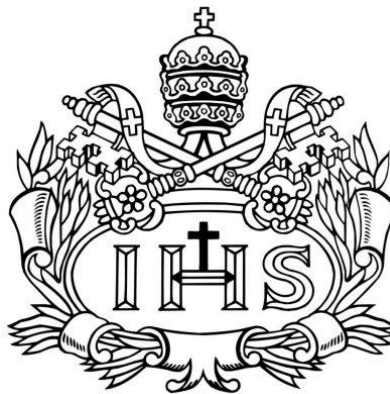


**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR
DOS CEPAS NATIVAS DE *Lactobacillus plantarum*.**

JAIRO EMMANUEL AMÓRTEGUI DÍAZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
MICROBIOLOGO INDUSTRIAL Y BACTERIOLOGO**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ. D.C
Junio de 2012**

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR
DOS CEPAS NATIVAS DE *Lactobacillus plantarum*.**

JAIRO EMMANUEL AMÓRTEGUI DÍAZ

APROBADO

Ingrid Schuler
Decano Académico

Janeth Arias, Bacterióloga
Director de Carrera

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR
DOS CEPAS NATIVAS DE *Lactobacillus plantarum*.**

JAIRO EMMANUEL AMÓRTEGUI DÍAZ

APROBADO

**Carlos Javier Alméciga Díaz,
QF., PhD.
Director**

**Alexander Rodríguez, LQ.
Codirector**

**Ana Karina Carrascal, M.Sc.
Codirectora**

**Ricardo Vera, PhD.
Jurado**

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

*A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto
y haberme dado salud para lograr mis objetivos,
a mis padres, hermanos y familiares por haberme
apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores,
por la motivación constante que me ha permitido
ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.*

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud, principalmente está dirigida a Dios por haberme dado la existencia, por sus bendiciones y por permitirme culminar esta importante etapa de mi vida.

A mis padres por su infinito amor, comprensión, apoyo incondicional y sus ejemplos de perseverancia y constancia. A Camilo y Pablito, mis hermanos, por su fraterna compañía, atención y cariño.

A los docentes Javier Almeciga, Alexander Rodríguez, Jhoana Espejo, Deyci Rodríguez y Nadenka Melo que me han acompañado a lo largo del camino, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación.

Al Instituto de Errores Innatos del Metabolismo y a La Universidad Nacional de Colombia, especialmente a la profesora Adelina del Pilar Meléndez y Oscar Sánchez, por empezar con el proyecto y por su orientación a lo largo del mismo. (Proyecto No. 14729).

De manera especial al Profesor Ricardo Vera y Max del Laboratorio de Macromoléculas (PUJ) y al Departamento Química (PUJ) por su constante apoyo y colaboración.

A todos mis amigos, por su interés y preocupación, por estar siempre dispuestos a ayudarme y brindarme la fortaleza necesaria para seguir avanzando, y finalmente por acompañarme cotidianamente y vivir las mejores experiencias.

Tabla de contenido

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tablas	iii
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION.....	4
2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
3. REFERENTES CONCEPTUALES.....	6
3.1 Generalidades bacterias ácido lácticas	6
3.2 Bacteriocinas, estructura y función	6
3,3 Clasificación de las bacteriocinas.....	7
3,4 Mecanismo de acción de las bacteriocinas	7
3,5 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	8
4. OBJETIVOS.....	9
4.1 Objetivo general	9
4.2 Objetivos específicos.....	9
5. METODOLOGIA	9
5.1 Diseño.....	9
5.2 Población y Muestra	9
5.3 Procedimiento.....	10
5.3.1 Objetivo 1.....	10
5.3.2 Objetivo 2	11
5.3.3 Objetivo 3	12
6. RESULTADOS	13
7. DISCUSION	34
8. CONCLUSIONES	39
9. RECOMENDACIONES.....	39
10. BIBLIOGRAFIA.....	40

Índice de figuras

Figura 1. Halos de inhibición generados por la actividad antimicrobiana de los fracciones de <i>L. plantarum</i> LE 5 contra <i>L. innocua</i> determinada por el método de difusión en agar	13
Figura 2. Grafica integrada proceso de purificación: halos de inhibición y concentración de proteína por fracción.	14
Figura 3. Evaluación de las fracciones de <i>L. plantarum</i> LE 5 Electroforesis de Tricina SDS-PAGE	14
Figura 4. Halos de inhibición generados por la actividad antimicrobiana de los fracciones de <i>L. plantarum</i> LE 5 contra <i>L. innocua</i> por el método de difusión en agar	15
Figura 5. Grafica integrada proceso de purificación: halos de inhibición y concentración de proteína por fracción.	16
Figura 6. Evaluación de las fracciones de <i>L. plantarum</i> LE 27 Electroforesis de Tricina SDS-PAGE	16
Ensayo de Inhibición del gel de electroforesis de las fracciones purificadas de las cepas de <i>L. plantarum</i> LE 5 y LE 27	17
Bandas presuntivas que fueron cortadas y enviadas para el análisis mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)	18
Figura 9. Resultados del Blast para la proteína UPF0291 de <i>Lactobacillus plantarum</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q88VI7), contra la bases de datos de UniProtKB	18
Figura 10. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones producidas por las cepas <i>L. plantarum</i> LE 5 y LE 27 contra <i>L. monocytogenes</i> .	19
Figura 11. Actividad antimicrobiana frente a <i>L. monocytogenes</i> . Halos generados por cada fracción purificada.	20
Figura 12. Actividad antimicrobiana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> . Datos corregidos por la concentración de proteína en cada fracción.	20
Figura 13. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones producidas por las cepas <i>L. plantarum</i> LE 5 y LE 27 contra <i>Enterococcus faecalis</i> .	21
Figura 14. Actividad antimicrobiana frente a <i>Enterococcus faecalis</i> . Halos generados por cada fracción purificada.	22
Figura 15. Actividad antimicrobiana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> . Datos corregidos por la concentración de proteína en cada fracción.	22
Figura 16. Comparación de la actividad antimicrobiana entre Nisina y las fracciones purificadas de la cepa <i>L. plantarum</i> LE27 (Fracción: Dializado de 1 kDa)	23
Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa <i>L. plantarum</i> LE5 frente a <i>L. monocytogenes</i> .	24

Figura 18. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul), fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa <i>L. plantarum</i> LE5 frente a <i>L. monocytogenes</i>	24
Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa <i>L. plantarum</i> LE27 frente a <i>L. monocytogenes</i>	25
Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa <i>L. plantarum</i> LE27 frente a <i>L. monocytogenes</i>	25
Figura 21. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa <i>L. plantarum</i> LE5 frente a <i>L. monocytogenes</i>	26
Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa <i>L. plantarum</i> LE5 frente a <i>L. monocytogenes</i>	27
Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa <i>L. plantarum</i> LE27 frente a <i>L. monocytogenes</i>	27
Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa <i>L. plantarum</i> LE27 frente a <i>L. monocytogenes</i>	28
Figura 25. Estabilidad a condiciones de esterilización por calor húmero sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepas <i>L. plantarum</i> LE5 y LE27 frente a <i>L. monocytogenes</i>	28
Figura 26. Efecto del uso de agentes químicos (SDS= Dodecilsulfato sódico, T-80= Tween 80, TX= Triton X 100, EDTA, Urea 6M y NaCl 6,5%) sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa <i>L. plantarum</i> LE5 frente a <i>L. monocytogenes</i>	29
Figura 27. Efecto del uso de agentes químicos sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa <i>L. plantarum</i> LE5 frente a <i>L. monocytogenes</i>	30
Figura 28. Efecto del uso de agentes químicos (SDS= Dodecilsulfato sódico, T-80= Tween 80, TX= Triton X 100, EDTA, Urea 6M y NaCl 6,5%) sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa <i>L. plantarum</i> LE27 frente a <i>L. monocytogenes</i>	31
Figura 29. Efecto del uso de agentes químicos sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa <i>L. plantarum</i> LE27 frente a <i>L. monocytogenes</i>	31
Figura 30. Efecto del de enzimas Proteinasa K (K), Tripsina (T) y Catalasa (C), sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa <i>L. plantarum</i> LE5 frente a <i>L. monocytogenes</i>	32

Figura 31. Efecto del uso de Proteinasa K, Tripsina y Catalasa sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa <i>L. plantarum</i> LE5 frente a <i>L. monocytogenes</i>	32
Figura 32. Efecto del de enzimas Proteinasa K (K), Tripsina (T) y Catalasa (C), sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa <i>L. plantarum</i> LE27 frente a <i>L. monocytogenes</i>	33
Figura 33. Efecto del uso de Proteinasa K, Tripsina y Catalasa sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa <i>L. plantarum</i> LE27 frente a <i>L. monocytogenes</i>	33

Índice de tablas

Tabla 1. Diseño de investigación	7
Tabla 2. Microorganismos empleados para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones de las cepas <i>L. plantarum</i> LE5 y LE27.....	9

RESUMEN

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados por bacterias ácido lácticas que se caracterizan por su capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, especialmente aquellos genéticamente relacionados. Generalmente, las bacteriocinas son de bajo peso molecular y pueden tener un mecanismo de acción bactericida o bacterioestático. El objetivo del presente trabajo fue el de purificar y caracterizar las bacteriocinas producidas por dos cepas nativas de *Lactobacillus plantarum* (LE5 y LE27), previamente aisladas a partir de ensilaje de maíz. El sobrenadante libre de células fue purificado mediante precipitación con sulfato de amonio, ultrafiltración, diálisis y liofilización. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis de Tricina-SDS-PAGE, observándose bandas de inferiores 10 kDa con actividad inhibitoria sobre *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*. La caracterización de las bandas por LC-MS/MS mostró que la bacteriocina puede corresponder a una proteína de 79 aminoácidos y 9,3 kDa presente en otras bacterias ácido lácticas pero sin una función asignada. Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos y las fracciones purificadas sobre *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas auriginosa* y *Leuconostoc citreum*, observándose inhibición a *L. innocua*, *L. monocytogenes* y *E. faecalis*. La inhibición generada fue directamente proporcional a la cantidad de proteína en cada muestra, observando mayor actividad antimicrobiana en las fracciones purificadas. Finalmente, la actividad bacteriocina fue caracterizada después del tratamiento con proteinasa K, tripsina y catalasa; al igual que su estabilidad frente SDS, Tween 80, Urea, Triton X-100, EDTA y NaCl, y diferentes temperaturas y pHs, Los resultados mostraron que las bacteriocinas producidas por las dos cepas son estables en un amplio rango de pH (2 – 12), y temperaturas, y su función no es alterada por agentes químicos, exceptuando el SDS. En conclusión, este trabajo muestra la caracterización de dos nuevas bacteriocinas aisladas de cepas nativas de *L. Plantarum*, con potencial para ser utilizadas a nivel industrial.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas son definidas como péptidos sintetizados por microorganismos que presentan propiedades antimicrobianas, letales o inhibitorias, frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados con los microorganismos que las producen (Papagianni et al. 2003; Cotter et al. 2005.; McAuliffe et al 2001). Su principal función es la competencia y defensa del microorganismo productor contra otros microorganismos, se ha comprobado que pueden actuar sobre bacterias patógenas, especialmente en gram positivas (Cleveland J et al. 2001), además se caracterizan por presentar amplia estabilidad frente a factores físico-químicos como pH, temperatura y agentes químicos que permiten su actividad bajo diferentes condiciones de evaluación (Hill C. 2010). Gracias a sus características químicas y sus propiedades antimicrobianas, las bacteriocinas pueden ser consideradas como conservantes naturales, lo que refleja su gran potencial para utilizarse en diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área de la industria alimentaria y farmacéutica (McAuliffe et al 2001; Cotter et al 2013).

De forma general las bacteriocinas son producidas por bacterias ácido lácticas principalmente de los generos *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp, *Leuconostoc* spp, *Pediococcus* spp y *Enterococcus* spp (Cetinkaya et al 2003). Adicionalmente, se caracterizan por ser péptidos catiónicos o hidrofóbicos (Nes I et al 1996) y la mayoría presentan masas moleculares bajas (<30 kDa) y entre 40 y 60 aminoácidos. (Monroy MDC et al 2009).

En la actualidad, un gran número de bacteriocinas han sido identificadas y caracterizadas en distintos grupos de acuerdo a sus propiedades físicas y bioquímicas como su peso molecular, estabilidad al calor, espectro de acción antimicrobiano (Nes I et al 2007; Cintas et al, 2001). Las bacteriocinas pueden clasificarse en cuatro grupos: Clase I: lantibioticas, con poca estabilidad al calor, péptidos poli cíclicos (<5 KDa) con aminoácidos modificados; Clase II: pequeñas (<10 KDa) no – lantibioticas estables al calor; Clase III: moléculas grandes (>10 KDa) e inestables al calor (Cintas et al, 2001); y Clase IV: compuesta por las bacteriocinas con proteínas complejas que implican lípidos o hidratos de carbono para su actividad (Rodríguez J et al 2003; Klaenhammer 1993, Paganini et al 2003).

Considerando la tendencia actual de eliminar el uso de preservantes sintéticos en alimentos y obtener productos cada vez más naturales, saludables y frescos; las bacteriocinas se presentan como una alternativa potencial para suplir estas necesidades (Ahmadova et al 2013). De esta forma, las bacteriocinas, purificadas o semipurificadas, pueden ser empleados como biopreservantes en alimentos con el fin de reducir o eliminar microorganismos causantes de deterioro como *Leuconostoc* spp, *Pseudomonas* spp, *Bacillus subtilis*, y algunos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, responsables de enfermedades transmitidas por alimentos (Todorov et al 2005b; Todorov et al 2008; Parada J et al 2007).

Adicionalmente en la industria farmacéutica estos péptidos antimicrobianos, están siendo estudiados como nuevos compuestos antimicrobianos, que podrían ayudar a reducir el uso de varios antibióticos que han generado marcadas resistencias bacterianas, adicional al hecho de que en algunos casos pueden llegar a tener elevados costos de producción (Cotter et al 2013).

Debido al creciente interés en el estudio de microorganismos productores de sustancias antagonistas de aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica, el objetivo del presente estudio fue la purificación y caracterización de la estabilidad y el espectro antimicrobiano de bacteriocinas producidas por las cepas de *Lactobacillus plantarum* LE5 y LE27.

2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tanto para la industria de alimentos como para el sector de la salud, resulta de gran importancia controlar los factores responsables de la aparición de enfermedades transmitidas por alimentos. Estos microorganismos pueden llegar a contaminar los productos alimenticios y proliferar rápidamente. Adicionalmente, presentan diferentes tiempos de vida sobre superficies inanimadas, las cuales pueden servir como fuente de contaminación llegando a impactar negativamente la salud de los consumidores (Bhunia A. 2008; Heu S et al 2001).

Estimaciones recientes del Centro para el control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos sugieren que anualmente 1 de cada 6 Norteamericanos adquieren enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (CDC 2010). Estudios recientes han mostrado que en Estados Unidos se presentan 9,4 millones de casos de ETA, con cerca de 56,000 hospitalizaciones y 1,351 muertes por año (Scallan et al 2011). Por otro lado la Organización Panamericana para la Salud afirma que en el periodo de tiempo comprendido entre 1993 al 2002, se presentaron 6,332 brotes correspondientes a 230,141 casos relacionados con ETA. Finalmente para Colombia, en el año 2012, se notificaron al Sistema Nacional de Vigilancia 10,788 casos de ETA, involucrados en 899 brotes; lo que implica un gasto considerable para el sector de la salud al tratar de subsanar dicha problemática (INS 2012). En razón a lo anterior es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos, como las bacteriocinas, que representan una herramienta interesante para el control de microorganismos patógenos causantes de dichas patologías.

Las bacteriocinas son una opción atractiva que podría ofrecer parte de la solución para la reducción de ETA (McKay L et al 1990). Su interés radica en que estas sustancias antimicrobianas de origen biológico inhiben numerosos microorganismos patógenos en alimentos, son estables al calor y son activas en intervalos amplios de pH (Ajay P 2008). La carencia de toxicidad demostrada por la mayoría de bacteriocinas en animales y humanos, ha permitido que se investiguen sus potenciales aplicaciones en terapias biomédicas como se resalta también en el estudio de (McKay L et al 1990).

Debido a este panorama se han desarrollado investigaciones relacionadas con estos péptidos antimicrobianos y sus cepas productoras, como es el caso del estudio realizado por Muñoz y colaboradores, cuyo objetivo fue evaluar el efecto de los fructooligosacáridos en la producción de bacteriocinas por aislados nativos de *Lactobacillus* spp. En el estudio, a partir de ensilaje de maíz y melaza de cana se realizaron un total de 28 aislamientos, de los cuales 9 presentaron actividad antimicrobiana, de este último grupo se seleccionaron las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27, que se caracterizaron por tener el mayor espectro de inhibición (Muñoz et al 2012).

Debido a lo anterior el presente estudio busca purificar y caracterizar las bacteriocinas producidas por las cepas nativas de *L. Plantarum* LE5 y LE27. Para tal fin se evaluarán diferentes métodos de separación y purificación de proteínas, que permitan obtener los mejores rendimientos y el mayor grado de pureza de estos compuestos. Las bacteriocinas purificadas serán caracterizadas en cuanto a su estabilidad a diferentes valores de pH, temperatura, agentes químicos y enzimas, así como su actividad antimicrobiana sobre diferentes microorganismos indicadores, alteradores y patógenos.

3. REFERENTES CONCEPTUALES (MARCO TEORICO)

3.1 Generalidades bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) están constituidas por un grupo de bacterias Gram-positivas unidas por sus características morfológicas, metabólicas y fisiológicas (Axelsson 2004). En general, las BAL son Gram-positivas, no esporuladas, cocos o bacilos microaerófilos, catalasa-negativas, ácido-tolerantes y productoras de ácido láctico como producto principal de la fermentación de carbohidratos. El término BAL está asociado íntimamente con las bacterias presentes en las mucosas de animales y humanos (Riley M, et al 2002a).

Las BAL son conocidas por la producción de diversos compuestos antimicrobianos, como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y bacteriocinas (Aymerich et al., 2000). Las bacteriocinas se definen como proteínas caracterizadas por tener un efecto antagónico frente a bacterias patógenas, hongos y algunos parásitos (Sablon L et al 2000). La efectividad de estos compuestos depende de su potencial (capacidad de inhibir bacterias Gram positivas, Gram negativas o ambas), concentración y nivel de estabilidad (Monroy MdC et al. 2009; Rodríguez JM et al 2002). En la actualidad se han descrito más de 300 bacteriocinas diferentes para los géneros *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp, *Leuconostoc* spp, *Pediococcus* spp y *Enterococcus* spp; los cuales han sido ampliamente estudiados en aplicaciones industriales, biomédicas y farmacéuticas (Papagianni 2003; Cetinkaya S et al 2003; De Vuyst L 1994).

Dentro de los diferentes grupos de bacterias ácido lácticas, el género de mayor importancia y que presenta más especies es el de *Lactobacillus*; de igual forma es el género más heterogéneo (Axelsson 2004). De forma general, este género se ha subdividido en tres grupos dependiendo de la presencia o no de las enzimas claves para la fermentación de azúcar de forma homo ó heterofermentativa, la fructosa-1,6-difosfato aldolasa y/o la fosfocetolasa, respectivamente. Además de otras pruebas clásicas como la configuración del ácido láctico producido, hidrólisis de arginina y crecimiento a ciertas temperaturas (Hoover D, 2005).

3.2. Estructura y función de las bacteriocinas.

Por lo general las bacteriocinas son péptidos de bajo peso molecular con tamaños que varían entre 30 y 40 aminoácidos, capaces de entrar en las células diana mediante la unión con los receptores de la superficie celular. Su mecanismo de acción puede variar e incluye la formación de poros en la membrana, la degradación del ADN celular, la inhibición de la síntesis de proteínas a través de la escisión específica del ARNr 16s y la

inhibición de la síntesis de peptidoglicano (Heu S et al 2001). Su principal función es la defensa de la bacteria ácido láctica contra microorganismos patógenos en diferentes ambientes (Papagianni 2003). Las bacteriocinas y los antibióticos se diferencian en al menos dos características: 1) las bacteriocinas son péptidos (metabolito primario), mientras que los antibióticos son metabolitos secundarios; y 2) el espectro de inhibición de las bacteriocinas es relativamente estrecho ya que usualmente son activas contra microorganismos cercanos al microorganismo que las produce (Riley M et al 2002a; Rodriguez J et al. 2002).

Como reporta Cotter et al. (2005), las bacteriocinas se pueden emplear para conferir inmunidad innata a los alimentos. Desde hace varios años las bacteriocinas, al igual que las BAL, han sido consumidos por el hombre. Por esta razón son considerados como ingredientes naturales en los alimentos (Settanni L et al 2008), y tienen el estatus de QPS (qualified presumption of safety), es decir son consideradas como seguras para la salud (Monroy MdC et al. 2009; Jamuna M et al 2004)

3.3 Clasificación de las bacteriocinas

Aunque se han propuesto diferentes clasificaciones de estos péptidos antimicrobianos, la más reciente y sencilla es propuesta por Cotter et al. (2005), quien propone únicamente dos grupos o clases: la Clase I, o lantibióticos, a la cual pertenecen las bacteriocinas que contienen el aminoácido lantionina, y la Clase II para las demás bacteriocinas. La Clase I se ha subdividido en tres subclases de acuerdo a su actividad antimicrobiana y mecanismo de acción. Los lantibióticos se caracterizan por ser péptidos termoresistentes de entre 19 a 39 aminoácidos. Contienen residuos de lantionina o metil-lantionina formados por modificaciones postraduccionales, tales como la deshidratación de residuos de serina y treonina a 2,3-dehidroalanina y 2,3-dehidrobutirina, que se unen de forma covalentemente con la cisteína para dar origen a la lantionina y metillantionina, respectivamente. Estas interacciones dan origen a la configuración característica de los anillos estructurales de los lantibióticos (Hoover D et al 2005). Dentro de esta clase de bacteriocinas se encuentra la Nisina, Mutacina, Salivaricina, Estreptococina, Planataricina y Bovicina, entre otras (Muñoz et al. 2012).

Las bacteriocinas de la Clase II se caracterizan por tener un bajo número de aminoácidos, ser termoresistentes y no contienen lantionina por lo cual no están sometidas a grandes cambios postraduccionales. La mayoría de estas bacteriocinas son activas en concentraciones nanomolares y el mecanismo de acción principalmente se basa en la formación de poros en la membrana celular (Cotter et al. 2005).

3.4 Mecanismos de acción de las bacteriocinas

Entre los mecanismos de acción reportados para las bacteriocinas se destacan varias características esenciales para que puedan llevar a cabo su actividad antimicrobiana independiente del blanco celular, membrana o pared celular, así como la interacción con algunas proteínas importantes en el metabolismo de la célula. Las bacteriocinas poseen una carga neta positiva que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram-negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram-positivas (Cleveland J et al 2001). La hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la

bacteriocina en la membrana celular, así como su flexibilidad, que le permite realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno de interacción con la membrana. A pesar que estas características varían de molécula a molécula, todas son importantes para la actividad antimicrobiana (López J et al. 2008)

El mecanismos de acción de estos compuestos incluyen: la formación de poros en la membrana celular, lo que causa la pérdida del contenido celular, éste es el mecanismo descrito para las bacteriocinas nisina y lactocoquina A de *L. lactis*; la inhibición de la síntesis de la pared celular, mecanismo de acción descrito para la mersacidina, que involucra la unión al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano (UDPMur- Nac-pentapéptido-GlcNAc); y la inhibición de la actividad de enzimas como la fosfolipasa A2, que participa en la reparación de membranas, mecanismo reportado para la cinamicina de *Streptomyces cinnamoneus* (López J et al. 2008; Monroy MdC et al. 2009; OMGE 2008)

3.5 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Los microorganismos patógenos en alimentos son los responsables de la intoxicación por alimentos. Se distinguen tres clases: 1) la toxina se ha formado antes de la ingesta del alimento; 2) las toxi-infecciones, donde la toxina se forma en el interior del huésped una vez ha ingerido el alimento contaminado con el microorganismo; y 3) las infecciones por alimentos donde hay ingestión de patógenos (Bhunja 2008). De forma general la incidencia de brotes de ETA, se debe principalmente al incumplimiento de buenas prácticas de manufactura, operaciones inadecuadas y malos hábitos de higiene de parte de las personas que manipulan alimentos (Bhunja 2008). La similitud de los microorganismos patógenos en los diferentes brotes de ETA, tiene también una incidencia cultural, asociada a los hábitos alimenticios del consumidor. Por ejemplo, los reportes etiológicos de agentes causantes de ETA ocurridos en el 2007 en USA de Boore et al. (2010) para el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) muestran que la incidencia de los microorganismos causantes de mayores casos de ETA en este país está encabezada por *Salmonella*, *C. perfringens*, *E. coli*, *Shigella* y *Staphylococcus*. Mientras que en Colombia, según el reporte SIVIGILA del Instituto Nacional de Salud, los microorganismos predominantes en los brotes de ETA registrados en el mismo año son: *Staphylococcus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium* y *Bacillus cereus*. Lo que muestra una diversidad de agentes patógenos probablemente debido a hábitos culturales y tecnologías de procesamiento de los alimentos.

La actual tendencia en los procesos de conservación de alimentos está dirigida hacia la disminución del uso de aditivos químicos, debido a su impacto nocivo en la salud humana. Por ello, se ha dedicado especial atención al estudio de metabolitos producidos naturalmente por bacterias del ácido láctico, las que poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables alteradores o causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA). La actividad antimicrobiana de estas bacterias es atribuida, al menos parcialmente, a la producción de sustancias tipo bacteriocinas (Moragues L et al 2003).

Como plantea Gálvez et al 2007 en su revisión sobre la aplicación de las bacteriocinas, el uso de estos péptidos para la conservación de alimentos ofrece las siguientes ventajas: son sustancias seguras, no son activas o tóxicas para células eucariotas, se inactivan por

proteasas del sistema digestivo, no afectan negativamente la carga intestinal, son tolerantes a diferentes rangos de pH y temperatura, relativamente tienen un amplio espectro antimicrobiano, poseen un efecto antagónico importante sobre muchos patógenos de origen alimentario y bacterias asociadas a la putrefacción, no tienen reacción cruzada con los antibióticos y adicionalmente los determinantes genéticos son normalmente codificados por plásmidos. Estas propiedades pueden entonces garantizar una mayor vida útil de los alimentos, proporcionar una protección adicional en condiciones elevadas de temperatura, reducir la aplicación de conservantes químicos, y disminuir el riesgo de transmisión de los agentes patógenos transmitidos a través de la cadena alimentaria (Robertson et al 2004).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Purificar y caracterizar la estabilidad y el espectro antimicrobiano de bacteriocinas producidas por las cepas de *Lactobacillus plantarum* LE5 y LE27.

4.2 Objetivos específicos

1. Purificar las bacteriocinas a partir de los extractos crudos obtenidos de cultivos De *Lactobacillus plantarum* LE 5 y LE 27.
2. Caracterizar el efecto de las bacteriocinas purificadas sobre el crecimiento de diferentes microorganismos indicadores, alteradores y patógenos.
3. Establecer los perfiles de estabilidad de las bacteriocinas frente a pH, temperatura, detergentes y enzimas.

5. METODOLOGIA

5.1 Diseño

Tabla 1. Diseño de investigación

Finalidad	Control de asignación de factores	Secuencia temporal	Direccional
Descriptivo	Observacional	Longitudinal	Prospectivo

5.2 Población y Muestra

Para el desarrollo del presente estudio no se puede definir una población y una muestra en específico, ya que el tamizaje de las cepas de *Lactobacillus plantarum* productoras

potenciales de las bacteriocinas, ya fue realizado previamente en un estudio realizado por Muñoz y colaboradores en la Universidad Nacional de Colombia. El resto de la investigación consiste en el análisis descriptivo de las variables manipuladas en cada experimento o ensayo (Muñoz et al. 2012).

5.3 Procedimiento

5.3.1 Purificar las bacteriocinas a partir de los extractos crudos obtenidos de cultivos de *Lactobacillus plantarum* LE5 y LE27

Actividades:

Obtención del cultivo de *L. plantarum*: las cepas para este estudio fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Las cepas fueron aisladas de ensilaje de maíz, donde se identificaron y caracterizaron como cepas promisorias para la producción de bacteriocinas (Muñoz et al 2012). A partir de la cepa se realizó un banco de células primarias y fueron almacenadas en glicerol al 20% a -80°C.

Obtención y purificación del extracto crudo: Cada cepa fue cultivada en caldo MRS, suplementado con fructooligosacaridos e incubadas a 37°C durante 48 h en condiciones de microaerofilia. El medio de cultivo de cada cepa de *Lactobacillus plantarum*, se centrifugó a 4000 rpm durante media hora. Las células fueron descartadas y el sobrenadante fue almacenado a 4°C para la posterior purificación de las bacteriocinas.

Para la purificación se llevó a cabo inicialmente una filtración del extracto crudo a través de papel Wathman No. 1 y membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,45 y 0,22 µm. Finalmente, este extracto libre de células fue llevado a pH 7 con NaOH 10M. (Jamuna M et al 2004)

A partir del extracto libre de células se evaluaron dos rutas diferentes de purificación de las bacteriocinas. En primer lugar se realizó una ultrafiltración usando membranas de 100, 30 y 10 kDa, mediante un sistema de presión con nitrógeno gaseoso, donde se colectaron muestras de los retentatos y ultrafiltrados (Kacem M et al 2005). A continuación, se realizó el segundo protocolo de purificación que consistió en una precipitación con sulfato de amonio al 70% (p/v) (Todorov S et al 2010), el precipitado obtenido por centrifugación a 4000 rpm durante 40 minutos y 4 °C, se resuspendió en buffer Tris-HCl 25 mM pH 7; continuando con el proceso de purificación se hizo una doble diálisis utilizando membranas de 12 y 1 kDa, respectivamente (BioLynx Inc.). Posteriormente, las fracciones del proceso de purificación fueron concentradas por liofilizaron. Paralelamente, se evaluarán otros métodos de purificación como cromatografías de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica, teniendo en cuenta las propiedades de dichas proteínas, reportadas en la literatura (Bouksaim M et al 1999).

La cuantificación de la concentración de proteínas en las fracciones del proceso de purificación se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA). Adicionalmente, las

muestras fueron evaluadas mediante electroforesis de Tricina SDS-PAGE (Schägger Y et al 1987; Todorov S et al 2010), en condiciones reductoras y no reductoras. Los geles de electroforesis fueron teñidos mediante tinción de plata. La evaluación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas en ensayos de inhibición del crecimiento frente al microorganismo indicador: *Listeria monocytogenes* y *L. monocytogenes*, se realizó siguiendo el protocolo establecido por (Nack-Shick C et al 2010; Pinto A et al 2009; Todorov S et al 2010),

Finalmente, se realizó una electroforesis de Tricina SDS-PAGE a partir de la cual se cortaron las bandas presuntivas correspondientes a las bacteriocinas producidas por las cepas *L. plantarum* LE5 y LE 27, para ser analizadas mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), por la empresa Applied Biomics Inc (Hayward, CA, USA).

5.3.2 Caracterizar el efecto de las bacteriocinas purificadas sobre el crecimiento de diferentes microorganismos indicadores, alteradores y patógenos.

Actividades:

La Tabla 2 presenta los microorganismos empleados para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones. Todos los microorganismos fueron obtenidos del Cepario de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ):

Tabla 2. Microorganismos empleados para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones de las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27.

Grupo	Microorganismo	Código CMPUJ	Equivalente a
Indicadores	<i>Listeria innocua</i>	CMPUJ 290	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	CMPUJ 286 – HUSI	
Patógenos	<i>Listeria monocytogenes</i>	CMPUJ 296	ATCC 7644
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMPUJ 080	ATCC 6538
	<i>Salmonella enteritidis</i>	CMPUJ 302	ATCC 13076
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	CMPUJ 215	
Alteradores	<i>Bacillus subtilis</i>	CMPUJ 075	ATCC 6633
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMPUJ 055	ATCC 9027
	<i>Leuconostoc citreum</i>	CMPUJ 328	

En primer lugar se hicieron cultivos de cada microorganismo en caldo BHI, a condiciones apropiadas para su crecimiento, para hacer los bancos de trabajo con glicerol al 20%, que fueron almacenados a -80°C. Posteriormente, se estandarizó el inóculo para cada microorganismo a una concentración de 10⁵ UFC/mL, a través de la medición de su

absorbancia a 610nm y recuentos de UFC/mL por la técnica de microgota (Harshada M et al 2012).

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y las fracciones purificadas se realizó mediante la técnica de difusión en agar. Para esta técnica, el agar Mueller-Hilton fue inoculado con cada uno de los microorganismos en una concentración final de 10^5 UFC/mL. Una vez gelificados se realizaron pozos de 5mm de diámetro en donde se dispensaron 80 μ l de cada una de las muestras a evaluar. Las cajas fueron preincubadas a 4°C durante 18 h y posteriormente incubadas durante 18 h a 30°C o 37°C, dependiendo del microorganismo a evaluar. Al cabo de esta incubación se realizó la medición de los halos de inhibición. La actividad se expresa como la diferencia, en milímetros, entre el diámetro del halo de inhibición y el diámetro del pozo. (Alegría A et al 2010; Jamuna M et al 2004) Cada muestra fue analizada por triplicado.

Para estos ensayos se usaron como controles positivos de actividad, soluciones con concentración conocida de nisina (Nisaplin, Sigma-Aldrich) y de ampicilina (Sigma-Aldrich); y como control negativo de actividad se usó el buffer Tris-HCl 25 mM pH 7.

5.3.3 Establecer los perfiles de estabilidad de pH y temperatura de las bacteriocinas purificadas

Actividades:

Los ensayos de estabilidad se realizaron con el extracto libre de células y las fracciones del proceso de purificación obtenidas después de la precipitación con sulfato de amonio y la doble diálisis.

Para determinar el efecto del pH, en tubos de vidrio estériles se dispensaron alícuotas de cada fracción a analizar y luego el pH de la muestra fue ajustado a 2, 4, 6, 8, 10 y 12, con soluciones estériles de HCl 1 M y NaOH 1 M. Posteriormente los tubos fueron incubados a 30°C durante 1 h. Después de la incubación el pH de las muestras fue ajustado a 7, para descartar inhibición por este factor. Finalmente, se evaluó la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar descrito anteriormente (Kacem M et al 2005). Cada muestra se analizó por triplicado.

En cuanto a la estabilidad a temperatura, volúmenes de cada fracción fueron sometidos a tratamientos de 1 h a 4, 25, 37, 80 y 100°C. Adicionalmente las muestras fueron sometidas a condiciones de esterilidad mediante calor húmedo (121°C, 15 atm, 15 min). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar descrito anteriormente (Nowroozi J et al 2012). Cada muestra se analizó por triplicado.

Para la evaluación de la estabilidad frente a agentes químicos se hicieron ensayos con dodecilsulfato de sodio (SDS), Tween 80, TritonX-100 en una concentración final de 1% v/v, Urea 6 M, EDTA 25 mM y NaCl 6,5% p/v, respectivamente. Las mezclas fueron incubadas durante 1 h a 37°C. Seguidamente se llevó a cabo el ensayo para determinar la actividad antimicrobiana (Todorov S et al 2010; Nowroozi J et al 2012; Martinez R et al 2013). Cada muestra se analizó por triplicado.

Por último, para determinar la estabilidad de las fracciones frente a enzimas, se resuspendieron en buffer fosfato pH 6,4 las enzimas catalasa, proteinasa K y tripsina, a concentración de 2 mg/ml. Posteriormente fueron mezcladas con volúmenes de cada muestra de interés en una relación 1:1, para que la enzimas quedaran en una

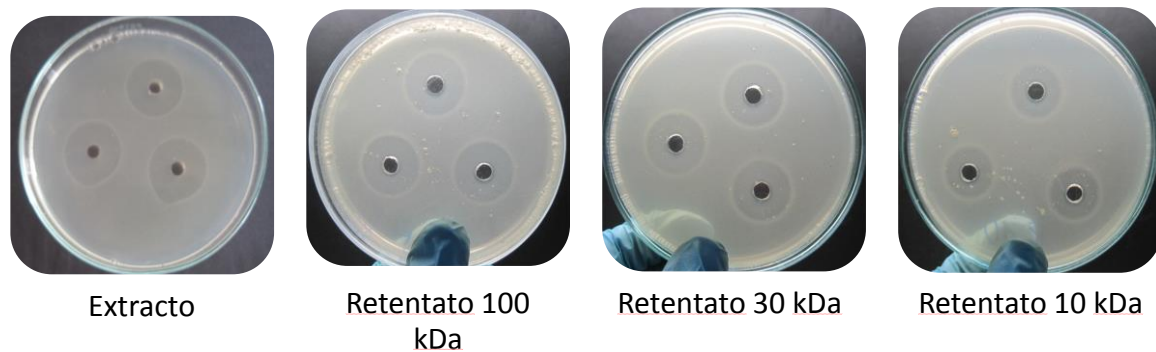
concentración final de 1 mg/ml. Cada reacción fue incubada por 1 h a 37°C. Después de este periodo las enzimas se inactivaron a 90°C por 5 minutos, y finalmente se evaluó la actividad antimicrobiana por el método señalado anteriormente (Todorov S et al 2010), Ivanova et al., 2000). Cada muestra se analizó por triplicado.

Como control negativo de actividad en cada ensayo se evaluó bajo las mismas condiciones de prueba el buffer Tris-HCl 25 mM, donde se encontraban resuspendidas las muestras o fracciones purificadas.

6. RESULTADOS

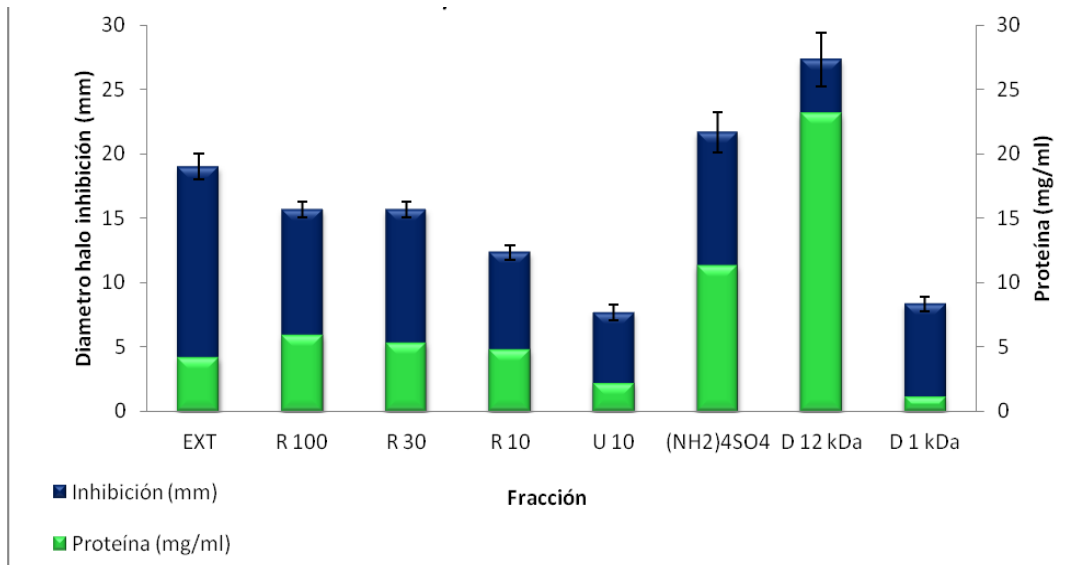
Objetivo 1: Purificar las bacteriocinas a partir de los extractos crudos obtenidos de cultivos de *Lactobacillus plantarum* LE 5 y LE 27.

La figura 1 muestra la evaluación de la actividad antimicrobiana para el extracto de la cepa *L. plantarum* LE5. Se observó que en todas las fracciones del proceso de purificación hay actividad contra *L. innocua*, el diámetro del halo fue directamente proporcional a la concentración de proteína presente en cada muestra.



La figura 2 muestra gráficamente la relación entre el tamaño de los halos de inhibición generados por las diferentes fracciones del proceso de purificación de las bacteriocinas producidas por la cepa *L. plantarum* LE5 y la respectiva concentración de proteína de cada una. Se observó que en todas las fracciones del proceso de purificación hay actividad contra *L. innocua* y que el mejor protocolo para llevar a cabo la purificación de las bacteriocinas es el que incluye la precipitación con sulfato de amonio y la doble diálisis, ya

Figura 1. Halos de inhibición generados por la actividad antimicrobiana de los fracciones de *L. plantarum* LE 5 contra *L. innocua* determinada por el método de difusión en agar

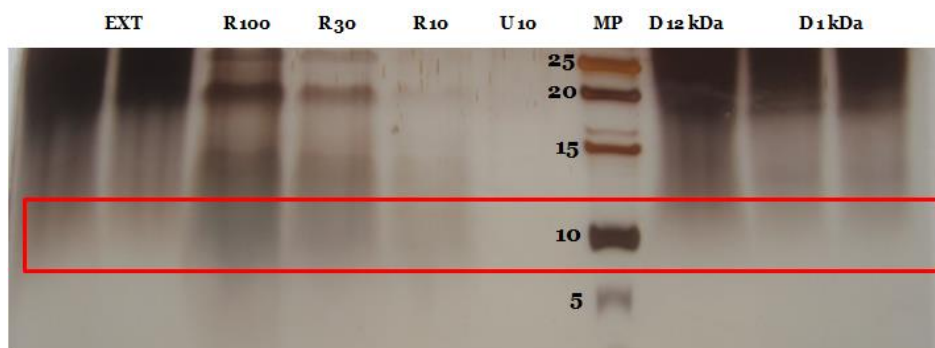


FRACCIONES:

- EXT = Extracto crudo
- R 100 kDa = Retentato de 100 kDa
- R 30 kDa = Retentato de 30 kDa
- R 10 kDa = Retentato de 10 kDa
- U 10 kDa = Ultrafiltrado de 10 kDa
- D 12 kDa = Dializado de 12 kDa
- D 1 kDa = Dializado de 1 kDa

Figura 2. Grafica integrada proceso de purificación: diámetro de los halos de inhibición (mm) y concentración de proteína por fracción (mg/ml) *L. plantarum* LE 5. Ensayos de inhibición realizados por triplicado.

La figura 3 corresponde al analisis de las fracciones del proceso de purificación mediante electroforesis de Tricina SDS-PAGE en condiciones reductoras, en la imagen se observan bandas tenues cercanas a la zona del marcador de peso de 10 kDa, sin embargo nunca fue posible observarlas de manera definida y clara.



FRACCIONES:

- EXT = Extracto crudo
- R 100 kDa = Retentato de 100 kDa
- R 30 kDa = Retentato de 30 kDa
- R 10 kDa = Retentato de 10 kDa
- U 10 kDa = Ultrafiltrado de 10 kDa
- D 12 kDa = Dializado de 12 kDa
- D 1 kDa = Dializado de 1 kDa

Figura 3. Evaluación de las fracciones de *L. plantarum* LE 5 Electroforesis de Tricina SDS-PAGE

La figura 4 muestra la evaluación de la actividad antimicrobiana para el extracto de la cepa *L. platarum* LE 27. Se observó que en todas las fracciones del proceso de purificación hay actividad contra *L. innocua*, el diámetro del halo fue directamente proporcional a la concentración de proteína presente en cada muestra.

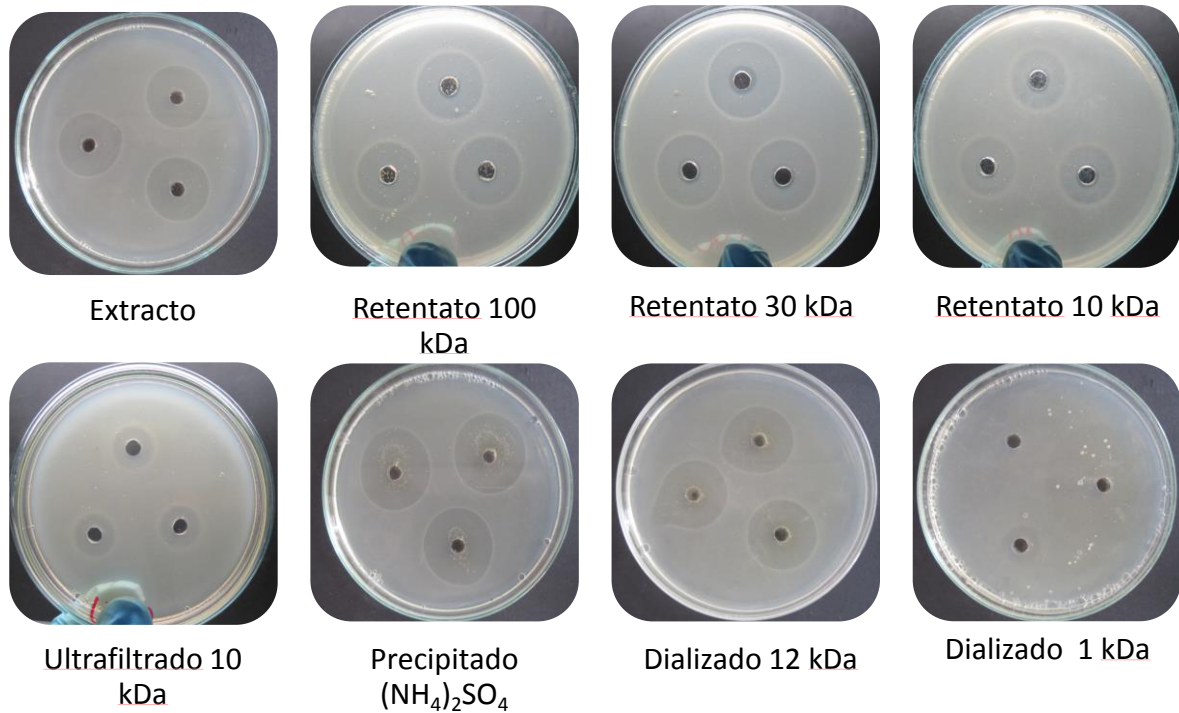
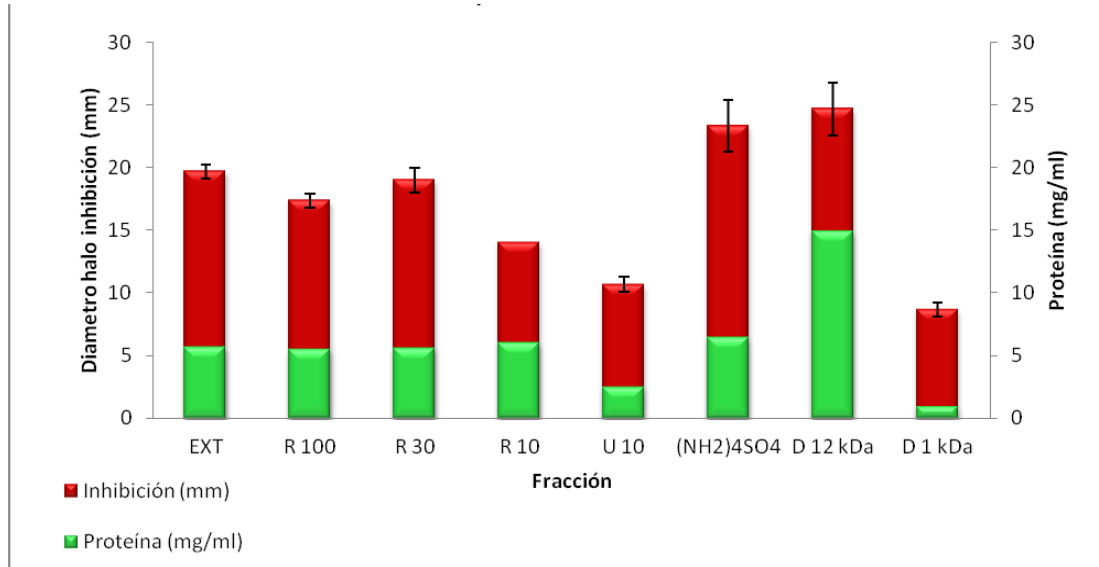


Figura 4. Halos de inhibición generados por la actividad antimicrobiana de los fracciones de *L. platarum* LE 27 contra *L. innocua* por el método de difusión en agar

La figura 5 muestra gráficamente la relación entre el tamaño de los halos de inhibición generados por las diferentes fracciones del proceso de purificación de las bacteriocinas producidas por la cepa *L. platarum* LE27 y la respectiva concentración de proteína de cada una. Se observó que en todas las fracciones del proceso de purificación hay actividad contra *L. innocua* y que el mejor protocolo para llevar a cabo la purificación de las bacteriocinas es el que incluye la precipitación con sulfato de amonio y la doble diálisis, ya que se obtuvo mayor concentración de proteína y grado de pureza.



FRACCIONES:

- EXT = Extracto crudo
- R 100 kDa = Retentato de 100 kDa
- R 30 kDa = Retentato de 30 kDa
- R 10 kDa = Retentato de 10 kDa
- U 10 kDa = Ultrafiltrado de 10 kDa
- D 12 kDa = Dializado de 12 kDa
- D 1 kDa = Dializado de 1 kDa

Figura 5. Grafica integrada proceso de purificación: diámetro de los halos de inhibición (mm) y concentración de proteína por fracción (mg/ml) *L. plantarum* LE 27. Ensayos de inhibición realizados por triplicado.

La figura 6 corresponde al análisis de las fracciones del proceso de purificación mediante electroforesis de Tricina SDS-PAGE en condiciones reductoras, en la imagen se observan bandas tenues cercanas a la zona del marcador de peso de 10 kDa.

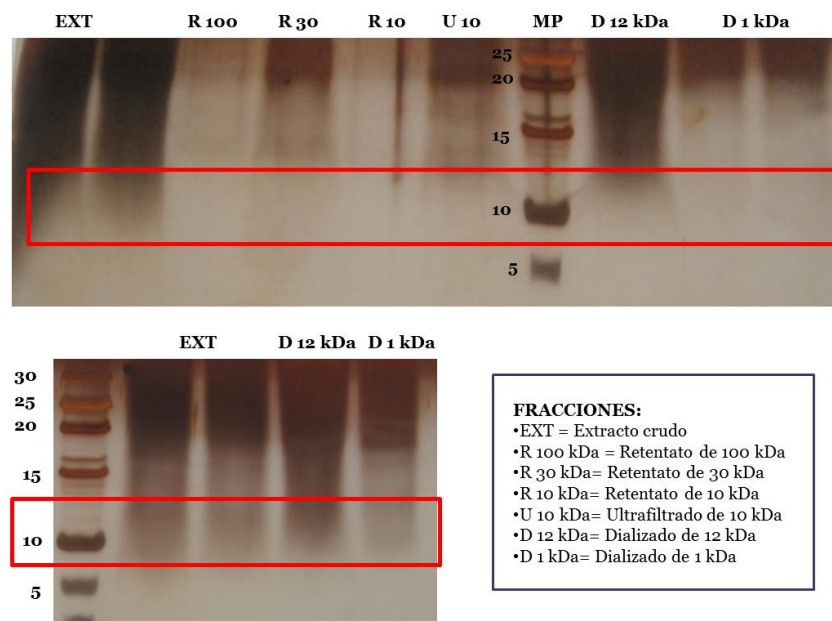


Figura 6. Evaluación de las fracciones de *L. plantarum* LE 27 Electroforesis de Tricina SDS-PAGE

En resumen, estos resultados muestran que la ruta de purificación más adecuada fue la precipitación con sulfato de amonio y la posterior diálisis usando membranas de 12 kDa y 1 kDa, ya que se obtuvo la mayor concentración de proteína, los mayores halos de inhibición y mayor pureza, sobre todo al analizar la relación de actividad del dializado de 1 kDa. Sin embargo, el análisis por electroforesis mostró que la proteína no se encuentra completamente pura.

El ensayo de inhibición de los geles sobre el crecimiento de *L. innocua* y *L. monocytogenes*, mostró que las dos cepas sintetizan una proteína con actividad antimicrobiana con un tamaño entre 4,6 y 10 kDa (Figura 7)

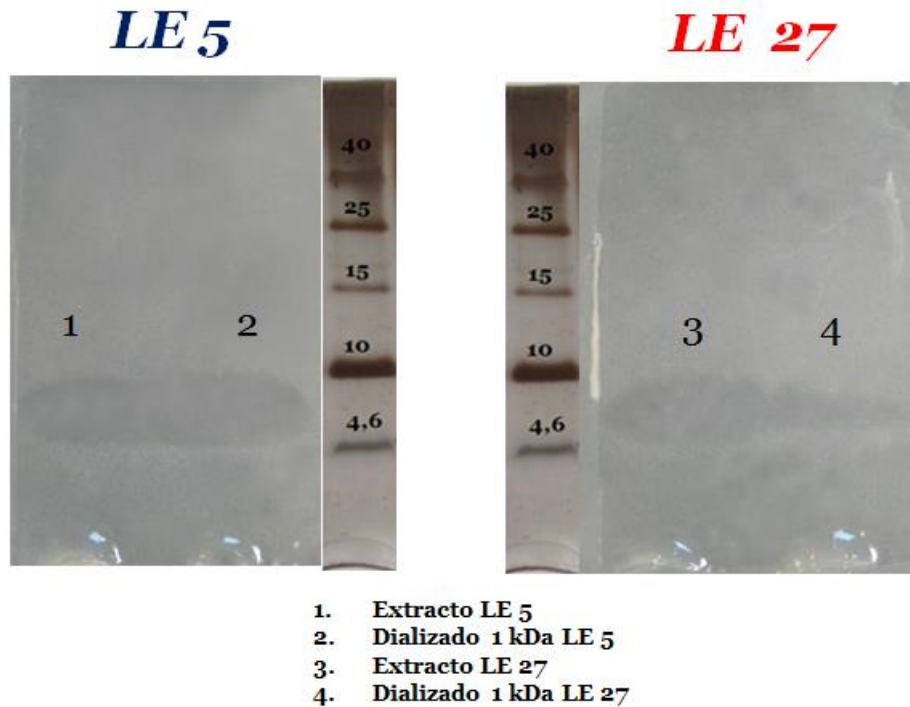


Figura 7. Ensayo de Inhibición del gel de electroforesis de las fracciones purificadas de las cepas de *L. plantarum* LE 5 y LE 27

Con el objetivo de identificar la proteína responsable de la actividad antimicrobiana, se realizó una electroforesis Tricina SDS-PAGE y se recortó la región entre 4,6 y 10 kDa (Figura 8), la cual fue analizada mediante nano LC-MS/MS. Para las dos cepas el análisis mostró la presencia de la secuencia INELAHK, la cual hace parte de la proteína UPF0291 de *Lactobacillus plantarum* (UniProtKB/Swiss-Prot Q88VI7), que se caracteriza por tener un total de 79 aminoácidos y una masa molecular de 9,3 kDa. Al comparar esta proteína con las presentes en la base de datos de Uniprot se observó la presencia de proteínas con un alto grado de identidad, presentes en otras especies de bacterias ácido lácticas (Figura 9). Sin embargo, es importante destacar que hasta el momento no tiene una función asignada.

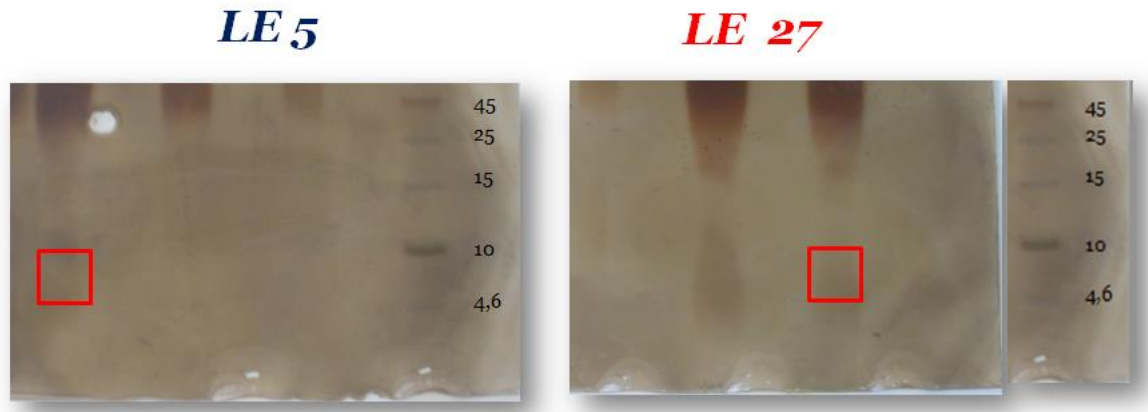


Figura 8. Bandas presuntivas que fueron cortadas y enviadas para el análisis mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Graphical overview

Color code for identity 0-100% =

Accession	Entry name	0Query hit79	0	Match hit (sqr scale)	109	Name (Organism)
<input type="checkbox"/> Query	20130429701CENHHFS					
<input type="checkbox"/> E1TTQ9	E1TTQ9_LACPS					UPF0291 protein LPST_C1651 (<i>Lactobacillus plantarum</i> (strain ST-III))
<input type="checkbox"/> C6VQZ6	C6VQZ6_LACPJ					UPF0291 protein JDM1_1724 (<i>Lactobacillus plantarum</i> (strain JDM1))
<input type="checkbox"/> H3P560	H3P560_LACPN					UPF0291 protein nc8_1773 (<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. planta...)
<input type="checkbox"/> Q88V17	Y2062_LACPL					UPF0291 protein Ip_2062 (<i>Lactobacillus plantarum</i> (strain ATCC ...))
<input type="checkbox"/> D7VBS3	D7VBS3_LACPN					UPF0291 protein HMPREF0531_11596 (<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. planta...)
<input type="checkbox"/> G0M0D2	G0M0D2_LACPE					UPF0291 protein LPENT_02966 (<i>Lactobacillus pentosus</i> IG1)
<input type="checkbox"/> F6IRC1	F6IRC1_LACPE					UPF0291 protein LPE_00070 (<i>Lactobacillus pentosus</i> MP-10)
<input type="checkbox"/> I9L019	I9L019_LACPE					Uncharacterized protein (<i>Lactobacillus pentosus</i> KCA1)
<input type="checkbox"/> G6CD65	G6CD65_LACCU					UPF0291 protein ynzC (<i>Lactobacillus curvatus</i> CRL 705)
<input type="checkbox"/> G6IQ37	G6IQ37_PEDAC					UPF0291 protein KIW_04145 (<i>Pediococcus acidilactici</i> MA18/5M)
<input type="checkbox"/> E0NDE4	E0NDE4_PEDAC					UPF0291 protein HMPREF0623_0316 (<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284)
<input type="checkbox"/> D2EI45	D2EI45_PEDAC					UPF0291 protein HMPREF9024_00515 (<i>Pediococcus acidilactici</i> 7_4)
<input type="checkbox"/> Q38W55	Y1274_LACSS					UPF0291 protein LCA_1274 (<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. sakei (str...))
<input type="checkbox"/> Q03QR3	Y1359_LACBA					UPF0291 protein LVIS_1359 (<i>Lactobacillus brevis</i> (strain ATCC 367...))
<input type="checkbox"/> K9I745	K9I745_9LACO					UPF0291 protein PLO_0029 (<i>Pediococcus lolii</i> NGRI 0510Q)
<input type="checkbox"/> H3RMA4	H3RMA4_9LACO					UPF0291 protein LBLM1_00440 (<i>Lactobacillus mucosae</i> LM1)
<input type="checkbox"/> H8G0W0	H8G0W0_PEDPE					UPF0291 protein ynzC (<i>Pediococcus pentosaceus</i> IE-3)
<input type="checkbox"/> Q03FU2	Y871_PEDPA					UPF0291 protein PEPE_0871 (<i>Pediococcus pentosaceus</i> (strain ATCC ...))
<input type="checkbox"/> H4GKS3	H4GKS3_9LACO					UPF0291 protein PS3_16193 (<i>Lactobacillus gastricus</i> PS3)
<input type="checkbox"/> C7XTR1	C7XTR1_9LACO					UPF0291 protein HMPREF0501_00077 (<i>Lactobacillus coleohominis</i> 101-4-CHN)
<input type="checkbox"/> C0WXJ5	C0WXJ5_LACFE					UPF0291 protein HMPREF0511_0846 (<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931)
<input type="checkbox"/> D8IHG5	D8IHG5_LACFC					UPF0291 protein LC40_0475 (<i>Lactobacillus fermentum</i> (strain CECT 5716))
<input type="checkbox"/> B2GBL3	B2GBL3_LACF3					UPF0291 protein LAF_0709 (<i>Lactobacillus fermentum</i> (strain NBRC ...))
<input type="checkbox"/> D0DQX3	D0DQX3_LACFE					UPF0291 protein HMPREF0513_00328 (<i>Lactobacillus fermentum</i> 28-3-CHN)
<input type="checkbox"/> F4FUF3	F4FUF3_LACBN					UPF0291 protein Lbuc_0963 (<i>Lactobacillus buchneri</i> (strain NRRL...))
<input type="checkbox"/> J9W545	J9W545_LACBU					UPF0291 protein LBUCD034_1099 (<i>Lactobacillus buchneri</i> CD034)

Figura 9. Resultados del Blast para la proteína UPF0291 de *Lactobacillus plantarum* (UniProtKB/Swiss-Prot Q88V17), contra la bases de datos de UniProtKB

Objetivo 2: Caracterizar el efecto de las bacteriocinas purificadas sobre el crecimiento de diferentes microorganismos indicadores, alteradores y patógenos.

El espectro antimicrobiano de los extractos y las fracciones purificadas fue evaluado empleando los microorganismos *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas auriginosa* y *Leuconostoc citreum*, en una concentración de 10^5

UFC/mL y por medio de la técnica de difusión en agar. Los resultados mostraron que las bacteriocinas producidas por las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27, tienen un efecto inhibitorio exclusivamente frente a *L. innocua*, *L. monocytogenes* (Figuras 10-12), y *E. faecalis* (Figuras 13-15)

La figura 10 muestra los halos de inhibición generados contra *L. monocytogenes* por las fracciones obtenidas del proceso de purificación más adecuado, es decir: el extracto libre de células, el precipitado de sulfato de amonio y los dializados de 12 y 1 kDa respectivamente; en todas las fracciones se observó actividad, los halos más grandes se evidenciaron en el dializado de 12 kDa por efecto de la alta concentración de proteína presente en la misma. Llama la atención el comportamiento de la última fracción, el dializado de 1 kDa, donde se observó un halo de inhibición claramente definido, a pesar de la baja concentración de proteína presente en esta muestra, lo que puede ser un indicador importante de mayor grado de pureza.

***Lactobacillus plantarum* LE 5**



***Lactobacillus plantarum* LE 27**

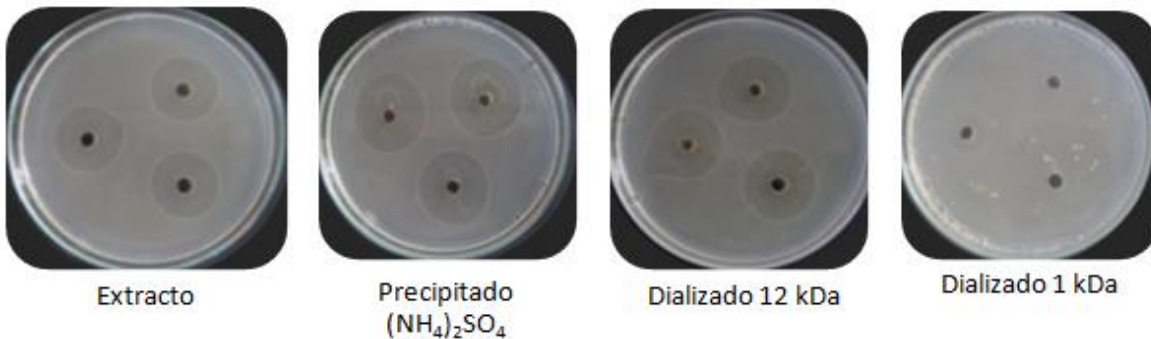


Figura 10. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones producidas por las cepas *L. plantarum* LE 5 y LE 27 contra *L. monocytogenes*.

En la figura 11 se evidencia graficamente el tamaño de los halos de inhibición generados por las fracciones de las cepas de *L. plantarum* LE 5 y LE 27, la cepa LE 27 genera una inhibición de *L. monocytogenes* ligeramente mayor a la cepa LE 5.

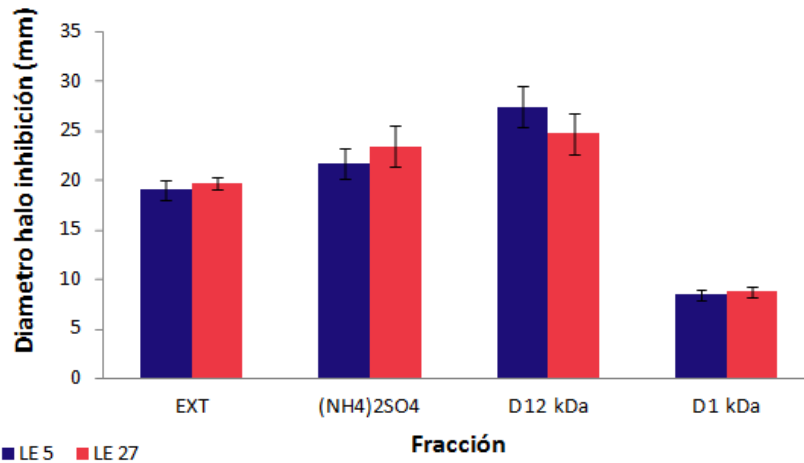


Figura 11. Actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. Halos generados por cada fracción purificada. (EXT) Extracto crudo, ((NH₄)₂SO₄) Precipitado de Sulfato de Amonio, (D 12kDa) Dializado de 12 kDa, (D 1kDa) Dializado de 1 kDa

La figura 12 muestra los datos anteriores corregidos por la concentración de proteína en cada ensayo (se hizo una relación de actividad al dividir el tamaño del halo por la concentración de proteína presente en los 80 µl de cada fracción dispensada en cada pozo en el agar). Se observó con claridad que la bacteriocina producidas por la cepa LE 27 es mucho más activa que la de la cepa LE 5, por otro lado se destaca que el mayor grado de actividad se obtuvo en la última fracción que corresponde al dializado de 1 kDa, posiblemente por su mayor grado de pureza.

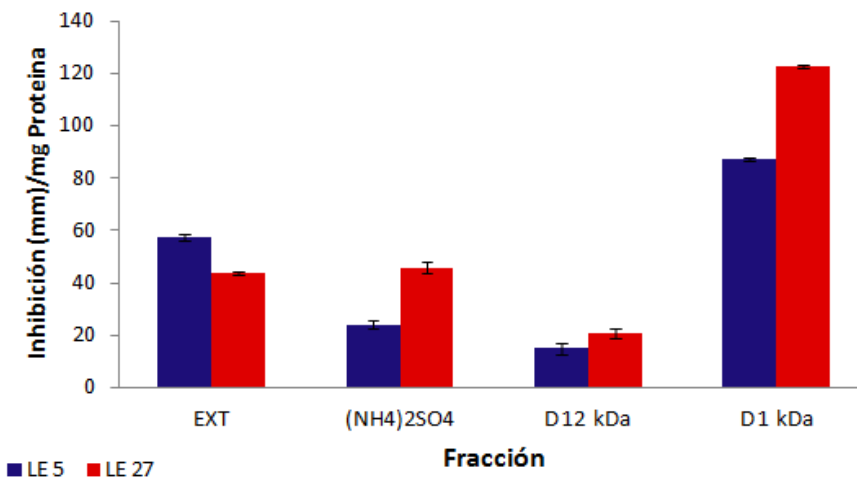


Figura 12. Actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*. Datos corregidos por la concentración de proteína en cada fracción. (EXT) Extracto crudo, ((NH₄)₂SO₄) Precipitado de Sulfato de Amonio, (D 12kDa) Dializado de 12 kDa, (D 1kDa) Dializado de 1 kDa

La figura 13 muestra los halos de inhibición generados contra *E. faecalis* por las fracciones obtenidas del proceso de purificación más adecuado, es decir: el extracto libre de células, el precipitado de sulfato de amonio y los dializados de 12 y 1 kDa respectivamente; en todas las fracciones se observó actividad, los halos más grandes se evidenciaron en el dializado de 12 kDa por efecto de la alta concentración de proteína presente en la misma.

***Lactobacillus plantarum* LE 5**



***Lactobacillus plantarum* LE 27**

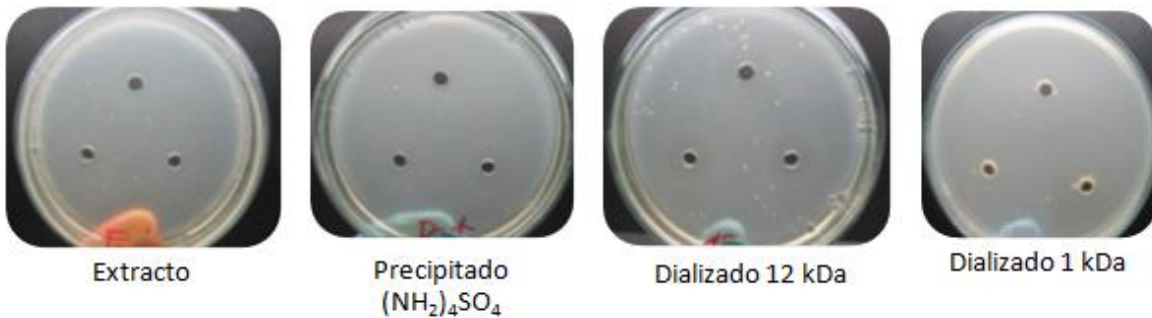


Figura 13. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones producidas por las cepas *L. plantarum* LE 5 y LE 27 contra *Enterococcus faecalis*.

En la figura 14 se evidencia graficamente el tamaño de los halos de inhibición generados por las fracciones de las cepas de *L. plantarum* LE 5 y LE 27, al igual que los datos anteriores la cepa LE 27 genera una inhibición de *Enterococcus faecalis* ligeramente mayor a la cepa LE 5.

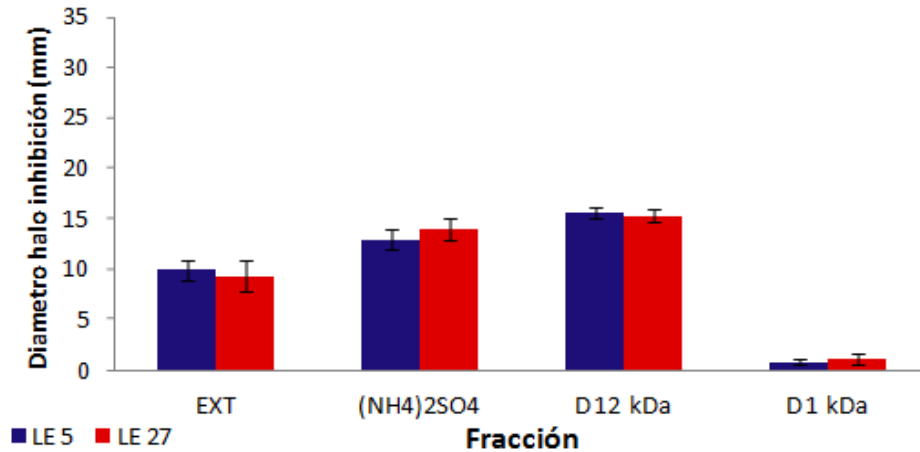


Figura 14. Actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*. Halos generados por cada fracción purificada. (EXT) Extracto crudo, ((NH₄)₂SO₄) Precipitado de Sulfato de Amonio, (D 12kDa) Dializado de 12 kDa, (D 1kDa) Dializado de 1 kDa

La figura 15 muestra los datos anteriores corregidos por la concentración de proteína en cada ensayo (se hizo una relación de actividad al dividir el tamaño del halo por la concentración de proteína presente en los 80 µl de cada fracción dispensada en cada pozo en el agar). Se observó con claridad que la bacteriocina producidas por la cepa LE 27 es mucho más activa que la de la cepa LE 5.

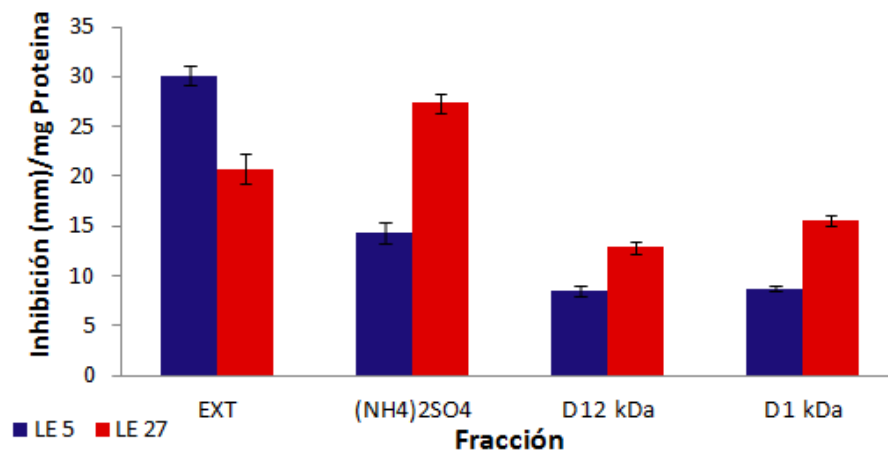


Figura 15. Actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*. Datos corregidos por la concentración de proteína en cada fracción. (EXT) Extracto crudo, ((NH₄)₂SO₄) Precipitado de Sulfato de Amonio, (D 12kDa) Dializado de 12 kDa, (D 1kDa) Dializado de 1 kDa

Después de evaluar el espectro antimicrobiano de las bacteriocinas producidas por ambas cepas de *L. plantarum*, se seleccionó la fracción de 1 kDa de la cepa LE 27 por demostrar la mayor relación de actividad al presumirse su mayor grado de pureza, y se comparó su actividad frente a los dos microorganismos sensibles (*L. monocytogenes* y *E. faecalis*) con la Nisina, producida por *Lactococcus lactis*, que es la única bacteriocina aprobada por la FDA y la Union Europea para su uso en alimentos.

A pesar de que la fracción de 1 kDa de la cepa LE 27 se encontraba en menor concentración que la solución de Nisina evaluada, ésta demostró un nivel de actividad ligeramente mayor frente a *L. monocytogenes*. Sin embargo el halo de inhibición generado frente a *E. faecalis* fue mucho más reducido que el generado por la Nisina.

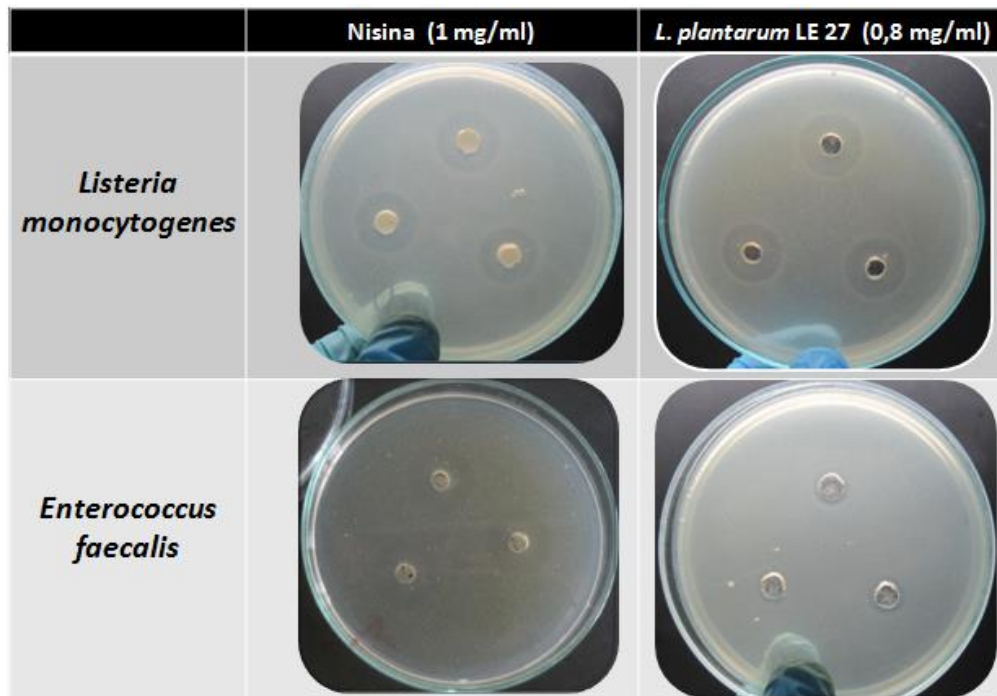


Figura 16. Comparación de la actividad antimicrobiana entre Nisina y las fracciones purificadas de la cepa *L. plantarum* LE27 (Fracción: Dializado de 1 kDa)

Objetivo 3: Establecer los perfiles de estabilidad de las bacteriocinas frente a pH, temperatura, detergentes y enzimas.

Las figuras 17 a 20 muestran los resultados del efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27. Los resultados mostraron que el pH máximo de actividad para las dos bacteriocinas es 6, también se observó que las tres fracciones analizadas son ampliamente estables a pH ácidos (2, 4, 6), de manera interesante se evidenció como la estabilidad de las bacteriocinas fue aumentando a medida que avanza el proceso de purificación, sobre todo después de la incubación bajo pH alcalinos (8, 10 y 12) donde las fracciones más purificadas (dializado de 1 kDa) mantienen siempre una actividad mayor al 85%.

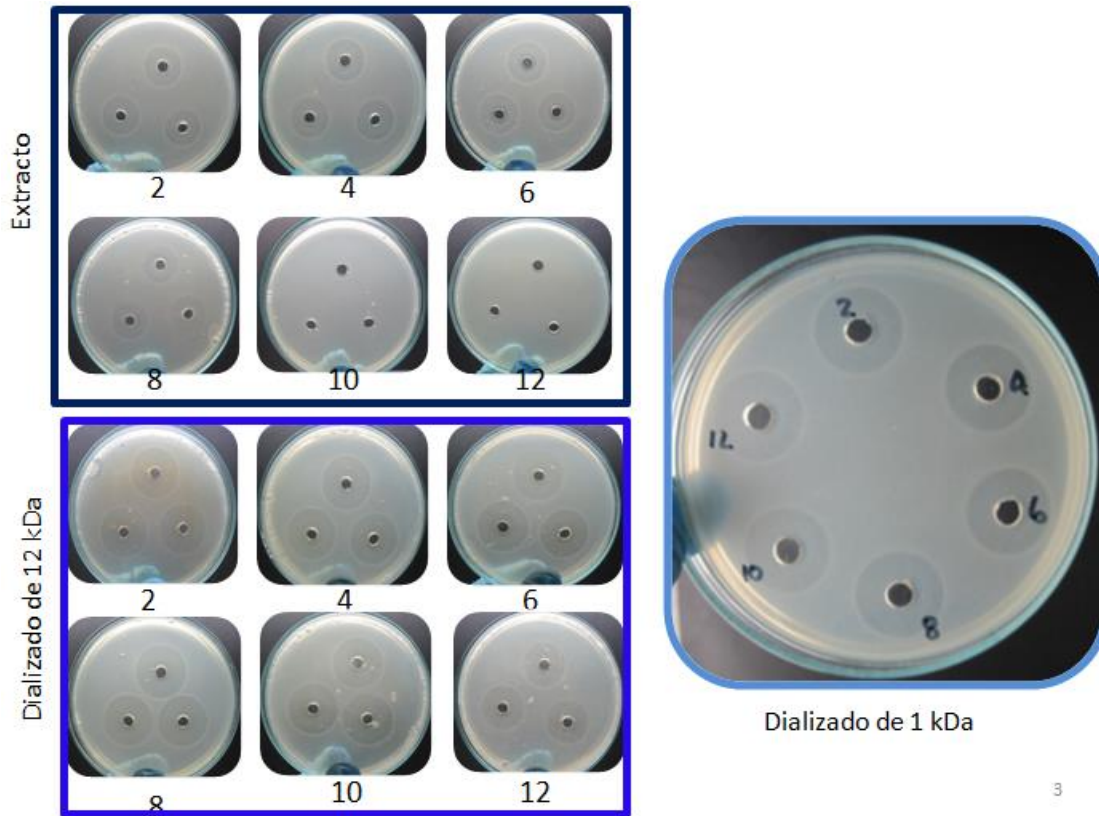


Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa *L. plantarum* LE5 frente a *L. monocytogenes*.

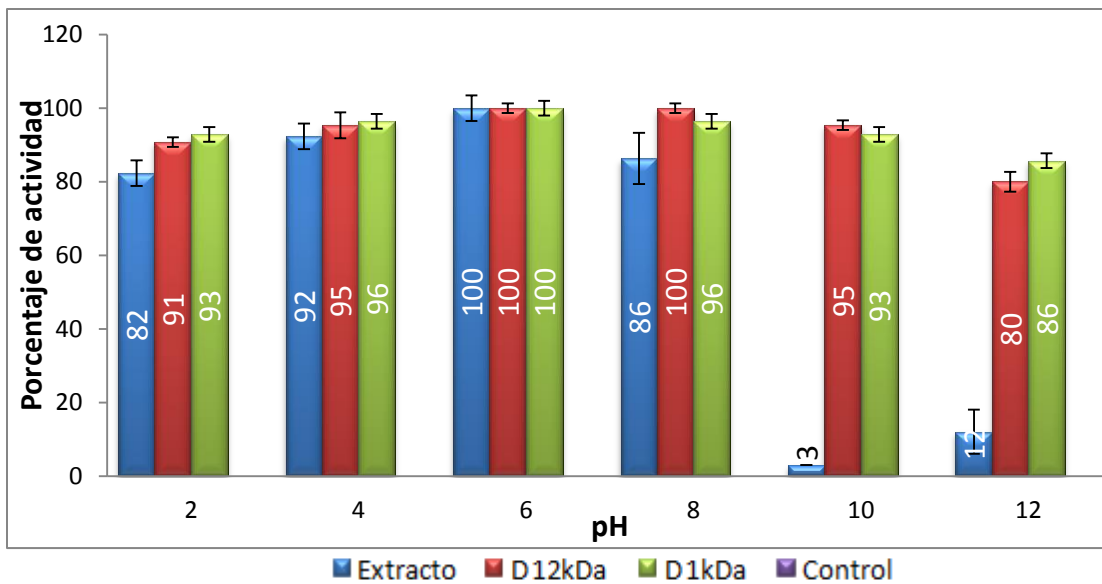


Figura 18. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul), fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa *L. plantarum* LE5 frente a *L. monocytogenes*. Los datos son presentados como el porcentaje del tamaño del halo de inhibición contra la condición que presentó los mayores halos (pH 6,0).

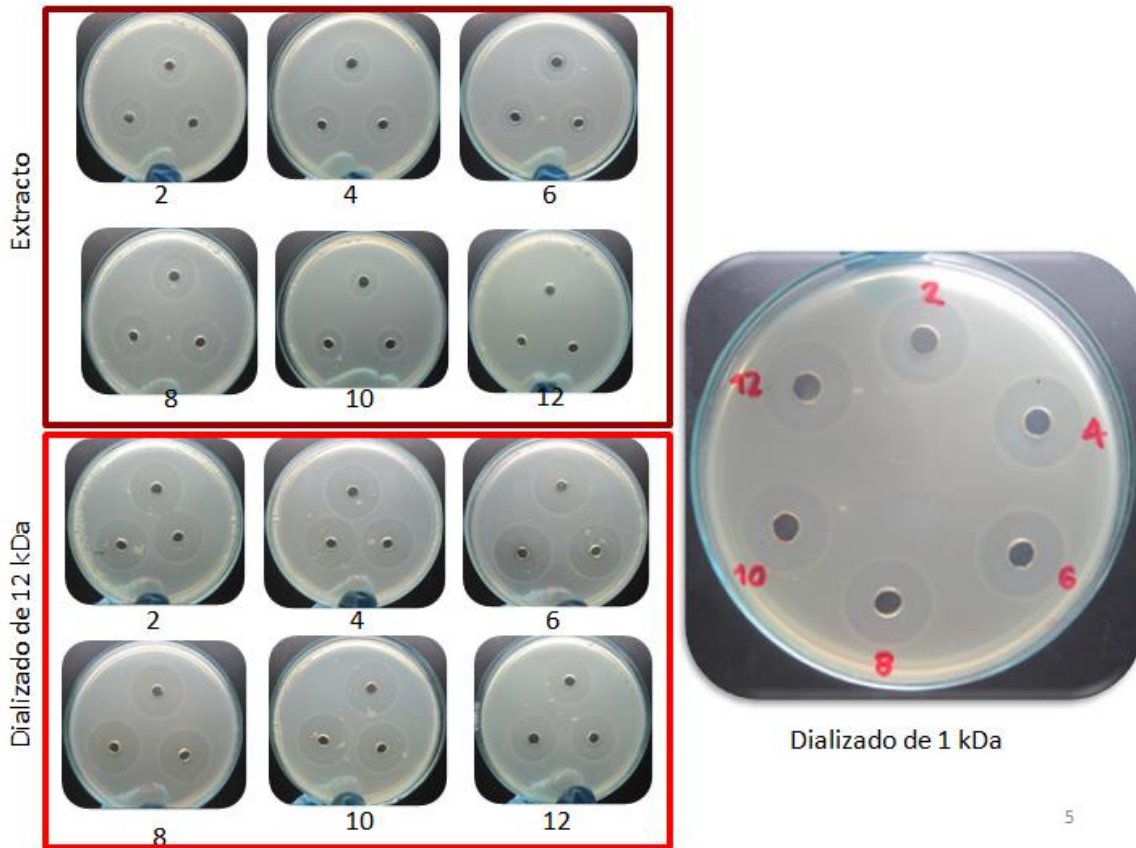


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa *L. plantarum* LE27 frente a *L. monocytogenes*.

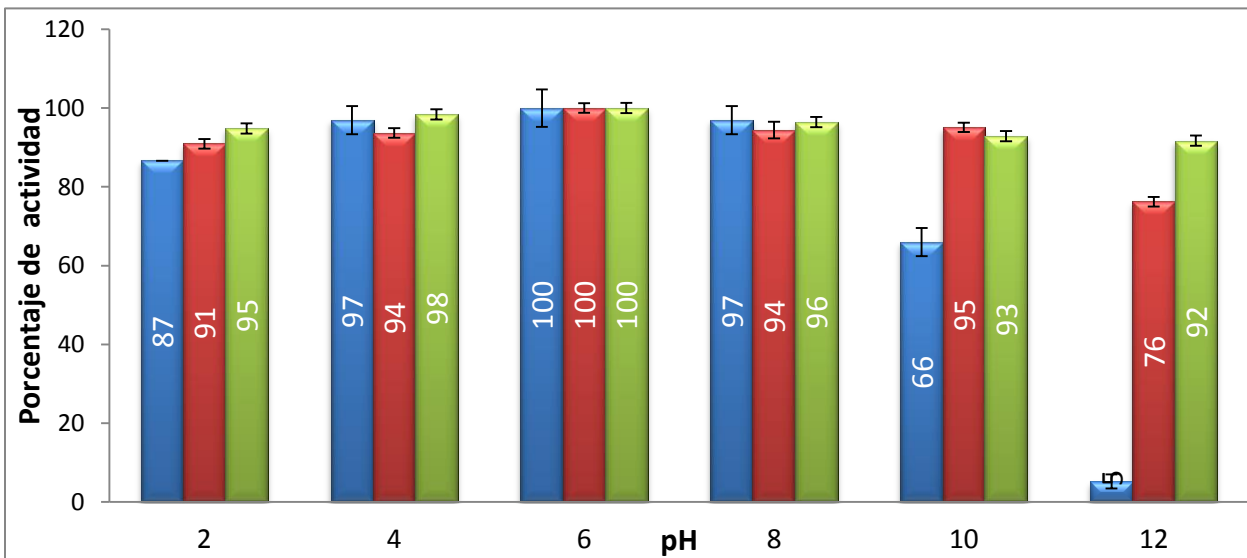


Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa *L. plantarum* LE27 frente a *L. monocytogenes*. Los datos son presentados como el porcentaje del tamaño del halo de inhibición contra la condición que presentó los mayores halos (pH 6,0).

Las figuras 21 a 25 muestran los resultados del efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27. Los resultados mostraron que las bacteriocinas permanecen con casi el 100% de su actividad en el rango de temperatura de 4 a 37 grados centígrados. Los extractos empiezan a perder estabilidad de manera notoria a partir de la incubación a 80°C, sin embargo las fracciones con mayor grado de pureza demostraron ser mucho más estables después de la incubación a 80 y 100°C manteniéndose en un nivel de actividad siempre mayor al 80%. Finalmente se pudo comprobar que las bacteriocinas producidas por las 2 cepas permanecen estables incluso después de un proceso de esterilización mediante calor húmedo (121°C, 15 atm, 15 min).

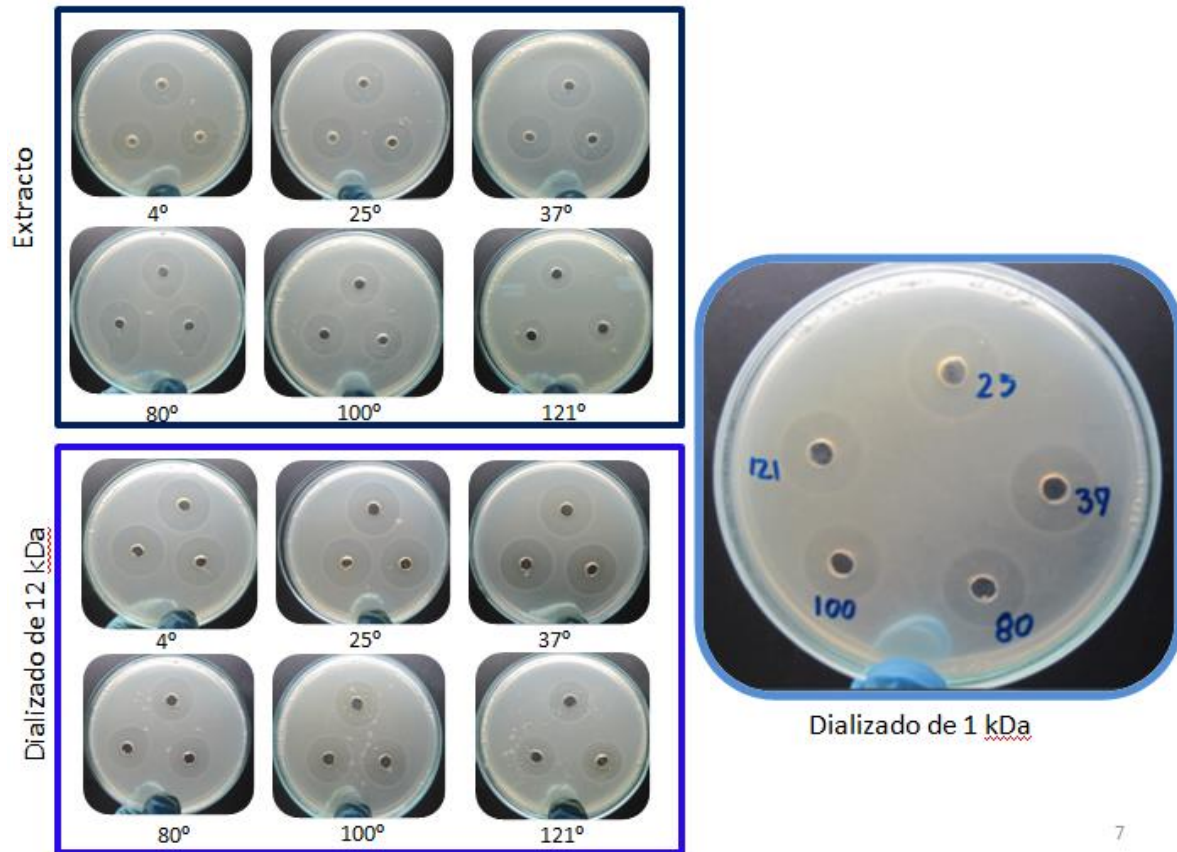


Figura 21. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa *L. plantarum* LE5 frente a *L. monocytogenes*.

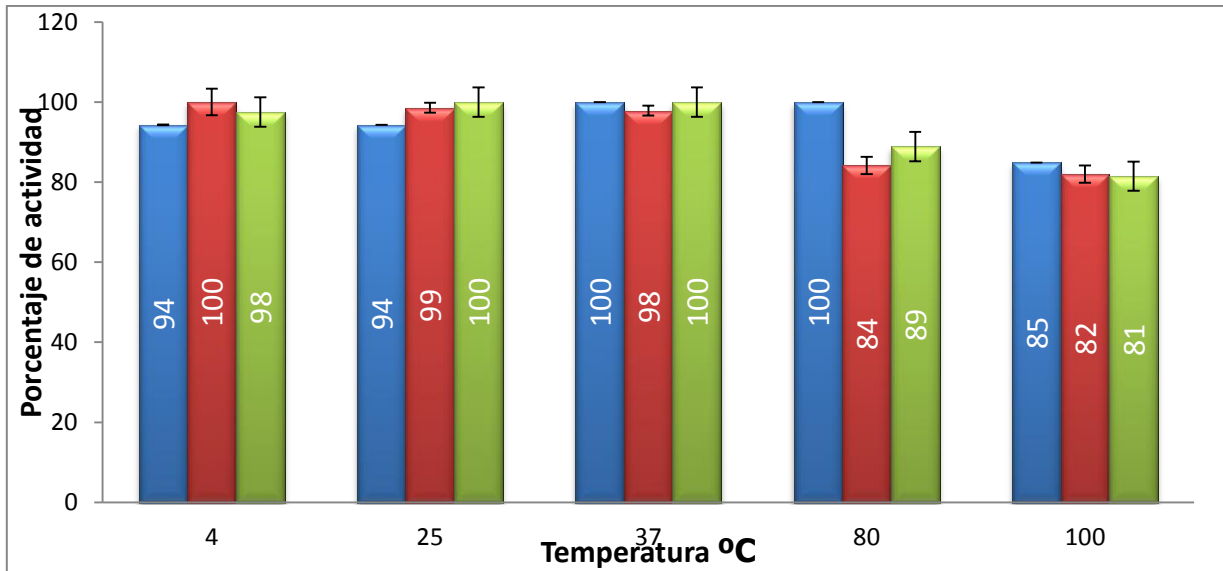


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa *L. plantarum* LE5 frente a *L. monocytogenes*. Los datos son presentados como el porcentaje del tamaño del halo de inhibición contra la condición que presentó los mayores halos (4 °C, 12 kDa).

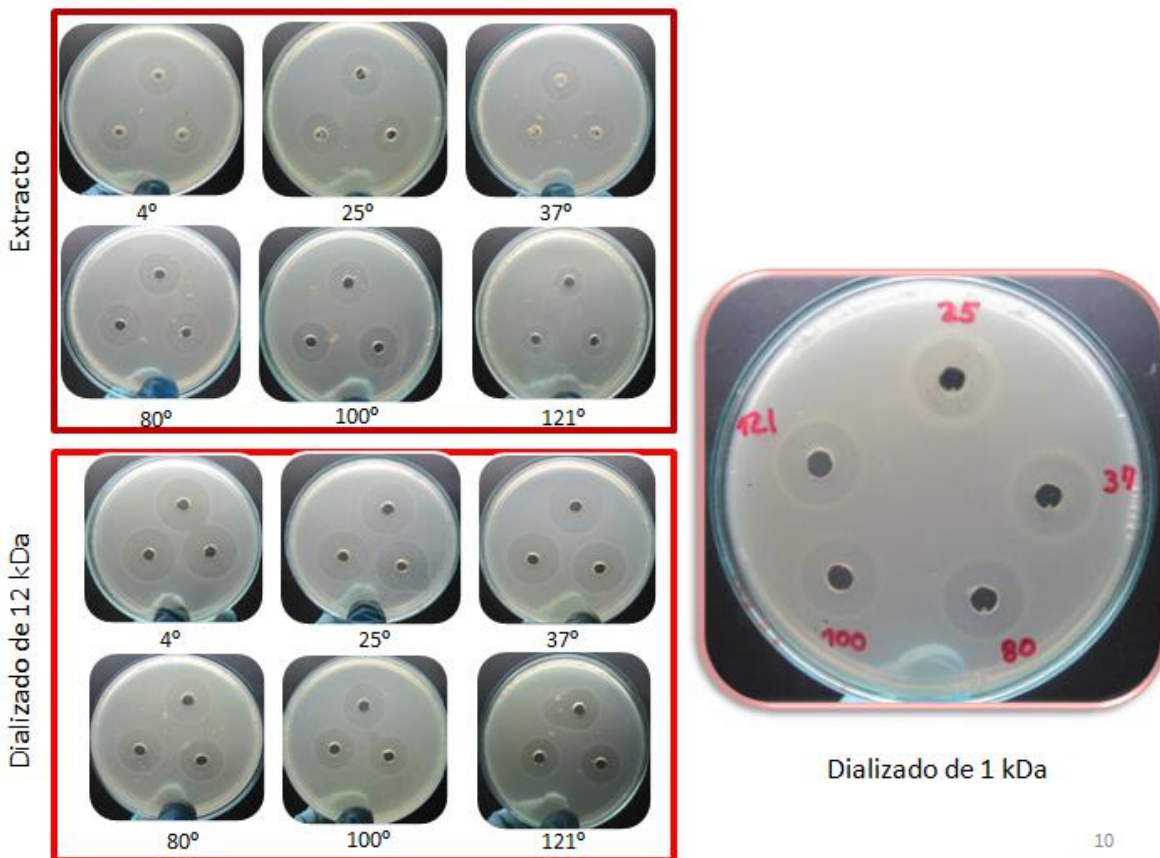


Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa *L. plantarum* LE27 frente a *L. monocytogenes*.

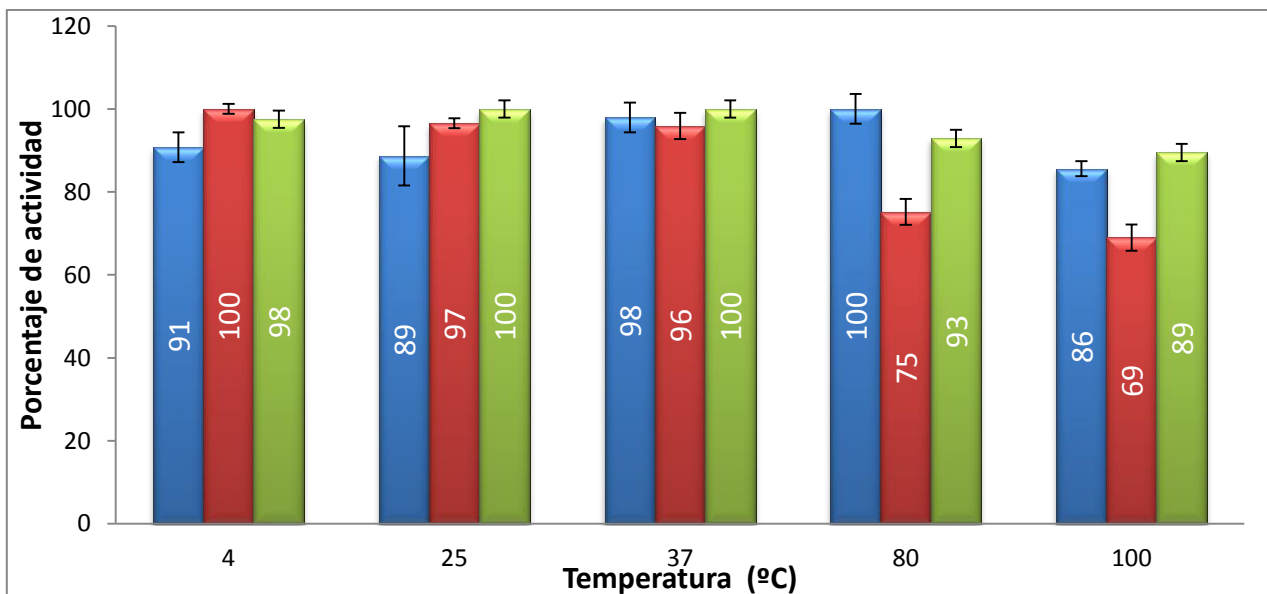


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa *L. plantarum* LE27 frente a *L. monocytogenes*. Los datos son presentados como el porcentaje del tamaño del halo de inhibición contra la condición que presentó los mayores halos (4 °C, 12 kDa).

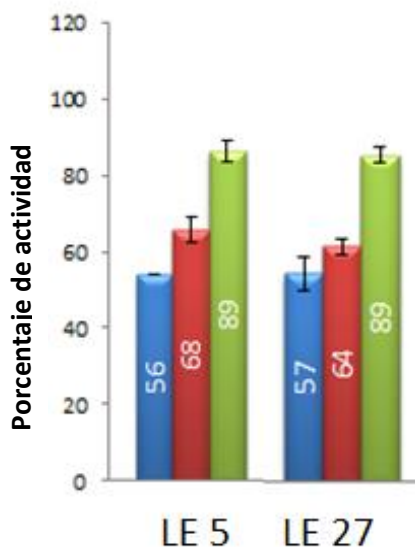


Figura 25. Estabilidad a condiciones de esterilización por calor húmido sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27 frente a *L. monocytogenes*. Los datos son presentados como el porcentaje del tamaño del halo de inhibición contra la condición que presentó los mayores halos (4 °C, 12 kDa), para cada cepa.

Las figuras 26 a 29 muestran los resultados de la evaluación del efecto de diferentes agentes químicos sobre la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones purificadas de las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27. El objetivo de este ensayo fue

determinar si los agentes químicos evaluados potenciaban o reducían la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas frente al crecimiento de *L. monocytogenes*. Antes de realizar los ensayos con las fracciones de las bacteriocinas purificadas, se evaluó si cada agente químico por si solo generaba algún tipo de inhibición frente al crecimiento de este microorganismo. El único agente que presentó efecto inhibitorio frente al crecimiento de *L. monocytogenes* fue el SDS, por lo que el diámetro del halo de inhibición generado por esta sustancia fue restado del halo generado en el ensayo de estabilidad con las bacteriocinas de cada cepa estudiada.

Los resultados mostraron que entre los agentes evaluados sólo el SDS produjo una marcada reducción en la actividad antimicrobiana llegando a valores de 4% y 6% respectivamente para las cepas LE 5 y LE 27 en las fracciones más purificadas (dializado de 1kDa) con respecto a los observados con los controles normales (fracciones sin agentes químicos). De otro lado se evidencio que los otros agentes químicos evaluados no afectaron de manera considerable la actividad de las fracciones en estudio, por ejemplo al observar los valores de actividad de la fracción más purificada (dalizado de 1 kDa) se evidencio que su efecto antimicrobiano se mantiene en un 75 y 98% respectivamente para las cepas LE 5 y LE 27, esto con respecto a los valores de los controles normales.

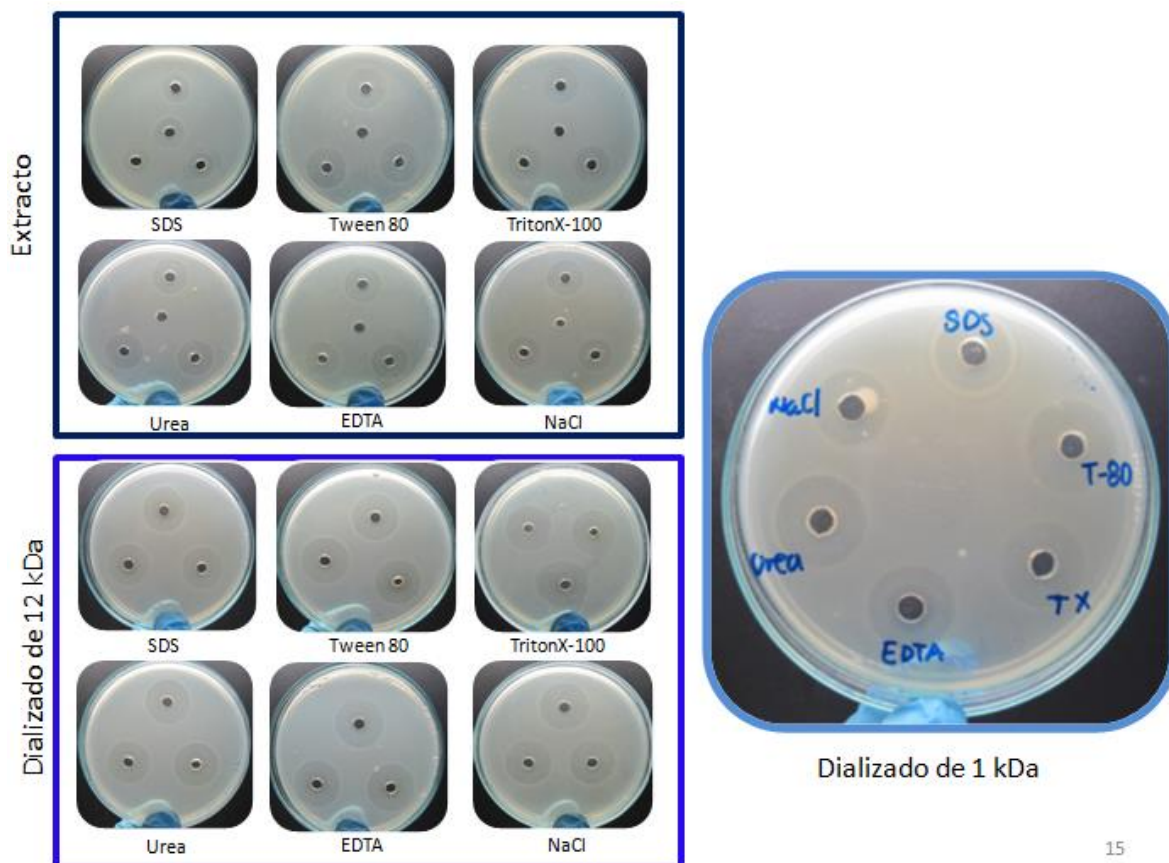


Figura 26. Efecto del uso de agentes químicos (SDS= Dodecilsulfato sódico, T-80= Tween 80, TX= Triton X 100, EDTA, Urea 6M y NaCl 6,5%) sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa *L. plantarum* LE5 frente a *L. monocytogenes*.

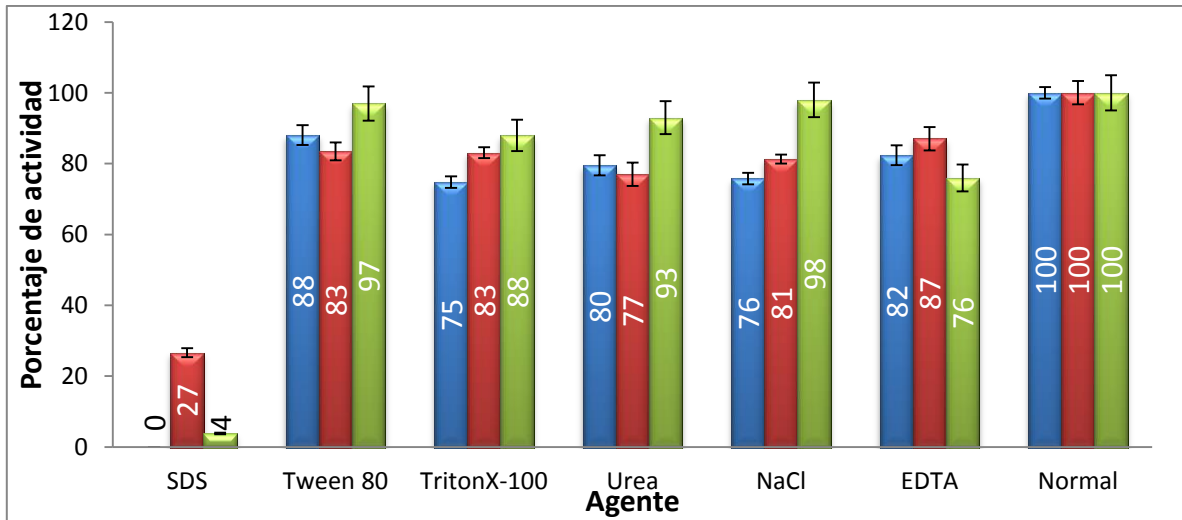


Figura 27. Efecto del uso de agentes químicos sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa *L. plantarum* LE5 frente a *L. monocytogenes*. Los datos son presentados como el porcentaje del tamaño del halo de inhibición contra los valores en ausencia de agente químicos (normal).

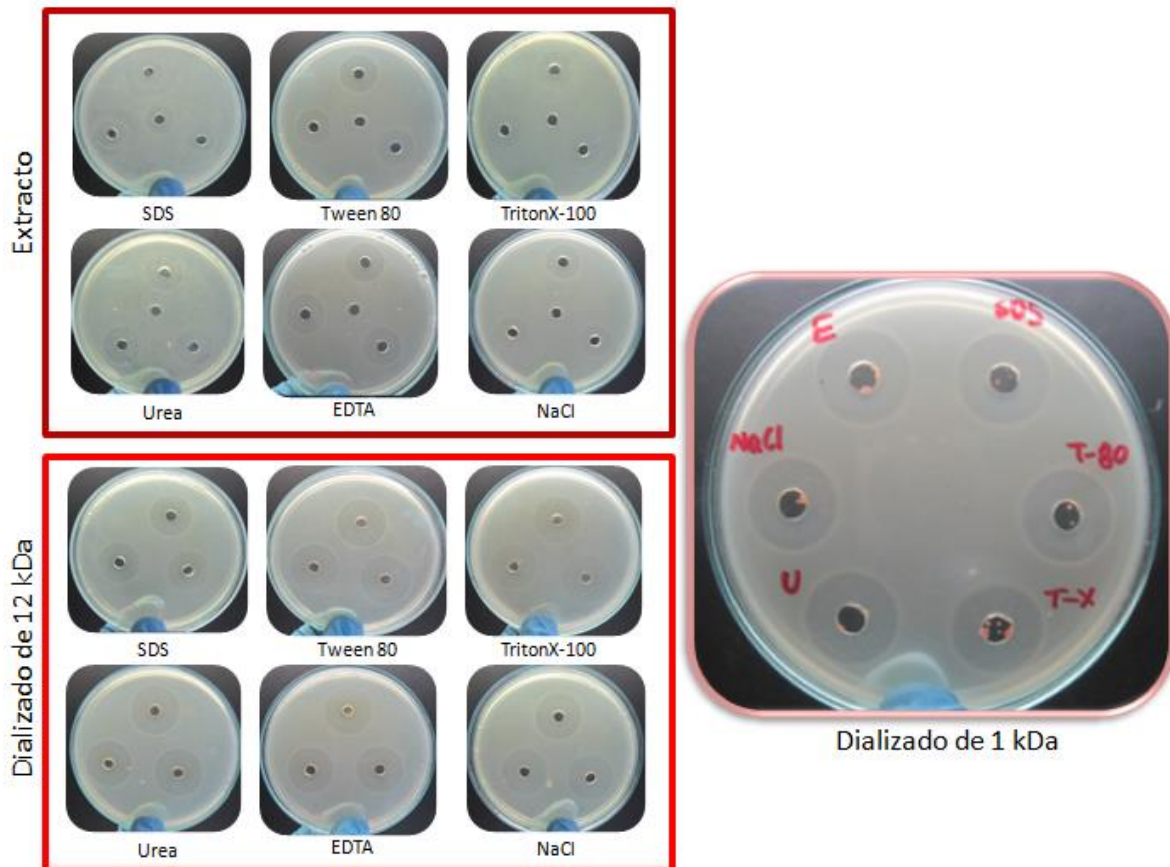


Figura 28. Efecto del uso de agentes químicos (SDS= Dodecilsulfato sódico, T-80= Tween 80, TX= Triton X 100, EDTA, Urea 6M y NaCl 6,5%) sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa *L. plantarum* LE27 frente a *L. monocytogenes*.

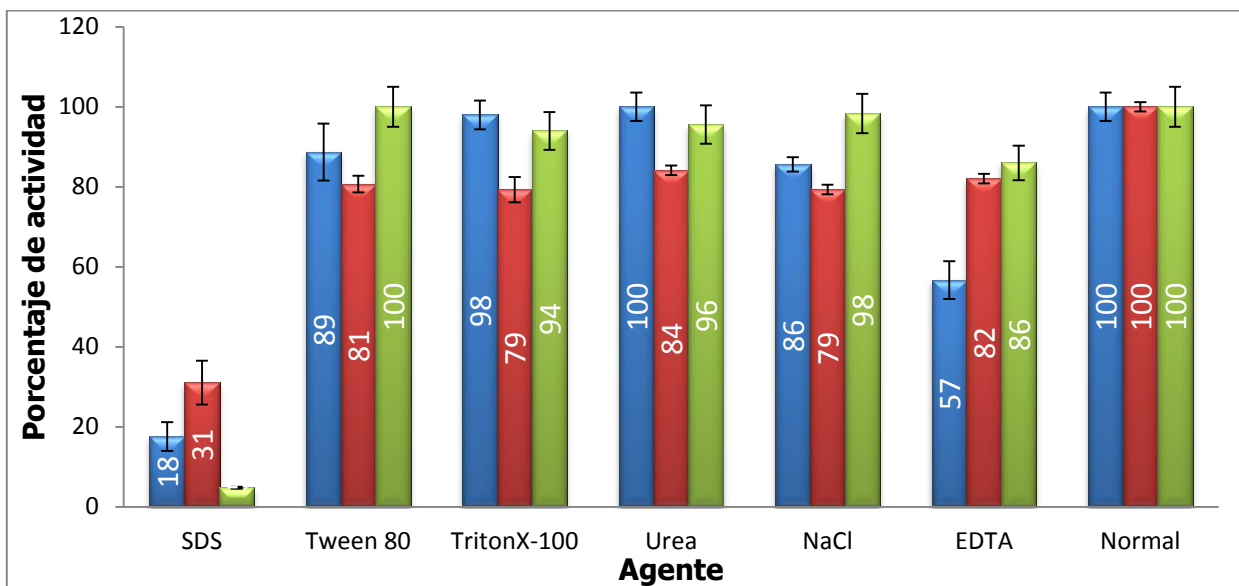


Figura 29. Efecto del uso de agentes químicos sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa *L. plantarum* LE27 frente a *L. monocytogenes*. Los datos son presentados como el porcentaje del tamaño del halo de inhibición contra los valores en ausencia de agente químicos (normal).

Finalmente, se evaluó el efecto de proteínasa K, tripsina y catalasa sobre la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones purificadas de *L. plantarum* LE5 y LE27 (Figuras 30 a 33). EL objetivo del uso de las proteinasas fue el de confirmar el carácter proteico del agente antimicrobiano, mientras que el uso de la catalasa fue el de descartar una posible inhibición en el crecimiento del microorganismo por efecto de la presencia de H₂O₂. Los resultados mostraron que la actividad de las bacteriocinas producidas por ambas cepas de *L. plantarum* no se ve afectada por el tratamiento con catalasa, lo que demuestra que la actividad no se debe a la posible presencia de H₂O₂. Sin embargo se debe resaltar que se presentó una reducción de la actividad de cada ensayo en relación al control de cada fracción sin catalasa, esto se debe a un efecto de dilución sobre las fracciones evaluadas al ser mezcladas en relación 1:1 con la solución de la enzima.

De otro lado, se observó que la actividad de todas las fracciones fue reducida en un 100% después del tratamiento con las dos enzimas proteolíticas: Proteínasa k y Tripsina; lo que permitió confirmar que la actividad antimicrobiana de cada fracción se debe a las bacteriocinas, que son péptidos o proteínas que fácilmente son denaturadas o degradadas por la acción de dichas enzimas.

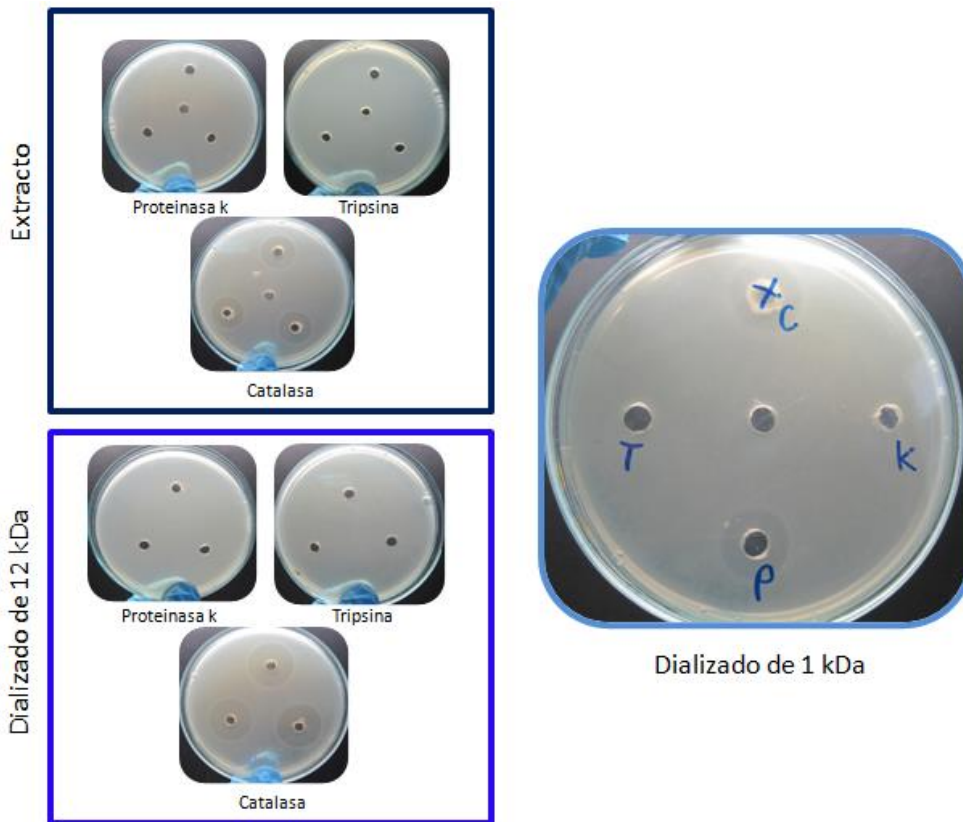


Figura 30. Efecto del de enzimas Proteínasa K (K), Tripsina (T) y Catalasa (C), sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa *L. plantarum* LE5 frente a *L. monocytogenes*.

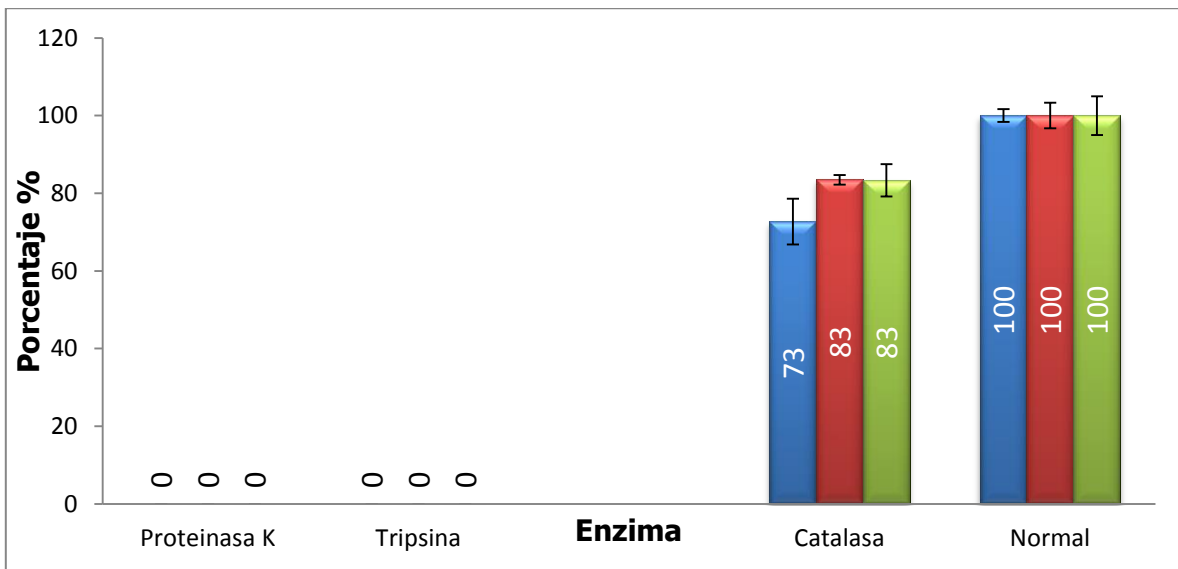


Figura 31. Efecto del uso de Proteínasa K, Tripsina y Catalasa sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa *L. plantarum* LE5 frente a *L. monocytogenes*. Los datos son presentados como el porcentaje del tamaño del halo de inhibición contra los valores en ausencia de enzimas (normal).



Figura 32. Efecto del de enzimas Proteínasa K (K), Tripsina (T) y Catalasa (C), sobre la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones purificadas de la cepa *L. plantarum* LE27 frente a *L. monocytogenes*.

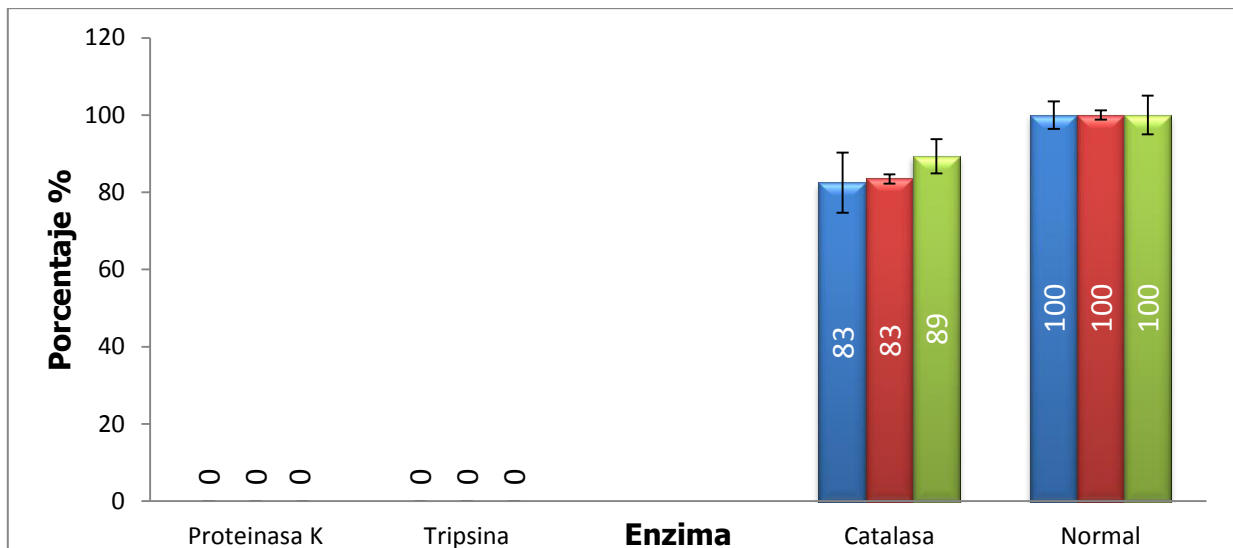


Figura 33. Efecto del uso de Proteínasa K, Tripsina y Catalasa sobre la actividad antimicrobiana del extracto (azul) y fracciones de 12 kDa (rojo) y 1 kDa (verde) de la cepa *L. plantarum* LE27 frente a *L. monocytogenes*. Los datos son presentados como el porcentaje del tamaño del halo de inhibición contra los valores en ausencia de enzimas (normal).

7. DISCUSION

Durante los últimos años se ha presentado un creciente interés en la búsqueda de sustancias antimicrobianas que permitan reducir el uso de antibióticos y conservantes sintéticos, siendo las bacteriocinas uno de los grupos de moléculas más importantes dentro de este nuevo arsenal de sustancias antimicrobianas. Sin embargo, la identificación de bacteriocinas con potencial de ser utilizadas en la industria de alimentos o farmacéutica requiere la identificación de nuevos microorganismos productores así como de la caracterización de dichas bacteriocinas. Dentro de este marco, el presente trabajo se enfocó en la purificación y caracterización de las bacteriocinas producidas por las cepas nativas de *L. plantarum* LE 5 y LE 27.

En primer lugar evaluando el proceso de separación y purificación de las bacteriocinas producidas por las cepas nativas de *L. plantarum* LE 5 y LE 27, se evidenció que el mejor protocolo de purificación fue el que incluía la precipitación con sulfato de amonio con una saturación del 70% y la doble diálisis usando membranas de 12 kDa y 1 kDa. Las fracciones colectadas en estas etapas se caracterizaron por generar los mayores halos de inhibición frente al microorganismo indicador, la mayor concentración de proteína y el mayor nivel de pureza teniendo en cuenta la relación de actividad en cada ensayo. Lo anterior es coherente con lo reportado en otros estudios, como el realizado por (Todorov S et al 2010; Martínez R et al 2013) donde a partir de una saturación con 60% de sulfato de amonio se precipitaron las bacteriocinas bacST202Ch y bacST216Ch. (Sambrook J et al 1989). Resultados similares fueron obtenidos por (Harshada M et al 2012) quienes emplearon una saturación del 40% durante la precipitación con sulfato de amonio. Esta ruta de purificación también fue seguida en el estudio de (Kacem M et al 2005), argumentando que con el método de ultrafiltración se observaba pérdida parcial de la actividad bacteriocina, lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio. Además, Bouksaim M et al en su investigación en 1999 afirman que la purificación de bacteriocinas como la nisina Z se logra con una precipitación con sulfato de amonio seguida por diálisis y liofilización tal como se describe por Meghrou et al. (1997), Sin embargo, se recomienda emplear otras técnicas adicionales para aumentar el grado de pureza de las bacteriocinas, tales como la cromatografía de fase reversa o el análisis por HPLC de las fracciones obtenidas en cada paso de la purificación (Bouksaim M et al 1999).

Durante los análisis de las muestras por electroforesis de Tricina-SDS-PAGE realizada tanto en condiciones reductoras como no reductoras, no fue posible observar la presencia clara y definida de bandas correspondientes a las bacteriocinas producidas por ambas cepas. Este resultados coincide con algunos reportes en los que se muestra que debido a las características químicas de estos compuestos se mantienen su estabilidad incluso después de un tratamiento con β -mercaptoetanol (Ahmadova A et al 2013), afectando el corrido electroforético. Estos resultados sugieren que las bacteriocinas producidas por *L. plantarum* LE5 y LE27 pudieron permanecer estables después de la acción de dicho

agente, lo que podría explicar la falta de definición de las correspondientes bandas. Sin embargo, en algunas electroforesis se observaron bandas tenues cercanas al marcador de peso de 10 kDa, que según la literatura, se encuentran dentro del rango de tamaño reportado para las bacteriocinas sintetizadas por otras cepas de *Lactobacillus*. Por ejemplo, bacST202Ch y bacST216Ch presentan un tamaño de 3,5 y 10,0 kDa, respectivamente (Todorov S et al 2010); ST13BR y ST194BZ, producidas por *L. plantarum*, presentan un tamaño de 10,0 y 14,0 kDa, respectivamente (Todorov S et al 2005b); LABB y LABP de 3,8 y 4,5 kDa (Jamuna M et al 2005); bacALP7, correspondiente a enterocina B, y bacALP57, correspondiente a pediocina PA-1, presentan un tamaño cercano a 6,5 kDa (Pinto A et al 2009); y finalmente ST28MS y ST26MS con una masa molecular en el rango de 5,5 y 2,8 kDa, respectivamente (Martínez R et al 2013; Todorov S et al 2010b).

El ensayo de inhibición de los geles de electroforesis sobre *L. innocua* y *L. monocytogenes* permitió confirmar el tamaño de la proteína responsable de la actividad antimicrobiana en las cepas de *L. plantarum* LE5 y LE27. Se observó con claridad una zona de inhibición por debajo del marcador de peso de 10 kDa, similar a lo reportado por otros autores (Todorov S et al 2005c; Todorov S et al 2004) quienes destacan la pertinencia de esta técnica en el estudio de bacteriocinas. Finalmente, el análisis por nano LC-MS/MS sugiere que la proteína responsable de la actividad antimicrobiana en estas dos cepas de *L. plantarum* presenta una masa molecular de 9,3 kDa, la cual está presente, con un alto grado de identidad, en otras bacterias ácido lácticas, pero sin una su función específica establecida. Por tanto, estos resultados sugieren que las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27 producen una nueva bacteriocina, presente en otras bacterias ácido lácticas.

En cuanto a la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se observó actividad frente a *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*, con lo reportado para este tipo de bacteriocinas (Todorov S, 2008). En primer lugar se reporta que por lo general las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas demuestran ser altamente efectivas frente a bacterias Gram-positivas (Cintas et al, 2001; Nes I et al 2004; Gálvez A 2007; Rivera A et al 2007). Por ejemplo, (Todorov S et al 2010) las bacteriocinas ST28MS y ST26MS, producidas por *Lactobacillus plantarum*, presentaron actividad contra *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Así mismo, las bacteriocinas LABB y LABP, producidas por *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, respectivamente presentaron una marcada inhibición contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Jamuna M et al 2004 y 2005). Pinto A. et al 2009 observaron un amplio espectro de inhibición de bacteriocinas frente a varias cepas de *Listeria* spp y *Bacillus* spp, sin observar actividad frente a microorganismos Gram-negativos. Sin embargo, Suma et al. (1998), informo capacidad inhibitoria de una bacteriocina de *L. plantarum* frente a cepas Gram-negativas.

El espectro antimicrobiano de las bacteriocinas purificadas en el presente estudio, se caracteriza por tener una fuerte actividad anti listerial. Resultados análogos se han reportado para otras bacteriocinas como plantaracina, mesentericina Y105 y pediocina PA-1, caracterizadas por su actividad frente a varias cepas de *L. innocua* y varias cepas de *L.*

monocytogenes incluyendo algunas resistentes a antibióticos (Simon L et al 2001; Nowroozi J et al 2012; Ahmadova A et al 2013).

Por otro lado al considerar el efecto de los cuatro parámetros evaluados para determinar la estabilidad de estos péptidos antimicrobianos se pueden destacar varios aspectos interesantes. Analizando el efecto del pH, se encontró que para ambas bacteriocinas el pH máximo de actividad fue 6, lo que es coherente con la literatura donde se documenta que muchas bacteriocinas tienen un 100% de actividad a pH neutro o a intervalos cercanos (Harshada M et al 2012). Adicionalmente se evidenció como las tres fracciones analizadas (Extracto crudo, Dializado de 12 kDa y Dializado de 1 kDa) son ampliamente estables a niveles de pH ácido (2, 4 y 6); y se observó de manera interesante en los ensayos a niveles de pH básico (8, 10 y 12) que a medida que avanza el proceso de purificación las fracciones se muestran más estables, destacando el comportamiento del Dializado de 1 kDa que siempre permanece con una actividad superior al 85%. En cuanto a lo reportado por otros autores se encontraron datos diversos; existen informes sobre bacteriocinas muy estables, como ST28MS y ST26MS que permanecen activas después de 2 horas de incubación a valores de pH entre 2,0 y 12,0 (Todorov S et al 2005b), al igual que bacST202Ch y bacST216Ch Bacteriocina 1 (Todorov S et al 2010) y ST71KS producida por *L. plantarum* ST71KS (Martínez R et al 2013). Por otra parte se ha documentado que la mayoría de las bacteriocinas pierden su estabilidad a valores extremos de pH y sobre todo después de su incubación a pH mayores a 8 y/o alcalinos. Por ejemplo la actividad de la bacteriocina ST28MS disminuyó en un 50% a un pH por debajo de 4,0 mientras que ST26MS es poco estable en condiciones básicas (Todorov S et al 2005b). En el estudio de Jamuna M et al 2005 la actividad inhibidora de CEO era estable a un pH de 3 a 8, pero era completamente inactiva después de la exposición a pH 9 o superior. Finalmente se puede observar el caso de los péptidos caracterizados por Nowroozi J et al donde se encontró que la actividad inhibitoria se mantuvo estable durante el intervalo de pH de 2 a 10, pero se perdió después de la incubación a pH 12, lo que indica su sensibilidad al tratamiento con soluciones alcalinas (Nowroozi J et al 2012). En resumen, las bacteriocinas producidas por las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27 presentan un perfil de actividad en un rango de actividad superior al observado por otras bacteriocinas, lo que podría tener un impacto importante en las aplicaciones de estas bacteriocinas tanto en alimentos como en la industria farmacéutica.

Para el ensayo de estabilidad a diferentes temperaturas, se encontró que las bacteriocinas producidas por las cepas de *L. plantarum* LE 5 y LE 27 se caracterizan por ser termoestables, incluso después de someterlas a condiciones de esterilización mediante calor húmedo. Inicialmente se evidencio su marcada estabilidad en el rango de 4 a 37°C, lo cual está plenamente justificado por otros estudios donde se afirma que la mayoría de las bacteriocinas mantienen el 100% de su actividad hasta 60°C (Harshada M et al 2012), algunas presenta su pico máximo de actividad a los 4°C, y otras a los 25°C (Nowroozi J et al 2012) De igual forma se observa que por encima de 80°C la actividad antimicrobiana empieza a disminuir de forma considerable, como en el caso de la lactocina NK24,

producida por *L. lactis* NK24, que perdió 87,5% de su actividad después de 30 minutos a 100°C y se inactiva completamente después de 15 min a 121°C (Lee N et al 2001). En el caso de la lactocina MMFII producida por *L. lactis* MMFII, sólo el 8,3% de la actividad se registró después de 30 minutos a 110°C y 25% después de 30 min a 80 y 90°C, respectivamente (Ferchichi M et al 2001). La nisina, producida por *L. lactis* subsp. *lactis* WNC20, se inactiva después de 15 min a 121°C cuando se incubaba a pH 7,0, pero no cuando se incubaba a pH 3,0 (Noonpakdee W et al 2001). Bozacina B14, producida por *L. lactis* subsp. *lactis* B14, se inactivó después de 10 min a 90°C (Ivanova et al., 2000). Las bacteriocinas LB1-LB11 producidas por *Lactobacillus* spp, presentaron actividad del 80% A 100°C, pero con el aumento de temperatura hasta 121°C se observó una reducción del 70% de la actividad (Harshada M et al 2012). Finalmente se puede comparar con casos como la plantaricina evaluada por Nowroozi J et al cuya actividad antibacteriana era estable a 100 ° C durante 10 min y a 56 ° C durante 30 min, pero la actividad se perdió después de tratamiento en autoclave. De esta forma, las bacteriocinas producidas por las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27 presentan un perfil de estabilidad a temperaturas superior al observado para otras bacteriocinas, mostrando el potencial de estas proteínas para sus futuras aplicaciones industriales. Por ejemplo, el hecho de que estas bacteriocinas resistan el tratamiento de esterilización a 121°C y 15 atm de presión durante 15 minutos, implica que sean compuestos prometedores al poder ser usados como bioconservantes en la industria de alimentos debido a que muchos procedimientos involucran etapas de calentamiento, escaldado, pasteurización y almacenamiento a bajas temperaturas. Resultados parecidos se han obtenido en la purificación de otras bacteriocinas de *L. plantarum* y *Lactococcus*, como bacST202Ch y bacST216Ch (Todorov S et al 2010), enterocina AS-48. (Grande et al 2005), plantaricina OL15 (Kacem M et al 2005), SFC de *E. faecium* AQ71 (Ahmadova A et al 2013).

Con respecto al efecto de agentes químicos sobre la actividad se encontró que las bacteriocinas producidas por las cepas *L. plantarum* LE5 y LE27 solo se ven afectadas de forma considerable después del tratamiento con SDS, similar a lo reportado previamente. Por ejemplo, la plantaricina C19, producida por *L. plantarum* C19 pierde su actividad después del tratamiento con SDS o Triton X-100 (Atrih A et al 2001). No obstante para bacST202Ch y bacST216Ch solo se observó reducción de la actividad con Triton X-114, manteniéndose estable bajo tratamientos con Tween 20, Tween 80, SDS, NaCl, urea y EDTA (Todorov S et al 2010); Comportamientos afines se han reportado para la bacteriocina J46 producida por *L. lactis* subsp. *cremoris* (Hout E et al 1996), enterocina EJ97 producida por *E. faecalis* EJ97 (Gálvez et al 1998), bozacina B14 producida por *L. lactis* subsp. *lactis* B14 (Ivanova et al 2000), la pediocina ST18 producida por *Pediococcus pentosaceus* ST18 (Todorov S et al 2005d) y ST15 producida por *E. mundtii* (De Kwaasdstenietet al, 2005).

Es relevante destacar que varios autores afirman que los tratamientos con NaCl y EDTA deberían potenciar el funcionamiento de las bacteriocinas, considerando que el primer agente, contribuye a la generación de un estrés osmótico para la célula diana lo que

facilita la acción del péptido (Nowroozi J et al 2012), mientras que, para el EDTA se describe que su mecanismo es fundamental a la hora de determinar inhibición del crecimiento frente a bacterias gram negativas, ya que tiene un efecto sinérgico con las bacteriocinas al quelar iones Ca^{2+} y Mg^{2+} de la membrana bacteriana externa, para desestabilizar su estructura y modificar su permeabilidad (Vaara, 1992), permitiendo de este modo que la bacteriocina pueda alcanzar su sitio de acción, la membrana de la célula (Vesterlund S et al 2004).

La actividad de las bacteriocinas en alimentos está altamente influenciada por diferentes factores como composición de los alimentos, interacción con los componentes, estabilidad de la bacteriocina, pH y temperatura de almacenamiento (Grande et al, 2006), por ello es importante comprobar que las bacteriocinas puedan ejercer la actividad antimicrobiana en diferentes matrices alimentarias donde confluyen varios factores que pueden alterar su función. El hecho de evidenciar la estabilidad de las bacteriocinas frente a la mayoría de agentes químicos permite deducir su gran potencial para su futura aplicación a nivel industrial. Por ejemplo, al analizar los resultados de estabilidad frente a los detergentes no iónicos como el Tween 80 y el TritonX-100, se puede sugerir que la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por las cepas LE5 y LE27 al permanecer estables bajo condiciones no polares, lo que puede ser de interés al examinar su posible aplicación en alimentos con contenido graso como embutidos, cárnicos, quesos etc. También es interesante considerar la estabilidad observada frente a la urea, ya que permite inferir que las bacteriocinas resisten el aumento de la fuerza iónica generada por este agente, manteniendo la integridad de su estructura y sus interacciones electrostáticas, lo que se podría traducir en una ventaja interesante a la hora de determinar su actividad antimicrobiana en matrices alimentarias, donde pueden haber compuestos adicionales que tengan efectos similares a dicho agente.

En último lugar comparando el efecto de las enzimas frente a la actividad de las bacteriocinas de las cepas LE 5 y LE 27, en términos generales se ha reportado que la mayoría de las bacteriocinas son sensibles al tratamiento con enzimas proteolíticas como proteinasa K, tripsina, quimiotripsina, pronasa, pepsina, entre otras, lo que permite ratificar que la actividad antimicrobiana generada está dada por una molécula de origen proteico (De Vuyst et al 1996; Todorov S et al., 2004; Todorov S et al 2010; Jamuna et al 2004; Kacem M et al 2005; Ahmadova A et al 2013). Adicionalmente, se observó que la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas purificadas o semipurificadas no se redujo de manera considerable después del tratamiento con catalasa, lo que permite descartar una posible inhibición del crecimiento de los microorganismos patógenos e indicadores por posible presencia de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), como también se sustenta en la bibliografía anteriormente relacionada. Vale la pena comentar que algunos autores proponen la evaluación del efecto de la alfa-amilasa y algunas lipasas sobre la actividad de las bacteriocinas para evidenciar si los péptidos requieren de glicosilaciones o que no poseen lípidos o hidratos de carbono en su parte activa (Todorov S et al 2010; Ahmadova A et al 2013).

Para concluir y en razón a los resultados obtenidos a lo largo del presente estudio, se puede inferir que las bacteriocinas en cuestión pertenecen muy probablemente a la clasificación IIa, debido a su potente actividad antilisterial, su bajo peso molecular (9,3 kDa) y su amplia termoestabilidad incluso bajo condiciones de esterilización por calor húmedo (B. ten Brink et al., 1994; Jamuna et al 2005b; Todorov S et al 2010; Richarda C et al 2006; Nowroozi J et al 2012). Según los reportes de literatura, la mayoría de las bacteriocinas reportadas hasta el momento producidas por *L. plantarum* se encuentran agrupadas en esta clase. El modo de acción de las bacteriocinas clase IIa ha sido estudiado en gran medida por el uso de enterocina P (Cintas et al 1997; Herranz C et al 2001), mesentericina Y105 (Dalet K et al 2001), bavaricina MN (Kaiser A et al 1996), pediocina PA-1 (Bhunja A et al, 1991; Chikindas M et al 1993; Fimland G et al, 1998) y divercina V41 (Bhugaloo V et al 1999); estudios que demostraron que la sensibilidad de bacterias como *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*, que se produjo a nivel molecular debido a la expresión de σ^{54} , una RNA polimerasa con subunidades EIII^{Man} y EIII^{2Man}, mientras que a nivel bioquímico se debió a la permeabilización de la membrana (Richarda C et al 2006).

8. CONCLUSIONES

- Se realizó la purificación parcial de las bacteriocinas producidas por las cepas de *L. plantarum* LE 5 y LE 27.
- La mejor ruta para la purificación de las bacteriocinas fue precipitación con sulfato de amonio y la doble diálisis usando membranas de 12 kDa y 1 kDa, ya que se logró una mayor concentración de proteína y un mayor grado de pureza en cada fracción.
- El análisis de las fracciones mediante LC-MS/MS sugiere que se trata de una nueva bacteriocina que se caracteriza por tener 79 aminoácidos y pesar 9,3 kDa. Por sus características químicas puede pertenecer a la clase IIa.
- Las bacteriocinas tienen un potente efecto inhibitorio frente a *L. monocytogenes* y *E. faecalis*, por tal motivo son compuestos antimicrobianos prometedores.
- La bacteriocina producida por la cepa LE 27 es más activa que la producida por la cepa LE 5, ya que presentó mayor relación halo de inhibición/concentración de proteína.
- Las bacteriocinas son estables bajo diferentes condiciones de prueba; permanecen activas en un amplio rango de pH (2 – 12), y son termoestables incluso después de someterlas a condiciones de esterilización, adicionalmente su función no es alterada por agentes químicos. En conjunto estas propiedades resultan interesantes al evaluar su futura aplicación a nivel industrial.

9. RECOMENDACIONES

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de las fracciones purificadas (CMI).
- Caracterizar en detalle la secuencia de aminoácidos y/o clonar su gen codificante para confirmar sus características moleculares.
- Realizar ensayos de actividad antimicrobiana en diferentes matrices alimentarias para evaluar su potencial a mayor escala.
- Caracterizar la actividad antimicrobiana frente a cepas resistentes a antibióticos.
- Caracterizar la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas usando compuestos quelantes, que potencien la actividad de las bacteriocinas.
- Evaluar los costos de su producción a nivel industrial.

10. BLIOGRAFIA

1. Ahmadova A, Todorov S, Choiset Y, Rabesona H, Mirhadi T , Kuliyevev A, Gombossy B. et al. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control* 30: 631-641
2. Ajay P, Ramana K. (2008) Purification and characterization of bacteriocin from *Weissella paramesenteroides* dfr-8, an isolate from cucumber (*Cucumis sativus*). *Food Biotechnology Discipline*. 34(5): 932 – 948.
3. Alegría A, Delgado S, Rocés C, López B, Mayo B. (2010) Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 143: 61–66
4. Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A. J. G., Lebrihi, A., & Lefebvre, G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 93–109.
5. Axelsson L. (2004) Chap 1. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *Lactic Acid Bacteria* Marcel Dekker, Inc.
6. Aymerich M, Garriga M, Monfort J, Nes I, Hugas M. (2000) Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish style fermented sausages: Characterization of bacteriocins. *Food Microbiology* 17: 33–45.
7. B. ten Brink, Minekus, M., van der Vossen, J. M. B. M., Leer, R. J., and Huisin't Veld, J. H. J. (1994) Antimicrobial activity of lactobacilli: Preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 140–148.
8. Bhugaloo-Vial, P., Douliez, J.P., Moll, D., Dousset, X., Boyaval, P., Marion, D., 1999. Delineation of key amino acid side chains and peptide domains for antimicrobial properties of divercin V41, a pediocin-like bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2895–2900.

9. Bhunia A. 2008. Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis. Springer. Food Science Text Series. XVIII, 276 p. 93 illus.
10. Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B., Kalchayanand, N., 1991. Mode of action of pediocin ACh from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 25–33.
11. Boore A, Herman K, Perez A, Chen C, Cole D, Mahon B, Griffin P, Williams I, Hall A. 2010. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks --- United States, 2007 Morbidity and Mortality Weekly Report 59(31):973-979.
12. Bouksaim M, C. Lacroix, R. Bazin^{1,2} and R.E. Simard (1999) Production and utilization of polyclonal antibodies against nisin in an ELISA and for immunolocalization of nisin in producing and sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Microbiology* 87: 500–510
13. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, USA, 2010 [Sitio en Internet]. Disponible en <http://www.cdc.gov/nczved>. Consultado: 8 de abril de 2013.
14. Cetinkaya S, Osmanag A, Cokmus O. (2003). Bacteriocin diversity in *Bacillus sphaericus*. *Folia Microbiologica* 48:157–161.
15. Chikindas, M.L., Garcia-Garcera, M.J., Driessen, A.J., Ledebouer, A.M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N., Venema, G., 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3577–3584.
16. Cintas L, Herranz C, Hernández P, Casaus M, Nes L. (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 7: 281-305
17. Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. & Hernández, P.E. 2001. REVIEW: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science Technology International*. 7(4): 281-305.
18. Cleveland J, Montville T, Ingolf F, Chikindas M (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71:1–20
19. Cotter P, Hill C, Ross R. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3(10):777-88.
20. Cotter P, Ross P, Hill C. (2013) Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature reviews | microbiology* 11: 95-105
21. Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., He´chard, Y., 2001. A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* 147, 3263–3269.
22. De Vuyst L., Vandamme, E. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria (p. 539). Blackie London, United Kingdom.
23. Ferchichi, M., Frere, J., Mabrouk, K., & Manai, M. (2001). Lactocin MMFII a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from Tunisian dairy product. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 49–55.
24. Fimland, G., Jack, R., Jung, G., Nes, I.F., Nissen-Meyer, J., 1998. The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5057–5060.
25. Gálvez A, Abriouel H, López R, Ben O. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120 (2007) 51–70.
26. Harshada M, Prakash T. (2012) Antimicrobial Activity Studies of Bacteriocin

- Produced by Lactobacilli Isolates from Carrot Kanji. Journal of Biological Sciences 12(1): 6-10, 2012
27. Herranz, C., Cintas, L.M., Hernandez, P.E., Moll, G.N., Driessen, A.J., 2001. Enterocin P causes potassium ion efflux from Enterococcus faecium T136 cells. Antimicrob. Agents. Chemother. 45, 901–904.
 28. Heu S, Oh J, Kang Y, Ryu S, Cho S, Cho Y, et al. (2001). Gly gene cloning and expression and purification of Glycinecin A, a bacteriocin produced by Xanthomonas campestris pv. Glycines 8ra. Applied and Environmental Microbiology. 67:4105-4110.
 29. Hill C. (2010) Probiotics and pharmabiotics: Alternative medicine or an evidence-based alternative? Bioengineered Bugs 1(2):79-84.
 30. Hoover DG, Chen H. 2005. Chap 13. Bacteriocins with Potential for Use in Foods. ANTIMICROBIALS IN FOOD Third Edition.
 31. Hout, E., Maghrous, J., & Barena-Gonzalez, C. (1996). Bacteriocin J46, a new bacteriocin produced by Lactococcus lactis subsp. cremoris J46: Isolation and characterisation of the protein and its gene. Anaerobe, 2, 137–145.
 32. Instituto Nacional de Salud. Bogotá DC, Colombia, 2012. [Sitio en Internet]. <http://www.ins.gov.co/> Consultado: 10 de abril de 2013.
 33. Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S., & Dousset, X. (2000). Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by Lactococcus lactis subsp. lactis B14 isolated from boza-Bulgarian traditional cereal beverage. Biocatalis – Vestnik Moskova Uniiversiteta, Seria Kimia, 41: 47–53.
 34. Jamuna M, Babusha S, Jeevaratnam K (2005) Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from Lactobacillus isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. Food Microbiology 22:449–454
 35. Jamuna M, Jeevaratnam K (2004). Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. J. Gen. Appl. Microbiol., 50: 79–90.
 36. Kacem M, Zadi-Karam H, Karam N.(2005). Detection and activity of plantaricin OL15 a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum OL15 isolated from Algerian fermented olives. Grasas y Aceites. 56 (3), 192-197.
 37. Kaiser, A.L., Montville, T.J., 1996. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against Listeria monocytogenes Scott A cells and lipid vesicles. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4529–4535.
 38. Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 12: 39–86.
 39. Lee, N. K., & Paik, H. D. (2001). Partial characterisation of lactocin NK24, a newly identified bacteriocin of Lactococcus lactis NK24 isolated from Jeot-gal. Food Microbiology, 18, 17–24.
 40. López J, Ochoa- A, Santoyo. G, Anaya J, Medina E, Martínez M, Loeza P. (2008) Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 39(3):49-57.
 41. Martinez R, Wachsman M, Torres N, LeBlanc J, Todorov S (2013) Biochemical, antimicrobial and molecular characterization of a noncytotoxic bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum ST71KS. Food Microbiology 34: 376-381
 42. McAuliffe O, Ross P, Hill C (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode

- of action. *FEMS Microbiology Reviews* 25:285-308
43. McKay L, Baldwin K. (1990). Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 7(1-2):3-14.
 44. Meghrous, J., Lacroix, C., Bouksaim, M., Lapointe, G. and Simard, R.E. (1997) Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719. *Journal of Applied Microbiology* 83:133–138.
 45. Monroy MdC, Castro T, Fernández F, Mayorga L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS* 73:63-72.
 46. Moragues L, Rozeck C, Simonetta A (2003). Caracterización preliminar de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de enterococos. *Revista Argentina de Lactología*. 22: 20-32.
 47. Muñoz M, Mosquera A, Alméciga C, Melendez A, Sánchez O (2012). Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe*. 18: 321-330.
 48. Nack-Shick C, Seong-Yeop J, Hee-Jong Y, Keug-Hyun A et al. (2010) Activity assay for nisin-like acidic bacteriocins using an optimal pH-conditioned gel matrix. *Analytical Biochemistry*. 397: 59–261
 49. Nes I, Dzung B, Håvarstein L, Brurberg M (1996). Biosynthesis of bacteriocins of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70:113- 128
 50. Nes I, Dzung B, Sung-Sik Y. (2007). Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Science and Biotechnology* 16 (5) 675 – 690.
 51. Nes, I. F., & Johnsborg, O. (2004). Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 100–104.
 52. Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., & Panyim, S. (2001). Isolation of a nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 137–145.
 53. Nowroozi J, Mirzaii M, Norouzi M (2012) Study of *Lactobacillus* as Probiotic Bacteria. *Iranian Journal Public Health* 33 (2) 1 -7.
 54. OMGE. 2008. Probióticos y Prebióticos. Organización Mundial de Gastroenterología:1-22.
 55. Organización panamericana para la salud. Washington, USA, 2002. [Sitio en Internet]. <http://new.paho.org/hq/>. Consultado: 8 de abril de 2013.
 56. Papagianni M. (2003) Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances* 21(6):465-99.
 57. Parada J, Ricoy C, Bianchi A, Soccol C (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian archives of biology and technology*. 50 (3): 521-542.
 58. Pinto A, Fernandes M, Pinto C et al. (2009) Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *International Journal of Food Microbiology* 129: 50–58
 59. Richarda C, Canona R, Naghmouchi K et al. (2006) Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiology* 23 175–183

60. Riley M, Wertz J. (2002a). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84(5-6):357-64.
61. Rivera A, Vanegas M. (2007). Inhibición de *Listeria monocytogenes* contra bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas. *Revista Alimentos Hoy*. 12.
62. Robertson A, Tirado C, Lobstein T, Jermini M, Knai C, Jensen J, Ferro A, James, W.P.T. (2004). Food and health in Europe: a new basis for action. WHO Regional Publications, European Series, vol. 96. Geneva.
63. Rodríguez J, Martínez M, Horn N, Dodd H. (2003). Review Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80:101-116.
64. Rodriguez JM, Martinez MI, Kok J. (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42(2):91-121
65. Sablon E., Contreras B., Vandamme E., Antimicrobial Peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action. Genetics and Biosynthesis, *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 68 (2000) 2 1-60
66. Sambrook, J. E., Eritsch, F., & Maniatis, J. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.). Cold spring Harbor, NY: Cold spring harbour Laboratory Press
67. Scallan E, Hoekstra R, Angulo F, Tauxe R, Widdowson M, Roy S, Jones J, Griffi P. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases* www.cdc.gov/eid. 17(1): 7-15.
68. Schagger H, Von Jagow G. (1987). Tricine–sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Annals of Biochemistry* 166:368–379.
69. Settanni L, Corsetti A. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiology* 121(2):123-38.
70. Simon L, Fremaux C, Cenatiempo Y. (2001). Luminescent method for the detection of antibacterial activities. *Applied Microbiology Biotechnology* 57:757–763
71. Suma, K., Misra, M. C., and Varadaraj, M. C. (1998) Plantaricin LP84, a broad-spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 40, 17–25.
72. Todorov S, Botes M, Guigas C, Schillinger U, Wiid I, Wachsman M, et al. (2008). Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 104: 465-477.
73. Todorov S, Dicks, L. M. T. (2005b). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Journal of Basic Microbiology* 45(4):312-322.
74. Todorov S, Hob P, Velho V, Dicks L. (2010) Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science*. 84: 334–343
75. Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005c). Effect of growth medium on bacteriocina production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 165–173.
76. Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005d). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry*, 40, 365–370.
77. Todorov, S.D., Wachsman, M., Tomé, E., Dousset, X., Destro, M.T., Dicks, L.M.T., Franco, B.D.G.M.C., (2010b). Characterisation of an antiviral pediocin-like

- bacteriocina produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology* 27, 869e879.
78. Vesterlund S, Paltta J, Laukova A, Karp M, Ouwehand A. (2004) Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances. *Journal of Microbiological Methods* 57:23– 31