

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PURIFICACIÓN DE LA/S
BACTERIOCINA/S PRODUCIDAS POR *Lactococcus lactis* NATIVO”**

por

Ignacio RODRÍGUEZ BARRETO

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, inspección, control y
tecnología de los alimentos de origen
animal.

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

Dra. María Bausero

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Aldo Calliari

Tercer Miembro:

Dra. Rosario de los Santos

Co-tutores:

Dra. Silvana Carro

.....

Dr. Álvaro González

Autor

Br. Ignacio Rodríguez

Fecha: 2 de Diciembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi familia por la motivación, la fuerza y el apoyo en todo momento.

A Aldo, Silvana y Álvaro por su tiempo, dedicación y paciencia.

A los compañeros del Dpto. de Ciencia y Tecnología de la Leche, por la colaboración, enseñanza y compañerismo.

Al IIBCE por la disposición de los equipos.

A CSIC, por la financiación del proyecto.

A Rosi por su apoyo y compañerismo infinito.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos, amigas que siempre están y a los compañeros de Facultad, por los momentos vividos en estos años.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	7
RESUMEN	8
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	10
Bacterias ácido lácticas	10
Actividad Antimicrobiana de las BAL: Bioconservación	10
Bacteriocinas: definición, estructura y clasificación	11
Clase I o lantibióticos:	12
Clase II:	12
Clase III:	13
Bacteriocinas del género <i>Lactococcus spp.</i>	13
Mecanismo de acción de las bacteriocinas.....	14
Espectro antimicrobiano de las bacteriocinas.....	15
Diferencias entre bacteriocinas y antibióticos	16
Aplicaciones de Bacteriocinas	16
Aplicación en productos lácteos	17
Biosíntesis y producción óptima de bacteriocinas	18
Propiedades de las bacteriocinas	19
Tolerancia al calor	19
Sensibilidad al pH	19
Sensibilidad a la actividad enzimática.....	20
Otras consideraciones relacionadas a su estabilidad.	20
Purificación de bacteriocinas	20
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Equipos y Materiales	24

Cepas bacterianas, medios de cultivo, condiciones de crecimiento y mantenimiento	24
Obtención del Sobrenadante del cultivo	24
Preparación del Pre-inóculo.....	24
Obtención del SLC crudo	25
Determinación de la actividad antimicrobiana.....	25
Caracterización del SLC con enzimas y calor.....	26
Optimización del cultivo de <i>L. lactis</i> Nativo	26
Aumento de biomasa y desadsorción de la bacteriocina a la célula productora ...	26
Purificación parcial del SLC	28
Precipitación con sulfato de amonio.....	28
Cromatografía de intercambio catiónico	29
Determinación de la concentración de proteína soluble.....	30
Evaluación de la estabilidad antimicrobiana en diversas condiciones de conservación.....	31
Temperatura y liofilización.....	31
Solubilidad del precipitado con sulfato de amonio a diferentes pH.....	31
RESULTADOS.....	32
Producción del cultivo y determinación de la actividad antimicrobiana del SLC	32
Caracterización del SLC con enzimas y calor	32
Optimización del cultivo de <i>L. lactis</i> Nativo	32
Aumento de biomasa y desadsorción de la bacteriocina a la célula productora ...	32
Purificación parcial del SLC	33
Precipitación con sulfato de amonio.....	33
Cromatografía de intercambio catiónico	34
Determinación de la concentración de proteína soluble.....	35
Evaluación de la estabilidad antimicrobiana en diversas condiciones de conservación.....	35
Temperatura y liofilización.....	35
Solubilidad del precipitado con sulfato de amonio a diferentes pH.....	37
DISCUSIÓN	38

Producción del cultivo y determinación de la actividad antimicrobiana del SLC	38
Caracterización del SLC con enzimas y calor.....	38
Optimización del cultivo de <i>L. lactis</i> Nativo	40
Aumento de biomasa y desadsorción de la bacteriocina a la célula productora ...	40
Precipitación con sulfato de amonio.....	41
Cromatografía de intercambio catiónico	41
Evaluación de la estabilidad antimicrobiana en diversas condiciones de conservación.....	43
Temperatura y liofilización.....	43
Solubilidad del precipitado con sulfato de amonio a diferentes pH.....	44
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA	46

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Cuadro I: Tratamiento de desadsorción de bacteriocinas según técnica de Taheri.....	27
Cuadro II: Resultado de la actividad antimicrobiana presente en el SLC tratado térmicamente y con enzimas. Comparación con nisina comercial utilizada como control.....	32
Cuadro III: Resultados de ensayo de actividad antimicrobiana luego del aumento de biomasa y desadsorción de la bacteriocina a la célula productora en el cultivo.....	33
Cuadro IV: Actividad antimicrobiana presente en el pellet y sobrenadante durante la precipitación con diferentes rangos de saturación de sulfato de amonio.....	34
Cuadro V: Concentración de proteínas y actividad antimicrobiana del proceso de purificación del SLC, Pellet y fracciones cromatográficas con actividad antibacteriana.....	35
Cuadro VI: Resultado del ensayo de conservación de la actividad antimicrobiana del SLC almacenado en refrigeración (4°C) o congelación (-18°C).....	36
Cuadro VII: Resultado del ensayo de conservación de la actividad antimicrobiana del SLC liofilizado almacenado en congelación (-18°C).....	36
Cuadro VIII: Resultado del ensayo de conservación de la actividad antimicrobiana del pellet (SLC concentrado) almacenado en refrigeración (4°C) o congelación (-18°C).....	37
Cuadro IX: Presencia/ausencia de actividad antimicrobiana en el precipitado de proteínas obtenidos del SLC al resuspender en buffer a diferentes pH.....	37
Figura 1: Principal mecanismo de acción de las bacteriocina.....	15
Figura 2: Sonificador de punta utilizado para los ensayos de desadsorción de bacteriocinas a la célula productora.	28
Figura 3: Precipitación con sulfato de amonio.....	29
Figura 4: Curva de crecimiento, producción de bacteriocina/s y actividad acidificante de <i>L. lactis</i> nativo en caldo MRS.	34

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representado por varios géneros con características morfológicas heterogéneas, cuyo rasgo común es la propiedad de producir ácido láctico como único o principal producto final de fermentación. Estos microorganismos forman parte de la microbiota natural de la leche y son utilizados en la industria alimentaria, no sólo por su habilidad para acidificar y preservar los alimentos, sino también por su implicancia en la textura, sabor, y desarrollo de aromas en productos fermentados. Además, pueden presentar actividad antimicrobiana que se atribuye principalmente a la producción de diferentes sustancias, entre las cuales se encuentran péptidos de síntesis ribosomal denominados bacteriocinas. El espectro de acción de algunas bacteriocinas producidas por BAL es amplio e incluye microorganismos alterantes y/o patógenos de los alimentos como, por ejemplo, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* entre otros. La capacidad antimicrobiana de las BAL, sumado a su *status* de “seguras” para el consumo hace que estas bacterias posean un gran potencial para su uso en biopreservación. Por otra parte, para la identificación de bacteriocinas es necesario llegar a su purificación y dado que son sustancias con características estructurales y propiedades químicas diferentes, no es posible generalizar un método único, debiendo adecuar el proceso para cada bacteriocina en particular. El objetivo del presente trabajo fue implementar una técnica de purificación de la/s bacteriocina/s producidas por una cepa de BAL nativa, *Lactococcus lactis* GU967439, con el propósito de identificar dicha/s sustancia/s. Para cumplir con el objetivo, en primer lugar, los cultivos de esta BAL fueron optimizados, de manera de obtener el mayor título posible de bacteriocinas para los pasos posteriores de concentración y purificación. Fue planteado una secuencia metodológica de tres pasos: precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de fase reversa (RP-HPLC). A su vez, se evaluaron en el sobrenadante crudo y concentrado, diferentes métodos de conservación (refrigeración, congelación y liofilización). Los resultados del crecimiento de la BAL en medio de cultivo mostraron actividad antimicrobiana baja (320 UA/mL), atribuyendo dicho valor a fenómenos de adsorción de la bacteriocina a la pared celular. Mediante ensayos de desadsorción (sonicación y tratamiento con detergentes) se logró optimizar el cultivo a una producción de 1280 UA/mL. Durante la concentración de la bacteriocina se definió un 40% de saturación de sulfato de amonio como el adecuado para los siguientes pasos de purificación (mayor actividad antimicrobiana). La cromatografía de intercambio iónico mostró dos picos de absorbancia, el primero al inicio del gradiente, el cual presentó actividad antimicrobiana, lo que indicaría la elución de la bacteriocina y que ésta no es retenida o es retenida débilmente en la columna. El último paso de purificación (RP-HPLC), se vio dificultado debido a la pérdida de estabilidad de la bacteriocina. Los ensayos de conservación de la actividad antimicrobiana mostraron la pérdida de la misma a lo largo del tiempo, independientemente de la forma en que se la conserve, aunque con diferentes cinéticas.

SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) is a group of microorganisms represented by various genres sharing heterogenous morphological characteristics, which common feature is the production of lactic acid as a unique or main product of fermentation. Those microorganisms are part of the natural microbiota present in milk and play an important role in fermentation processes. They are widely used in the food industry, not only for its ability to acidify and preserve food but also due to their capacity to confer texture, taste, odor and flavor to fermented products. In addition, LAB often shows antimicrobial activity that is mainly attributed to the production of different substances, including peptides of ribosomal synthesis called "bacteriocins". The antimicrobial spectrum of some bacteriocins produced by LAB is broad and includes food-spoilage microorganisms and/or pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum*, among others. The aforementioned antimicrobial activity, together with the fact that LAB are regarded as "safe" microorganism, make them candidates to be used as bioprotectors. In order to identify a bacteriocin it is necessary to purify it first. There are several purification procedures already available for specific groups of antimicrobial peptides. However, since we did not know the identity of the peptide we are dealing with, we needed to develop a specific protocol for its purification. Thus, the aim of this study was to implement a purification method for bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* GU967439, a native LAB strain. To accomplish this purpose for this, we first, optimized this BAL cultures and so we obtained the highest possible bacteriocins titers for the following concentration and purification steps. We propose a three-step methodological sequence: precipitation with ammonium sulphate; ion exchange chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Moreover, different methods of preservation of bacteriocin activity were evaluated in the crude and concentrated supernatant (refrigeration, freezing and lyophilization). The antimicrobial activity measured in culture media was moderate to low (320 UA/mL), probably due to the bacteriocin adsorption to the cell wall. In fact, the desorption procedures (sonication or detergent extraction) increased the activity to 1280 UA/mL. In an attempt to concentrate the bacteriocin, we found that a 40% of ammonium sulphate concentration, precipitated most of the bacteriocin present in the culture medium. The protein eluted after the ion exchange chromatography showed two main peaks, being the first the first at the beginning of the gradient, showing antimicrobial activity, which would indicate elution of the bacteriocin, and little or weak retention in the column. Further purification of the bacteriocins produced by this microorganism was hampered due to their loss of stability along the purification processes and so, the last step of purification (Reverse Phase Chromatography) could not be carried out. Sensitivity to proteolytic enzymes suggests that our bacteriocin is a peptide different from nisin. Conservation tests of bacteriocin activity showed that over time, it loses its activity regardless of the method used to store it (refrigerated, frozen or lyophilized), although with different kinetics.

INTRODUCCIÓN

Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos/microaerófilos o aerotolerantes, oxidasa y catalasa negativas, producen ácido láctico como único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr y col., 2002; Vázquez y col., 2009). Desde el punto de vista práctico y tecnológico son considerados los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Waters y col., 2015). Las BAL se localizan frecuentemente en hábitat ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas, vitaminas y en presencia de bajas tensiones de oxígeno. La leche y los productos lácteos son el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL (Vázquez y col., 2009), se las puede encontrar, además en productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca (Stiles, 1996; Cintas y col., 2000). Además, algunas bacterias lácticas son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre y animales, del estiércol y de aguas residuales urbanas e industriales (Cintas y col., 2000).

Este grupo representa un papel importante en los procesos de fermentación; son muy utilizadas en la industria alimentaria, no sólo por su habilidad para acidificar y preservar los alimentos, sino también su implicancia en la textura, sabor y desarrollo de aromas en productos fermentados (Parras, 2010). Así es que, estos microorganismos son generalmente utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos tales como leche acidificada, yogur, quesos, mantecas y cremas (García y col., 1998; Carr y col., 2002).

Actividad Antimicrobiana de las BAL: Bioconservación

El principal factor en el que se basa la actividad antimicrobiana de las BAL es la producción de ácidos orgánicos (fundamentalmente ácido láctico), derivada de la fermentación de carbohidratos presentes en alimentos y la consecuente disminución del pH, a lo que se suma, además, la competencia por nutrientes presentes en el sustrato. Estas bacterias pueden tener también la capacidad de producir otras sustancias inhibitorias tales como: peróxido de hidrógeno (H₂O₂), diacetilo, metabolitos de oxígeno y bacteriocinas (Rodríguez y col., 2000; Carro y col., 2005).

El uso de las BAL y de sus productos metabólicos son considerados por la FDA (Food and Drug Administration) con el *status* de seguros o GRAS (Generally Recognized as Safe). Éstas pueden ser empleadas por la industria alimenticia para evitar la contaminación de alimentos con microorganismos potencialmente patógenos para el hombre sin modificar las propiedades del alimento (Cleveland y col., 2001). La inhibición de patógenos transmitidos por alimentos mediante el uso de bacterias ácido lácticas es una de las formas de bioconservación (Riley, 2005). La “bioconservación” se define como la prolongación de la vida útil contribuyendo a la inocuidad de los alimentos mediante la microbiota natural o sus metabolitos (Holzapfel y col., 1995; Favaro y col., 2015). En este sentido, muchos investigadores consideran que las BAL son candidatas idóneas para formar parte de cultivos bioprotectores e incluso algunos han llegado a definir la bioconservación como el empleo de BAL, sus productos metabólicos o ambos para mejorar la calidad de los alimentos (Cintas y col., 1997; Casaus y col., 1998; Rodríguez y col., 2005).

Bacteriocinas: definición, estructura y clasificación

Las bacteriocinas son péptidos de síntesis ribosomal y con actividad antimicrobiana, sintetizadas durante la fase exponencial de crecimiento (Cotter y col., 2005). Las bacteriocinas de las BAL son un grupo heterogéneo constituido mayoritariamente por péptidos de pequeño tamaño entre 30 y 40 aminoácidos, generalmente catiónicos o anfipáticos y derivados de propéptidos con un extremo N-terminal cargado negativamente (Arqués, 2003; Joerger, 2003; Papagianni, 2003; Motta y col., 2008; García y col., 2010). Tienen un efecto bacteriocida o bacteriostático en otras bacterias ya sea de la misma especie (espectro estrecho) o de otros géneros (espectro amplio) (Balciunas y col., 2013).

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas (Klaenhammer., 1993; Nes, 1996). El conocimiento de su acción bactericida, estructura especial, peso molecular y secuencia de aminoácidos le permitió a Klaenhammer (1993) clasificar a las bacteriocinas en cuatro clases denominadas I, II, III y IV internacionalmente aceptada. La clase I (lantibióticos), representada por la nisina, reúne a los péptidos de bajo peso molecular (<5 kDa) termoestables caracterizado por la presencia de lantionina y derivados. La clase II se compone de pequeños péptidos termoestables (<10 kDa) dividido en tres subclases: IIa (pediocina y enterocina), IIb (lactocina G) y IIc (lactocina B). La clase III está representada por péptidos de alto peso molecular (> 30 kDa) termolábiles tales como la helveticin J, mientras que en la clase IV podemos encontrar grandes péptidos acomplejados con carbohidratos o lípidos.

Por otra parte, Cotter y col. (2005), sugirió una nueva clasificación, donde las bacteriocinas se dividen en dos grupos: Clase I y II. Los lantibióticos corresponden a la Clase I y las que no contienen lantionina pertenecen a la Clase II. Estos autores proponen, además, que los péptidos de alto peso molecular termolábiles (Clase III de Klaenhammer), constituyan un grupo

separado denominándolas “bacteriolisinas”, mientras que la Clase IV proponen eliminarla.

Por último, Drider, (2006) y col. proponen tres clases de acuerdo a sus características genéticas y bioquímicas. Dicha clasificación es aceptada por Balciunas y col., (2013) y se utiliza con frecuencia. Esta clasificación se desarrolla a continuación.

Clase I o lantibióticos:

Poseen entre 19 y 38 residuos de aminoácidos, son termoestables. Se caracteriza por la presencia de lantionina, un aminoácido modificado resultado de la combinación de dos alaninas por enlace disulfuro o de un ácido amino butírico unido a una alanina por un enlace disulfuro como es el β -metil-lantionina (Jarvis y col., 1968). La bacteriocina más representativa de esta clase es la nisina, se compone de 34 residuos de aminoácidos (Mulders y col., 1991).

Clase II:

Esta clase está compuesta por pequeños péptidos termoestables (<10kDa) con estructura anfifílica helicoidal que permite su inserción en la membrana citoplasmática de la célula blanco, promoviendo así la despolarización de la membrana y la muerte celular. Se proponen tres subdivisiones de esta clase, de acuerdo con Drider y col., 2006 citado por Balciunas y col., 2013).

La *subclase IIa* está compuesta por bacteriocinas que tienen alta especificidad contra *L. monocytogenes*, tienen entre 37 y 48 residuos de aminoácidos con una porción C- terminal que contiene una o dos α - hélices (Fimland y col., 2005). Las bacteriocinas de esta clase penetran en la membrana celular del microorganismo diana y promueven la formación de poros con la consiguiente disipación de la fuerza motriz de protones (Kaiser, 1996). Pediocina PA-1, se compone de 44 residuos de aminoácidos, es la única bacteriocina que pertenece a la subclase *IIa* que se sintetiza no sólo por diferentes especies, sino también por los diferentes géneros de LAB (Bhunja, 1987).

La *subclase IIb* incluye bacteriocinas heterodiméricas por ejemplo bacteriocinas que requieren la actividad combinada de dos péptidos. Normalmente los genes están ubicados en el mismo operón y se expresan simultáneamente, éstos muestran un importante efecto sinérgico (Balciunas y col., 2013). Su mecanismo de acción implica también la disipación del potencial de membrana y una disminución en la concentración de ATP intracelular. Estos péptidos tienen actividad muy baja cuando se emplean de forma individual (Garneau, 2002).

Subclase IIc. Las bacteriocinas que pertenecen a esta subclase tienen un enlace covalente entre C y N terminales, lo que resulta en una estructura cíclica (Kawai y col., 2004). La enterocina AS-48, circularina A y reutericina 6 son representantes de esta subclase.

Clase III:

Esta clase reúne grandes bacteriocinas termolábiles (>30 kDa) que tiene actividad y estructura proteica compleja. Su mecanismo de acción es diferente de las otras bacteriocinas, se basa en promover la lisis de la pared celular del microorganismo diana. Su porción N-terminal es similar a una endopeptidasa implicada en la síntesis de la pared celular, mientras que la parte C-terminal es responsable del reconocimiento de la célula blanco (Lai y col., 2002).

Bacteriocinas del género *Lactococcus* spp.

Diferentes cepas de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) se encuentran formando parte de la mayoría de los cultivos iniciadores comerciales de BAL utilizados en la industria láctea para la elaboración de queso y otros productos fermentados. Se han identificado y caracterizado varias cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de distintas fuentes y que producen diferentes bacteriocinas (Ayad, 2009). Así, la Nisina, fue la primera bacteriocina aislada producida por *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*. Fue descubierta en 1928 luego de observarse que, durante la maduración de quesos, determinadas cepas de *Lactococcus lactis* inhibían el crecimiento de bacterias patógenas y que ésta además no era perjudicial para la salud (Suárez, 1997). Al momento han sido identificadas cinco variantes naturales de nisina (A, Z, Q, U y F). Otros péptidos antimicrobianos producidos por *L. lactis* incluyen a la Lacticina 481, Lacticina 3147, Lactococcinas MMFII, A (Diplococcina), B, G, M, Q y 972 (Venema y col., 1995; Rodríguez y col., 2000; De Vuyst y col., 2007; Oppegård y col., 2007; Trmcic y col., 2008; Alegría y col., 2010).

Desde 1951 la nisina juega un papel importante en la conservación de los alimentos. En 1968 una comisión conjunta de la FAO/WHO aceptó su empleo como conservante alimentario, indicando que la dosis aceptable podría ser superior a los 0,125 mg/Kg (FAO/WHO, 1969). En 1983 se añadió a la lista positiva de aditivos del CEE (Consejo de la Unión Europea) con el número E234 y en 1988 la FDA le confirió el *status* de sustancia GRAS para su empleo en la elaboración de quesos fundidos pasteurizados, dado que no es tóxica y se degrada por enzimas digestivas (Martínez, 1996). Además, no brinda sabor ni color (De Arauz y col., 2008). Tiene un amplio espectro antimicrobiano, siendo activo contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y otros patógenos (Rilla y col., 2004).

Actualmente se emplea en más de 50 países, aunque con distintos criterios en cuanto a los límites máximos de utilización permitidos y de alimentos donde se puede emplear. Es la única bacteriocina incluida en la lista positiva de aditivos alimentarios, Codex Alimentarius, en su norma estándar para quesos. Se admite a una concentración de 12,5 mg/Kg (Codex Stan 283 – 1978) (Sierra, 2012), la que también es aceptada en Uruguay para quesos, según el Reglamento Bromatológico Nacional (MSP, 1994).

Mecanismo de acción de las bacteriocinas

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 y col., 2001).

Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas poseen características esenciales para llevar a cabo su actividad antimicrobiana, independientemente del blanco celular. Estas incluyen una carga neta positiva, que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas; la hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular y la flexibilidad que le permite a la bacteriocina realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno de interacción con la membrana. Estas características varían de molécula a molécula, no obstante, todas son importantes para la actividad antimicrobiana (López y col., 2008).

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

En la Figura 1 se observa un modelo que muestra el mecanismo de acción más común de las bacteriocinas, el cual consta de 3 etapas bien marcadas. En la *etapa 1* las mismas poseen una carga neta positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente en la *etapa 2*, la bacteriocina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular interfiriendo con su síntesis. Finalmente, en la *etapa 3*, varias moléculas de la bacteriocina utilizan al lípido II para anclarse e insertarse en la membrana celular y comenzar con la formación de los poros, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte. Un ejemplo claro del uso de este mecanismo de acción es la nisina.

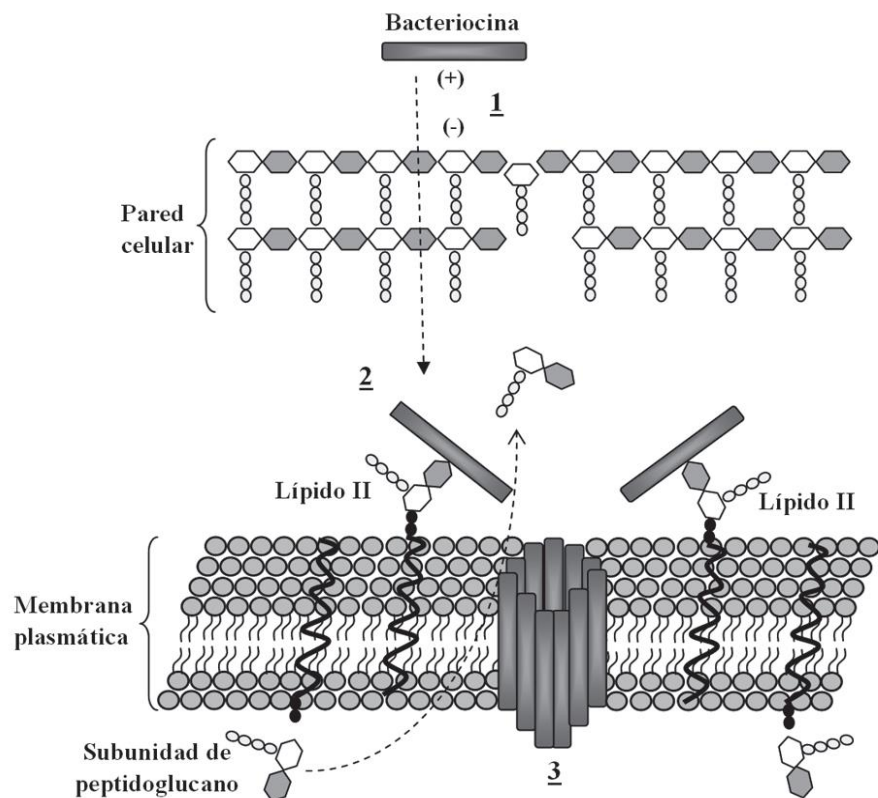


Figura 1. Principal mecanismo de acción de las bacteriocinas. Fuente: (López y col., 2008). Etapa 1 interacción entre carga (+) de la bacteriocina y carga (-) de la pared bacteriana, Etapa 2 unión al lípido II y Etapa 3 formación de poros en la membrana bacteriana.

Espectro antimicrobiano de las bacteriocinas

Normalmente actúan contra microorganismos no deseados o patógenos, estrechamente relacionados o responsables del deterioro y causantes de enfermedades. Por esta razón, se utilizan en varias aplicaciones, entre las que se encuentran la biopreservación, la extensión de la vida útil, la acción antimicrobiana clínica y el control de la fermentación de la microbiota (Balciunas y col., 2013). La susceptibilidad de las bacterias Gram negativas es mucho más limitada y hasta hace poco no se conocían bacteriocinas producidas por bacterias lácticas activas naturalmente frente a Gram negativas (Vázquez y col., 2009), pero recientemente se han encontrado algunas cepas como *L. curvatus* y *L. casei* que inhiben el crecimiento de cepas patógenas de *E. coli* y *Salmonella enterica* sin necesidad de tratamiento previo (Rodríguez y col., 2006). Existen numerosas bacteriocinas producidas por otras familias de bacterias con un amplio límite de acción, inhibiendo el crecimiento de especies de bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos patógenos de humanos y virus. Incluso pueden tener actividad contra diversas células eucariotas, tales como eritrocitos humanos y bovinos (López y col., 2008).

Diferencias entre bacteriocinas y antibióticos

Desde hace varios años en países de Europa y en Estados Unidos está prohibida la producción de alimentos que contengan antibióticos debido a que puede generarse en el consumidor final resistencia por parte de los microorganismos a esos antibióticos dejándolo propenso a enfermedades bacterianas. Adicionalmente, la utilización de antibióticos destruye no sólo las bacterias patógenas sino también las bacterias que forman parte de la microbiota normal que intervienen en el proceso de digestión de los alimentos y protegen al organismo contra infecciones futuras. Por estas razones, es necesario encontrar sustancias que cumplan con la función antibiótica pero que no afecten las funciones regulares del organismo (Castrillon y col., 2010).

Debido a la naturaleza peptídica de las bacteriocinas estas son degradadas por enzimas digestivas, resultando así presuntivamente inocuas para el consumidor y su microbiota intestinal (Díaz, 2011). Las bacteriocinas y los antibióticos se diferencian en al menos dos características: las bacteriocinas son péptidos (metabolito primario), producidos por reacciones anabólicas y catabólicas necesarias para el crecimiento y mantenimiento de la célula (Ward, 1991), mientras que los antibióticos son metabolitos secundarios, éstos son el producto de un metabolismo específico y cumplen así una función determinada y el espectro de inhibición de las bacteriocinas es relativamente estrecho ya que usualmente son activas contra microorganismos cercanos al microorganismo que las produce (Riley y col., 2005; Rodríguez y col., 2002).

Sin embargo, para el empleo de bacteriocinas en los alimentos, éstas deberán cumplir con ciertos requisitos tales como no afectar las características sensoriales propias del producto, ser efectivas en bajas concentraciones y no ser tóxicas para el consumidor (Medina y col., 1992).

Aplicaciones de Bacteriocinas

El empleo de bacteriocinas como una alternativa natural para la preservación de los alimentos ha despertado interés en productos cuyos mercados les presentan exigencias estrictas de calidad microbiana (Concha y col., 1999). No sólo interesa una reducida carga microbiana, sino la ausencia de patógenos de importancia sanitaria que constituyen un riesgo para los consumidores. Además, las bacteriocinas presentan ciertas ventajas, sus propiedades fisicoquímicas las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento y su pequeño tamaño permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los productos alimentarios (Martínez, 1996).

El uso de bacteriocinas en el control de patógenos es de especial interés en productos frescos o mínimamente procesados, donde *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum* representan el principal peligro en este tipo de productos. Esto se debe a que estos microorganismos tienen la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración y/o formar esporas resistentes a procesos térmicos moderados, pudiendo luego germinar y desarrollarse con la

consiguiente producción de toxina cuando no se alcanza la temperatura de cocción, temperaturas menores de 85°C (Schneider, 2007).

Se han considerado tres métodos para la aplicación de bacteriocinas en la preservación de alimentos (Alquicira, 2006; Castro, 2009):

a) la inoculación de alimentos con cultivos iniciadores o protectores que producen bacteriocinas en el producto.

b) la adición de bacteriocinas purificadas o semipurificadas como preservativo alimenticio

c) el uso de un producto previamente fermentado con un cultivo productor de bacteriocina, como ingrediente dentro del procesamiento de un alimento

En cualquier caso, para que las bacteriocinas resulten una eficaz barrera requieren de una tecnología adicional, en la cual actuarían otros tratamientos de conservación clásicos (pasteurización, pH, preservantes) o el empleo de nuevas tecnologías (atmósfera modificada, envasado, altas presiones), cuyos sistemas en conjunto inducirían una acción letal sobre la/s bacteria/s que se pretenda/n inhibir (Martin, 2002).

Aplicación en productos lácteos

La aplicación de BAL como biopreservantes en productos lácteos fermentados data desde hace mucho tiempo, particularmente en referencia a elaboración de quesos (Delves, 2006). Como se ha mencionado anteriormente la nisina es la más estudiada de las bacteriocinas, siendo comercialmente la de mayor importancia. El producto desarrollado en el 2003, por Danisco Dinamarca, Nisaplin™ ha sido considerado como la presentación comercial más disponible de nisina para la conservación de alimentos. Este producto contiene 2,5% de nisina como ingrediente activo, 77,5% de NaCl, y leche en polvo descremada (comprende 12% de proteína y 6% de hidratos de carbono).

En la producción de quesos, la nisina, es capaz de inhibir el crecimiento de *Clostridium tyrobutyricum* y *Cl. butyricum* previniendo el desarrollo de gas y por lo tanto el fenómeno denominado “hinchazón tardía”, siendo una alternativa para la industria alimentaria a la aplicación de nitrato, la que atiende la tendencia de la industria y los consumidores a evitar este último conservante. Algunos ejemplos en los cuales se ha implementado el uso específicamente de nisina, son en quesos Gouda y Emmenthal, evitando así el problema de “hinchazón tardía”. El uso de nisina permite además que estos productos puedan ser formulados con altos niveles de humedad y bajos contenidos de NaCl y fosfato, y también permite el almacenamiento en cabinas sin refrigeración y sin riesgo de deterioro. La concentración utilizada depende de la composición del alimento, probablemente de la carga de esporas, vida útil requerida y la temperatura de almacenamiento (O'keeffe, 1999). Uno de los problemas frecuentes que se presentan al usar bacteriocinas de amplio espectro tales como nisina en productos fermentados es que los microorganismos iniciadores probablemente serán inhibidos al igual que los

microorganismos de deterioro y patógenos (Ross, 1999). En el yogurt se da una inhibición del cultivo iniciador *Lactobacillus delbrückii bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* por la nisina por lo que se comprueba que no cualquier bacteriocina puede ser aplicada como preservante en alimentos.

En particular, las BAL productoras de nisina presentan baja velocidad de acidificación y limitada actividad proteolítica, sumado a que pueden ser más sensibles a bacteriófagos (virus que atacan a estas bacterias conduciendo en general a su lisis); todo lo cual debe ser considerado en los procesos de elaboración queseros (O'Sullivan, y col. 2003). Estos aspectos deben ser evaluados al momento de aplicarse como cultivos *starter* o adjuntos en los procesos tecnológicos. No obstante, Schillinger y col., (1996) reportaron mayor vida útil en quesos fundidos producidos a partir de quesos Cheddar elaborados con *Lactococcus* productor de nisina. Además, la nisina tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en diferentes tipos de quesos (Gorgonzola, Muzzarella, Taleggio) (Giraffa, 1995).

Por lo anterior, cultivos *starter* con múltiples cepas BAL productoras de nisina, combinados con cultivos nisin-resistentes y de acidificación más rápida han sido propuestos (O'Sullivan, y col. 2003). De esta forma, han sido aplicados cultivos combinados en quesos Cheddar y Gouda, verificando el control entre otros de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium sporogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Biosíntesis y producción óptima de bacteriocinas

Las bacteriocinas se sintetizan generalmente como pre-péptidos inactivos con una secuencia N-terminal. Estos precursores son transportados a la superficie celular, donde durante la fase de crecimiento exponencial se convierten por acción de enzimas en sus formas activas. Los transportadores contienen una porción peptídica N-terminal responsable de la escisión del péptido guía, así como una porción C-terminal responsable de la hidrólisis de ATP y del suministro de energía. El sistema de regulación de la producción de bacteriocinas se compone de tres componentes: un péptido inductor (o factor de feromona de activación), la histidina quinasa transmembranal (receptor de feromona) y un regulador de respuesta. El péptido inductor se sintetiza en el ribosoma en niveles de baja concentración como un pre-péptido, que se escinde y se excreta al medio. Cuando este compuesto alcanza una concentración umbral, se activa la histidina quinasa transmembranal, lo que conduce a la autofosforilación del residuo de histidina, por lo tanto, se produce la transferencia de fosfato a una proteína reguladora de respuesta. El regulador fosforilado activa la transcripción de la bacteriocina, además de los elementos que componen el sistema de regulación, iniciando una retroalimentación positiva (Lugo Magaña, 2013)

La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Vázquez y col., 2009). De hecho, la mayoría de las bacteriocinas que se han estudiado hasta el momento presentan una cinética de metabolito

primario y, en consecuencia, su producción está correlacionada con el aumento de la biomasa. Por otro lado, el control del pH a lo largo de la fermentación puede resultar en valores más altos de actividad (Martínez, 1996). Consecuentemente, la naturaleza de la cepa productora, la composición del medio de cultivo (relación entre carbono, nitrógeno y fósforo), las condiciones de fermentación (temperatura, tiempo de crecimiento, pH inicial y final, generalmente entre 5.5 a 6.0, agitación, aireación, etc.) son factores muy importantes que influyen en la producción de las bacteriocinas. Hay BAL que producen más de una bacteriocina, y en este caso el pH y temperatura del medio juegan un papel muy importante en dicha producción (Yin y col., 2004). Además, la célula productora en general, sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina.

La producción de bacteriocinas de BAL está usualmente asociada con la fase de crecimiento de la cepa, y dicha producción cesa al final de la fase exponencial (algunas veces antes de que termine el crecimiento). Esto puede ser atribuido a la adsorción de la bacteriocina a las células productoras o a la degradación de las mismas por proteasas (Alquicira, 2006).

Propiedades de las bacteriocinas

Tolerancia al calor

En la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL se ha demostrado cierta resistencia al calentamiento, pudiendo resistir tratamientos equivalentes al de pasteurización, pero la sensibilidad a la temperatura depende del estado de purificación de la bacteriocina, decreciendo en bacteriocinas purificadas y parcialmente purificadas (Martin, 2002). Sin embargo, la nisina purificada permanece activa después de un calentamiento a 100°C por 10 min a pH 2,0. La característica de termoresistencia que presentan algunas de las bacteriocinas parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria (Martin, 2002). La termoresistencia permite que permanezcan activas después de tratamientos equivalentes a la pasteurización a 63°C por 30 minutos y/o 72°C por 15 segundos (Piard, 1992). Por otro lado, las bacteriocinas termolábiles, poseen mayor peso molecular y probablemente una estructura molecular más compleja.

Sensibilidad al pH

La mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL son generalmente estables a pH ácido o neutro, lo que indica probablemente una adaptación de estas sustancias al entorno natural de las bacterias que las producen. La nisina y la lactoestreptocina son sin embargo la excepción, ya que su actividad antimicrobiana es extremadamente dependiente de este parámetro. La nisina tiene su máxima solubilidad y estabilidad a pH 2,0, disminuyendo en la medida que aumenta el pH siendo irreversiblemente inactiva a pH 7,0, mientras que las lactoestreptocina son estables y activas entre un rango de pH de 4,2 a 5,0 y reversiblemente inactivas entre un pH 7,0 y 8,0. Por el contrario, muchas de las

bacteriocinas producidas por BAL, resisten la exposición a un amplio rango de pH entre 3,0 y 9,0. La tolerancia a valores de pH extremos entre 1,0 a 2,0 y 10,0 a 11,0 han sido reportadas para la acidocina B y bavaracina A (Martin, 2002).

Sensibilidad a la actividad enzimática

Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimotripsina) y algunas de origen gástrico, como la pepsina y proteinasa K. Esta característica permite la utilización de bacteriocinas en productos alimentarios, puesto que son inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar los riesgos que presenta por ejemplo los antibióticos (Martin, 2002) por lo tanto su ingesta resulta inocua para el consumidor y no altera la microbiota intestinal normal (Suarez, 1997).

Otras consideraciones relacionadas a su estabilidad.

Como se mencionó, las bacteriocinas presentan estabilidad cuando son sometidas a temperaturas elevadas y pHs ácidos, ambas propiedades están ligadas debido a que un incremento del pH reduce la estabilidad al calor (Chen, 2003). La estabilidad de las bacteriocinas disminuye a medida que aumenta su purificación (Ellison, 1970; Mahony, 1974; Tagg y col., 1975). La adición de sero-albúmina bovina protege de la pérdida excesiva de actividad experimentada por algunas bacteriocinas durante su purificación. La mayoría de las bacteriocinas son mucho más tolerantes a los pHs muy ácidos que a los alcalinos (Barrow, 1963; Ellison, 1970). Los criterios de termoestabilidad de las bacteriocinas son difíciles de definir, pues dependen de su purificación y de factores tales como pH, fuerza iónica y presencia de moléculas protectoras.

Purificación de bacteriocinas

El primer paso que se requiere para la purificación de las bacteriocinas se refiere a concentrar la bacteriocina en el sobrenadante asumiendo un proceso de producción de bacteriocinas óptimo (Svetoslav y col., 2004).

Debido a que son sustancias con diferentes características estructurales y propiedades químicas, no es posible generalizar un método único de purificación. Sin embargo, muchos trabajos presentan metodologías similares para este proceso. Durante el crecimiento bacteriano las bacteriocinas son secretadas en el medio de cultivo, produciéndose una gran dilución de las mismas, por ello un primer paso necesario para la purificación puede ser la concentración de la misma. El proceso de producción de bacteriocinas, suele iniciarse con el crecimiento y producción bacteriana en un medio de cultivo adecuado. Luego es seguido de un paso de centrifugación del cultivo para separar las células del sobrenadante, obteniéndose así el denominado sobrenadante libre de células (SLC), conteniendo la bacteriocina en solución. Posteriormente, una fracción de las proteínas contenidas en ese sobrenadante

puede ser precipitadas con sulfato de amonio. Así es como logra un primera etapa de concentración de las sustancias proteicas, entre ellas las bacteriocinas (Cintas y col, 2001).

Las BAL son microorganismos exigentes en cuanto a su crecimiento y requieren un medio de cultivo rico y complejo. A menudo éstos contienen grandes cantidades de péptidos pequeños (3.000-6.000 Da) que se encuentran en el rango del tamaño de la mayoría de las bacteriocinas, siendo además su concentración mayor en comparación con ellas (Parente, 1999). Debido a lo anterior, la liofilización o cualquier otra extracción directa de agua no son adecuadas como métodos de purificación. Además, ya que las etapas de concentración sólo reducen el volumen y no proporcionan un alto grado de pureza, se requieren varias fases posteriores de cromatografías para la purificación.

Una estrategia clásica para la concentración y purificación de bacteriocinas incluye (Muriana y col., 1991; Yang y col. 1992):

1. La concentración del péptido presente en el sobrenadante de un cultivo por precipitación con una sal, como el sulfato de amonio o la extracción con un ácido.
2. Cromatografía de intercambio iónico.
3. Cromatografía de filtración en gel y/o cromatografía de fase reversa (RP-HPLC).

Uno de los métodos de utilidad general para la purificación de proteínas es la cromatografía, la cual aprovecha las diferencias en carga, tamaño, afinidad de enlaces, etc. que hubiera en una mezcla de proteínas. Un material poroso sólido con propiedades químicas apropiadas (fase estacionaria) se coloca dentro de una columna, y una solución amortiguada (fase móvil) pasa a través de ésta. La solución que contiene las proteínas se vierte por la parte superior de la columna y pasa a través de la matriz sólida. Las proteínas migran más rápidas o más lentas a través de la columna dependiendo de su interacción con la fase estacionaria, con lo que se logra su separación. Hay diferentes tipos de matrices para cromatografía. Las de intercambio iónico constan de pequeñas esferas que contienen cargas positivas o negativas, de modo que las proteínas se separan en función de la disposición de cargas de la superficie. Estas esferas (de 75 a 300 μm de diámetro) son empaquetadas formando un lecho uniforme en la columna. Considerando la ventaja de la naturaleza catiónica e hidrófoba de las bacteriocinas, pueden utilizarse diferentes tipos de columnas cromatográficas. Como primera elección, se utiliza en la mayoría de los procedimientos una columna de intercambio iónico (catiónico). Este tipo de cromatografía logra la separación de casi todos los tipos de moléculas cargadas, desde grandes proteínas a pequeños nucleótidos y aminoácidos. En este caso, las moléculas de interés son proteínas que se separan en base a su diferencia de carga iónica. La separación se basa en la adsorción reversible de las proteínas cargadas a grupos de intercambio iónicos de carga opuesta inmovilizados en una matriz. La separación se da cuando existen sustancias

con diferente grado de interacción con el intercambiador debido a sus diferencias y densidades de carga. Estas interacciones pueden controlarse variando condiciones como fuerza iónica y pH. Para eluir las proteínas del gel hay que cambiar las condiciones de forma que se tornen desfavorables para la unión de esas moléculas a la matriz. Esto en general involucra un cambio de pH o un aumento de la fuerza iónica en el buffer de elución (Alberts y col., 2002).

En las columnas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, o High Performance Liquid Chromatography) se alcanza un alto grado de separación. Como las columnas de HPLC contienen partículas empaquetadas de forma muy compacta, la velocidad de flujo a través de ellas es prácticamente nula a menos que se apliquen altas presiones. La cromatografía en fase reversa se basa en el reparto del soluto entre dos fases líquidas. Una de las fases líquidas se mantiene en el soporte sólido (fase estacionaria) mientras que la otra fluye libremente a través de la columna (fase móvil). En estas formas de cromatografía la fase líquida estacionaria forma una capa fina (cromatografía líquido-líquido) sobre la superficie de un soporte sólido o se encuentra químicamente unida a él. De esta forma, los solutos se distribuyen (particionan) de acuerdo a sus solubilidades relativas entre las fases móvil y estacionaria. Esta cromatografía de partición se denomina "fase reversa" porque la fase móvil es más polar que la fase estacionaria (Alberts y col., 2002).

En este marco, en el Laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Veterinaria desde hace unos años se ha desarrollado una línea de investigación bajo la responsabilidad de la Dra. Silvana Carro. Actualmente, existen aislamientos de BAL autóctonas con potencial bacteriocinogénico, los cuales fueron obtenidos a partir de muestras de leche y quesos artesanales de la zona de Colonia, Uruguay. Entre estos aislamientos existe la cepa *Lactococcus Lactis* GU967439. Se han realizado estudios de caracterización bioquímica de la/s sustancia/s antimicrobiana/s producidas por este microorganismo utilizando como indicadores *Listeria innocua* y *monocytogenes* entre otros (González, 2012; Fraga y col., 2013)

Para dar continuación a esta línea de investigación es indispensable identificar la/s bacteriocina/s producida/s por *L. lactis* GU967439. Para ello es fundamental aislar y purificar dicha/s bacteriocina/s. En este sentido, desde hace tiempo se han ido publicando diversos enfoques para la purificación analítica de bacteriocinas de BAL y específicamente para las bacteriocinas de *L. lactis* por lo que se propusieron los siguientes objetivos en este trabajo (Nissen-Meyer y col 1992.; Piard y col. 1992; Suárez y col., 1997; Mc Auliffe y col., 1998; Prioult y col., 2000; Lee y col., 2001; Zendo y col., 2003; Zendo y col., 2006).

OBJETIVO GENERAL

- Implementar una técnica de purificación de la/s bacteriocina/s producidas por *Lactococcus lactis* GU967439.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener un SLC con actividad antimicrobiana para su purificación e identificación. Evaluar la presencia de bacteriocinas entre los elementos con actividad antimicrobiana.
- Purificar la/s bacteriocina/s de *Lactococcus lactis* nativo mediante la secuencia metodológica de: precipitación con Sulfato de Amonio, Cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de Fase Reversa (RP-HPLC).
- Evaluar diferentes métodos de conservación de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina cruda y purificada de *Lactococcus lactis* nativo (refrigeración-congelación-liofilización) y medir la solubilidad de ésta a diferentes pH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos y Materiales

Para el desarrollo del trabajo experimental se utilizaron equipos y materiales provistos por el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche y por el Departamento de Biología Celular y Molecular (Área Biofísica), Facultad de Veterinaria, UdelaR. Este trabajo fue financiado por el proyecto de iniciación a la investigación de CSIC (Responsable: Dr. Álvaro González) y el plan de dedicación total de la Dra. Silvana Carro.

Cepas bacterianas, medios de cultivo, condiciones de crecimiento y mantenimiento

Lactococcus lactis (identificado como GU967439) es una BAL nativa con comprobada producción de bacteriocinas, con efecto inhibitorio frente a *L. monocytogenes* y *L. innocua* (Perelmuter y col., 2010; González, 2012). La misma fue aislada de quesos artesanales provenientes del Departamento de Colonia, Uruguay (Laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, Facultad de Veterinaria, UdelaR). *L. Lactis* GU96743 fue mantenido congelado a -80°C en caldo Mann-Rogosa-Sharpe (MRS, Difco, USA) con glicerol (15%, v/v). Como medio de cultivo en los ensayos *in vitro* se utilizó caldo MRS (Difco, USA) incubado a 30°C por 12hs en condiciones de microaerofilia, siendo éstas las condiciones óptimas determinadas en ensayos previos en nuestro laboratorio (Lorenzo y Raffo, 2015).

Como microorganismo indicador de actividad antimicrobiana, se utilizó *Listeria innocua* ATCC N° 33090. La identidad fue verificada mediante ensayos de caracterización fenotípica, como tinción de Gram, catalasa y morfología celular. Para el crecimiento de este microorganismo se utilizó Brain Heart Infusion, (BHI HiMedia®, India) suplementado con 0.6% (p/v) de extracto de levadura (HiMedia®, India) e incubado a 37°C por 24 hs en aerobiosis. La evaluación de inhibición *in vitro* de *L. innocua* se realizó con BHI adicionado de Agar (1.5% p/v, HiMedia®, India) suplementado con 0.6% (p/v) de extracto de levadura (BHIA con extracto de levadura) y se incubaron a 37°C por 24 hs en aerobiosis.

Obtención del Sobrenadante del cultivo

La primera etapa para cumplir con el primer objetivo específico implica obtener en el medio de cultivo un alto título de bacteriocina/s para su seguimiento durante los procesos de purificación e identificación. Para ello el cultivo del microorganismo se realizó de acuerdo a las condiciones determinadas por Lorenzo y Raffo, (2015) quienes estudiaron mediante curvas de crecimiento la cinética de producción de la/s bacteriocina/s de este microorganismo.

Preparación del Pre-inóculo

La cepa de *L. lactis* nativo congelada se sembró en tubos con 5 mL de caldo MRS (HiMedia®, India) y se incubó a 30°C por 24 hs en microaerofilia,

posteriormente se sembraron por estrías en placas de MRS, (HiMedia®, India) y se incubaron a 30°C durante 24 hs en microaerofilia. La pureza de la cepa se evaluó mediante el examen macroscópico de las colonias, tinción de Gram y prueba de catalasa.

Obtención del SLC crudo

Un matraz conteniendo 250mL de MRS fue sembrado con una dilución del pre-inoculo en diluyente estéril (NaCl 0,85%), de manera tal que se alcanzara un nivel cercano a $1,0 \times 10^3$ ufc/mL, dicha concentración se confirmó mediante recuento directo en placas de MRS agar. Posteriormente el cultivo se incubó a 30°C durante 12 hs en condiciones de microaerofilia.

El cultivo fue centrifugado a 10.000xg por 15 minutos a 4°C y posteriormente fue filtrado con membranas de 0,22 μ m de diámetro (Millipore®, Merck®, Brasil) obteniendo así el SLC crudo.

Determinación de la actividad antimicrobiana

Se determinó en el SLC crudo la actividad antimicrobiana a través del método “well diffusion” (Fraga y col., 2008, Perelmuter y col., 2008), utilizando *Listeria innocua* como indicador. La técnica de “well diffusion” se realizó de la siguiente manera:

La cepa de *L. innocua* congelada se sembró en tubos con 5 mL de BHI (HiMedia®, India) y se incubó a 37°C por 24 hs en aerobiosis. Posteriormente se sembraron por estrías en placas de Trypticase Soya Agar, (HiMedia®, India) y se incubaron a 37°C durante 24 hs en aerobiosis.

Para la preparación de las placas de pocillos con el indicador se colocaron cilindros metálicos estériles en placas de Petri. Se utilizó BHA suplementado con extracto de levadura (previamente fundido y templado a 45°C) el cual fue sembrado con 1mL de una dilución (1/1000) de un cultivo overnight de *L. innocua* en BHI de manera de obtener una concentración aproximada a 1×10^6 ufc/mL en cada placa. Este medio conteniendo así el microorganismo indicador se fraccionó en las placas de Petri con los cilindros estériles y una vez solidificado el medio, los cilindros fueron retirados quedando así los pocillos formados en el agar.

Alícuotas de 1 mL del SLC fueron colocadas en tubos tipo eppendorf las cuales se ajustó el pH a 6,5 con NaOH 1M. Por último, para poder expresar la producción de bacteriocinas en unidades arbitrarias de actividad (UA/mL) se realizaron diluciones seriadas en base dos con solución buffer fosfato estéril (PBS, 10mM pH 7). Una UA se definió como el inverso de la dilución más alta que presentó un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador (Schillinger y col., 1991).

Posteriormente se inoculó en cada pocillo 100 μ L de cada una de las diluciones del SLC. Como control positivo se inoculó 100 μ L de Nisina (Nisaplin®, Danisco)

en una concentración de 100 mg/mL. Como control negativo se utilizó el mismo volumen de MRS ajustado a pH 6,5 con NaOH 1M.

Las placas se incubaron a 37°C por 24h en aerobiosis. La lectura se realizó observando halos de inhibición y la producción de bacteriocinas de cada sobrenadante se expresó en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL). Este ensayo se realizó por duplicado.

Caracterización del SLC con enzimas y calor

Los experimentos de tratamiento enzimático de nuestra molécula de interés, tuvo el doble propósito de, por un lado, establecer el origen peptídico de la actividad antimicrobiana detectada por los ensayos de “well diffusion”. Como la sensibilidad a diferentes enzimas proteolíticas difiere según el tipo de bacteriocina, el segundo objetivo de este experimento, fue generar pistas sobre la posible identidad de la molécula con actividad antimicrobiana. Por esta última razón, también se incluyó el tratamiento térmico (100°C x 5 min) como un parámetro más de comparación. A modo de control de la actividad enzimática, se realizó en paralelo un ensayo con nisina.

La técnica utilizada consistió en evaluar la actividad antimicrobiana remanente en el SLC luego de su incubación con las siguientes enzimas: pepsina, proteinasa K, α quimiotripsina y pronasa E. Las soluciones enzimáticas se prepararon en un buffer fosfato (pH 5,5).

Las enzimas se prepararon en solución a una concentración de 10x, quedando como concentración final 10 mg/mL.

Se utilizaron 10 tubos tipo eppendorf, en los cuales a la mitad se les agregó 900 μ L de nisina y a los restantes 900 μ L de SLC. Posteriormente, se inoculó a cada eppendorf 100 μ L de cada enzima a 37 °C durante 1 hora. Para estos tratamientos se utilizaron dos controles: uno conteniendo únicamente 900 μ L del SLC y el otro conteniendo únicamente nisina.

Optimización del cultivo de *L. lactis* Nativo

Como el título de bacteriocinas alcanzado con las condiciones anteriores no fue suficiente para continuar su seguimiento durante los pasos de purificación, se implementaron algunos ensayos para aumentar el volumen de cultivo y producción de bacteriocinas (aumento de la biomasa a través de cultivos seriados), así como para lograr la desadsorción de las mismas de la superficie bacteriana.

Aumento de biomasa y desadsorción de la bacteriocina a la célula productora

Para aumentar el volumen del cultivo de *L. lactis*, la biomasa y la producción de bacteriocinas, se realizaron cultivos seriados inoculando al 10% e incubando a 30°C por 12 hs (tres pasajes de 2,5; 25; 250 mL de medio de cultivo: MRS). Se partió de un cultivo “overnight” de *L. lactis* nativo en MRS con el cual se inoculó un tubo con 2,5mL de MRS, incubándose a 30°C por 12 hs. Este procedimiento

se repitió secuencialmente de la misma manera hasta alcanzar un cultivo final de 250 mL. A partir de este cultivo se obtuvo el SLC y se determinó la actividad antimicrobiana utilizando las técnicas ya descritas.

Como estrategia para aumentar el título de bacteriocina en el SLC, se realizaron diferentes ensayos de desadsorción de la molécula de interés de las paredes o restos bacterianos, donde presuntivamente se particiona. Para lograr la desadsorción de la bacteriocina se utilizó la técnica descrita por Taheri y col., 2012, basada en el uso combinado o alternativo de detergentes y sonicación (ultrasonido) sobre el cultivo bacteriano obtenido anteriormente en el ensayo de aumento de biomasa.

El cultivo final (250mL) se fraccionó en 6 tubos de centrífuga estériles, los que se utilizaron para los tratamientos indicados en el Cuadro I.

Cuadro I: Tratamientos de desadsorción de bacteriocinas según técnica de Taheri y col., 2012

Tratamiento	Ajuste de pH	Sonicación ¹	Tween 80 ²
A	2	Si	No
B	4	Si	No
C	No (pH=6)	Si	No
D	2	Si	Si
E	4	Si	Si
F	No(pH=6)	NO	Si

1-Sonicación: 28 KHz, 5 min en una amplitud de 50%; 2-Surfactante no iónico

El protocolo de sonicación fue el siguiente: se aplicó ultrasonido durante un período de 5 min cada tubo, en una amplitud de 50% (energía aplicada durante el ensayo, expresada en porcentaje) y en ciclos periódicos de 50 % (modo de pulso), manteniendo la muestra en hielo.



Figura 2: Sonicator de punta utilizado para los ensayos de desadsorción de bacteriocinas a la célula productora.

Los cultivos tratados de la forma descrita en el cuadro I fueron centrifugados a 10.000xg, por 15 minutos a 4 °C. De esta forma, se recupera un SLC al cual se le midió la actividad antimicrobiana por medio de la técnica “well diffusion”. Este sobrenadante es el que se utilizó para la purificación de bacteriocinas.

Purificación parcial del SLC

Dicho procedimiento fue planteado en una secuencia metodológica de tres pasos: precipitación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de fase reversa (RP- HPLC).

Precipitación con sulfato de amonio

A partir del SLC de *L. lactis* con actividad antimicrobiana, se realizó la concentración de la/s bacteriocina/s por la técnica de precipitación con sulfato de amonio. La concentración final de sales de amonio a utilizar se determinó experimentalmente ya que el porcentaje de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ necesario para precipitar una bacteriocina, depende de la naturaleza de la molécula de interés (Pingitore y col., 2007). Se evaluaron concentraciones en un rango entre 0-80 % de saturación (0-20, 20-40, 40-60 y 60-80% de saturación) a fin de evaluar en qué rango de concentración de sulfato de amonio se precipitaban las bacteriocinas presentes. Posteriormente, la mezcla resultante de bacteriocina y sulfato de amonio se centrifugó a 10.000xg por 30 minutos. El “pellet” o sedimento obtenido de cada fracción se resuspendió y solubilizó en 2 mL de

buffer fosfato 10 mM, pH 5.5. Cada uno de los pellets resuspendidos se sometieron al test de "well diffusion" con el fin de determinar la presencia de actividad inhibitoria frente a *L. innocua* y expresarla en UA/mL. Posteriormente las fracciones con actividad fueron mantenidas en refrigeración y con ellas se procedió a realizar cromatografía de intercambio iónico.



Figura 3: Precipitación con sulfato de amonio. La sal es vertida en un Erlenmeyer que contiene el SLC a un flujo constante de 0,5 ml/min, controlado por una bomba peristáltica y bajo agitación permanente.

Cromatografía de intercambio catiónico

La bacteriocina resuspendida a partir del pellet obtenido en la etapa anterior fue sometida a una cromatografía de intercambio iónico (catiónico) utilizando un soporte de intercambio catiónico CM Sepharose Fast Flow (Ge Healthcare).

La técnica se ajustó utilizando Nisina comercial (Nortesur, grado alimentario), bacteriocina ya descrita y más estudiada producida por *L. lactis*. Para ello se sembraron 50 mg de nisina reconstituida en buffer fosfato. Considerando el rango de los puntos isoléctricos de los distintos tipos de Nisina los que se ubican entre 9-10 y se propuso eluir con un buffer fosfato de pH=7; con un gradiente de 0 a 1000 mM de NaCl (Cotter y col., 2005).

La cromatografía de intercambio catiónico para las bacteriocina/s de *L. lactis* se realizó de la siguiente manera: el pellet obtenido de la precipitación con sulfato de amonio es solubilizado en buffer fosfato, centrifugado durante 10 min a 10.000xg y se sembró 1,3 mL del sobrenadante en la columna de intercambio catiónico (45 cm de altura x 1 cm de diámetro), equilibrada con solución buffer fosfato de 20 mM a pH 5.5, sin NaCl. Las proteínas retenidas se eluyeron con la aplicación de un gradiente lineal 50 ml de fase móvil conteniendo cloruro de sodio (de 0 a 500 mM de NaCl), con un flujo constante de 0,3 ml. min⁻¹. El punto de comienzo y final del gradiente se confirmó midiendo conductividad eléctrica en las diferentes fracciones. La proteína eluida en las diferentes fracciones fue monitoreada en tiempo real mediante lectura de absorbancia a 280 nm utilizando un módulo UV SPD-6A intercalado a la salida de la columna

y antes de la colección de las fracciones. Las fracciones eluidas (1,5 mL) y recolectadas fueron sometidas al test "well diffusion" con el fin de determinar la presencia de actividad inhibitoria en ellas. El ensayo se repitió al menos 3 veces con sobrenadantes obtenidos de diferentes cultivos del microorganismo.

Aquellas fracciones que demostrasen actividad antimicrobiana serian analizadas por cromatografía de fase reversa (columna C-18, gradiente de ácido fórmico pH 4 y acetonitrilo) con el fin de separar los péptidos de la mezcla e identificarlos. Sin embargo, debido a que la actividad antimicrobiana de la/s bacteriocinas presentes en las fracciones es poco estable no fue posible realizar este paso.

Determinación de la concentración de proteína soluble

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta, cuando se quiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática, así como para otros propósitos.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el rango UV, b) la formación de derivados químicos, o c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes (Reyes y col., 2010).

En este trabajo se utilizó el método de Bradford, (Bradford., 1976). El mismo está basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 al unirse a proteínas en solución. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomasie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Experimentalmente se mide la diferencia de absorbancia entre 595 y 465 nm (595-465nm).

Este método fue seleccionado ya que presenta enormes ventajas de las cuales alguna de ellas son que requiere sólo un reactivo y 5 minutos para efectuarlo y el complejo proteína-colorante permanece estable de 5 min a 1 hora. Por lo tanto, este método es un procedimiento sencillo, sensible, rápido, automatizable y conveniente. Se cuantificó la concentración de proteínas (mg/ml) en aquellas fracciones con actividad antimicrobiana.

La curva de calibración de proteínas se realizó de la siguiente manera: se prepararon diluciones del estándar de proteína (albúmina bovina) de 25, 50, 75, 100 y 200 µg/mL en un volumen final de 100 µL. Como Blanco, en otro tubo se añadieron 100 µL de la solución de dilución (buffer fosfato).

Las muestras a medir se prepararon tomando un volumen igual o menor a 100 µL; completando los 100µL con la solución de dilución. Luego de esto se

añadió a cada tubo 1 mL del reactivo de Bradford y se mezcló inmediatamente, incubándose la reacción a temperatura ambiente por 2 min.

Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro, en un plazo no mayor a 1 hora. Posteriormente, se colocan en regresión los valores de absorbancia (restado el blanco) contra los respectivos valores de concentración de proteínas. Para el ajuste de los puntos experimentales a una recta, se utilizó el método de mínimos cuadrados. Los valores de pendiente de la recta y la ordenada en el origen, fueron utilizados para estimar la concentración de proteínas en las muestras de las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico.

Evaluación de la estabilidad antimicrobiana en diversas condiciones de conservación

Temperatura y liofilización

Se evaluó la conservación de actividad antimicrobiana en el tiempo bajo condiciones tales como refrigeración a 4 °C, congelación a -18 °C y liofilización del SLC y fracción obtenida luego de la precipitación con sulfato de amonio. La actividad antimicrobiana se midió cada 7 días, por un periodo de 28 días, utilizando el método "well diffusion" ya descrito.

Por otra parte, el SLC obtenido se sometió a un tratamiento de liofilización en el Instituto de Higiene UdelaR, midiéndose posteriormente la actividad antimicrobiana por el método mencionado anteriormente.

Solubilidad del precipitado con sulfato de amonio a diferentes pH

La fracción precipitada con sulfato de amonio (pellet) se solubilizó en 1 mL de PBS y clarificó por centrifugación (10 minutos a 10.000xg, a 4 °C). El sobrenadante obtenido se dividió en 4 tubos eppendorf con 25 µL cada uno, conteniendo cada tubo un buffer a diferentes pH (2; 5,5; 7; 10). Los tubos se colocaron en agitación durante 30 min y transcurrido este tiempo se centrifugaron nuevamente. Los sobrenadantes obtenidos son sometidos a la técnica "well diffusion". Cada tubo se sembró en la placa con sus respectivos controles (sólo buffer a diferentes pH).

RESULTADOS

Producción del cultivo y determinación de la actividad antimicrobiana del SLC

Utilizado las condiciones de crecimiento determinadas por Lorenzo y Raffo, (2015), para obtener en el cultivo la más alta producción de bacteriocinas, se logró un resultado final de 320UA/mL promedio. Como el título de bacteriocinas alcanzado no fue suficiente para continuar su seguimiento durante los pasos de purificación, se implementaron ensayos para aumentar el volumen de cultivo y producción de bacteriocinas, así como para lograr la desadsorción de las mismas de la superficie bacteriana.

Caracterización del SLC con enzimas y calor

Los resultados obtenidos de la caracterización del SLC con enzimas y calor se indican en el Cuadro II.

Cuadro II: Resultado de la actividad antimicrobiana presente en el SLC tratado térmicamente y con enzimas. Comparación con nisina comercial utilizada como control.

Actividad antimicrobiana (UA/mL)¹		
Tratamiento	SLC²	Nisina³
Control	640	640
Temperatura 100°C, x 5 min, pH=5,5	0	160
Pepsina	160	0
Proteinasa K	640	160
α Quimiotripsina	2560	40
Pronasa E	0	0

1-Unidades arbitrarias de actividad por mililitro calculadas como el inverso de la dilución más alta que presentó un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador; 2-Sobrenadante libre de células obtenidos durante la optimización del cultivo; 3- Nisina comercial 100 mg/mL. Estos valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes.

Optimización del cultivo de *L. lactis* Nativo

Aumento de biomasa y desadsorción de la bacteriocina a la célula productora

Los resultados de los estudios de aumento de biomasa y desadsorción se muestran en el Cuadro III.

Cuadro III. Resultados de ensayo de actividad antimicrobiana luego del aumento de biomasa y desadsorción de la bacteriocina a la célula productora en el cultivo.

Tratamiento	Actividad antimicrobiana (UA/mL)	Desadsorción (%) ¹
(A) Sonicación ² a pH=2	ND ³	****
(B) Sonicación a pH=4	320	0
(C) Sonicación a pH=6	1280	300
(D) Tween 80 ⁴ + Sonicación a pH=2	ND	****
(E) Tween 80 + Sonicación a pH=4	640	100
(F) Tween 80 a pH=6	1280	300
Control (pH=6)	320	0

1-Unidades arbitrarias de actividad por mililitro calculadas como el inverso de la dilución más alta que presentó un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador. 2-Desadsorción en % calculada como la diferencia entre la actividad antimicrobiana luego del tratamiento y antes del tratamiento sobre la actividad antes del tratamiento. 3- Sonicación: 28 KHz, 5 min, amplitud de 50%. 4-N/D: no se detecta halo de inhibición. 4- Tween 80 0,5%. Estos valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes.

Purificación parcial del SLC

Precipitación con sulfato de amonio

Los resultados obtenidos de la precipitación fraccionada del SLC con sulfato de amonio se muestran a continuación en el Cuadro IV.

Cuadro IV. Actividad antimicrobiana presente en el pellet y sobrenadante durante la precipitación con diferentes rangos de saturación de sulfato de amonio.

Rango de saturación del (NH ₄) ₂ SO ₄	Actividad antimicrobiana (UA/mL) ¹		
	Pellet ²	Sobrenadante	SLC Original ²
0-20%	640	ND ³	640
20-40%	20	ND	
40-60%	ND	ND	
60-80%	ND	ND	

1- Unidades arbitrarias de actividad por mililitro calculadas como el inverso de la dilución más alta que presentó un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador. 2-Mediana (M_e) (n=3) de la actividad antimicrobiana del pellet y sobrenadante del cultivo original. 3-ND: no se detecta halo de inhibición.

Cromatografía de intercambio catiónico

Los resultados obtenidos de la cromatografía de intercambio catiónico de la fracción precipitada por sales y resolubilizada en buffer fosfato, pH 6 se muestran en la figura 4.

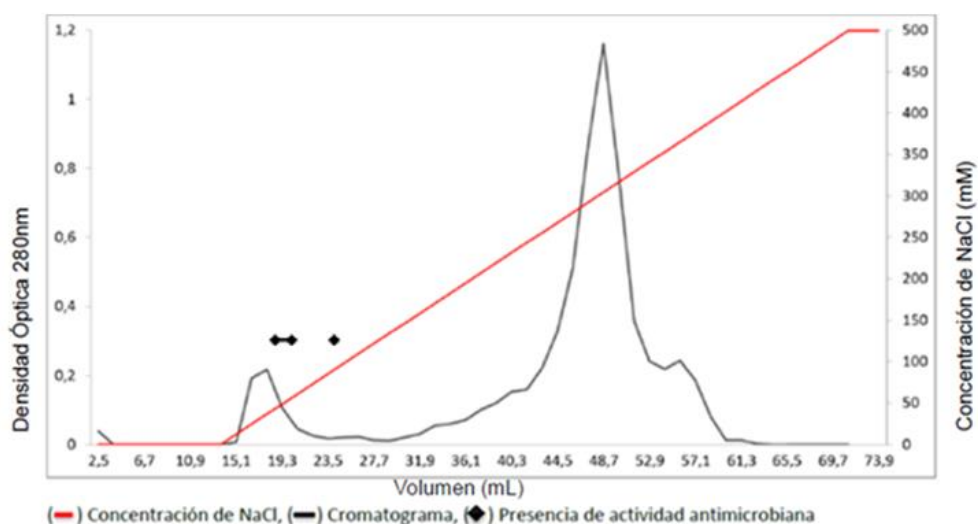


Figura 4. Cromatografía de intercambio iónico. Fracción obtenida de la precipitación con sulfato de amonio (0-40%) del SLC del cultivo de *L. lactis* nativo en caldo MRS. Se muestra un cromatograma representativo de un experimento realizado por triplicado.

Determinación de la concentración de proteína soluble

En cada etapa de purificación se calculó la actividad antimicrobiana y se midió simultáneamente la concentración de proteínas para luego poder expresar la actividad específica de cada fracción a lo largo del proceso de purificación. Los resultados de estos ensayos se resumen en el Cuadro V.

Cuadro V: Concentración de proteínas y actividad antimicrobiana del proceso de purificación del SLC, Pellet y fracciones cromatográficas con actividad antibacteriana.

	Volumen(mL)	Actividad antimicrobiana (UA ¹ /mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Actividad específica (UA/mg)	Actividad total (UA)
SLC	210	256	0,070	3657	767970
Pellet	1,3	160	0,16	1000	1300
F ² =18,2 mL	1,5	20	0,060	333	500
F=19,6 mL	1,5	10	0,042	238	357
F=25,2 mL	1,5	40	0,051	784	1176

1- Unidades arbitrarias de actividad por mililitro calculadas como el inverso de la dilución más alta que presentó un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador. 2- Fracciones recolectadas durante la cromatografía de intercambio iónico (volumen del gradiente de NaCl). Estos valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes.

Evaluación de la estabilidad antimicrobiana en diversas condiciones de conservación

Temperatura y liofilización

La estabilidad antimicrobiana se evaluó mediante los métodos clásicos de refrigeración, congelación y liofilización de fracciones obtenidas en diversas etapas del proceso. Los resultados de dicha actividad en el SLC almacenado en condiciones de refrigeración/congelación o liofilizado se indican en los Cuadros VI y VII respectivamente; mientras que la actividad antimicrobiana de la fracción precipitada con sulfato de amonio "pellet" refrigerada/congelada se resume en el Cuadro VIII.

Cuadro VI: Resultado del ensayo de conservación de la actividad antimicrobiana del SLC almacenado en refrigeración (4°C) o congelación (-18°C).

Tiempo (días)	Actividad antimicrobiana (UA/mL) ¹	
	Refrigerado (4°C)	Congelado (-18°C)
0	640	640
7	640	80
14	320	10
21	160	ND ²
28	10	ND

1- Unidades arbitrarias de actividad por mililitro calculadas como el inverso de la dilución más alta que presentó un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador. 2-ND: no se detecta halo de inhibición. Estos valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes

Cuadro VII: Resultado del ensayo de conservación de la actividad antimicrobiana del SLC liofilizado almacenado en congelación (-18°C).

Tiempo (días)	Actividad antimicrobiana (UA/mL)
	Liofilizado ³ Congelado (-18°C)
0	640
7	320
14	320
21	320
28	ND

1- Unidades arbitrarias de actividad por mililitro calculadas como el inverso de la dilución más alta que presentó un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador. 2-ND: no se detecta halo de inhibición. 3-Liofilizado del SLC (reconstituido a 100mg/mL). Estos valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes

Cuadro VIII: Resultado del ensayo de conservación de la actividad antimicrobiana del pellet (SLC concentrado) almacenado en refrigeración (4°C) o congelación (-18°C).

Rango de saturación del (NH ₄) ₂ SO ₄	Actividad antimicrobiana (UA/mL) ¹		
	Tiempo	Refrigeración (4°C)	Congelación (-18°C)
0-40%	0	640	640
	7	640	160
	21	ND ²	ND

1- Unidades arbitrarias de actividad por mililitro calculadas como el inverso de la dilución más alta que presentó un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador. 2-ND: no se detecta halo de inhibición. Estos valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes

Solubilidad del precipitado con sulfato de amonio a diferentes pH

La solubilidad del precipitado “pellet” se estudió mediante el uso de buffers con diferentes pH como forma de optimizar la extracción de la bacteriocina de ese pellet. Los resultados de la actividad antimicrobiana al resuspender en los diferentes buffers se resumen en el Cuadro IX.

Cuadro IX: Presencia/ausencia de actividad antimicrobiana en el precipitado de proteínas obtenidos del SLC al resuspender en buffer a diferentes pH

pH del Buffer	Presencia/ausencia de actividad antimicrobiana ¹	
	Precipitado proteico resuspendido	Control
2	Ausencia	Ausencia
5,5	Presencia	Ausencia
7	Presencia	Ausencia
10	Presencia	Ausencia

1-Actividad antimicrobiana determinada en ensayo “well difussion” con el sobrenadante luego de neutralizado, leído como presencia/ausencia de halo de inhibición del crecimiento. 2-Control (sólo buffer a diferentes pH). Estos valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Producción del cultivo y determinación de la actividad antimicrobiana del SLC

La producción de las bacteriocinas depende del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora, estando correlacionada la biomasa con la cantidad de bacteriocina producida. Consecuentemente, la naturaleza de la cepa productora, la composición del medio de cultivo (relación entre carbono, nitrógeno y fósforo), las condiciones de fermentación (temperatura, tiempo de crecimiento, pH inicial y final, generalmente entre 5.5 a 6.0, agitación, aireación, etc.) son factores muy importantes que influyen en la producción de las bacteriocinas (Yin y col., 2004).

De acuerdo con las curvas de crecimiento y cinética de producción de bacteriocinas para este microorganismo, el número máximo de células viables en caldo MRS se obtuvo a las 12 hs de incubación (8,88 log UFC/mL) a 30°C, por lo que este período se relaciona con el final de la fase exponencial. En cuanto a la tasa de producción de bacteriocinas, ésta acompaña su crecimiento exponencial, detectándose a partir de las 4hs y observándose un título máximo de 1360 UA/mL a las 11hs de crecimiento (Lorenzo y Raffo, 2015). Sin embargo en el presente trabajo la producción promedio de bacteriocinas fue menor (promedio= 320 UA/mL). La reducción en la actividad inhibitoria podría estar relacionado con la degradación de proteínas por peptidasas, adsorción de la bacteriocina a la célula productora y/o diferentes efectos sobre la producción debido a un pH bajo, (Choi y col., 2000; Todorov y col., 2004; Todorov y col., 2007; Juncioni de Arauz y col., 2009 citados por Taheri y col., 2012). Otro factor importante a considerar es que la bacteriocina presente una baja estabilidad y que la actividad antimicrobiana decaiga rápidamente y no sea detectada, en este sentido se realizaron estudios para caracterizar dicha estabilidad.

Caracterización del SLC con enzimas y calor

Una forma de acercamiento a la identidad de las bacteriocinas producidas por la cepa nativa de *L. lactis* es mediante el estudio de su susceptibilidad a la hidrólisis por diferentes proteasas. Este análisis parte del hecho que ciertas enzimas proteolíticas reconocen con cierto grado de especificidad determinados motivos (secuencias aminoacídicas específicas) presentes en sus sustratos. Por lo tanto, la susceptibilidad a la hidrólisis por proteasas variará de una bacteriocina a otra. En función de lo anterior se estudió la susceptibilidad de la bacteriocinas producida por *L. lactis* nativo y se comparó con la de la nisina comercial, uno de los candidatos (en principio) más probable a estar presente en el SLC.

De los resultados expuestos en el Cuadro II, se puede concluir claramente que la actividad antimicrobiana presente en el SLC, es sensible a pepsina y pronasa E. Es llamativa la respuesta al tratamiento con α Quimiotripsina. Estos mismos resultados también muestran un perfil de inhibición diferente al de la nisina. En términos generales se ha reportado que la mayoría de las bacetriocinas son sensibles cuando se enfrentan a estas enzimas, según los resultados obtenidos muestran que el sobrenadante pierde actividad frente a estas, esto es, antes que nada, la caracterización de una actividad antimicrobiana debida a un péptido, (De Vuyst y col., 1994; Jamuna y col., 2004; Todorov y col., 2004; Kacem y col., 2005; Todorov y col., 2010, Ahmadova y col., 2013;).

Con respecto a lo que ocurre con la pepsina la cual la actividad del sobrenadante se reduce no por completo, sino que disminuye 75% su actividad antimicrobiana, coincide con lo reportado por González, (2002). El cual caracterizó una bacteriocina producida por *Carnobacterium piscícola* L103. En ese caso se midió la sensibilidad del sobrenadante frente a enzimas proteolíticas, obteniendo una reducción de 75% de la actividad antimicrobiana.

Se considera que la pronasa E y la proteinasa K (proteasas de amplio espectro) inhiben la actividad antimicrobiana de cualquier bacteriocina. Por ello, es que durante los ensayos de *screening* de actividad tipo bacteriocina es esencial su utilización para confirmar el origen proteico del inhibidor (Ray y col., 1992). De todas formas, existen bacteriocinas que mantienen la actividad frente a la proteinasa K. Un estudio realizado por González y col., (1994), determinó la sensibilidad de una bacteriocina (planticin C) el cual obtuvo como resultado que esta mantenía la actividad frente a la proteinasa K. Lo mismo ocurrió con lo reportado por Zapata y col. (2009), pero con diferente bacteriocina (bacteriocina LPBM10), producida por *Lactobacillus plantarum* el cual el sobrenadante obtenido conserva su actividad luego de una incubación con proteinasa K. La resistencia a proteasas puede darse en compuestos como los lantibióticos, los cuales, al sufrir grandes modificaciones postraduccionales, son altamente resistentes a la acción de estas enzimas proteolíticas (Willey y col. 2007). En ese sentido, podemos especular que la actividad antimicrobiana presente en nuestro SLC es mayormente debida a un lantibiótico.

Más difícil de explicar es el resultado de la digestión de la bacteriocina con quimiotripsina. En este caso se detectó un aumento importante de la actividad antimicrobiana, fruto del tratamiento. No existe literatura disponible que reporte un hallazgo de este tipo. Sólo como especulación podríamos proponer que nuestra bacteriocina (u otro péptido también presente), que se encuentren en el medio como pro-bacteriocina y que sean activadas por proteólisis regulada. Podría ser un péptido excretado durante el crecimiento bacteriano o presente en formas inmaduras dentro de la bacteria y liberado por la sonicación. Es de destacar que como se mencionó, el clivaje enzimático de péptidos en bacterias suele ser una etapa de maduración que cumplen algunas bacteriocinas, previo a su excreción al medio.

Hay que considerar que los ensayos enzimáticos sólo contribuyen a efectuar una caracterización preliminar de los SLC con actividad bacteriocinogénica obtenidos de cultivos de BAL, y brindan únicamente una primera aproximación al conocimiento de la naturaleza química de los compuestos activos presentes en ellos (Cardoso, 2012).

Para el ensayo de estabilidad de temperatura, se vio que la bacteriocina en estudio pierde actividad a una temperatura de 100°C durante 5 min. No obstante, existen estudios que afirman que la mayoría de las bacteriocinas mantienen el 100% de su actividad hasta 60°C (Harshada y col., 2012), alguna presenta su pico máximo de actividad a los 4°C, y otras a los 25°C (Nowroozi J y col., 2012). Como se muestra en el Cuadro II, la Nisina pierde actividad, pero no por completo lo que coincide con lo reportado por Hurst, (1981) y Martin, (2002). Estos autores comprobaron que la nisina purificada, se caracteriza por su elevada termoestabilidad a pH 5.5, permaneciendo activa tras ser sometida a 100°C durante 10 minutos. Esta característica de termoresistencia parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Otras bacteriocinas, en su mayor parte producidas por lactobacilos, son termolábiles, incluso sin haber sido purificadas; las mismas poseen un mayor peso molecular y una estructura molecular más compleja. La estabilidad al calor es una característica muy útil de algunas bacteriocinas para su empleo como bioconservantes alimentarios, ya que muchos procesos de elaboración de alimentos involucran procesos de calentamiento.

Optimización del cultivo de *L. lactis* Nativo

Aumento de biomasa y desadsorción de la bacteriocina a la célula productora

El protocolo de desadsorción de la bacteriocina y el que se utilizó para aumentar el volumen del cultivo dieron mejores resultados en cuanto al aumento de la actividad antimicrobiana (Cuadro III). Obtuvimos un aumento significativo de la actividad, se partió de un nivel de 320 UA/ml en el SLC sin sonicar y se llegó a 1280 UA/ml luego del tratamiento. Interpretamos este efecto como la desadsorción de la bacteriocina de la pared celular.

El protocolo que produjo también un aumento importante de la actividad antibacteriana fue el de la utilización de Tween 80 y pH=6. Este protocolo no se tomó en cuenta ya que el Tween 80, si bien se caracteriza por favorecer la liberación de las bacteriocinas al medio (Nissen-meyer y col., 1993; Aymerich y col., 2000), es un detergente y, por tanto, interfiere en los procesos de purificación.

En cuanto al pH utilizado durante la desadsorción en ambos casos, se vio que el pH=6 es el óptimo en cuanto al aumento de la producción de bacteriocinas, esto coincide con lo reportado por Olvera-García, (2015) el cual indica que las bacteriocinas en general son más estables en un medio a pH entre 5,5 y 6.

Por otra parte, Taheri y col., 2012, quienes estudiaron la producción de bacteriocinas de la cepa de *L. lactis* subesp. *Lactis* ST1 reportan un aumento de la actividad antimicrobiana, en particular en presencia de 0,5% Tween80 y después de calentar el cultivo en condiciones ácidas y/o después del tratamiento de ultrasonido. Esto podría ser debido a la liberación de bacteriocina adsorbidas a la pared celular. Además concluyen que el ultrasonido se puede utilizar como un método alternativo al tratamiento con calor, con el fin de liberar la bacteriocina de la pared de la célula productora.

Purificación parcial del SLC

Precipitación con sulfato de amonio

La mayor actividad antimicrobiana detectada en los rangos de 0-20% y 20-40% permitió definir el rango de 0-40% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como el adecuado para utilizar rutinariamente durante la purificación, dado que en el mismo se obtiene la mayor actividad antimicrobiana y por ende una mayor concentración de bacteriocina/s (Cuadro IV). Además, esto nos permite descartar todos aquellos compuestos que precipitan entre 40 y 80 % de saturación.

El rango utilizado (0-40%) coincide con el óptimo reportado por varios autores, Muriana y col. (1991), para la purificación de lactacina F, bacteriocina producida por *Lactobacillus acidophilus* 11088; Lozano y col., (1992) para una bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* (Pediocina PA-1) obtuvieron alrededor de un 40% de recuperación de la actividad, después de la precipitación con sulfato de amonio a un nivel de 40% de saturación.

En este sentido, Wannum y col., (2014) quienes purificaron una bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* SD1, inicialmente precipitaron a partir de un SLC con el 40, 60 y 80% de saturación de sulfato de amonio. En sus resultados también demostraron que la actividad antimicrobiana fue más elevada y se recuperó en el pellet de proteínas que se saturó con sulfato de amonio al 40%.

Cromatografía de intercambio catiónico

En este trabajo se realizó como método de purificación la técnica de cromatografía de intercambio catiónico en buffer fosfato pH 6 en un gradiente de NaCl de 0 a 500 mM.

El cromatograma muestra dos picos principales de absorbancia a 280 nm. Nótese que la primera fracción con absorbancia a 280 nm aparece simultáneamente con el inicio del gradiente de NaCl (Figura 4).

Se recolectaron tres fracciones con actividad antimicrobiana y son eluidas entre 50 y 120 mM de NaCl, estas fracciones coinciden con el final del primer pico del cromatograma, lo que indica que no son retenidas en la columna o que su retención es muy débil y que la molécula con actividad antimicrobiana es un catión muy débil a pH 6. Otro aspecto interesante es que la actividad

antimicrobiana detectada por “well diffusion” aparece en forma discontinua en dos fracciones diferentes (volúmenes de elusión 18-20 ml y 25 ml, aproximadamente), lo cual sugiere la posibilidad de que estemos frente a más de una molécula diferente, ambas con propiedades antimicrobianas.

El segundo pico, es el que corresponde a los cationes retenidos, los cuales son la mayor parte de los presentes en la muestra. Este dato es interesante pues puede ayudar a mejorar el protocolo de purificación. Por ejemplo, un ligero aumento del pH de la fase móvil puede eliminar totalmente su retención y eluirlo en el volumen muerto, lo cual implica que está siendo separada de la mayor parte del resto de las sustancias cargadas presentes en la mezcla.

Los datos de actividad específica de la bacteriocina (Cuadro V) muestran que las fracciones resultantes de la cromatografía presentaron menos actividad específica con respecto al sobrenadante. Lo esperable para un proceso de purificación es exactamente lo inverso. Estos resultados sugieren dos posibilidades: una es que la bacteriocina no está siendo purificada a lo largo del proceso, sino que va perdiéndose en sus sucesivas etapas. Esta interpretación contrasta con el hecho de que en cada paso de purificación se preservan las fracciones con más actividad, mientras que las que se descartan demuestran tener poca o ninguna. Por lo tanto, la actividad antimicrobiana que se va perdiendo, no va quedando por el camino. La otra posibilidad es que se trate de una molécula lo suficientemente lábil como para ir inactivándose sólo con el transcurso del tiempo. En ese sentido, es conocido que en general las proteínas se tornan crecientemente inestables (por agregación, oxidación o proteólisis) cuanto más puras y diluidas estén. Como se expresa más adelante, los experimentos de medida de actividad bajo diferentes condiciones de conservación (refrigerada o congelada), son consistentes con esta última hipótesis. Esto coincide con lo reportado por Stoffels y col. (1992), los cuales purificaron carnocina U149, obteniendo una reducción de la actividad específica debido a la pérdida sustancial de la actividad bactericida. En nuestro caso, la pérdida rápida de la actividad es un hecho que hemos constatado en forma regular y como se ha expuesto, resulta difícil de revertir. Esto es un obstáculo importante a la hora de desarrollar un método eficaz y efectivo de purificación, tanto con fines analíticos como a escala.

Adicionalmente, la pérdida de actividad antimicrobiana durante el proceso de purificación podría estar relacionada también con la tendencia a asociarse que presentan este tipo de moléculas peptídicas, tanto entre ellas mismas como con otras proteínas, debido a la elevada hidrofobicidad natural de los péptidos (Aktypis y col., 1998; Motta y col., 2007).

Como siguiente etapa de purificación inicialmente nos planteamos procesar las fracciones seleccionadas de la cromatografía de intercambio iónico por una de fase reversa para obtener una separación ulterior de los péptidos presentes en la mezcla y en una segunda etapa, identificarlos. Sin embargo, debido a que la actividad antimicrobiana de la/s bacteriocinas presentes en las fracciones resultó baja y poco estable no fue posible realizarla. Actualmente las fracciones

con actividad se encuentran congeladas y se plantea su análisis mediante espectrometría de masas.

Evaluación de la estabilidad antimicrobiana en diversas condiciones de conservación

Temperatura y liofilización

Los procesos de purificación de proteínas son largos y laboriosos. Por esta razón es importante identificar métodos de conservación de fracciones parcialmente purificadas de forma tal de poder subdividir el proceso de purificación en etapas intermedias sin perder actividad de forma significativa.

En este trabajo, se midió la actividad antibacteriana durante 28 días en refrigeración y congelación. Como se desprende del análisis de los cuadros VI, VII y VIII, la actividad antimicrobiana se pierde con el tiempo, independientemente del método de conservación. Esta forma de conservación (refrigeración-congelación) no evita la aparición de los fenómenos de degradación ni desnaturalización. Lo que si se logra es una reducción de la velocidad de las reacciones. En el caso de la refrigeración, la pérdida de actividad que se observa a lo largo del tiempo puede ser al menos parcialmente, por la hidrólisis de estos péptidos, dando lugar a la acumulación de péptidos de bajo peso molecular. También puede deberse a agregación y precipitación de los péptidos que están en solución.

Por otra parte, llama la atención que la congelación parece acelerar el proceso, en comparación con la refrigeración. Esto podría ser esperable para péptidos complejos con estructura al menos terciaria, pero no para bacteriocinas. El SLC mantiene la actividad hasta el día 28 en refrigeración, pero cuando se lo congela ésta se pierde a los 21 días. El precipitado del tratamiento con sulfato de amonio, (pellet concentrado) tuvo una resistencia bastante similar al SLC el cual perdió la actividad a los 21 días.

La liofilización parece ser el sistema más eficiente de conservación pues la actividad antimicrobiana se mantiene estable por lo menos por 3 semanas. En este trabajo al liofilizado se lo estudió únicamente congelado y mostró que mantiene la actividad hasta los 21 días. En la liofilización, durante las fases de deshidratación primaria y secundaria los péptidos o proteínas sufren cambios físicos y químicos, como incremento de la concentración salina, agregación/precipitación, estrés físico, que producen alteraciones en su estructura y/o actividad. Adicionalmente, los péptidos o proteínas liofilizadas usualmente son muy higroscópicos, y tienen tendencia a absorber la humedad ambiental, lo que también ocasiona fenómenos de degradación y descenso de la actividad de dichos péptidos o proteínas (Webb y col., 2003).

Solubilidad del precipitado con sulfato de amonio a diferentes pH

Durante la resuspensión del precipitado de proteína en sulfato de amonio, ocurre que sólo un porcentaje de ese precipitado se resolubiliza. Esto implica el riesgo de perder una fracción importante de la actividad originalmente presente en el SLC (Cuadro IX). Por tal motivo y considerando la estabilidad que poseen muchas bacteriocinas a diferentes pH, decidimos explorar el uso de buffers con diferentes pH como forma de optimizar la extracción de la bacteriocina de ese pellet. Según los resultados obtenidos el precipitado mantiene la actividad luego de resuspenderlo en buffers pH 5.5, 7 y 10 mientras que a pH 2 la actividad se pierde, lo que coincide con los ensayos de desadsorción en los cuales no existía actividad a pH ácidos. En este sentido, el pH 5.5 sería el óptimo para solubilizar la bacteriocina ya que esta se encuentra más estable en el medio a un pH entre 5.5 y 6, según lo reportado por Olvera-García, (2015).

En resumen, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se podría afirmar que la bacteriocina en estudio no sería Nisina ya que el perfil de susceptibilidad enzimática es diferente con respecto al sobrenadante, es sensible a la temperatura y según los experimentos de sonicación de diferentes pH, presenta un mejor desempeño a pHs neutros (en contraposición con la nisina, que es más activa a pH bajo). Adicionalmente la bibliografía consultada, reporta bacteriocinas con similar comportamiento frente a enzimas proteolíticas, como es la bacteriocina LPBM103, producida por un *Lactococcus* y la planticina C quienes también pierden actividad antimicrobiana al calentarlas a una temperatura de 100°C durante 5 min.

Consideramos que la identificación de la sustancia en cuestión constituye un paso esencial para poder seguir avanzando en el proceso de generación de una herramienta con fines tecnológicos. Para eso, deberían utilizarse otras tecnologías disponibles que aborden el problema desde una perspectiva complementaria. En ese sentido, se proponen utilizar la espectrometría de masas para estudiar la identidad de los péptidos presentes en las fracciones con actividad obtenidos en la cromatografía de intercambio iónico o análisis de genómica o transcriptómica de *L. lactis* para conocer los genes presentes en la bacteria o los expresados por ella durante su crecimiento en MRS.

CONCLUSIONES

- La producción de bacteriocinas de *Lactococcus lactis* nativo fue menor a lo reportado en estudios anteriores, lo que podría deberse a un fenómeno de adsorción de la bacteriocina a la pared de la célula productora.
- El protocolo utilizado para optimizar la producción de bacteriocinas del cultivo (aumento de la biomasa) y para desadsorberla (sonicación) fue efectivo en cuanto al aumento de la actividad antimicrobiana con título suficiente para detectarla en los siguientes pasos de purificación.
- Con respecto a su comportamiento ante diferentes pHs (más activa a pH neutro) y por la sensibilidad frente a enzimas proteolíticas se concluye que la bacteriocina es un péptido con una identidad diferente a la de la nisina, aunque probablemente es un lantibiótico.
- El desarrollo de un protocolo para la purificación eficiente de bacteriocinas producidas por este microorganismo se vio dificultado debido a la pérdida de estabilidad de la misma a medida que avanzan los procesos de purificación.
- Los diferentes métodos de conservación mostraron que a lo largo del tiempo la bacteriocina contenida en el SLC, va perdiendo su actividad independientemente de la forma en que se la conserve (refrigerada, congelada o liofilizada), aunque con diferentes cinéticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmadova A, Todorov S, Choiset Y, Rabesona H, Mirhadi T , Kuliyeu A, Gombossy B, Chobert JM, Haertlé T.(2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control* 30: 631-641.
2. Aktypis, A.; Kalantzopoulos, G.; Huis in't Veld, J. H. J.; Ten Brink, B. (1998) Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 J. *Appl. Microbiol.*, 84: 568-576.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (2002) *Biología molecular de la célula*. 3ª ed. Barcelona, Omega, p176-218.
4. Alegría, A., Delgado, S., Rocas, C., López, B., Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International J. F. Microbiol.* 143: 61-66.
5. Alquicira Paez, L. (2006). Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK. Tesis de maestria. Iztapalapa, Mexico: Universidad Autónoma Metropolitana. 133p.
6. Arqués, J.L. (2003) Tratamientos Combinados de Bacteriocinas y otros Sistemas Inhibitorios para la mejora de la seguridad de los Productos Lácteos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 187p.
7. Ayad, E. (2009). Starter culture development for improving safety and quality of Domiati cheese. *Food Microbiology* 26: 533-541.
8. 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.
9. Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A., de Souza Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32(1):134-142.
10. Barrow, O. 1. (1963). The nature of inhibitory activity by *Staphylococcus aureus* type 71. *J. Gen. Microbiol.*, 32: 255-261.

11. Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2: 319-322.
12. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
13. Cardoso, María de las Mercedes Elisa. (2012) Caracterización y purificación parcial de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de *Enterococcus*. Tesis Universidad nacional del litoral. Facultad de Ingeniería y Química. Santa Fe, p272
14. Carro, S.; Zocche, F.; Jantzen, M.; Silveira, A.; Rosa, L.; Soares, G.; Da Silva, W. (2005) Actividad anti-*Listeria monocytogenes* de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos artesanales producidos en la región de Pelotas, R.S., Brasil. *Alimentaria* 361:73-76.
15. Carr, F., Chill, D., Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Review in Microbiology* 28:281-370.
16. Casaus, P. (1998) Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 363 p.
17. Castrillón Giraldo, G., y Cortés Ossa, Y. J. (2010). Elaboración del manual de buenas prácticas de manufactura y manual de control de calidad para la empresa CI Frude del municipio de Dosquebradas Risaralda. Tesis Universidad Tecnológica de Pereira, p176
18. Castro Albornoz, G., Valbuena Colmenares, E. (2009). Biopreservación: alternativa para mejorar la calidad de los quesos. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/121460574/Biopreservacion-alternativa-para-mejorar-la-calidad-de-los-quesos>. Fecha de consulta: 6 de julio de 2016.
19. Chen, H., Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2:82-100.
20. Choi, H.J.; Cheigh, C.I.; Kim, S.B.; Pyun, Y.R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 88: 563-571.

21. Cintas, L.M.; Casaus, P.; Havarstein, L.S.; Hernández, P.E.; Nes, I.F. (1997) Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2643-2648.
22. Cintas, L. M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I. F. , Hernández, P. E., (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *Food Science and Technology International*, 74:281- 305.
23. Cleveland, J., T. J. Montville, I.F Nes, M. L. Chikindas. (2001). Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71:1-20.
24. Concha, R., Farías, M., Kümmerlin, R., Sesma, F. (1999). Enterocina - 35, una Bacteriocina con Actividad sobre *Listeria monocytogenes*. Posible uso en la industria de alimentos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41:133- 138.
25. Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P., (2000). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews*, 3: 777-787.
26. Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3:777-788. Crow, V.; Curry, B.; Hayes, M. (2001) The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal* 11:275-283.
27. De Arauz, L. J., Jozala, A. F., Pinheiro, G. S., Mazzola, P. G., Pessoa, A., Vessoni, T. C., (2008). Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk whey medium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83:325-328.
28. Delves-Broughton, J., Thomas, L. V., Williams, G. (2006). Natamycin as an antimycotic preservative on cheese and fermented sausages. *Food Australia*, 58(1-2):19-21.
29. De Vuyst, L., Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13:194-199.
30. De Vuyst, L., Vandamme, E. J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. London, Blackie Academic & Professional 539p

31. Díaz Aldama, L. (2011). Efectos de agentes enológicos y pediocina PA-1 sobre las bacterias lácticas del vino. Tesis. Universidad de la Rioja. 76p
32. Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M., Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 564-582.
33. Ellison, J., Kauter, J. A. (1970). Purification and some properties of two bacteriocins. *J. Bacteriol.*, 14: 19-26.
34. Favaro, L.; Penna, A.L.B.; Todorov, S.D. (2015) Bacteriocinogenic LAB from cheeses Application in biopreservation. *Trends in Food Science & Technology* 41:37-48.
35. Fraga, M.; Perelmuter, K.; Delucchi, L.; Cidade, E.; Zunino, P. (2008) Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:71-78.
36. Fraga, M.; Perelmuter, K.; Giacman, S.; Zunino, P.; Carro, S. (2013) Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. *Food Science and Technology* 33:801-804.
37. Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J. (2005). Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure and mode of action. *Journal of Peptide Science*, 11: 688-696.
38. Garcia, M. Revah, S, Gomez, L (1998). Productos Lácteos. En: Garcia Garibay M., Quintero Ramirez R, Lopez-Munjuia Canales A. *Biología Alimentaria*. México, Limusa Noriega, pp 163-178.
39. García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology* 2: 373-382.
40. Garneau, S., Martin, NI, Vederas, JC (2002). Dos péptidos bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico. *Biochimie*, 84 (5): 577-592.
41. González B, Arca P, Mayo B, Suárez JE. (1994) Detection, Purification, and Partial Characterization of Plantaricin C, a Bacteriocin Produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain of Dairy Origin. *Appl Environ Microbiol.* 60 (6): 2158-2163.

42. González, P. A. L. (2002). Caracterización de una Bacteriocina producida por una bacteria Acido Láctica de carne envasada al vacío. Doctoral dissertation, Universidad Austral de Chile, 69p.
43. González Martínez, B. E., Gómez Treviño, M., Jiménez Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN Revista de Salud Pública y Nutrición*, 4(2). Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:GtCJkEWzbOQJ:www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=uy> Fecha de consulta 11 de julio de 2016.
44. González, A. (2012) *Lactococcus lactis* autóctono: efecto antilisterial y evaluación de propiedades sensoriales en quesos tipo cuartirolo. Tesis de grado, Facultad Veterinaria (UdelaR), 62p.
45. 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.
46. Heu S, Oh J, Kang Y, Ryu S, Cho S, Cho Y. (2001). Gly gene cloning and expression and purification of Glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *Glycines*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:4105-4110.
47. Holzapfel, W.H.; Geisen, R.; Schillinger, U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24:343-362.
48. Hurst, A. (1981) Nisin. En: Perlman, D, Laskin, A. I. *Advances in Applied Microbiology*". New York, Academic Press, pp. 85-123.
49. Jamuna, M., Jeevaratnam, K. (2004). Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *The Journal of G, A, M*, 50(2):79-90.
50. Jarvis, B., Jeffcoat, J., Cheeseman, G. (1968). Molecular weight distribution of nisin. *Biochemical Biophysiology Acta*, 168:153-155.
51. Joerger, R. D. (2003). Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages, *Poultry Science* 82: 640-647.
52. Juncioni de Arauz, L.; Faustino Jozala, A.; Gava Mazzola, P.; Vessoni Penna, T. (2009) Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology* 20:146-154.

53. 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.
54. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4529-4535.
55. Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., (2004). Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:2906e2911.
56. Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Review*, 12: 39-85.
57. Lai, A. C., Tran, S., Simmonds, R. S. (2002). Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 215:133-138
58. Lee. K. N , Paik. D.H. (2001) Partial characterization of lacticin NK 24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK 24 isolated from Joet-gal. *Food Microbiology*, 18: 17-24.
59. López, J. E., Ochoa Z., A., Anaya L., J. L., Martínez T., M., Medina M., E. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de C y F*, 39(3):49 57.
60. Lorenzo Gonzalo, Raffo Martin (2015) *Lactococcus lactis* nativo: caracterización de la producción de bacteriocinas, propiedades tecnológicas y efecto antimicrobiano sobre *Listeria innocua*. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria (UdelaR), 71p
61. Lozano, J. C. N., Meyer, J. N., Sletten, K., Peláz, C., Nes, I. F. (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Microbiology*, 138(9): 1985-1990.
62. Lugo Magaña O. (2013). Caracterización de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus helveticus*. Tesis, Universidad Autónoma Metropolitana 72p
63. Mahony, D. E. (1974). Bacteriocin susceptibility of *Clostridium peifringens*: a provisional typing schema. *Appl. Microbiol.*, 28: 172-176.

64. Martínez, B. (1996) Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: nisina z y lactococina 972. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, Asturias. 110p
65. Martin Katusic, A. (2002). Capacidad Antagonista frente a la *Listeria monocytogenes* de dos sustancias tipo Bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO₂. Chile: Universidad Austral De Chile. 90p
66. McAuliffe Olivia, Ryan. P. Maire, Ross R. Paul, Hill Colin, Breeuwer Pieter, Abee Tjakko. Lacticin 3147, (1998) Broad-Spectrum Bacteriocin Which Selectively Dissipates the Membrane Potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2): 439-445.
67. Medina, M., Gaya, P., Núñez, M. (1992). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas. *Revista Española de Lechería*. 34: 28-32
68. Ministerio de Salud Pública. (1994) Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N° 315/994 de fecha 05/07/1994. 2ª ed., Montevideo, IMPO. 454p.
69. Motta, A. S.; Cannavan, F. S.; Mui Tsai, S.; Brandelli, A. (2007) "Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin".. *Arch. Microbiol.*, 188: 367-375.
70. Motta, S. A., Brandelli, A. (2008). Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34. *World Journal of. Microbiology and Biotechnology* 24:641-646.
71. Mulders, J. W., Boerrigter, I. J., Siezen, J., R., Vos, M. W. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*, 201:581-584.
72. Muriana, P.M., Klaenhammer, T.R. (1991) Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:114- 121.
73. Nes IF, DB Diep, LS Havarstein, Mi Brurberg, V Eijsink and H Holo (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70 (2): 113-128
74. Nissen-Meyer Jon, Holo Helge, Haverstein Sigve Leiv, Sletten Knut, Nes Ingol. F. (1992). A novel Lactococcal Bacteriocin Whose Activity Depends on the Complementary Action of Two Peptides. *Journal of Bacteriology*, 174(17): 5686-5692.

75. Nissen-Meyer, J., Håvarstein, L.S. Holo, H. Sletten, K., Nes, I. F (1993). Association of the lactococcal A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 1503–1509.
76. Nowroozi J, Mirzaii M, Norouzi M (2012) Study of Lactobacillus as Probiotic Bacteria. *Iranian Journal Public Health* 33(2):1 -7.
77. O'keeffe, T., Hill, C. (1999). Potential in Food Preservation: Disponible en: <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/BACTERIOCINS.doc>
Fecha de consulta: 15 de junio de 2016.
78. O'Sullivan, L., Ryan, M. P., Ross, R. P., Hill, C. (2003). Generation of foodgrade lactococcal starters which produce the lantibiotics lacticin 3147 and lacticin 481. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 69: 3681-3685.
79. Olvera-García, M., Serrano, E., Quirasco, M. (2015). Detección de Proteínas con Actividad Antibacteriana Producidas por Bacterias Ácido Lácticas. *BioTecnología* 19(1): 25-43. Disponible en: Fecha de consulta: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2015_1/acidolacticas.pdf 11 de junio de 2016.
80. Oppegård, C., Fimland, G., Thorbæk, L., Nissen-Meyer, J. (2007). Analysis of the Two-Peptide Bacteriocins Lactococcalin G and Enterocin 1071 by Site-Directed Mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 73(9):293.
81. Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advance* 21: 465-499.
82. Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1). 93-105.
83. Parente E, Ricciardi A (1999) Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 628–638.
84. Perelmuter, K.; Fraga, M.; Zunino, P. (2008) In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *Applied Microbiology* 104:1718-1725
85. Perelmuter, K., Fraga, M., Acosta, Y., Giacaman, S., Calliari, A., Carro, S., Zunino, P., Bianchi, P. (2010) Aislamiento y caracterización de

bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas de la zona de Colonia, Uruguay, 11 Congreso Panamericano de la Leche, Belo Horizonte, Brasil.

86. Piard J.-C, Muriana P.M, Desmazeaud M.J, Klaenhammer T.R. (1992). Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(1):279-284.
87. Pingitore, E.V., Salvucci, E., Sesma, F., Nader-Macías, M.E. (2007). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). Disponible en: <http://www.formatex.org/microbio/pdf/pages557-568.pdf> Fecha de consulta: 11 de julio de 2016.
88. Prioult G, Turcotte C, Labarre L, Lacroix C, Fliss I. (2000) Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads . *International Dairy Journal*, 10: 627-633.
89. Ray, B., Daeschel, M. (1992). *Food biopreservatives of microbial origin*. CRC Press Inc.
90. Reyes Fernández Emilio, Cejudo Galván. Aurora (2010) Métodos para la cuantificación de proteínas. Disponible en: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>. Fecha de consulta: 11 de julio de 2016.
91. Riley M, Wertz J. (2005). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84(5-6):357-64.
92. Rilla, N., Martínez, D., Rodríguez, A. (2004). Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega l pitu Cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis lactis* IPLA 729. *Journal of Food Science*, 67:928-933.
93. Rodríguez, M.; Suárez, A.M.; Herranz Sorribes, C.; Martínez Corbacho, J.M.; Martínez Magro, M.I. (2000) Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. *Alimentaria* 314:59-66.

94. Rodríguez JM, Martínez MI, Kok J. (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42(2):91-121.
95. Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J.M., Nuñez, M., Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal* 15,:51-57.
96. Rodríguez Peña, J., Torres Lozano, L. M. (2006). Proyecto de grado. Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. Bogotá, Universidad de la Sabana. 76p
97. Ross, R. P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S. M., Ryan, M. P., Twomey, D. P., Hill, C. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and applications* (pp. 337-346). Springer Netherlands.
98. Schillinger, U., Lucke, F. (1991) El empleo de bacterias lácticas como cultivos protectores en productos cárnicos. *Fleischwirtsch.* 1:35-40.
99. Schneider, R. (2007). Aplicación de bacteriocinas en el control de contaminación de la carne. *Nacameh*, 1(1): 41 - 52.
100. Sierra Lopera, L. (2012). Evaluación de la preservación de extractos líquidos de café mediante el uso de bacteriocina (nisina) y aplicación de microondas Tesis. Universidad Nacional de Colombia 536p
101. Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 70: 331-345.
102. Stoffels, G.; Nes, I. F., Guthmundsdóttir, A. (1992) Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.*, 73: 309-316.
103. Suarez. M. Ana, Azcona. I. Juan, Rodríguez. M. Juan, Sanz Bernabe and Hernandez E. Pablo. (1997) One-Step Purification of Nisin A by Immunoaffinity Chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12): 4990-4992.
104. Svetoslav, T., Vaz-Velho, M. Gibbs, P. (2004) Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian J. Microbiol. a Microbiology*, 35:157-160.

105. Tagg, J. R., Dajani, A., Wannamaker, L. W. (1975). Bacteriocin of a group B *streptococcus* : partial purification and characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7: 764-772.
106. Taheri, P., Samadi, N., Ehsani, M. R., Khoshayand, M. R., Jamalifar, H. (2012). An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ST1 isolated from goat milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4):1452-1462.
107. Todorov, S. D.; Vaz-velho, M.; Gibbs, P. (2004). Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Braz. J. Microbiol.*, 35: 157-160.
108. Todorov, S.D.; Nyati, H.; Meincken, M.; Dicks, L.M.T. (2007). Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control*. 18: 656–664.
109. Todorov, S. D., Wachsman, M., Tomé, E., Dousset, X., Destro, M. T., Dicks, L. M. T., Drider, D. (2010). Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*, 27(7):869-879.
110. Trmcic, A., Obermajer, T., Rogelj, I., Bogovic Matijasic, B. (2008). Short communication: Culture-independent detection of lactic acid bacteria bacteriocin genes in two traditional Slovenian raw milk cheeses and their microbial consortia. *J. Dairy Sci.* 91: 4535-4541.
111. Vazquez, S.M., Suarez, H., Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1):64-71.
112. Venema, K., Venema, G., Kok, J. (1995). Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends in Microbiology* 3(8): 299-304.
113. Ward, C. V. (1991). Functional Anatomy of the Lower Back and Pelvis of the Miocene Hominoid "Proconsul Nyanzae" from Mfangano Island, Kenya (Doctoral dissertation). Tesis Facultada de Química, p76.
114. Wannun, P., Piwat, S., Teanpaisan, R. (2014). Purification and characterization of bacteriocin produced by oral *Lactobacillus paracasei* SD1. *Anaerobe*, 27: 17-21.

115. Waters, D. M., Mauch, A., Coffey, A., Arendt, E. K., Zannini, E. (2015). Lactic acid bacteria as a cell factory for the delivery of functional biomolecules and ingredients in cereal-based beverages: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(4):503-520.
116. Webb, S. D., Cleland, J. L., Carpenter, J. F., Randolph, T. W. (2003). Effects of annealing lyophilized and spray-lyophilized formulations of recombinant human interferon- γ . *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(4):715-729.
117. Willey JM, van der Donk WA. (2007) Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annu Rev Microbiol*, 61:477-501.
118. Yang, R.; Johnson, M. C., Ray, B. (1992), Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:3355-3359.
119. Yin, L., Wu , C., Jiang, S. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5):1146 - 1151.
120. Zapata, S., Munoz, J., Ruiz, O. S., Montoya, O. I., Gutierrez, P. A. (2009). Isolation of *Lactobacillus plantarum* LPBM10 and partial characterization of its bacteriocin. *Vitae*, 16(1):75-82
121. Zendo Takeshi, Fukao Masanori, Ueda Kyoko, Higuchi Tomoko, Nakayama Jiro, Sonomoto Kenji (2003). Identification of the Lantibiotic Nisin Q, a New Natural Nisin Variant Produced by *Lactococcus lactis* 61-14 Isolated from a River in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(7): 1616-1619.
122. Zendo Takeshi, Koga Shoko, Shigeri Yasushi, Nakayama Jiro and Sonomoto Kenji (2006). Lactococcin Q, a Novel Two-Peptide Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* QU. *Applied and Environmental Microbiology* 71(5): 3383-3389.