAS PRODUCIDAS POR CEPAS DE *LACTOBACILLUS* AISLADAS DE CHICHA DE JORA UTILIZANDO CEPAS INDICADORAS DEL MISMO GENERO. (Método de Difusión en Pocillos)



Orificios conteniendo:

En A: 200 μl de sobrenadante (control).

En B: 200 μl de sobrenadante neutralizado con NaOH 2 N

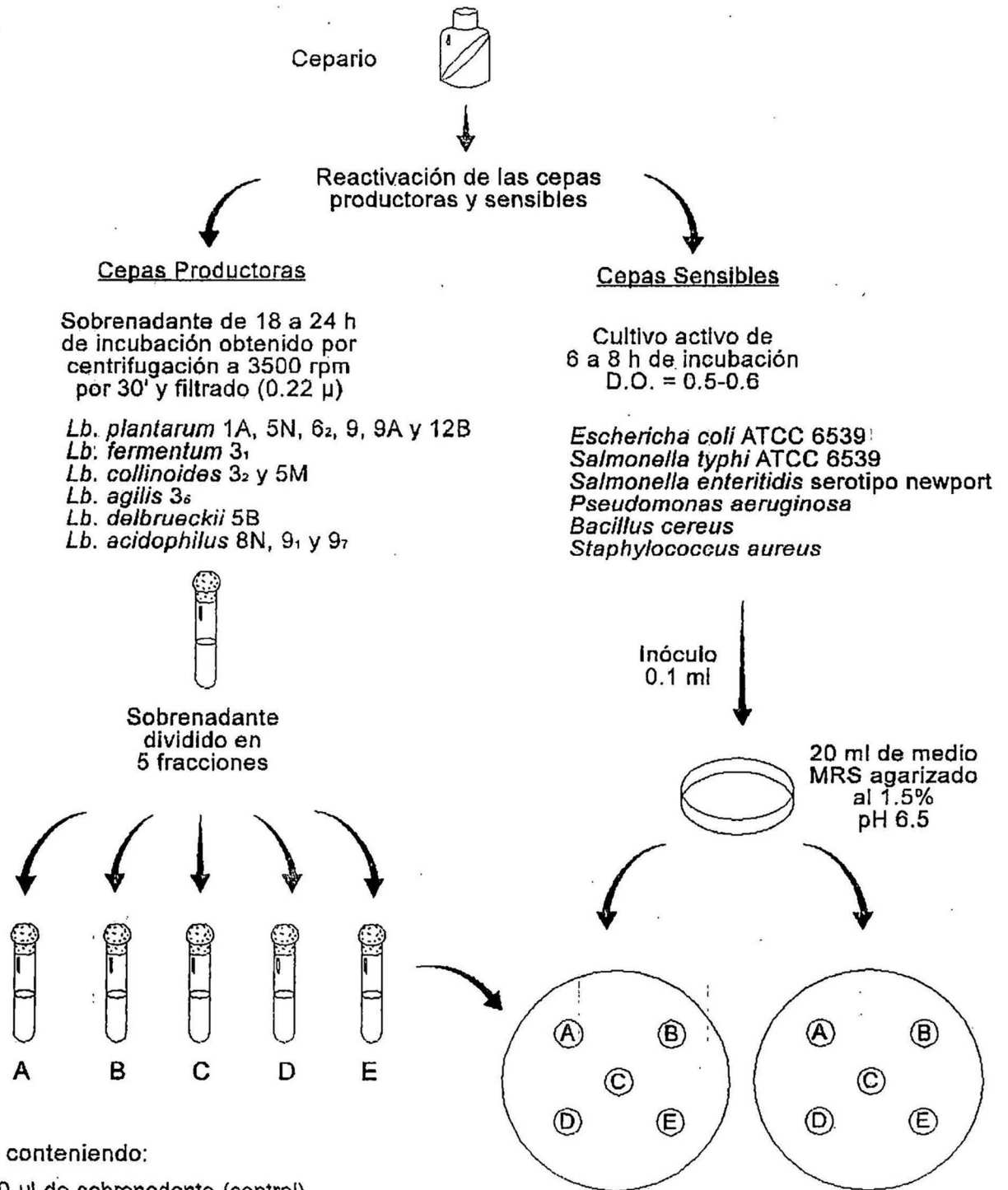
En C: 200 μl de sobrenadante neutralizado y tratado con 1 mg/ml de catalasa.
Incubación 30°C/1 hora

En D: 200 μl de sobrenadante neutralizado y tratado con 1 mg/ml de catalasa y con tripsina 2 mg/ml (Reposo por 1 hora).

En E: 200 μl de sobrenadante neutralizado y tratado con 1 mg/ml de catalasa y con pepsina 2 mg/ml (Reposo por 1 hora).

Incubación a 30°C por 12 h en condiciones de microaerofilia

ESQUEMA N° 2: CARACTERIZACION PARCIAL DE LA NATURALEZA DE LAS SUSTANCIAS INHIBITORIAS PRODUCIDAS POR CEPAS DE *LACTOBACILLUS* AISLADAS DE CHICHA DE JORA UTILIZANDO CEPAS INDICADORAS PATOGENAS. (Método de Difusión en Pocillos)



Orificios conteniendo:

En A: 200 μ l de sobrenadante (control).

En B: 200 μ l de sobrenadante neutralizado con NaOH 2 N

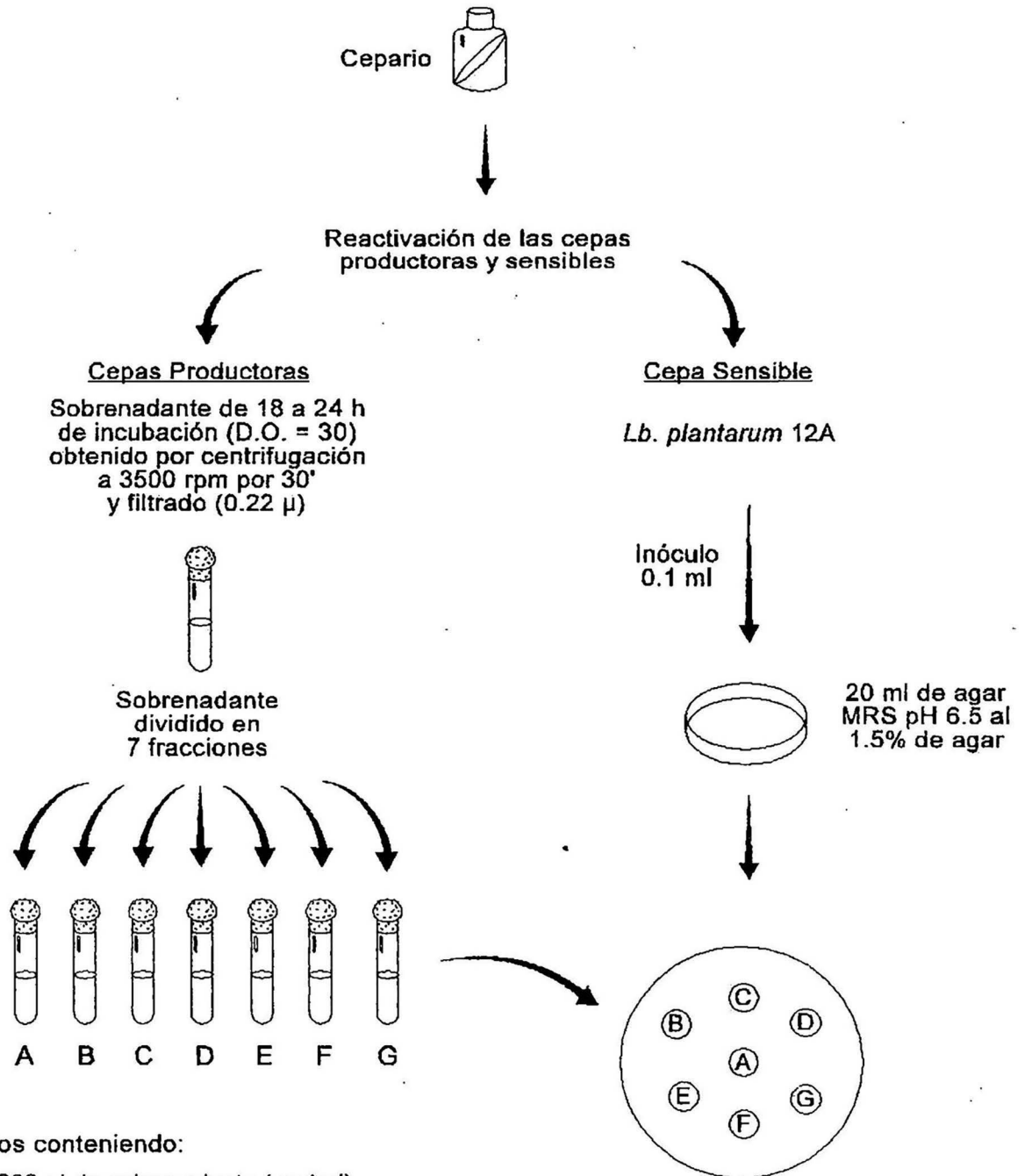
En C: 200 μ l de sobrenadante neutralizado y tratado con 1 mg/ml de catalasa.
Incubación 30°C/1 hora

En D: 200 μ l de sobrenadante neutralizado y tratado con 1 mg/ml de catalasa y con tripsina 2 mg/ml (Reposo por 1 hora).

En E: 200 μ l de sobrenadante neutralizado y tratado con 1 mg/ml de catalasa y con pepsina 2 mg/ml (Reposo por 1 hora).

Incubación a 30°C por 12 h

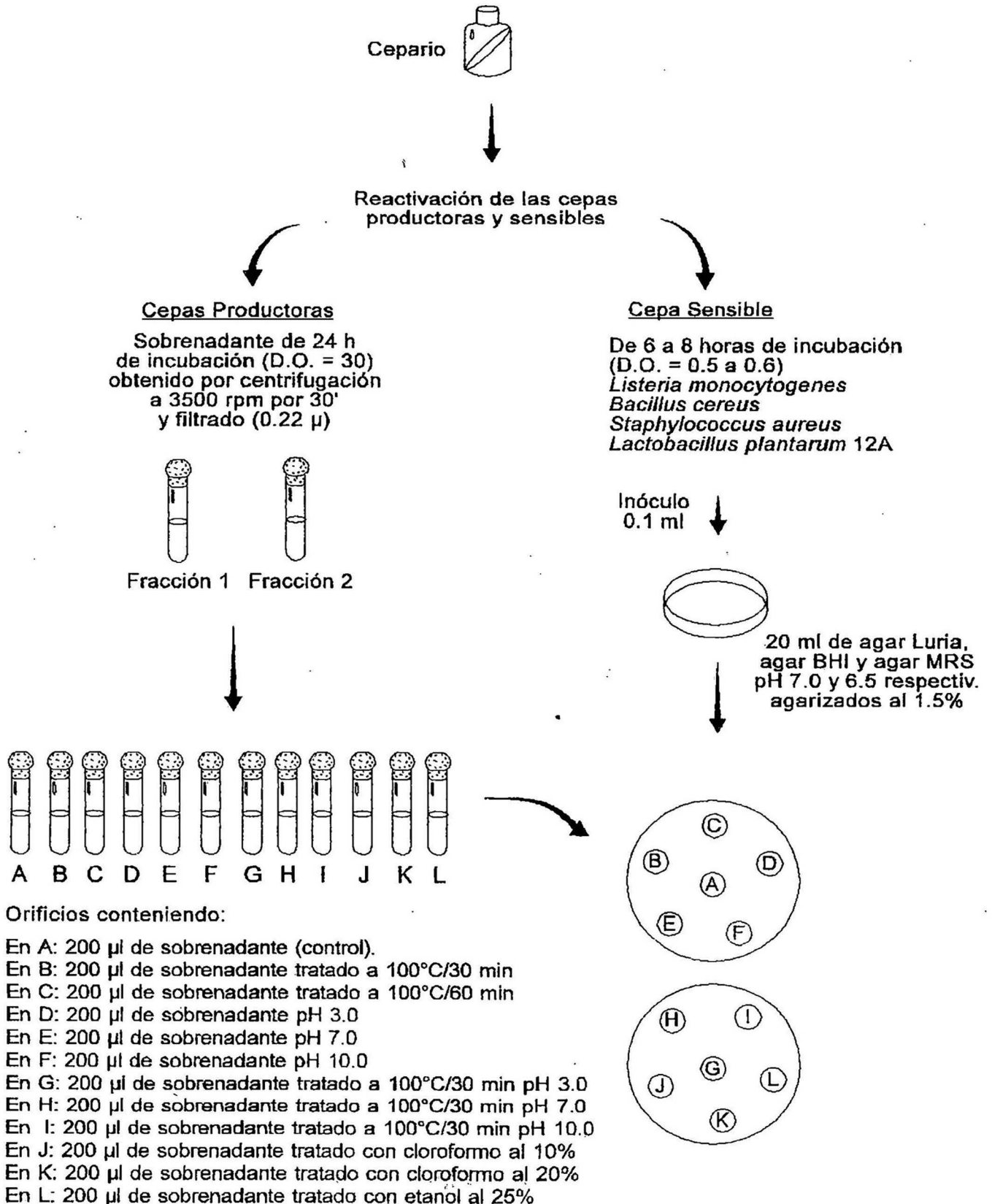
ESQUEMA Nº 3: SENSIBILIDAD A DIFERENTES TEMPERATURAS Y pH DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR LAS CEPAS DE *LACTOBACILLUS* AISLADAS DE CHICHA DE JORA



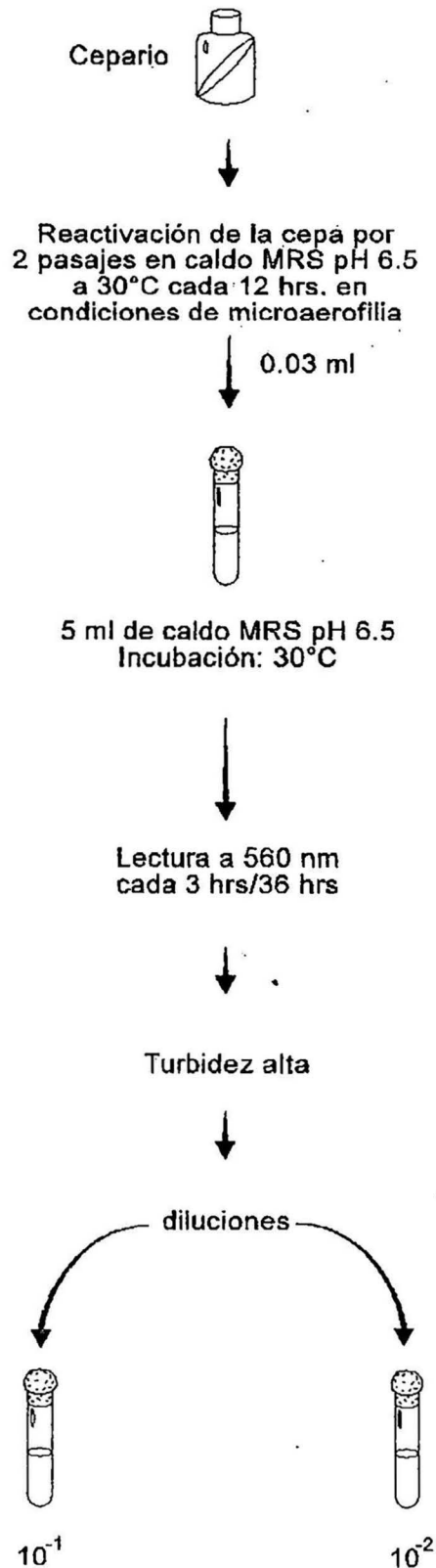
Orificios conteniendo:

- En A: 200 μl de sobrenadante (control).
- En B: 200 μl de sobrenadante pH 3.0
- En C: 200 μl de sobrenadante pH 7.0
- En D: 200 μl de sobrenadante pH 10.0
- En E: 200 μl de sobrenadante tratado a 80°C/20 min
- En F: 200 μl de sobrenadante tratado a 90°C/20 min
- En G: 200 μl de sobrenadante tratado a 100°C/20 min

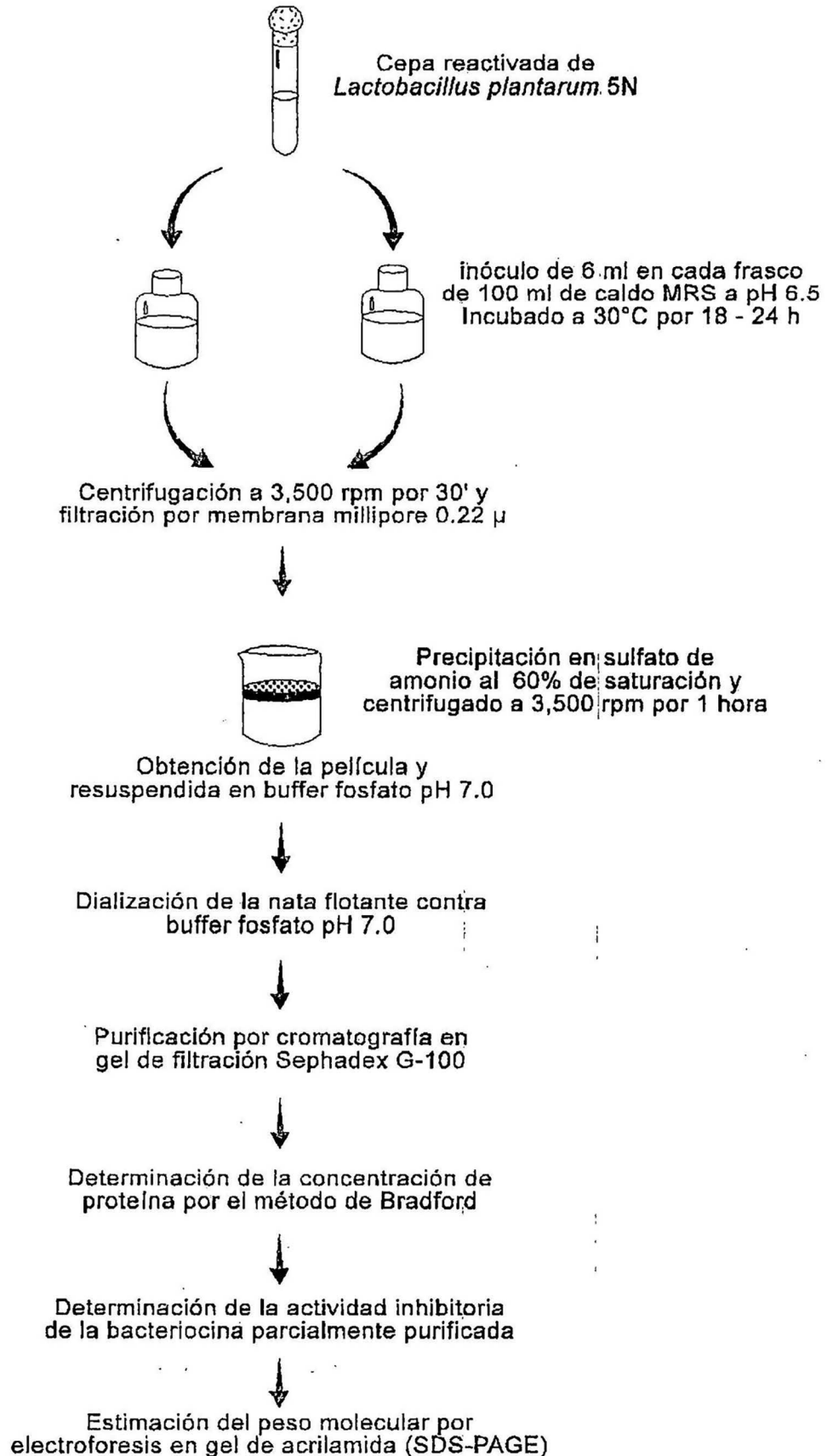
ESQUEMA N° 4: SENSIBILIDAD DE LAS FRACCIONES 1 Y 2 PRODUCIDA POR LA CEPA DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 5N A DIFERENTES TEMPERATURAS, pH Y SOLVENTES ORGANICOS



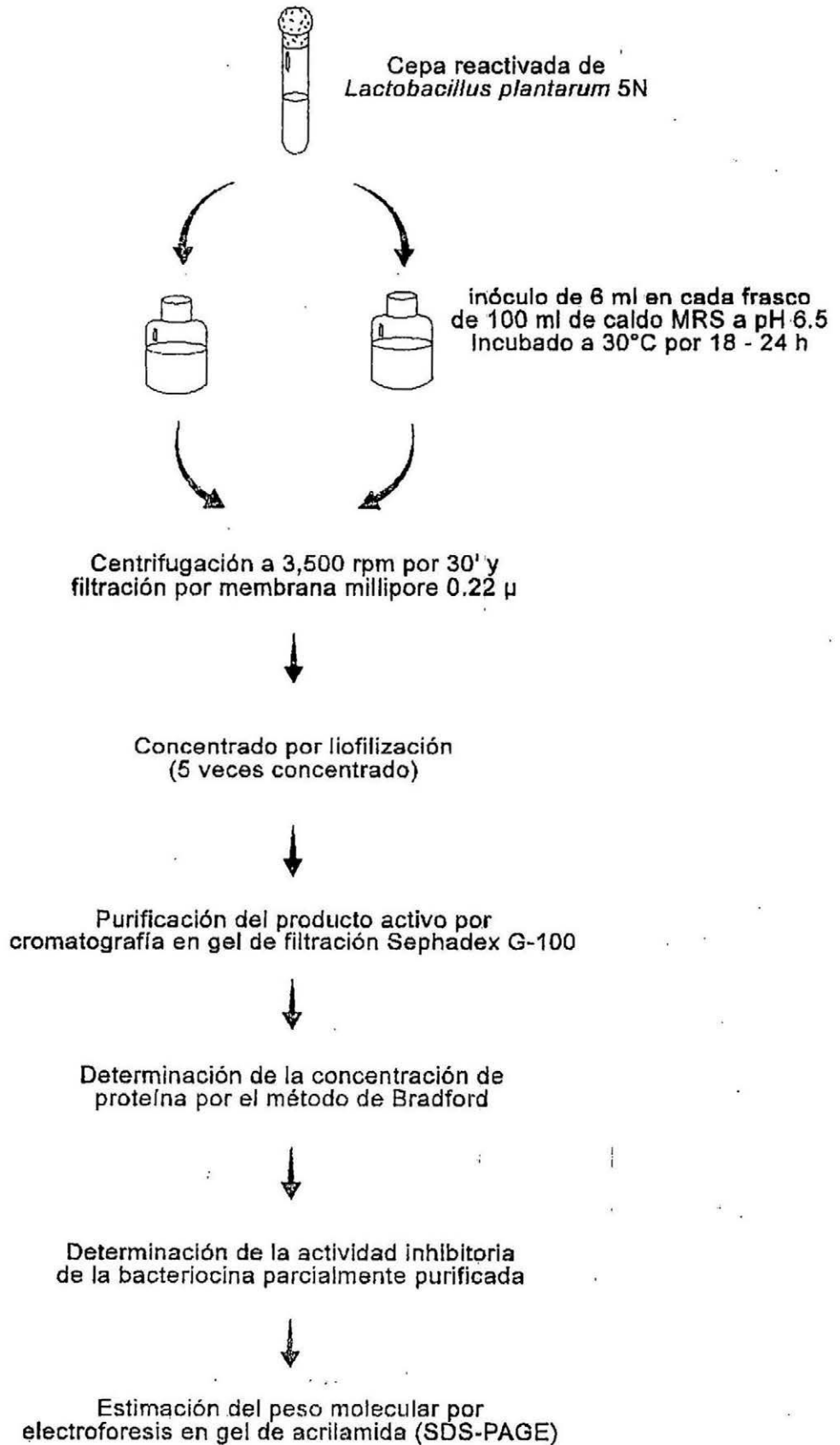
ESQUEMA N° 5: DETERMINACION DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 5N PRODUCTORA DE SUSTANCIAS INHIBITORIAS



ESQUEMA N° 6: PURIFICACION PARCIAL DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 5N (FRACCION 1)



ESQUEMA N° 7: PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 5N (FRACCIÓN 2)



4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente investigación son los siguientes:

4.1. Caracterización de las sustancias antimicrobianas producidas por cepas silvestres de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora

De 14 cepas productoras de sustancias inhibitorias seleccionadas, se logró detectar mediante pruebas de caracterización 9 cepas sintetizadoras de bacteriocinas: *Lactobacillus fermentum* 3₁, *Lactobacillus collinoides* 3₂, *Lactobacillus agilis* 3₅, *Lactobacillus collinoides* 5M, *Lactobacillus plantarum* 5N, *Lactobacillus plantarum* 6₂, *Lactobacillus acidophilus* 9₇ y *Lactobacillus plantarum* 9A, de las cuales 3 mostraron un mayor espectro de actividad inhibitoria: *Lactobacillus plantarum* 5N, *Lactobacillus collinoides* 3₂ y *Lactobacillus agilis* 3₅, las demás cepas tuvieron un comportamiento variado (Tablas 6 y 7).

4.2. Sensibilidad a diferentes temperaturas y pH de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus*

Las sustancias antimicrobianas presentes en los sobrenadantes de los cultivos de las cepas productoras, al ser tratadas a 80, 90 y 100°C por 20 minutos y a diferentes pH, mostraron una estabilidad notable, lo cual fue demostrado, enfrentando tales sustancias con la cepa indicadora *Lactobacillus plantarum* 12A (Tabla 9).

4.3. Determinación de la actividad inhibitoria de las bacteriocinas sintetizadas por cepas de *Lactobacillus*

De las 3 cepas seleccionadas como productoras de bacteriocinas, *Lactobacillus plantarum* 5N, reveló mayor diámetro de halos de inhibición con respecto a *Lactobacillus collinoides* 3₂ y *Lactobacillus agilis* 3₅. Asimismo se pudo observar que

las mejores cepas indicadoras de bacteriocinas fueron 5: ***Lactobacillus brevis*** 10, ***Lactobacillus vitulinus*** 11C, ***Lactobacillus plantarum*** 12A, ***Staphylococcus aureus*** y ***Listeria monocytogenes*** (Foto N° 2).

4.4. Caracterización de la bacteriocina producida por la cepa seleccionada *Lactobacillus plantarum* 5N

4.4.1. Determinación de la máxima producción de la sustancia antimicrobiana.

Al realizarse la cinética de crecimiento de ***Lactobacillus plantarum*** 5N, tanto por recuento en placa como por espectrofotometría, se comprobó que la máxima producción del producto activo se dio al finalizar la fase exponencial (5×10^{17} UFC/ml, densidad óptica = 30) que coincidió aproximadamente entre 18 y 24 horas de crecimiento (Fig. 1 y 2).

4.4.2. Determinación de la concentración de proteínas de la sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus plantarum* 5N

La cantidad de proteínas registrada en la sustancia antimicrobiana sintetizada por ***Lactobacillus plantarum*** 5N, fue como sigue: En el producto activo obtenido por precipitación con sulfato de amonio se registró por el método de Bradford 287.76 µg/ml de proteína (fracción 1), en el sobrenadante concentrado por liofilización, se registró 379.22 µg/ml de proteína (fracción 2) y en el sobrenadante concentrado por liofilización y purificado por cromatografía, se registró 19.71 µg/ml de proteína (eluidos 26 y 27). (Tabla 8).

La comprobación de la actividad inhibitoria de la sustancia antimicrobiana obtenida por procedimientos arriba indicados, fue realizado por el método de difusión en pocillo (Tabla 12).

4.4.3. Actividad inhibitoria del sobrenadante concentrado por liofilización (fracción 2)

Los eluidos obtenidos por cromatografía en gel de filtración, fueron 50 fracciones, de las cuales solo aquellas comprendidas entre las fracciones 22 a la 32 mostraron actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*. Los mayores tamaños de halos de inhibición estuvieron entre las fracciones 26 y 27 (19 mm) (Fig. N° 3).

4.4.4. Sensibilidad de la sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus plantarum* 5N a diferentes temperaturas, pH y solventes orgánicos

A través de estas pruebas, se pudo comprobar que el producto activo liberado por *Lactobacillus plantarum* 5N, fue estable (Tablas 10 y 11).

4.4.5. Estimación del peso molecular por electroforesis

Mediante pruebas de caracterización realizadas, se pudo comprobar que el producto activo sintetizado por *Lactobacillus plantarum* 5N, denominado plantaricin ChJPe era de naturaleza proteica, y el peso molecular revelado por SDS-PAGE, fue 6.2 kDa aproximadamente (Foto N° 3).

TABLA 6: Naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora y su efecto inhibitorio contra cepas lácticas sensibles

CEPAS PRODUCTORAS		CEPAS INDICADORAS O SENSIBLES **		
	Fracciones Ensayadas	<i>Lactobacillus brevis</i> 10	<i>Lactobacillus vitulinus</i> 11C	<i>Lactobacillus plantarum</i> 12A
<i>Lb. Plantarum</i> 1A	A	12.0	12.0	13.0
	B	-	-	13.0
	C	-	-	13.0
	D	-	-	12.0
	E	-	-	12.0
<i>Lb fermentum</i> 3₁	A	12.0	12.0	12.0
	B	14.0	11.0	12.0
	C	12.0	11.0	12.0
	D	-	-	-
	E	-	-	-
<i>Lb. Collinoides</i> 3₂	A	12.0	12.0	14.0
	B	11.0	11.0	12.0
	C	11.0	11.0	11.0
	D	-	-	-
	E	-	-	-

** = Diámetro de la zona de inhibición en mm

A = Sobrenadante no tratado (Control)

B = Sobrenadante neutralizado con NaOH 2N

C = Sobrenadante neutralizado, más 1 mg/ml de catalasa

Tamaño del orificio = 10 mm

D = Sobrenadante neutralizado, más 1 mg/ml de catalasa y 2 mg/ml de pepsina

E = Sobrenadante neutralizado, más 1 mg/ml de catalasa y 2 mg/ml de tripsina

- = No inhibición

Continuación...

TABLA 6: Naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora y su efecto inhibitorio contra cepas lácticas sensibles

CEPAS PRODUCTORAS		CEPAS INDICADORAS O SENSIBLES **		
	Fracciones Ensayadas	<i>Lactobacillus brevis</i> 10	<i>Lactobacillus vitulinus</i> 11C	<i>Lactobacillus Plantarum</i> 12A
<i>Lb. agilis</i> 3_s	A	12.0	12.0	12.0
	B	11.0	11.0	11.0
	C	11.0	11.0	11.0
	D	-	-	-
	E	-	-	-
<i>Lb. Delbrueckii</i> 5B	A	12.0	12.0	12.0
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
	E	-	-	-
<i>Lb. Collinoides</i> 5M	A	14.0	13.0	14.0
	B	11.0	11.0	11.0
	C	11.0	11.0	11.0
	D	-	-	-
	E	-	-	-

Continuación...

TABLA 6: Naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora y su efecto inhibitorio contra cepas lácticas sensibles

CEPAS PRODUCTORAS		CEPAS INDICADORAS O SENSIBLES **		
	Fraciones Ensayadas	<i>Lactobacillus brevis</i> 10	<i>Lactobacillus vitulinus</i> 11C	<i>Lactobacillus plantarum</i> 12A
<i>Lb. Plantarum</i> 5N	A	12.0	12.0	14.0
	B	12.0	12.0	12.0
	C	12.0	12.0	12.0
	D	-	-	-
	E	-	-	-
* <i>Lb. Plantarum</i> 6₂	A	14.0	12.0	14.0
	B	12.0	11.0	11.0
	C	11.0	11.0	11.0
	D	-	-	-
	E	-	-	-
<i>Lb. Acidophilus</i> 8N	A	12.0	12.0	12.0
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
	E	-	-	-

* *Lb. plantarum* 6₂, además de mostrar los halos totalmente transparentes, formó un segundo halo opaco de 25 mm de diámetro.

Continuación...

TABLA 6: Naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora y su efecto inhibitorio contra cepas lácticas sensibles

CEPAS PRODUCTORAS		CEPAS INDICADORAS O SENSIBLES **		
	Fracciones Ensayadas	<i>Lactobacillus brevis</i> 10	<i>Lactobacillus vitulinus</i> 11C	<i>Lactobacillus plantarum</i> 12A
<i>Lb. Acidophilus</i> 9 ₁	A	12.0	13.0	13.0
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
	E	-	-	-
<i>Lb. Acidophilus</i> 9 ₇	A	12.0	12.0	12.0
	B	11.0	11.0	11.0
	C	11.0	11.0	12.0
	D	-	-	-
	E	-	-	-
<i>Lb. Plantarum</i> 9 ₂	A	12.0	12.0	12.0
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
	E	-	-	-

Continuación...

TABLA 6: Naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora y su efecto inhibitorio contra cepas lácticas sensibles

CEPAS PRODUCTORAS		CEPAS INDICADORAS O SENSIBLES **		
	Fracciones Ensayadas	<i>Lactobacillus brevis</i> 10	<i>Lactobacillus vitulinus</i> 11C	<i>Lactobacillus plantarum</i> 12A
<i>Lb. Plantarum</i> 9A	A	12.0	14.0	12.0
	B	12.0	12.0	12.0
	C	11.0	11.0	11.0
	D	-	-	-
	E	-	-	-
<i>Lb. Plantarum</i> 12B	A	12.0	12.0	12.0
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
	E	-	-	-

TABLA 7: Naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora y su efecto inhibitorio contra cepas patógenas sensibles

CEPAS PRODUCTORAS		CEPAS INDICADORAS O SENSIBLES **					
	Fracciones Ensayadas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	<i>Salmonella enteritidis</i> serotipo newport	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lb. Plantarum</i> 1A	A	20.0	18.0	17.0	18.0	22.0	21.0
	B	-	-	-	-	-	12.0
	C	-	-	-	-	-	12.0
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-
<i>Lb fermentum</i> 3₁	A	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	18.0
	B	-	-	-	-	-	12.0
	C	-	-	-	-	-	12.0
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. Collinoides</i> 3₂	A	20.0	20.0	18.0	18.0	20.0	16.0
	B	-	-	-	-	11.0	12.0
	C	-	-	-	-	12.0	12.0
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-

** = Diámetro de la zona de inhibición en mm
 A = Sobrenadante no tratado (Control)
 B = Sobrenadante neutralizado con NaOH 2N
 C = Sobrenadante neutralizado, más 1 mg/ml de catalasa

D = Sobrenadante neutralizado, más 1 mg/ml de catalasa y 2 mg/ml de pepsina
 E = Sobrenadante neutralizado, más 1 mg/ml de catalasa y 2 mg/ml de tripsina
 - = No inhibición

Continuación...

TABLA 7: Naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora y su efecto inhibitorio contra cepas patógenas sensibles

CEPAS PRODUCTORAS		CEPAS INDICADORAS O SENSIBLES **					
	Fracciones Ensayadas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	<i>Salmonella enteritidis</i> serotipo newport	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lb. Agilis 3₅</i>	A	14.0	14.0	13.0	14.0	13.0	16.0
	B	-	-	-	-	12.0	12.0
	C	-	-	-	-	12.0	12.0
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-
<i>Lb delbrueckii 5B</i>	A	13.0	12.0	12.0	12.0	12.0	13.0
	B	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. Collinoides 5M</i>	A	18.0	20.0	20.0	22.0	20.0	18.0
	B	-	-	-	-	-	12.0
	C	-	-	-	-	-	12.0
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-

Continuación...

TABLA 7: Naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora y su efecto inhibitorio contra cepas patógenas sensibles

CEPAS PRODUCTORAS		CEPAS INDICADORAS O SENSIBLES **					
	Fracciones Ensayadas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	<i>Salmonella enteritidis</i> serotipo newport	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lb. Plantarum</i> 5N	A	20.0	20.0	20.0	18.0	18.0	17.0
	B	-	-	-	-	12.0	14.0
	C	-	-	-	-	12.0	14.0
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-
<i>Lb plantarum</i> 62	A	20.0	22.0	20.0	20.0	18.0	19.0
	B	-	-	-	-	-	12.0
	C	-	-	-	-	-	12.0
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. Acidophilus</i> 8N	A	14.0	12.0	12.0	12.0	13.0	14.0
	B	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-

Continuación...

TABLA 7: Naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora y su efecto inhibitorio contra cepas patógenas sensibles

CEPAS PRODUCTORAS		CEPAS INDICADORAS O SENSIBLES **					
	Fraciones Ensayadas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	<i>Salmonella enteritidis</i> serotipo newport	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lb. Acidophilus</i> 9₁	A	14.0	14.0	12.0	13.0	14.0	14.0
	B	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-
<i>Lb acidophilus</i> 9₇	A	14.0	14.0	12.0	12.0	14.0	15.0
	B	-	-	-	-	-	12.0
	C	-	-	-	-	-	12.0
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. Plantarum</i> 9₂	A	14.0	14.0	13.0	13.0	14.0	15.0
	B	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-

Continuación...

TABLA 7: Naturaleza de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora y su efecto inhibitorio contra cepas patógenas sensibles

CEPAS PRODUCTORAS		CEPAS INDICADORAS O SENSIBLES **					
	Fracciones Ensayadas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	<i>Salmonella enteritidis</i> serotipo newport	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lb. Plantarum 9A</i>	A	16.0	17.0	16.0	18.0	17.0	18.0
	B	-	-	-	-	-	12.0
	C	-	-	-	-	-	12.0
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-
<i>Lb plantarum 12B</i>	A	14.0	14.0	12.0	13.0	14.0	15.0
	B	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-
	D	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-

TABLA 8: Determinación de la concentración de proteínas en el crudo plantaricin ChJPe producida por *Lactobacillus plantarum* 5N (método de Bradford a 560 nm)

CRUDO PLANTARICIN ChJPe	CONCENTRACION DE PROTEINA
Sobrenadante precipitado con sulfato de amonio al 60% de saturación, dializado en buffer fosfato pH 7.0 (fracción 1)	287.76 µg/ml
Sobrenadante concentrado por liofilización (fracción 2)	379.22 µg/ml
Sobrenadante concentrado por liofilización y purificado por cromatografía (elúidos 26 y 27)	19.71 µg/ml

TABLA 9: Sensibilidad a diferentes temperaturas y pH de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora de Apurimac y Lambayeque

	CEPAS PRODUCTORAS								
	1A	3 ₁	3 ₂	3 ₅	5M	5N	6 ₂	9 ₁₇	9A
Control	13.0	12.0	14.0	14.0	12.0	14.0	14.0	14.0	1.20
pH 3	-	12.0	14.0	12.0	13.0	14.0	13.0	12.0	12.0
pH 7	11.0	12.0	13.0	12.0	11.0	12.0	11.0	11.0	11.0
pH 10	-	12.0	12.0	11.0	11.0	12.0	11.0	11.0	11.0
80°C/20 min.	-	12.0	14.0	12.0	14.0	13.0	12.0	12.0	12.0
90°C/20 min.	-	12.0	13.0	12.0	12.0	12.0	11.0	12.0	11.0
100°C/20 min.	-	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	11.0	11.0	11.0

CEPAS PRODUCTORAS:

- 1A = *Lactobacillus plantarum*
 3₁ = *Lactobacillus fermentum*
 3₂ = *Lactobacillus collinoides*
 3₅ = *Lactobacillus agilis*
 5M = *Lactobacillus collinoides*
 5N = *Lactobacillus plantarum*
 6₂ = *Lactobacillus plantarum*
 9₁₇ = *Lactobacillus acidophilus*
 9A = *Lactobacillus plantarum*

CEPA INDICADORA:

- 12A = *Lactobacillus plantarum*

- = No inhibición

TABLA 10 : Sensibilidad de la sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus plantarum* 5N a diferentes temperaturas, pH y solventes orgánicos (Fracción 1)

	CEPAS INDICADORAS			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 12A
CONTROL	20 mm	15 mm	22 mm	14 mm
TEMPERATURA				
100° C / 30 min	16 mm	14 mm	18 mm	12 mm
100° C / 60 min	15 mm	14 mm	17 mm	11 mm
pH				
3.0	20 mm	11 mm	22 mm	12 mm
7.0	16 mm	-	20 mm	12 mm
10.0	13 mm	-	14 mm	11 mm
TEMPERATURA + pH				
100° C / 30 min pH 3.0	16 mm	11 mm	18 mm	12 mm
100° C / 30 min pH 7.0	13 mm	-	13 mm	11 mm
100° C / 30 min pH 10.0	12 mm	-	12 mm	11 mm
SOLVENTES ORGANICOS				
CLOROFORMO 10%	17 mm	17 mm	19 mm	16 mm
20%	16 mm	-	18 mm	15 mm
ETANOL 25%	14 mm	11 mm	17 mm	14 mm

TABLA 11 : Sensibilidad de la sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus plantarum* 5N a diferentes temperaturas, pH y solventes orgánicos (Fracción 2)

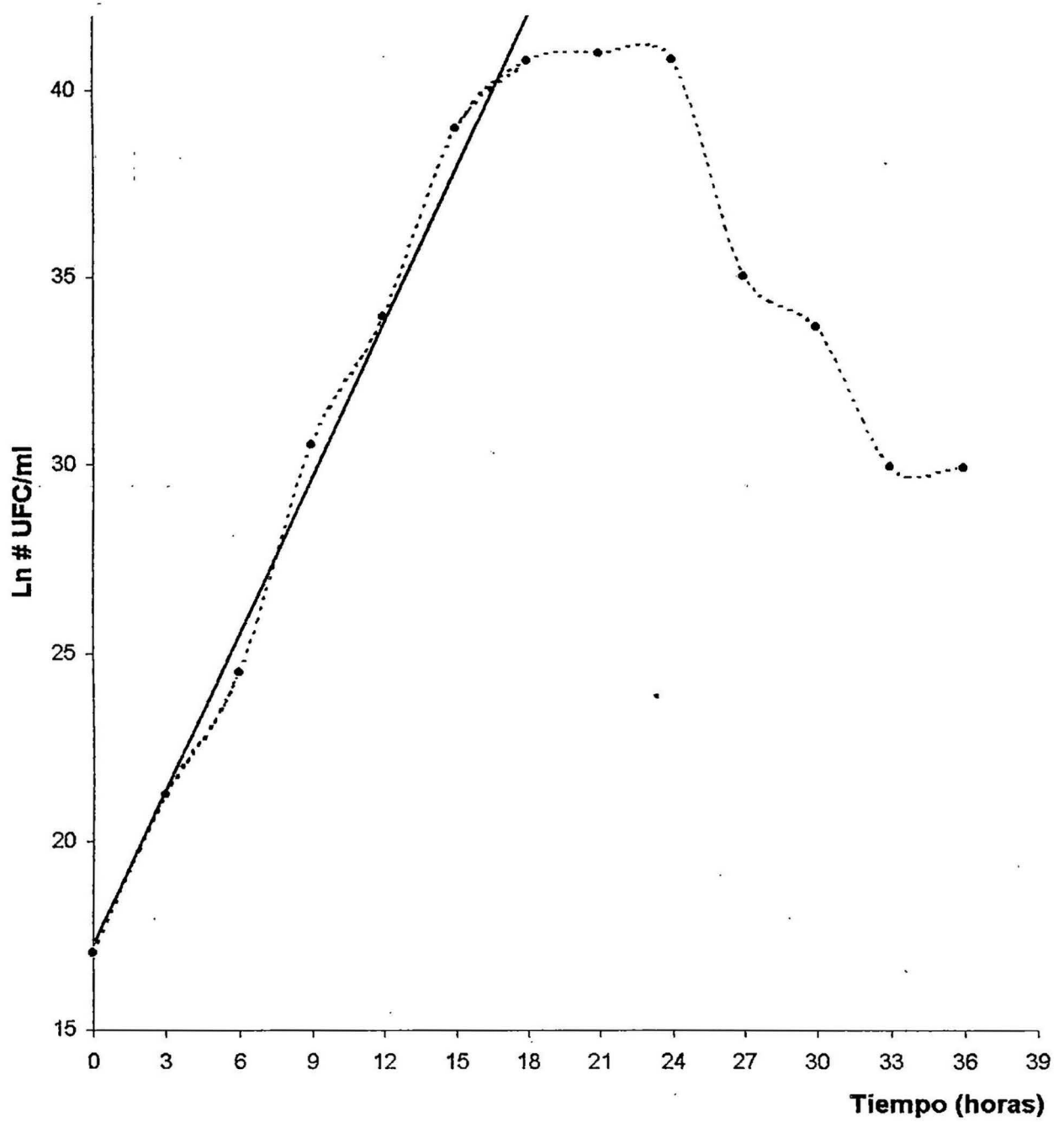
	CEPAS INDICADORAS			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 12A
CONTROL	22 mm	16 mm	24 mm	15 mm
TEMPERATURA				
100° C / 30 min	20 mm	15 mm	20 mm	14 mm
100° C / 60 min	19 mm	15 mm	18 mm	11 mm
pH				
3.0	20 mm	12 mm	22 mm	13 mm
7.0	18 mm	-	20 mm	13 mm
10.0	16 mm	-	16 mm	11 mm
TEMPERATURA + pH				
100° C / 30 min pH 3.0	18 mm	12 mm	18 mm	13 mm
100° C / 30 min pH 7.0	15 mm	-	15 mm	12 mm
100° C / 30 min pH 10.0	13 mm	-	12 mm	12 mm
SOLVENTES ORGANICOS				
CLOROFORMO 10%	19 mm	16 mm	21 mm	15 mm
20%	18 mm	14 mm	20 mm	14 mm
ETANOL 25%	17 mm	12 mm	19 mm	13 mm

TABLA 12: Determinación de la actividad inhibitoria del producto activo sintetizado por *Lactobacillus plantarum* 5N

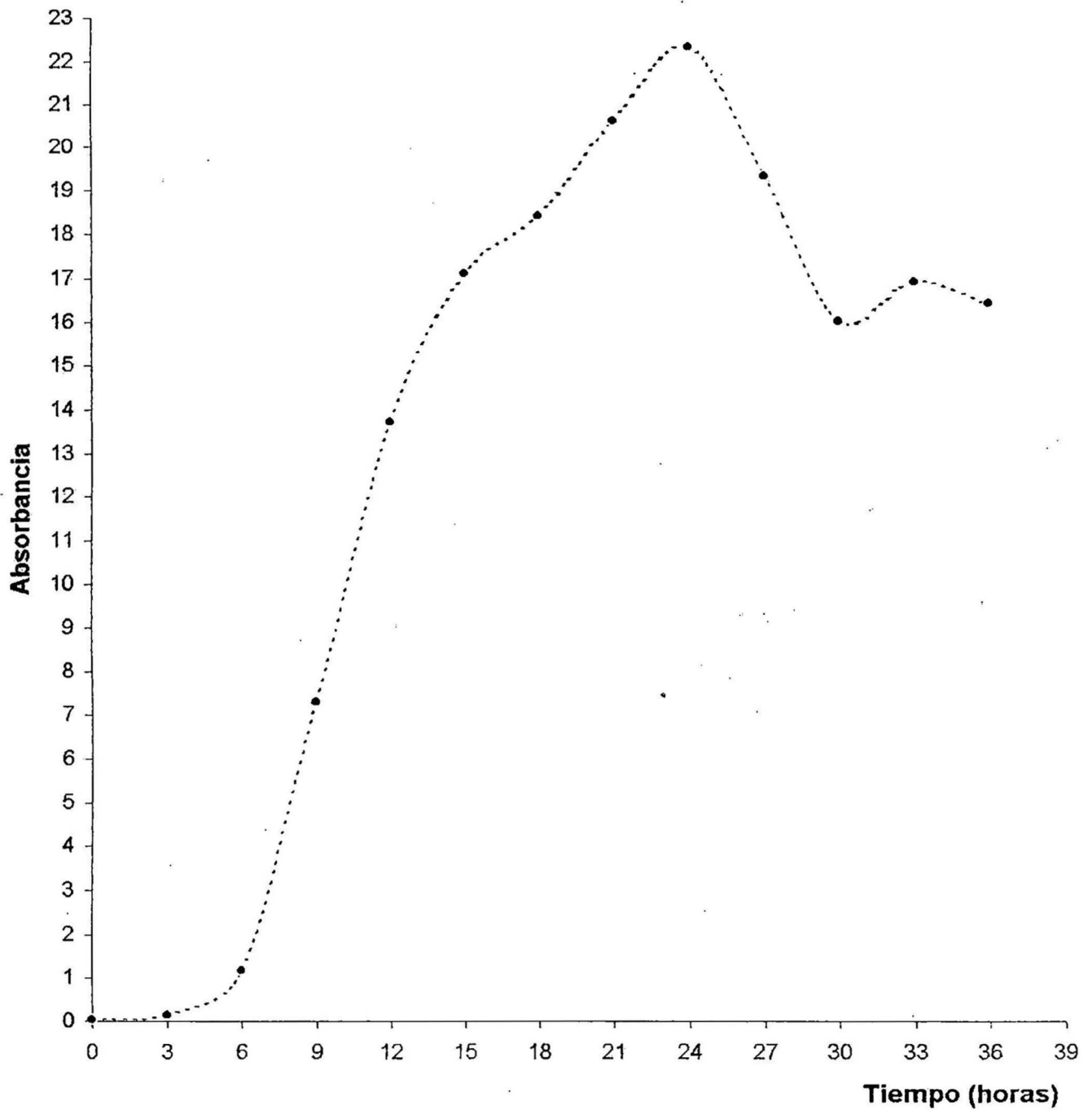
CEPAS INDICADORAS	CEPA PRODUCTORA <i>Lactobacillus plantarum</i> 5N	
<i>Salmonella tiphy</i>	So	15 mm
	SpD	16 mm
	SoL	18 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	So	15 mm
	SpD	15 mm
	SoL	22 mm
<i>Bacillus cereus</i>	So	16 mm
	SpD	17 mm
	SoL	20 mm
<i>Lactobacillus brevis</i> 10	So	12 mm
	SpD	13 mm
	SoL	14 mm
<i>Lactobacillus vitulinus</i> 11C	So	12 mm
	SpD	12 mm
	SoL	14 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i> 12A	So	13 mm
	SpD	14 mm
	SoL	15 mm

- So = Sobrenadante del cultivo
 SpD = Sobrenadante precipitado con sulfato de amonio al 60% y dializado contra buffer fosfato pH 7.
 SoL = Sobrenadante concentrado por liofilización.

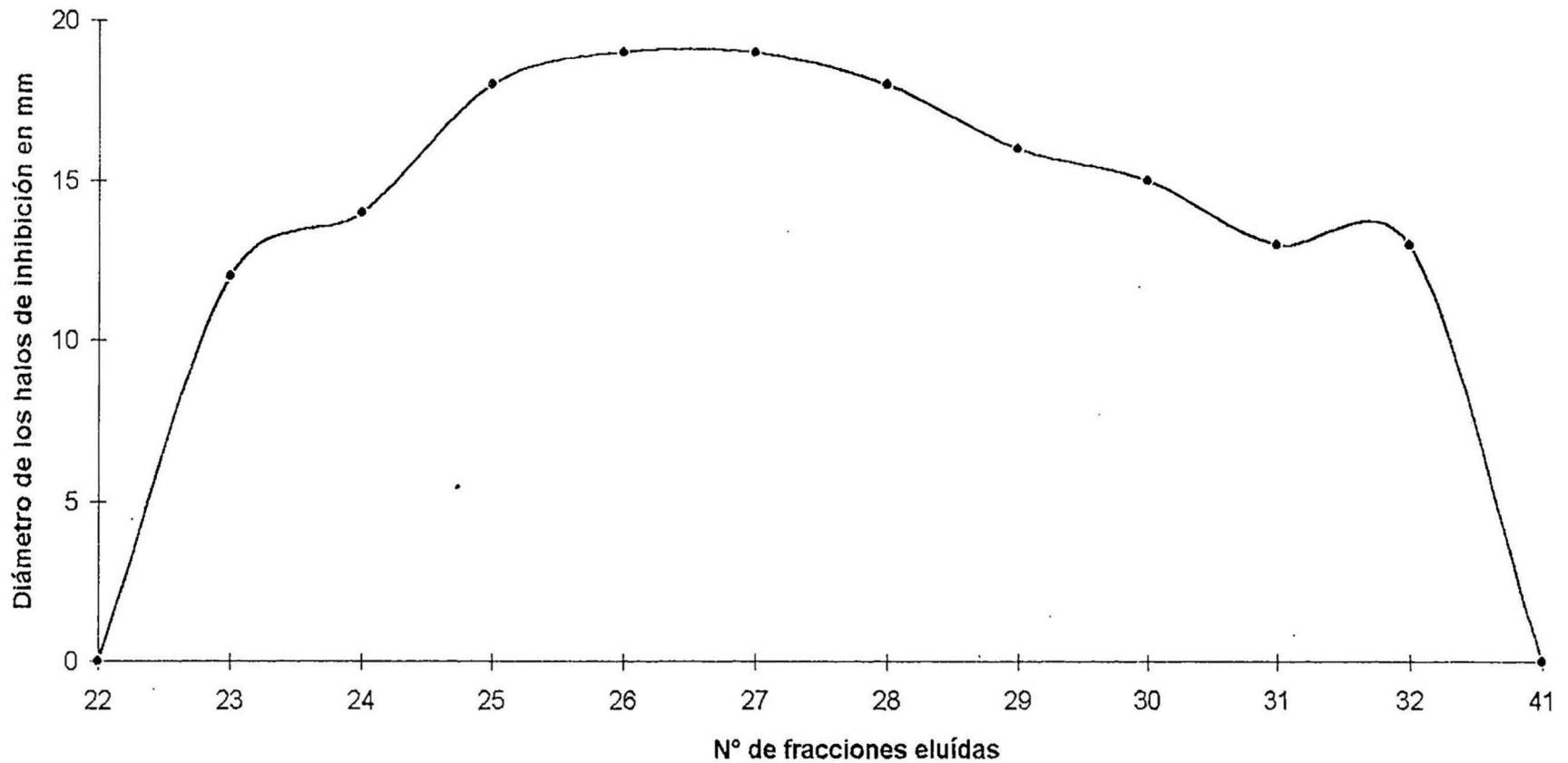
FIG. N° 1: CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA PRODUCTORA *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 5N (Recuento en placa)



**FIG. N° 2: CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA PRODUCTORA
LACTOBACILLUS PLANTARUM 5N
(Densidad Optica a 560 nm)**



**FIG. N° 3: ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA BACTERIOCINA PLANTARICIN ChJPe
(FRACCION 2) OBTENIDA POR CORMATOGRAFIA EN GEL DE SEPHADEX G-100
FRENTE A LA CEPA INDICADORA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***



Diámetro del producto crudo concentrado
por liofilización = 28 mm (control positivo)

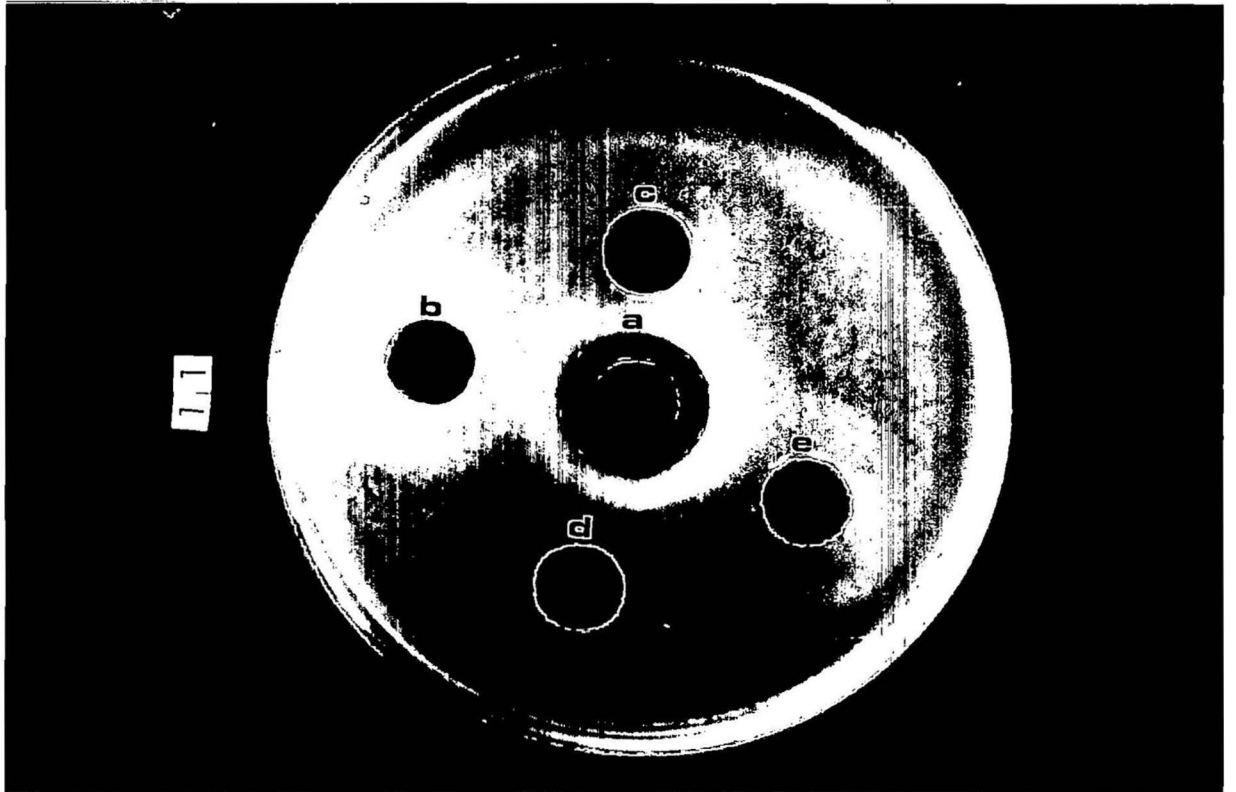


Foto N° 1: Inhibición de *Salmonella typhi* ATCC 6539 por *Lactobacillus agilis* 3₅. En A = El orificio contiene el sobrenadante puro de la cepa (control positivo). Se observa halo de inhibición de 14 mm.
En B, C, D y E = los orificios contienen los sobrenadantes tratados independientemente con NaOH 2 N, catalasa, pepsina y tripsina. No se observa halos de inhibición.

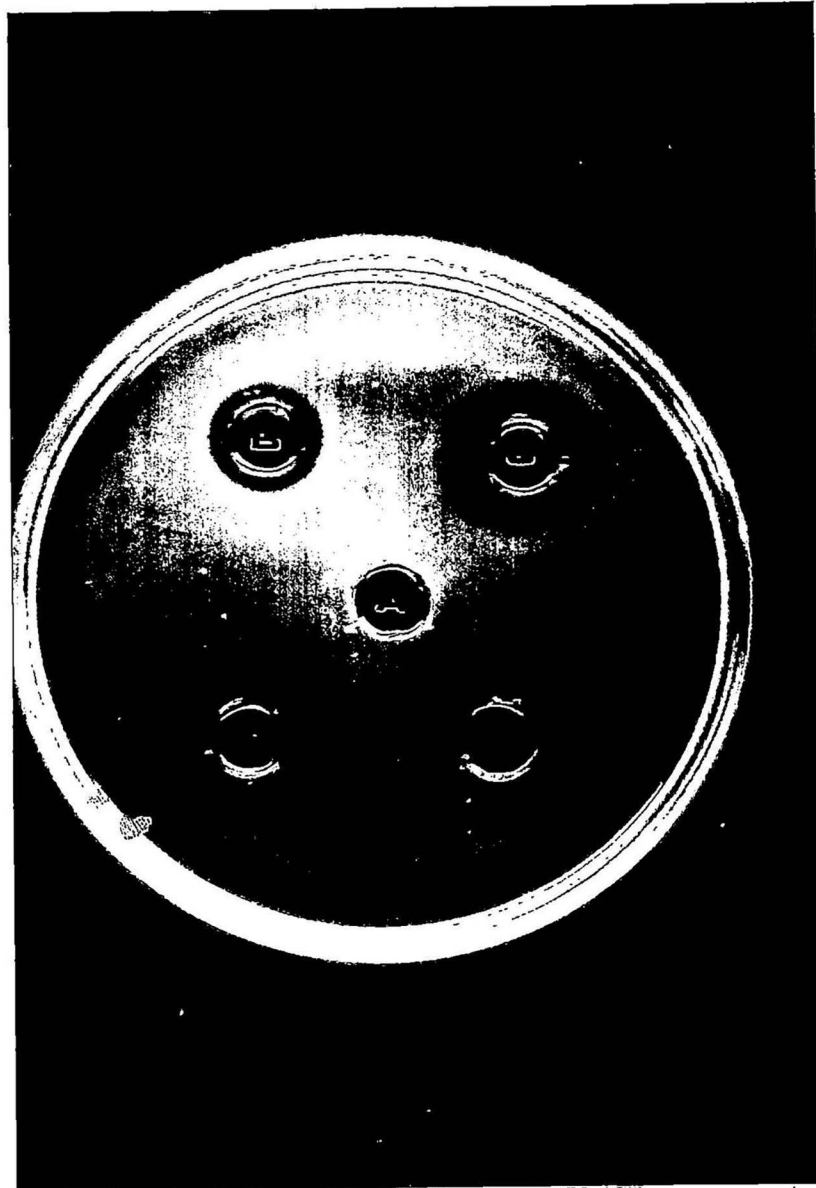


Foto N° 2: Inhibición de *Listeria monocytogenes* por *Lactobacillus plantarum* 5N y

Lactobacillus collinoides 3₂. Los orificios contienen:

En A = Control negativo. Caldo MRS. No se observa halo de inhibición.

En B = Control positivo. Sobrenadante puro de la cepa *Lactobacillus plantarum* 5N. se observa halo de inhibición de 14 mm.

En C = Sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* 5N precipitado con sulfato de amonio al 60% de saturación y dializado. Se observa halo de inhibición de 18 mm.

En D = Sobrenadante concentrado por liofilización de la cepa *Lactobacillus collinoides* 3₂. Se observa halo de inhibición de 20 mm.

En E = Sobrenadante concentrado por liofilización de la cepa *Lactobacillus plantarum* 5N. Se observa un halo de inhibición de 22 mm.

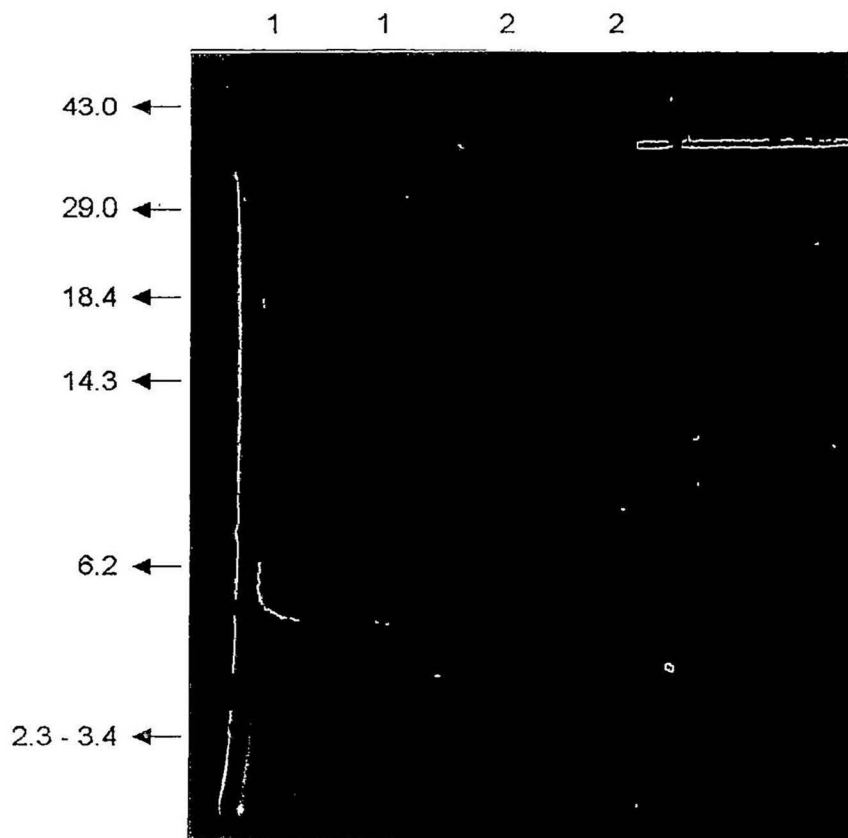


Foto N° 3: SDS-PAGE. Análisis de la bacteriocina en la fracción 27.

Líneas:

1. Estándares
2. Plantaricin ChJPe

5. DISCUSION

De 9 cepas de *Lactobacillus* identificadas mediante pruebas de caracterización como productoras de bacteriocinas, 3 fueron las que mostraron mayor espectro inhibitorio, correspondiendo a *Lactobacillus plantarum* 5N, *Lactobacillus collinoides* 3₂ y *Lactobacillus agilis* 3₅, siendo *Lactobacillus plantarum* 5N la más estudiada y reportada por varios autores como Piart y col. (1992), Jiménez-Díaz y col. (1993), Garriga y col. (1993) y Atrih y col. (1993), coincidiendo con los resultados del presente trabajo, mientras que *Lactobacillus collinoides* 3₂ y *Lactobacillus agilis* 3₅, aun no han sido registradas como productoras de sustancias inhibitorias por otros autores, siendo éste el primer reporte en bebidas fermentadas de Perú como la chicha de jora (Tablas 6 y 7).

Las sustancias antimicrobianas producidas por cepas de *Lactobacillus* mostraron estabilidad a 80°C, 90°C y 100°C por 20 minutos, a pH 3.0, 7.0 y 10.0, sin embargo, cuando el pH fue elevado a 10.0, se observó una reducción en el tamaño de las zonas de inhibición, lo que estaría indicando una tendencia a perder actividad inhibitoria en pH alcalino. Este mismo comportamiento se pudo comprobar cuando el sobrenadante de la cepa *Lactobacillus plantarum* 5N fue sometida a la temperatura de 100°C durante 30 y 60 minutos y pH 3.0, 7.0 y 10.0, coincidiendo con los resultados de Strasser y Manca (1993), Piva y Headon (1994) y Thompson y col. (1996) (Tablas 10 y 11).

Con respecto a la sensibilidad frente a enzimas proteolíticas, se pudo observar que las sustancias antimicrobianas presentes en los sobrenadantes de las cepas *Lactobacillus plantarum* 5N, *Lactobacillus collinoides* 3₂ y *Lactobacillus agilis* 3₅, fueron inactivadas por la pepsina y tripsina, es decir perdieron actividad inhibitoria, lo que estaría indicando que las sustancias en estudio eran de naturaleza proteica, resultados que coinciden con varios investigadores como Jiménez-Díaz y col. (1993), Samelis y col. (1994) y Olsen y Jacobsen (1995).

Asimismo se pudo comprobar que la bacteriocina producida por ***Lactobacillus plantarum*** 5N no fue desnaturalizada con solventes orgánicos como etanol al 25% y cloroformo al 10 y 20%, coincidiendo con lo reportado por Bhunia y col. (1988), Strasser y Manca (1993).

En relación a la concentración y purificación parcial de proteínas, se pudo demostrar que la proteína activa presente en el crudo plantaricin ChJPe, precipitó óptimamente con sulfato de amonio al 60% de saturación, con formación de un material flotante como lípido. Este fenómeno permitió interpretar que era una sustancia hidrofóbica y por tanto difícil de ser obtenida para posteriores estudios. Experiencia que coincidió con lo sustentado por Samelis y col. (1994).

También se pudo demostrar que la bacteriocina producida por ***Lactobacillus plantarum*** 5N ejerció un efecto inhibitorio sólo frente a bacterias Gram positivas como ***Lactobacillus brevis*** 10, ***Lactobacillus plantarum*** 12A, ***Lactobacillus vitulinus*** 11C, ***Bacillus cereus***, ***Staphylococcus aureus*** y ***Listeria monocytogenes***, en cambio las bacterias Gram negativas no fueron afectadas. Siendo las mejores cepas indicadoras, las especies taxonómicamente afines, datos que coinciden con la mayoría de los investigadores Tagg y col. (1976), Rammelsberg y Radler (1990), Mathieu y col. (1993) y Samelis y col. (1994).

Con respecto a la determinación del peso molecular, se pudo observar que la bacteriocina de ***Lactobacillus plantarum*** 5N era un péptido pequeño de aproximadamente 6.2 kDa. Este resultado coincidió con lo reportado por la mayoría de los estudiosos como Bhunia y col., (1988), Jiménez-Díaz y col. (1993) y Thompson y col. (1996).

6. CONCLUSIONES

- Por primera vez se ha logrado detectar cepas nativas de ***Lactobacillus*** productoras de bacteriocinas a partir de chicha de jora, correspondiendo el mayor porcentaje a ***Lactobacillus plantarum***.
- De las 9 cepas sintetizadoras de bacteriocinas, la cepa ***Lactobacillus plantarum*** 5N fue la que tuvo mayor actividad inhibitoria frente a cepas taxonómicamente afines y cepas Gram positivas patógenas contaminantes de alimentos.
- La máxima producción de la bacteriocina sintetizada por ***Lactobacillus plantarum*** 5N, se pudo observar al finalizar la fase exponencial de crecimiento.
- La sustancia antimicrobiana producida por ***Lactobacillus plantarum*** 5N fue estable a diferentes temperaturas y pH, así como a diferentes concentraciones de solventes orgánicos, pero fue sensible a la acción de 2 enzimas proteolíticas: pepsina y tripsina, lo que estaría revelando que es una sustancia de naturaleza proteica.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- ALLISON, G. E.; FREMAUX, C. y KLAENHAMMER, T. R. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 1994; 176 (8): 2235-2241.
- 2.- ATRIH, A.; REKHIF, N.; MILLIÈRE, J.B. and LEFEBURE, G. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C 19. *Can. J. Microbiol.* 1993; 39, 1173-1179.
- 3.- AXELSSON, L. and HOLCK, A. The genes involved in production of immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb 706. *J. Bacteriol.* 1995; 177 (8): 2125-2137.
- 4.- BARNBY-SMITH, F. M.; ROLLER, S. A.; WOODS, L. F. J.; BARKER, M. B.; NIGHTINGALE, M. and GIBBS, P. A. Production of antimicrobial compounds by lactic acid bacteria. Research Report N° 662, Leather Head Food R. A. 1989.
- 5.- BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M.C. and RAY, B. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. of Appl. Bacteriol.* 1988; 65, 261-268.
- 6.- BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M.C.; RAY, B. and KALCHANAND, N. Mode of action of pediocin Ach from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* 1991; 70, 25-33.
- 7.- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72, 248-254.
- 8.- BRUNO, M. E. C. and MONTVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59, 3003-3010.

- 9.-BOTTAZZI, V. An introduction to red-shaped lactic and bacteria. *Biochemic.* 1988; 70(3), 303-316.
- 10.-CARMINATI, D.; GIRAFFA, G. And BOSSI, M. G. Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against ***Listeria monocytogenes***. *J. Food Prot.* 1989; 52, 614-617.
- 11.-DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 1989; 43, 164-167.
- 12.-DAESCHEL, M. A. and KLAENHAMMER, T. R. Association of a 13.6 megadalton plasmid in ***Pediococcus pentosaceus*** with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985; 50, 1538-1541.
- 13.-DE KLERK, H.C. Properties of a ***Lactobacillus fermenti*** bacteriocin. *J. Gen. Microbiol.* 1967; 48, 309-316.
- 14.-DE VUST, L.; CALLEWAERT, R. y CRABBE, K. Primary metabolite kinetics of bacteriocins biosynthesis by ***Lactobacillus amyloporus*** and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *J. Microbiol.* 1996; 142, 817-827.
- 15.-DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 1990; 44, 100-117.
- 16.-FARIAS, M.E.; P. DE RUIZ HOLGADO, A. and SESMA, F. Bacteriocins production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: Inhibition of foodborne pathogens. *J. of Food Prot.* 1994; 57, (11), 1013-1015.
- 17.-FREMAUX, C. H. Y. y CENATIEMPO, Y. Mesentericin Y 105 gene clusters in ***Leuconostoc mesenteroides*** Y 105. *J. Microbiol.* 1995; 141, 1637-1645.

- 18.- GARVER, K. I. and MURIANA P.M. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. *Int. J. Food Microbiol.* 1993;19, 241-258.
- 19.- GARCIA, H. G.; POLETTE, B. M. y RIOS, J. Espectro bactericida de piocinas sobre cepas colectadas en hospitales de las regiones IX y X de Chile. *Rev. Med. Chile.* 1988; 16: 543-548.
- 20.- GARCIA, H. G. Mecanismos de la actividad antibiótica de bacteriocinas. *Rev. Méd. Chile.* 1992; 120, 439-444.
- 21.- GARRIGA, M. HUGAS, M.; AYMERICH, T. and MONFORT, J. M. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 1993; 75, 142-148.
- 22.- GEIS, A.; SINGH, J.; TEUBER, M. Potencial of lactic streptococci to produce bacteriocin. *J. Appl. and Environ. Microbiol.* 1983; 45 (1): 205-211.
- 23.- GONZALES, C. F. and KUNKA, B. S. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987; 53, 2534-2538.
- 24.- GONZALES, S. N.; APELLA, M. C.; ROMERO, N. C.; NADER DE MACIAS, M. E. and OLIVER, G. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains in fermented milk. *J. Food Prot.* 1993; 56 (9), 773-776.
- 25.- HANLIN, M. B.; KALCHAYANAND, P.; RAY, P. and RAY, B. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* 1993; 56, 252-255.
- 26.- HÉCHARD, Y.; DERIJARD, B; LETELLIER, F. y CENATIEMPO, Y. Characterization and purification of mesenterocin Y 105, an anti-Listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138, 2725-2731.

- 27.-HOLCK, A.; AXELSSON, L.; BIRKELAND, S. E.; AUKRUST, T. y BLOM, H. Purification and aminoacid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb 706. J. Gen. Microbiol. 1992; 138, 2715-2720.
- 28.-HOLO, H.; NILSSEN, O. and NES, I. F. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. J. Bacteriol. 1995; 173 (2), 3879-3887.
- 29.-HOLZAPFEL, W.H. GEISEN, R. and SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int. Food Microbiol. 1995; 24, 342-362.
- 30.-HURST, A. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 1981; 27, 85-123.
- 31.-JARVIS, B. y FARR, J. Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin inactivating enzyme from *Bacillus cereus*. Biochem. Biophys. Acta. 1971; 227, 232-240.
- 32.-JACK, R.W.; TAGG, J.R. and RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Rev. Microbiol. 1995; 59(2), 171-200.
- 33.-JAY, J.M. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol. 1982; 14, 525-532.
- 34.-JEPPESEN, V. F. y HUSS, H. H. Characteristics and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products. Int. J. Food Microbiol. 1993; 18, 305-320.
- 35.-JIMENEZ-DIAZ, R.; PIARD, J.C.; RUIZ-BARBA, J. L. y DESMAZEAUD, M. J. Isolation of a bacteriocin producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. Third Symposium on Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 1990; 87-91.
- 36.-JIMENEZ-DIAZ, R.; RIOS SANCHEZ, R.M.; DESMAZEAUD, M.; RUIZ-BARBA, J.L. and PIARD, J.C. Plantaricin S and T two new bacteriocins produced by *Lactobacillus*

- plantarum** LPCO10 isolated from a green olive fermentation. J. Appl. Environ. Microbiol. 1993; 59, 1416-1424.
- 37.-KALCHAYANAND, N.; RAY, B.; FIELD, R. A. y JOHNSON, M. C. Spoilage of vacuum-packaged refrigerated beef by **Clostridium**. J. Food Prot. 1989; 52, 424-426.
- 38.-KATO, T.; MATSUDA, T.; OGAWA, E.; OGAWA, H.; KATO, H.; DOI, V. and NAKAMURA, R. Plantaricin-149, a bacteriocin produced by **Lactobacillus plantarum** NRIC 149. J. of Ferment. and Bioengineering. 1994; 77, (3), 277-282.
- 39.-KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimic. 1988; 70, 337-349.
- 40.-KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Fems Microbiol. Rev. 1993; 12, 39-86.
- 41.-KLERK, H. C. and SMIT, J. A. Properties of a **Lactobacillus fermenti** bacteriocins. J. Gen. Microbiol. 1967; 48, 309-316.
- 42.-KOK, J.; HOLD, H.; VAN BELKUM, M. J.; HANNDRIKMAN, A. J. y NES, I. F. Nonnisin bacteriocins in lactococci: Biochemistry, genetics and mode of action. En: D. Hoover y L. Steenson (Eds.) Bacteriocins of lactic acid bacteria. New York. Academic Press, pp. 121-150. 1993.
- 43.-LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227, 680-685.
- 44.-LARSEN, A.G.; VOGENSEN, F.K. and JOSEPHSEN, J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: Purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by **Lactobacillus bavaricus** MI401. J. Appl. Bacteriol. 1993; 75, 113-122.

- 45.- LEER, R.; VAN DER VOSSSEN, J. M. B. M. ; VAN GIEZEN, M.; VAN NOORT, J. M. y
POUWELS, P. H. Genetic analysis of acidocin B; a novel bacteriocin produced by
Lactobacillus acidophilus. J. Microbiol. 1995; 141, 1629-1635.
- 46.- LEWUS, C. B.; KAISER, A. and MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial
pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. J. Appl.
Environ. Microbiol. 1991; 57 (6), 1683-1688.
- 47.- LEWUS, C. B.; SUN, S. and MONTVILLE, T. J. Production of an amylasa sensitive
bacteriocin by an atypical ***Leuconostoc paramesenteroides*** strain. Appl. Environ.
Microbiol. 1992; 58, 143-149.
- 48.- LLOYD, A. G. y DRAKE, J. P. Problems posed by essential food preservatives. Med.
Bull. 1975; 31, 214-219.
- 49.- McDONALD, L.C.; McFEETERS, R.F.; DAESCHEL, M.A. and FLEMING, H.P. A
differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative
lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 1987; 53, 1382-1384 (Sept).
- 50.- MANIATIS, T.; SAMBROOK, J. and FRITSH, E. F. Molecular cloning: A laboratory
manual x 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- 51.- MATHIEU, F.; SUDIRMAN SUWANDHI, I.; REKHIF, N; MILLIERE, J.B. and
LEFEBVRE, G. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by ***Leuconostoc***
mesenteroides ssp. ***mesenteroides*** FR52. J. Appl. Bacteriol. 1993; 74, 372-379.
- 52.- MURIANA, P. M. y KLAENHAMMER, T. R. Cloning, phenotypic expression and DNA
sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by
Lactobacillus spp. J. Bacteriol. 1991; 173 (5), 1779-1788.
- 53.- NETTLES, C.G. and BAREFOOT, S.F. Biochemical and genetic characteristic of
bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. J. Food Prot. 1993; 56 (4), 338-
356.

- 54.- NIETO-LOZANO, J. C.; NISSEN-MEYER, J.; SLETTEN, K.; PELAEZ, C. y NES, I. F. Purification and aminoacid sequence of a bacteriocin produced *by Pediococcus acidilactici*. J. Gen. Microbiol. 1992; 138, 1985-1990.
- 55.- OJCIUS, D. M. y YOUNG, J. D. E. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: In these a common structural motif. Trends Biochem. Sci. 1991; 16, 225-229.
- 56.- OLSEN, A.; HALM, M. y JAKOBSEN, M. The microbial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. J. Appl. Bacteriol. 1995; 79, 506-512.
- 57.- PIARD, J.C. y DESMAZEAUD, M. J. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2 bacteriocins and other antibacterial substances. Lait 1992; 72, 113-142.
- 58.- PIVA, A. F. y HEADON, D. R. Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. J. Microbiol. 1994; 140, 697-702.
- 59.- PUCCI, M. J.; VEDAMUTHU, E. R.; KUNKA, B. S. y VANDENBURGH, P. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. Appl. Environ. Microbiol. 1988; 54, 2349-2353.
- 60.- QUILLAMA, E. y LIENDO, N. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas asociadas a chicha de jora. Libro de Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Lima-Perú. 1996.
- 61.- QUILLAMA, E.; PASTERIS, S. y MANCA DE NADRA, M. C. Estudio preliminar de la producción de sustancias inhibitorias por bacterias lácticas aisladas de chicha de jora. Libro de resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. Lima-Perú. 1996.
- 62.- RAMMELSBERG, M. and RADLER, F. Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. Journal of Applied Bacteriology 1990; 69, 177-184.

- 63.- RAY, B. Pediocins of ***Pediococcus*** species. En: L. de Vuyst y E. J. Vandamme (Eds.) Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Glasgow: Blackie Academic and Professional Ap. 465-495. 1994.
- 64.- REQUENA, T. y PELAEZ, C. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. Revista Española de Ciencia y tecnología de Alimentos 1995; 35 (1) 19-44.
- 65.- RODRIGUEZ, J.M.; CINTOS, L.M.; CASAUS, P.; HORN, N.; ROOD, H.M.; HERNANDEZ, P.E. and GASSONS, M.J. Isolation of nisin-producing ***Lactococcus lactis*** strains from dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriology 1995; 78, 109-115.
- 66.- SAMELIS, J.; ROLLER, S. y METAXOPOULOS, J. Sakacin B. a bacteriocin produced by ***Lactobacillus sake*** isolated from greek dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriology 1994; 76, 475-486.
- 67.- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F.K. Antibacterial activity of ***Lactobacillus sake*** isolated from meat. J. Appl. Environ. Microbiol. 1989; 55 (8), 1901-1906.
- 68.- SCHILLINGER, U.; KAYA, M. y LÜCKE, F.K. Behaviour of ***Listeria monocytogenes*** in meat and its control by bacteriocin-producing strain of ***Lactobacillus sake***. J. Appl. Bacteriol. 1991; 70, 473-478.
- 69.- SCOTT, V. N. y TAYLOR, S. L. Effect of nisin on the outgrowth of ***Clostridium botulinum*** spores. J. Food Sci. 1981; 46, 117-120.
- 70.- SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. and HOLT, J.E. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2. Williams and Wilkins, Baltimore. 1986.
- 71.- SOBRINO, O. J.; RODRIGUEZ, J.M.; MOREIRA, W. L.; FERNANDEZ, M. F.; SANZ, B. y HERNANDEZ, P.E. Antibacterial activity of ***Lactobacillus sake*** isolated from dry fermented sausages. Int. J. Food Microbiol. 1991; 13, 1-10.

- 72.- SOBRINO, O. J.; RODRIGUEZ, J.M.; MOREIRA, W. y HERNANDEZ, P.E. Sakacin M. a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. Int. J. Food Microbiol. 1992; 116, 215-225.
- 73.- SPELHAUG, S. R. y HERLANDER, S. K. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. J. Food Prot. 1989; 52 (12), 856-862.
- 74.- STODDARD, G. W.; PETZEL, J. P.; VAN BELKUM, M. J.; KOK, J. y Mc KAY, L. Molecular analysis of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar Diacetylactis WM4. J. Appl. Environ. Microbiol. 1992; 58 (6), 1952-1961.
- 75.- STOFFELS, G.; NES, I.F. and GUOMUNDSDOTTIR, A. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. J. of Appl. Bacteriol. 1992; 73, 309-316.
- 76.- STRASSER DE SAAD, A. M. y MANCA DE NADRA, M.C. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. J. Appl. Bacteriol. 1993; 74, 406-410.
- 77.- STRASSER DE SAAD, A. M.; PASTERIS, S. E. y MANCA DE NADRA, M.C. Production and stability of pediocin N5p in grape juice medium J. Appl. Bacteriol. 1995; 78, 473-476.
- 78.- TAGG, J. R.; DAJANI, A. S. and WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Bacteriol. Rev. 1976; 40, 722-756.
- 79.- THOMPSON, J. K.; COLLINS, M. A. and MERCER, W. D. Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. J. Appl. Bacteriol. 1996; 80, 338-348.
- 80.- TICHACZEK, P. S.; MEYER, J. N.; NES, R. F.; VOGEL, R. F. y HAMMES, W. P. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 y sakacin P from *L. sake* LTH 673. Systim. Appl. Microbiol. 1992; 15, 460-468.

- 81.-TICHACZEK, P. S.; VOGEL, R. F. y HAMMES, W. P. Cloning and sequencing of sak P incoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. J. Microbiol. 1994; 140, 361-367.
- 82.-VAUGHAN, E. E. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. J. Appl. Bacteriol. 1994; 76, 118-123.
- 83.-VIGNOLO, G.M.; DE KAIRUZ, M.N.; P. DE RUIZ HOLZADO, A. and OLIVER, G. Influence of growth conditions on the production of Lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. J. Appl. Bacteriol. 1995; 78, 5-10.
- 84.-WANG J. K. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Their potentials as food biopreservative. Food Rev. Int. 1993; 9 (2), 299-313.
- 85.-ZUÑIGA, M.; PARDO, I. and FERRER, S. An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic and bacteria. Int. J. Food Microbiol. 1993; 18, 37-42.

9. ANEXOS

Anexo N° 1: MEDIOS DE CULTIVO

1.1. Medio Man Rogosa Sharpe (MRS)

Composición por litro de agua destilada

Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de carne	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Glucosa	20.0 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g
Citrato de amonio	2.0 g
Acetato de sodio	5.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.2 g
Tween 80	1.0 ml
Agar agar	18.0 g

pH: 6.5. Autoclavar a 110°C y 10 Lb x 10'

1.2. Medio Luria

Composición por litro de agua destilada

Triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar agar	18.0 g

pH: 7.4. ± 0.2 Autoclavar a 120°C y 15 Lb x 15'

1.3. Caldo BHI

Composición por litro de agua destilada

Infusión de cerebro	12.5 g
Infusión de corazón	5.0 g
Peptona	10.0 g
Glucosa	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g

Disodio hidrógeno fosfato 2.5 g
pH: 7.4. ± 0.2 Autoclavar a 120°C y 15 Lb x 15'

Anexo N° 2: PREPARACION DE BUFFERS FOSFATO Y CITRATO

2.1. Buffer Fosfato (0.05 M pH 7)

Solución stock

Solución "A" = 0.68 g de fosfato de potasio dibásico (KH_2PO_4) en 100 ml de agua bidestilada

Solución "B" = 0.71 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) en 100 ml de agua bidestilada

Mezclar 41.3 ml de Sol. A + 58.7 ml de Sol. B. Agitar bien las soluciones antes de mezclar.

2.2. Buffer Citrato (0.05 M, pH 3.0)

Solución stock

Solución "A" = 0.96 g de ácido cítrico anhidro en 100 ml de agua bidestilada

Solución "B" = 7.1 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) en 100 ml de agua bidestilada

Mezclar 80.3 ml de Sol. A + 19.7 ml de Sol. B. Agitar bien las soluciones antes de mezclar.

Anexo N° 3: PREPARACION DE SOLUCIONES DE CATALASA, TRIPSINA Y PEPSINA

3.1. Catalasa

Pesar 4 mg del reactivo de catalasa (Sigma) y diluirlo en 4 ml de sobrenadante del cultivo previamente neutralizado con NaOH 2 N. Reposar por 30 minutos a 30°C.

3.2. Tripsina

Pesar 50 mg de tripsina (Sigma) y diluir en 1.2 ml de buffer fosfato (0.05 M y pH 7.0). tomar 0.2 ml de la solución stock y agregarle a 4 ml de sobrenadante del cultivo previamente neutralizado con NaOH 2 N y catalasa (1 mg/ml). Reposar por 60 minutos.

3.3. Pepsina

Pesar 25 mg de pepsina (Sigma) y diluir en 0.6 ml de buffer citrato (0.05 M y pH 3.0). tomar 0.1 ml de la solución stock y agregarle a 4 ml de sobrenadante del cultivo previamente neutralizado con NaOH 2 N y catalasa (1 mg/ml). Reposar por 60 minutos.

Anexo N° 4: CURVA PATRON DE BRADFORD

BSA 1 mg/ml	1/10
Cloruro de sodio	8.75 g/1000
Colorante BIORAD	250.0 µl

µg/ml	BSA (ml)	SS (ml)
1.25	0.25	0.75
2.20	0.20	0.80
3.15	0.15	0.85
4.10	0.10	0.90
5.80	0.08	0.92
6.60	0.06	0.94
7.40	0.04	0.96
8.20	0.02	0.98
9.00	0.00	1.00

Anexo N° 5: GEL DE RESOLUCION AL 12%

5.1	<u>Buffers</u>	1 Cámara (ml)
	Agua destilada	5.5
	Resolving gel buffer	4.0
	Resolving acrilamida	6.0
	APS (0.020 mg/ml)	0.25
	TEMED (150 µl/ml)	0.25

5.2	<u>Gel de Empacamiento</u>	
	Stacking gel buffer	1.0
	Stacking acrilamida	1.0
	APS (1/10)	1.0
	TEMED (1/5)	1.0

Anexo N° 6: BUFFERS DEL GEL

6.1	<u>Solución de Acrilamida</u>	
	Acrilamida	40.0 g
	Bis acrilamida	1.0 g
	Agua destilada	100.0 ml
	<u>Buffer de Resolución</u>	
	Tris	205.6 g
	Acido clorhídrico	15.0 ml
	Agua destilada	1000.0 ml
	pH 9.18	
6.2	<u>Solución de Empacamiento de Acrilamida</u>	
	Acrilamida	3.0 g
	Bis acrilamida	0.3 g
	Agua destilada	25.0 ml
6.3	<u>Buffer de Empacamiento</u>	
	Tris	2.62 g
	Agua destilada	100.0 ml
	Acido sulfúrico 2 M	5.0 ml
	pH 6.14	

Anexo N° 7: TRACKING DYE

7.1.	Azul de bromofenol	50.0 mg
------	--------------------	---------

Glicerol	8.0 ml
Tris 0.5 M	1.0 ml
Agua destilada	1.0 ml

7.2 Buffer de Muestra

SDS (10%)	1.0 ml
Tracking Dye	1.0 ml
DTT 2.5 M	0.5 ml

Anexo N° 8: BUFFER DE CORRIDA

8.1. Upper Buffer

Acido bórico	2.47 g
Tris	4.92 g
SDS (10%)	1.0 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH 8.64	

8.2. Lower Buffer

Tris	205.6 g
Agua destilada	1000.0 ml
Dilución (1:4)	

Anexo N° 9: COLORACION DE NITRATO DE PLATA

9.1. Solución Fijadora

Metanol	25.0 ml
Acido acético	10.0 ml
Agua destilada	65.0 ml

Anexo N° 10: SOLUCION DE COLORACION

a) Hidróxido de sodio	0.09 g
Agua destilada	25.0 ml
b) hidróxido de amonio	1.4 ml
solución (a)	21.0 ml
c) Nitrato de plata	0.776 g
Agua destilada	2.0 ml

Anexo N° 11: SOLUCION DE REVELADO

Acido cítrico	0.012 g
Formaldehido	0.12 ml
Agua destilada	250.0 ml