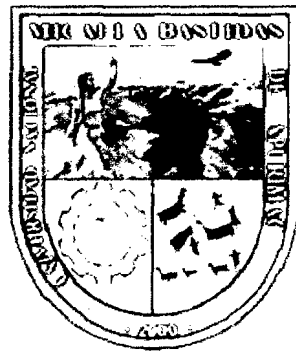


UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL



“PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINA UTILIZANDO COMO
SUSTRATO “CHICHA DE JORA” Y EVALUACIÓN DE SU
CAPACIDAD INHIBITORIA *in vitro* EN BACTERIAS
PATÓGENAS”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL

HUAMAN HUILLCA, Norma Silvia

Abancay, Diciembre del 2011



| | |
|---|-----------------------|
| UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC | |
| CÓDIGO | MFN |
| <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| | BIBLIOTECA CENTRAL |
| FECHA DE INGRESO: | 28 MAR 2012 |
| Nº DE INGRESO: | 00245 |



“Producción de bacteriocina utilizando como sustrato “chicha de jora” y evaluación de su capacidad inhibitoria *in vitro* en bacterias patógenas”



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

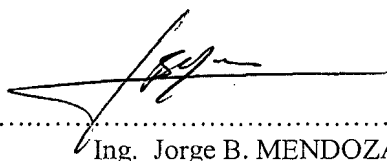
FACULTAD DE INGENIERIA

“Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac”

TITULO DE TESIS:

“Producción de bacteriocina utilizando como sustrato “chicha de jora” y evaluación de su capacidad inhibitoria *in vitro* en bacterias patógenas”

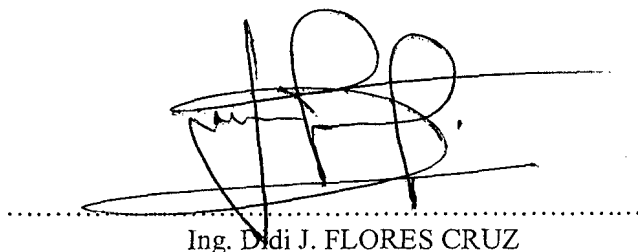
ASESOR:



.....
Ing. Jorge B. MENDOZA CACERES

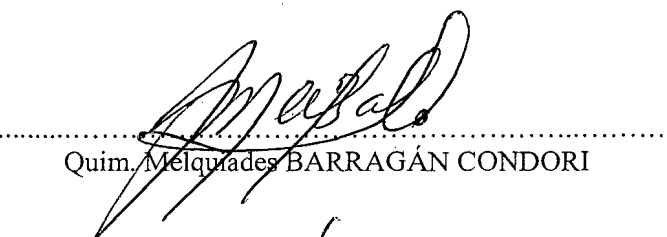
MIEMBROS DEL JURADO:

PRESIDENTE



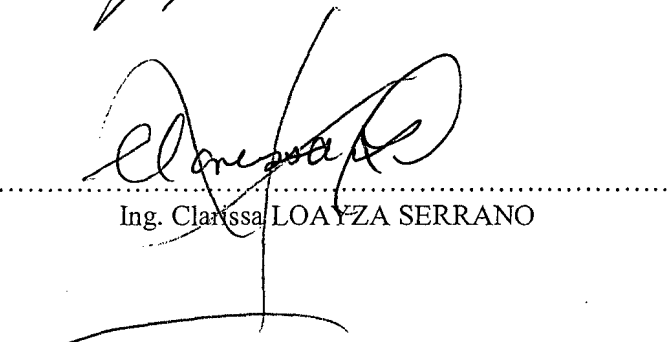
.....
Ing. Didi J. FLORES CRUZ

PRIMER MIEMBRO



.....
Quim. Melquades BARRAGÁN CONDORI

SEGUNDO MIEMBRO



.....
Ing. Clarissa LOAYZA SERRANO

RESUMEN

Las bacteriocinas son proteínas o péptidos bactericidas sintetizados en el ribosoma de las BAL, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma. El objetivo de la presente investigación fue, producir y purificar parcialmente la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* 32plp, utilizando como sustrato la chicha de jora, evaluación de su capacidad inhibitoria frente a los patógenos como: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. y la incidencia de los factores; siendo las variables: tratamiento térmico (pasteurización, esterilización), y dos temperaturas (25°C, 35°C) de fermentación eligiéndose los tratamientos más favorables para su actividad inhibitoria frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. Para la evaluación de la capacidad inhibitoria se utilizó el método de gota sobre césped (discos de sensibilidad), en agar nutritivo y caldo nutritivo para el crecimiento de los patógenos. La cepa *Lactobacillus plantarum* 32plp mostró un nivel de tolerancia de 4% (v/v) de etanol en sistema modelo (caldo Lactobacilli), siendo más del 50% del total de cepas toleraron dicha concentración. La cinética de crecimiento en la “chicha de jora” constituye una rica fuente para la producción de sustancias inhibitorias por *Lactobacillus plantarum* 32plp, adecuándose a un crecimiento de fase exponencial de 0.6 a 4.7×10^3 UFC/ml a partir de las 12 a 36 horas, finalizando con fase estacionaria y muerte a partir de 60 a 72 horas respectivamente, durante todo el proceso de fermentación existió una disminución de pH de 6.5 a 3.57 e incremento del ácido láctico de 0.21% a 0.8% promedio, para todos los tratamientos.



Los resultados indicaron que existe diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los factores evaluados, de los cuatro tratamientos, siendo el 3er tratamiento (tratamiento térmico de esterilizado, 25 °C de fermentación), como mejor tratamiento para inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus* a 48 horas de producida la bacteriocina con valores de inhibición promedio máximos de $2.25 \pm 0,29$ mm; a 60 horas de producida la bacteriocina inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* con valor de inhibición de $2.00 \pm 0,41$ mm y de 60 horas de producida la bacteriocina presenta acción inhibitoria frente a *Salmonella sp.*, con valores de inhibición de $2.69 \pm 0,38$ mm.

Se concluye que la bacteriocina cruda y parcialmente purificada producida por *L. plantarum 32plp* en sustrato de chicha de jora, posee capacidad inhibitoria frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.*, y la estabilidad de la bacteriocina a pH (4,0; 6,5; 9,0) favorecieron significativamente ($P < 0.05$) en el incremento del valor de inhibición frente a los patógenos antes mencionados, demostrándose que la sustancia inhibitoria no es ácido orgánico ni peróxido de hidrógeno al mantenerse estable frente a la acción de la catalasa y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de bacteriocina necesaria para inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* es de 1600 UA/ml y 800 UA/ml para *Salmonella sp.*

Palabras claves: Bacteriocina, Fermentación ácido-láctica, chicha de jora, CMI (concentración mínima inhibitoria), Cinética de crecimiento, *Lactobacillus plantarum 32plp*.



Abstract

The bacteriocins are proteins or peptides bactericides synthesized on the Ribosome in the BAL, producing cell synthesizes a molecule that immunizes it against the own bacteriocin. Production occurs naturally during the logarithmic phase of bacterial development or at the end of it. The objective of this research was, produce and partial purification of the bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 32plp, substrate using the chicha of jora, assessment of its inhibitory capacity against the pathogens as: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. and the impact of the factors; being the variables: heat treatment (pasteurisation, sterilization), and two (25 ° C, 35 C) temperatures of fermentation choosing treatments more favourable to its inhibitory activity against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. For the evaluation of the inhibitory capacity method of gout on grass (sensitivity discs), was used in nutrient agar and nutritious soup for the growth of pathogens. The strain *Lactobacillus plantarum* 32plp showed a level of tolerance of 4% (v/v) of ethanol in system model (stock Lactobacilli), being more than 50% of the total number of strains tolerated that concentration. Kinetics of growth in the "chicha of jora" is a rich source for the production of inhibitory substances by *Lactobacillus plantarum* 32plp, adapting to growth of exponential phase of 0.6 to 4.7 X 10³ UFC/ml from 12 to 36 hours, ending with stationary phase and death from 60 to 72 hours respectively, throughout the fermentation process there was a decrease in pH of 6.5 to 3.57 and increase of lactic acid of 0.21% to 0.8% average for all treatments.



Results indicated that there is significant differences ($P < 0.05$) between the evaluated factors of four treatments, being the 3rd treatment (heat treatment of sterilized, 25 ° C fermentation), as better treatment to inhibit the growth of *Bacillus cereus* to 48 hours of produced the bacteriocin with maximum average inhibition values of 2.25 ± 0.29 mm; to 60 hours of produced the bacteriocin inhibits the growth of *Staphylococcus aureus* with inhibition of 2.00 value $\pm 0, 41$ mm and 60 hours of produced the bacteriocin presents an inhibitory action against *Salmonella* sp., with values of inhibition of $2.69 \pm 0, 38$ mm.

Concludes that the crude and partially purified bacteriocin produced by *L. plantarum* 32plp in substrate of “chicha of jora”, possesses inhibitory ability against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp., and the stability of the bacteriocin to pH (4,0; 6,5 and 9,0) favored significantly ($P < 0.05$) in the increase of the value of inhibition against the above-mentioned pathogens, demonstrating that the inhibitory substance is not organic acid or hydrogen peroxide by remaining stable against the action of catalase and concentration minimum inhibitory (CMI) necessary bacteriocin to inhibit the growth of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* is 1600 UA/ml and 800 au/ml for *Salmonella* sp.

Keywords: Bacteriocin, fermentation acid-lactic, chicha of jora, CMI (concentration minimum inhibitory), kinetic for growth, *Lactobacillus plantarum* 32plp.



DEDICATORIA

A mi familia por su apoyo incondicional durante mis estudios, a Dios por darme la fuerza necesaria para seguir adelante gracias por apoyarme en todos los momentos.

Norma Silvia



AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, Ing. Jorge B. Mendoza Cáceres, M.Sc. Victor H. Sarmiento Casavilca, por su atinada dirección y por haberme brindado las facilidades técnicas, el apoyo constante y el seguimiento permanente, sin los cuales no hubiera sido posible el desarrollo de esta Tesis.

A los distinguidos docentes, Presidente Ing. Didi J. Flores Cruz y miembros del Jurado evaluador Quim. Melquiades Barragán Condori, Ing. Clarissa Serrano Loayza, quienes con sus acertadas sugerencias ayudaron a enriquecer el contenido de la presente Tesis y por su comprensión.

A la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, y en ella a sus abnegados docentes, cada uno de los cuales deja en mi persona un imborrable recuerdo. A la Blga. Elena Gonzalez, Gladys Castro, al Ing. Justo, Ing. Abdeli, Ing. Fulgencio Ing. José; porque aprendí mucho de ellos, por su apoyo y consejos muchas Gracias.

A mis padres, Maria y Antonio; hermanos, mis abuelos, a mis tios , que día a día me dieron fortaleza, amor, comprensión y apoyo, porque estuvieron siempre a mi lado y me enseñaron que no debo rendirme ante los tropiezos , equivocaciones y puedo dar lo mejor de mi



A mis amigos, quienes me apoyaron y compartieron la felicidad de un nuevo triunfo. Esto es para ellos, Verito, Lady, Isaac, Alex, Marco, Edwin, porque confiaron en mí a pesar de mis dudas y temores, y porque estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos y siempre he contado con Uds.

A todos aquellos que no he mencionado pero que no he olvidado y que tuvieron una parte importante en este trabajo. Y sobre todo a Dios, Gracias, por permitirme terminar una etapa más en mi vida profesional.

A todos ellos....Muchas Gracias.



INDICE

| | Pág. |
|--|------|
| CAPITULO I: INTRODUCCION | 1 |
| Objetivo general | 3 |
| Objetivos específicos | 5 |
| CAPITULO II: MARCO TEORICO | 5 |
| 2.1. Chicha de jora. | 5 |
| 2.2. Análisis Fisicoquímico de la chicha de jora | 7 |
| 2.3. Análisis microbiológico de la chicha de jora | 8 |
| 2.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 10 |
| 2.4. Bioconservación | 11 |
| 2.5. Bacterias ácido Lácticas | 11 |
| 2.5.1. Características de las bacterias ácido lácticas | 12 |
| 2.5.2. Metabolitos y mecanismos de inhibición microbiana | 14 |
| 2.5.3. Cinética de crecimiento microbiano | 15 |
| 2.5.4. Fases de crecimiento microbiano | 18 |
| 2.5.5. <i>Lactobacillus plantarum</i> | 20 |
| 2.5.6. Componentes antimicrobianos producidos por <i>L. plantarum</i> | 22 |
| 2.6. Bacteriocinas | 22 |
| 2.6.1. Características generales | 23 |
| 2.6.2. Diferencia entre bacteriocinas y antibióticos | 25 |
| 2.7. Clasificación de las bacteriocinas | 27 |
| 2.7.1. Bacteriocinas representativas | 28 |
| 2.8. Biosíntesis y Producción óptima de bacteriocinas | 30 |
| 2.9. Mecanismo de acción de las bacteriocinas | 32 |
| 2.10. Propiedades bioquímicas | 36 |
| 2.11. Factores que limitan la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos | 37 |
| 2.12. Métodos de identificación de bacteriocinas | 39 |
| 2.13. Purificación de las bacteriocinas | 39 |
| 2.14. Técnicas de purificación | 40 |



| | |
|--|----|
| 2.15. Acción inhibitoria de las bacteriocinas | 41 |
| 2.15.1. Determinación de la CMB y CMI | 42 |
| 2.16. Aplicaciones en la industria alimentaria | 43 |
| 2.17. Investigación en el campo de las bacteriocinas | 44 |
| 2.18. Importancia de las bacteriocinas en la industria alimentaria | 45 |
| 2.19. Patógenos bacterianos asociados a los alimentos | 46 |
| 2.19.1. <i>Salmonella</i> sp. | 47 |
| 2.19.2. <i>Bacillus cereus</i> | 47 |
| 2.19.3. <i>Staphylococcus aureus</i> | 48 |
| CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS | |
| 3.1. Lugar de ejecución | 50 |
| 3.2. Activación y conservación de las cepas | 50 |
| 3.3. Sustrato empleado | 51 |
| 3.4. Metodología (etapas de la investigación) | 51 |
| Etapa I. Identificación morfológica de levaduras predominantes en la chicha de jora, aislamiento de cepas bacterianas patógenas procedentes de alimentos | |
| a. Características generales para la Identificación de levaduras | 52 |
| b. Aislamiento y mantenimiento de cepas bacterianas | 53 |
| c. Medios de cultivo, materiales, equipos y reactivos | 57 |
| Etapa II. Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> 32plp | |
| a. Tolerancia al etanol de <i>Lactobacillus plantarum</i> | 58 |
| b. Equipos y materiales | 59 |
| Etapa III. Producción de bacteriocina por <i>Lactobacillus plantarum</i> 32plp | |
| a. Preparación del sustrato (chicha de jora) | 60 |
| b. Propagación de inóculo (<i>Lactobacillus plantarum</i> 32plp) | 61 |
| c. Proceso de fermentación para la producción de bacteriocina | 62 |
| d. Purificación parcial de las bacteriocinas | 63 |
| e. Equipos y materiales | 66 |
| Etapa IV. Determinación de la actividad inhibitoria de la bacteriocina | |
| a. Siembra en placas de las bacterias patógenas | 68 |



| | |
|---|-----|
| b. Preparación de los discos de sensibilidad | 68 |
| c. Aplicación de los discos de sensibilidad | 68 |
| d. Medida de las zonas de inhibición | 69 |
| e. Determinación de la concentración inhibitoria mínima | 69 |
| f. Equipos y materiales | 70 |
| Etapa V. Evaluación fisicoquímica de la bacteriocina producida | |
| a. Sensibilidad a catalasa | 71 |
| b. Estabilidad a diferentes pH | 72 |
| 3.5. Análisis estadístico | 72 |
| CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION | |
| 4.1. Características para la Identificación de levaduras y cepas bacterianas | 73 |
| 4.1.1. Observación macroscópica de las colonias | 73 |
| 4.1.2. Observación microscópica de las colonias (Tinción simple) | 75 |
| 4.1.3. Aislamiento de <i>Bacillus cereus</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> | 78 |
| 4.1.4. Observación microscópica de las colonias (Tinción Gram) | 78 |
| 4.2. Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum 32plp</i> | 80 |
| 4.3. Tolerancia al etanol de <i>Lactobacillus plantarum</i> | 83 |
| 4.3.1. Crecimiento de la cepa | 83 |
| 4.3.2. Máxima población relativa y nivel de tolerancia | 84 |
| 4.3.3. Valor de inhibición de <i>L. plantarum 32plp</i> a diferentes concentraciones de etanol frente a <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> sp. | 87 |
| 4.4. Producción de bacteriocina por <i>L. plantarum 32plp</i> en chicha de jora | 89 |
| Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum 32plp</i> en chicha de jora | 89 |
| 1 ^{er} TRATAMIENTO | 90 |
| 2 ^{do} TRATAMIENTO | 92 |
| 3 ^{er} TRATAMIENTO | 94 |
| 4 ^{to} TRATAMIENTO | 96 |
| 4.5. Variación del pH de la chicha de jora durante la fermentación | 101 |
| 4.6. Porcentaje de Acidez (ácido láctico) | 102 |
| 4.7. Comportamiento de la D.O. durante la fermentación | 103 |



| | |
|--|-----|
| 4.8. Purificación parcial de bacteriocina de <i>L. plantarum 32plp</i> en chicha de jora | 104 |
| 4.9. Evaluación fisicoquímica de la bacteriocina | 107 |
| 4.9.1. Sensibilidad a catalasa | 107 |
| 4.9.2. Estabilidad a diferentes pH | 109 |
| 4.10. Concentración Mínima Inhibitoria | 113 |
| 4.11. Resumen del análisis estadístico | 114 |
| CAPITULO V: CONCLUSIONES | 127 |
| CAPITULO V: RECOMENDACIONES | 130 |
| BIBLIOGRAFÍA | 131 |
| ANEXOS | 132 |



Índice de Cuadros

| | | Pág. |
|------------|--|------|
| Cuadro 01: | Fórmulas de elaboración de algunas variedades de chicha de jora que se consumen en el Perú..... | 6 |
| Cuadro 02: | Determinación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la “chicha”..... | 8 |
| Cuadro 03: | Porcentaje de levaduras aisladas de “chicha de jora” de Apurímac y Lambayeque..... | 9 |
| Cuadro 04: | Características del género <i>Lactobacillus</i> | 14 |
| Cuadro 05: | Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular obtenidos a partir de bacterias lácticas..... | 15 |
| Cuadro 06: | Clasificación científica de <i>Lactobacillus plantarum</i> | 22 |
| Cuadro 07: | Principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos..... | 26 |
| Cuadro 08: | Clasificación de las bacteriocinas..... | 28 |
| Cuadro 10: | Aislamiento de cepas utilizadas..... | 53 |
| Cuadro 11: | Preparación de medios de cultivo..... | 57 |
| Cuadro 12: | Composición del medio para la fermentación por tratamiento..... | 61 |
| Cuadro 13: | Características generales para la Identificación de levaduras como colonias predominantes en la microflora de la chicha de jora..... | 74 |
| Cuadro 14: | Características generales para la Identificación de cepas bacterianas..... | 78 |
| Cuadro 15: | Características como resultado de las pruebas presuntivas realizadas para la Identificación de <i>Bacillus cereus</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> | 79 |
| Cuadro 16: | Características microscópicas realizadas para la Identificación de cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> y cepas sensibles..... | 80 |
| Cuadro 17: | Calculo de los máximas poblaciones relativas y determinación del nivel de tolerancia de etanol para <i>Lactobacillus plantarum 32plp</i> | 87 |



| | | |
|------------|---|-----|
| Cuadro 18: | Producción de bacteriocina en la fase de crecimiento de <i>L. plantarum 32plp</i> en chicha de jora para el primer tratamiento y el efecto de inhibición frente a 3 patógenos..... | 92 |
| Cuadro 19: | Producción de bacteriocina en la fase de crecimiento de <i>L. plantarum 32plp</i> en chicha de jora para el segundo tratamiento y el efecto de inhibición frente a 3 patógenos..... | 94 |
| Cuadro 20: | Producción de bacteriocina en la fase de crecimiento de <i>L. plantarum 32plp</i> en chicha de jora para el tercer tratamiento y el efecto de inhibición frente a 3 patógenos..... | 96 |
| Cuadro 21: | Producción de bacteriocina en la fase de crecimiento de <i>L. plantarum 32plp</i> en chicha de jora para el cuarto tratamiento y el efecto de inhibición frente a 3 patógenos..... | 98 |
| Cuadro 22: | Resumen de los valores máximos de inhibición de la bacteriocina producida por <i>L. plantarum 32plp</i> en chicha de jora, frente a <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Bacillus cereus</i> | 99 |
| Cuadro 23: | Resumen de los valores ANOVA, de los valores de inhibición frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella sp.</i> y <i>Bacillus cereus</i> en caldo Lactobacilli y chicha de jora..... | 118 |
| Cuadro 24: | Resumen de los valores ANOVA, de los valores de inhibición frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella sp.</i> y <i>Bacillus cereus</i> | 119 |
| Cuadro 25: | Suma de Cuadrados Tipo III, de los valores de inhibición frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella sp.</i> y <i>Bacillus cereus</i> | 120 |
| Cuadro 26: | Resumen de los valores máximos de inhibición de la bacteriocina producida por <i>L. plantarum 32plp</i> en chicha de jora, con factores óptimos, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella sp.</i> y <i>Bacillus cereus</i> | 125 |



Índice de Tablas

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 01: Frecuencias de las muestras de chicha de jora en función de la acidez | 7 |
| Tabla 02: Frecuencias de las muestras de chicha de jora en función del pH | 7 |

Índice de Figuras

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 01: Frecuencia de especies de <i>Lactobacillus</i> de chicha de jora aisladas de Lambayeque..... | 10 |
| Figura 02: Rutas de fermentación de azúcares por bacterias lácticas..... | 13 |
| Figura 03: Representación gráfica teórica del incremento de la masa celular de los cultivos en función del tiempo de incubación..... | 16 |
| Figura 04. Representación gráfica de las fases de incremento de la masa celular de los cultivos en función del tiempo de incubación..... | 20 |
| Figura 05. Mecanismo de acción de las bacteriocinas por la formación de poros en la membrana bacteriana..... | 34 |
| Figura 06: Diagrama de flujo para la obtención de bacteriocinas chicha de jora.... | 63 |
| Figura 07: Vista macroscópica de levaduras en Agar YGC..... | 74 |
| Figura 08: Aspecto microscópico de levaduras, presentan células de forma esférica..... | 75 |
| Figura 09: Aspecto microscópico de levaduras, presentan células de forma de salchicha..... | 76 |
| Figura 10: Aspecto microscópico de levaduras, presentan forma esférica..... | 76 |
| Figura 11: Aspecto microscópico de levaduras, de forma ovalada..... | 76 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 12: | Características microscópicas de bacterias patógenas: A. <i>Bacillus cereus</i> , B. <i>Staphylococcus aureus</i> , C. <i>Salmonella</i> | 80 |
| Figura 13: | Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> en caldo Lactobacilli..... | 81 |
| Figura 14: | Formación de halos de inhibición de la bacteriocina producida por <i>Lactobacillus plantarum</i> en caldo Lactobacilli frente a tres tipos de patógenos..... | 83 |
| Figura 15: | Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> a diferentes concentraciones de etanol. (Densidad óptica cte. = 560 nm)..... | 85 |
| Figura 16: | Máxima población relativa en el crecimiento de <i>L. plantarum 32plp</i> a diferentes concentraciones de etanol..... | 86 |
| Figura 17: | Formación de halos de inhibición de la bacteriocina producida por <i>Lactobacillus plantarum</i> a 4% de etanol frente a tres tipos de patógenos. | 88 |
| Figura 18: | Formación de halos de inhibición de la bacteriocina producida por <i>Lactobacillus plantarum</i> a 8% de etanol frente a tres tipos de patógenos. | 89 |
| Figura 19: | Recuentos (UFC/ml) de <i>Lactobacillus plantarum 32plp</i> en chicha de jora durante el tiempo de fermentación para 4 tratamientos..... | 91 |
| Figura 20: | Valor de inhibición de la bacteriocina producida frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Bacillus cereus</i> para el 1er tratamiento..... | 93 |
| Figura 21: | Valor de inhibición de la bacteriocina producida frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Bacillus cereus</i> para el 2do tratamiento..... | 95 |
| Figura 22: | Valor de inhibición de la bacteriocina producida frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Bacillus cereus</i> para el 3er tratamiento..... | 97 |
| Figura 23: | Valor de inhibición de la bacteriocina producida frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Bacillus cereus</i> para el 4to tratamiento..... | 99 |
| Figura 24: | Variación del pH de la chicha de jora inoculado con <i>L. plantarum 32plp</i> para los 4 tratamientos con respecto a tiempo..... | 102 |



| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 25: | Comportamiento de la acidez titulable a lo largo del periodo de fermentación de la chicha de jora inoculado con <i>L. plantarum 32plp</i> para los 4 tratamientos..... | 103 |
| Figura 26: | Comportamiento de D.O. a lo largo del periodo de fermentación de la chicha de jora inoculado con <i>L. plantarum 32plp</i> para los 4 tratamientos.... | 104 |
| Figura 27: | Valor de inhibición de la bacteriocina parcialmente purificada frente a <i>Staphylococcus aureus</i> para los 4 tratamientos durante el tiempo de fermentación..... | 105 |
| Figura 28: | Valor de inhibición de la bacteriocina parcialmente purificada frente a <i>Salmonella</i> para los 4 tratamientos durante el tiempo de fermentación..... | 106 |
| Figura 29: | Sensibilidad a la catalasa (peróxido de hidrogeno) de la bacteriocina producida por <i>L. plantarum</i> y evaluación sobre <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> mediante los halos de Inhibición..... | 108 |
| Figura 30: | Sensibilidad a la catalasa (peróxido de hidrogeno) de la bacteriocina producida por <i>L. plantarum</i> y evaluación sobre <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> mediante los halos de Inhibición..... | 109 |
| Figura 32: | Estabilidad de la bacteriocina en diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0), evaluadas frente a <i>Bacillus cereus</i> , para el 1er y 3er tratamiento, probados mediante los halos de inhibición..... | 111 |
| Figura 33: | Estabilidad de la bacteriocina en diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0), evaluadas frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , para el 1er y 3er tratamiento, probados mediante los halos de inhibición..... | 112 |
| Figura 34: | Estabilidad de la bacteriocina en diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0), evaluadas frente a <i>Salmonella sp.</i> , para el 1er y 3er tratamiento, probados mediante los halos de inhibición..... | 113 |
| Fig. 35: | Concentración mínima inhibitoria para inhibir <i>Bacillus cereus</i> trabajándose a 25°C de fermentación..... | 115 |
| Fig. 36: | Concentración mínima inhibitoria para inhibir <i>Bacillus cereus</i> trabajándose a 35°C de fermentación..... | 115 |



| | | |
|----------|---|-----|
| Fig. 37: | Concentración mínima inhibitoria para inhibir <i>Staphylococcus aureus</i> trabajándose a 25°C de fermentación..... | 116 |
| Fig. 38: | Concentración mínima inhibitoria para inhibir <i>Staphylococcus aureus</i> a 35°C de fermentación..... | 116 |
| Fig. 39: | Concentración mínima inhibitoria para inhibir <i>Salmonella</i> trabajándose a 25°C de fermentación..... | 117 |
| Fig. 40: | Concentración mínima inhibitoria para inhibir <i>Salmonella</i> trabajándose a 35°C de fermentación..... | 117 |



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La contaminación alimentaria por microorganismos patógenos conlleva al deterioro de los alimentos y por ende la mayoría de las intoxicaciones alimentarias. Entre los patógenos que frecuentemente causan estas alteraciones se encuentran *Staphylococcus aureus* el cual puede crecer en un amplio rango de condiciones ambientales y es un contaminante frecuente de alimentos. Otros patógenos asociados se encuentran *Bacillus cereus* y *Salmonella* sp.. Actualmente la tendencia por consumir alimentos sin conservantes químicos, hace la necesidad de buscar nuevas alternativas de conservación.

La biopreservación es un método de conservación que ofrece diversas condiciones para extender la vida útil y aumentar la seguridad de los alimentos, por medio del uso de las Bacterias Acido Lácticas (BAL) y sus productos antibacteriales. Las bacteriocinas (sustancias antimicrobianas), están siendo ampliamente utilizadas como sustituto potencial de conservantes químicos, ya que son producidas por bacterias consideradas benéficas para la salud pública. Estos compuestos purificados o semipurificados pueden ser utilizados como biopreservantes para la reducción o eliminación de ciertos microorganismos patógenos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., que en su mayoría se encuentran en los alimentos.



Se han realizado diferentes estudios que demuestran la efectividad de las bacteriocinas provenientes de BAL contra cepas patógenas antes mencionadas. Por ejemplo, plantaricina C producida por *Lactobacillus plantarum* aislada de productos lácteos, presenta actividad contra especies de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., pero no es activa contra *Listeria innocua*. Otra cepa de *Lactobacillus plantarum* aislada de aceitunas verdes fermentadas producen plantaricinas S y T que tienen acción contra bacterias Gram positivas incluyendo clostridios y propionibacterias (Delgado, *et al.*, 2005)

Sin embargo, no se han encontrado estudios de inhibición *in vitro*, donde se emplee bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum 32plp* utilizando como sustrato chicha de jora como también estudios de la influencia de diversos factores como: acondicionamiento del sustrato (pasteurización, esterilización), condiciones de fermentación (temperatura, tiempo), contra cepas patógenas antes mencionadas y aisladas de la superficie de diversos alimentos.

Por otro lado en la región de Apurímac la actividad económica de elaboración y comercio artesanal de la chicha de jora (bebida fermentada a partir del maíz germinado) ha ido disminuyendo a este mismo hecho se suma que la chicha de jora al ser elaborada artesanalmente no cuenta con parámetros de fermentación, siendo una bebida que continúa en proceso de fermentación,



degenerándose su valor sensorial hasta el punto de que ya no es agradable su consumo derivándose a veces para uso en cocina y generalmente a ser desechado, siendo otro problema que hace que esta bebida oriunda se esté olvidando con el pasar el tiempo. Por esta razón la investigación se ha enfocado en un objetivo general:

- Producción y purificación parcial de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum 32plp*, utilizando como sustrato chicha de jora y evaluación de su capacidad inhibitoria *in vitro* sobre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp.

Formulándose objetivos específicos que conllevan a la investigación realizada.

1. Evaluación morfológica de levaduras predominantes en la flora microbiana de la chicha de jora.
2. Determinar la cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum 32plp* en sistema modelo (caldo Lactobacilli) y sustrato (chicha de jora).
3. Determinación del nivel de tolerancia de *Lactobacillus plantarum 32plp* a diferentes concentraciones de etanol.



4. Evaluación de la influencia del tipo de tratamiento térmico (pasteurización o esterilización), temperatura y tiempo de fermentación de la chicha de jora en la producción de bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum 32plp*.
5. Evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* de la bacteriocina cruda y parcialmente purificada frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* mediante el valor de inhibición.
6. Evaluación de la estabilidad a diferentes pH de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum 32plp* y verificar el efecto de la acción de la catalasa sobre la bacteriocina producida.
7. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro*, de bacteriocina producida para inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*

CAPÍTULO II: MARCO TEORICO

2.1. Chicha de jora.

Se denomina chicha de jora, según Vásquez (1927), a la bebida alcohólica obtenida por fermentación, de la materia azucarada contenida en el maíz malteado. Por otro lado para Simunovic (1999), define a la chicha de jora como la bebida “suigeneris”, que no ha completado su fermentación, muy dulce. Consecuentemente a esta bebida Ulloa y Herrera (1976), menciona que esta bebida se llama tesgüino, o tejuino, es una bebida alcohólica semejante a la cerveza, por ser preparada de granos germinados de un cereal, son de maíz y no de cebada. Algunos de los métodos artesanales empleados se encuentran en el cuadro 01.

En cuanto al tiempo de duración de la fermentación, Viñas (1956) señala que va de 48 horas a 15 días, llegando a casos como la chicha producida en Piura, cuyo proceso de fermentación dura aproximadamente 10 meses a más.

La investigación realizada en la fermentación natural de chicha de jora de maíz Alazán en condiciones no controladas, tuvo una duración de aproximadamente 3 días y se puede apreciar el sabor agrídulce que aparece a las 48 horas, llegando a las 96 horas a su sabor característico conocido como chicha fuerte. (Viñas, 1956)

Cuadro 01: Fórmulas de elaboración de algunas variedades de chicha de jora que se consumen en el Perú.

| PROCEDENCIA (Ciudad de Perú) | DESCRIPCIÓN (Apariencia) | COMPONENTES (Ingredientes) | COCCIÓN (Tiempo) | FERMENTACIÓN (Tiempo) |
|---------------------------------|---|--|---------------------|--------------------------------|
| Chiclayo | Pardo claro Con sedimento (Color) | 50 lb jora. 1 pata de toro. 50 lb Azúcar. 20 GAL agua. | 24 horas | 8 días |
| Catacaos | Pardo claro | ----- | 10-12 horas | 10 meses |
| Cajabamba | Pardo Claro Turbia | 5 lb Jora 15 lb de agua 0.5 arroba de chancaca | 9-10 horas | a)10-12 horas b)18-20 horas |
| Trujillo | Pardo Claro turbia | 50 L agua 36 Kg. Chancaca | 6-8 horas | 1-2 días |
| Huánuco | Pardo claro con sedimento | 10 Kg. Jora 2 patas de res 4 Kg. de cebada 100 L agua Azúcar | 24 horas | 1 día |
| Juliaca | Pardo claro turbia | 1 Kg. Jora 15 lb de chancaca 30 L agua | 1 día 6-8 horas | 15 días |
| Usquil (Trujillo) | Pardo claro turbia | 1/2 lb Jora 15 lb chancaca 30 L agua | 6-8horas | 15 días |
| Piura | Pardo claro turbia | 15 L agua 4 lb Jora 2 lb chancaca | 24 horas | 3 días |

Fuente: Viñas *et al.*, (1958).

2.2. Análisis Fisicoquímico de la chicha de jora.

El comportamiento de algunos parámetros como acidez fija, sólidos totales, y un valor de 9% de alcohol en volumen a 92 horas. Además se encontraron valores para la acidez como se puede ver en la tabla 01. El pH se encuentra en la tabla 02, los valores se encuentran más uniformes.

Tabla 01: Frecuencias de muestras de chicha de jora en función de la acidez.

| ACIDEZ (% de ácido láctico) | NUMERO DE MUESTRAS | % |
|--------------------------------|-----------------------|----|
| 0.48 – 3.97 | 34 | 79 |
| 3.48 – 7.47 | 7 | 17 |
| 7.48 – 10.97 | 0 | 0 |
| 10.98 – 14.7 | 1 | 2 |
| 14.47 – 17.38 | 1 | 2 |

Fuente: Manrique, (1978).

Tabla 02: Frecuencias de las muestras de chicha de jora en función del pH.

| pH | NUMERO DE MUESTRAS | % |
|-----------|-----------------------|----|
| 3.5 – 3.8 | 9 | 21 |
| 3.9 – 4.2 | 8 | 19 |
| 4.3 – 4.6 | 13 | 30 |
| 4.7 – 5.0 | 9 | 21 |
| 5.1 – 5.4 | 4 | 3 |

Fuente: Manrique, (1978).

Por otro lado se realizó un estudio (Beltrán, *et al.*, 2006), en donde se caracterizó la chicha a nivel físico-químico y microbiológico, obteniendo los resultados mencionados en el cuadro 02.

Cuadro 02: Determinación de los parámetros físicoquímicos y microbiológicos de la “chicha”.

| Parámetro | Valor encontrado | | Observaciones |
|-----------------------------|--|------|---|
| NMP Coliformes fecales | <3 | | Indican que el proceso de fermentación inhibe el crecimiento bacteriano, el proceso se realiza bajo condiciones de calidad y BPM. |
| Salmonella sp. | Negativo | | |
| Recuento de Bacillus Cereus | < 100 | | Materias primas (maíz) libres de contaminación. |
| Recuento de mohos | < 1000 | | Indican que los mohos son menos exigentes que las bacterias, crecen en lugares muy húmedos y oscuros y se favorecen por la acidez propia de la bebida. Se recomienda utilizar sustancias químicas que inhiban su crecimiento y mejorar las condiciones de almacenamiento final. |
| Físicoquímicos | pH | 3.44 | Se obtiene luego de 15 días de fermentación. |
| | %Acidez | 3.35 | |
| | °Brix | 3.37 | |
| Tiempo de vida útil | 10 días luego de lograda la fermentación | | |

Fuente: Beltrán, (2006).

2.3. Análisis microbiológico de la chicha de jora.

En esta bebida se han encontrado, *Lactobacillus sp.*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, entre otros. (Sedano, 2006).

Este tipo de flora favorece la degradación del almidón, produce fermentación alcohólica, además de favorecer la textura del producto y brindarle las



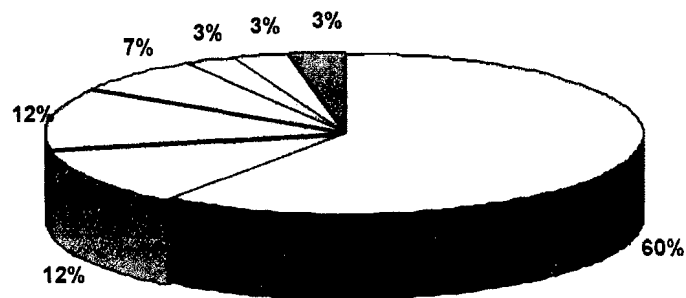
características organolépticas típicas del producto. (Aidoo, *et al.*, 2006) (Schwan, *et al.*, 2007) (Shrestha, *et al.*, 2002).

Sin embargo, a través de sus investigaciones Quillama, (1993); Quillama *et al.*, (1995) han logrado comprobar que durante la fermentación de “chicha de jora” procedentes de Chalhuanca (Apurímac) e Illimo y Mórrope (Lambayeque) intervienen levaduras y bacterias lácticas nativas, predominando las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum*, las mismas que se muestran en la cuadro 03 y figura 01.

Cuadro 03: Porcentaje de levaduras aisladas de “chicha de jora”. de Apurímac y Lambayeque.

| Nº de cepas | Agente | Porcentaje (%) |
|-------------|---|----------------|
| 40 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Serotipo Iab. Patrón Antigénico 1, 18, 18 ^a , p. | 24 |
| 51 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no serotipadas | 31 |
| 6 | <i>Saccharomyces</i> sp | 4 |
| 20 | <i>Hansenula anomala</i> | 12 |
| 10 | <i>Candida glabrata</i> Patrón antigénico 1, 4, 6, 34. | 6 |
| 16 | <i>Candida</i> sp | 10 |
| 5 | <i>Pichia</i> sp | 3 |
| 5 | <i>Kloekera</i> sp | 3 |
| 2 | <i>Brettanomyces</i> sp. | 1 |
| 10 | Levaduras no identificadas | 6 |

Fuente: Quillama, *et al.*, (1995)



- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus maltaromicus*
- *Lactobacillus buchneri*
- *Lactobacillus brevis*
- *Lactobacillus fermentum*
- *Lactobacillus delbrueckii*

Figura 01: Frecuencia de especies de *Lactobacillus* de chicha de jora aisladas de Lambayeque. (Quillama, E. 1993, Quillama *et al.*, 1995)

2.3.1. *Saccharomyces cerevisiae*

El género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas. (Dujon, 1996).

Son hongos unicelulares pertenecientes en su mayor parte al grupo de los Ascomicetos, vistas al microscopio las distintas especies presentan formas muy variadas. Las hay elípticas (con forma de huevo) como las especies del género *Saccharomyces*; esféricas como *Torula*; alargadas como *Torulopsis stellata* y apiculadas (con forma de limón) como *Hanseniaspora* (Peynaud, 1989); se pueden encontrar en agrupaciones de dos, cadenas cortas o racimos o bien sin agruparse, pueden formar o no pseudomicelio.



La apariencia de las colonias es muy diversa: de color crema a ligeramente café, de lisas a rugosas, en ocasiones sectorizadas, brillantes u opacas (García *et al.*, 2005). Su morfología es uno de los caracteres utilizados en su clasificación, como también lo son entre otros su forma de reproducción y sus características bioquímicas (Barnett, *et al.*, 1990; De Rosa, 1997).

2.4. Bioconservación

La biopreservación se refiere a la extensión de la vida útil y la seguridad de los alimentos mediante el empleo de su microbiota natural o controlada y/o sus productos antibacterianos. (Stiles, 1996)

Los bioconservantes por excelencia son, sin lugar a duda, las bacterias del ácido láctico (BAL). En la actualidad el estatus de organismos GRAS (Generally Recognized As Safe) reconocidos en general como seguros, en las fermentaciones de alimentos, es aceptado por los consumidores y recibe el estatus como producto natural y saludable, representando una solución ecológica a la problemática de la conservación de los alimentos, sobre todo de aquellos mínimamente procesados.

2.5. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan un grupo heterogéneo de microorganismos considerados seguros y beneficiosos para la salud, además poseen una larga tradición como perseverantes bacterianos naturales en alimentos (Aguilar, 1991).



Las BAL producen una serie de sustancias antimicrobianas responsables de la estabilidad de los alimentos fermentados (Requena, 1995). Además las bacterias lácticas pueden producir sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica, conocidas como bacteriocinas (Requena, 1995), las cuales han sido aisladas de diversos alimentos como lácteos, pescado, carnes y vegetales fermentados y de carne envasada al vacío (Bhugalloo, 1997).

2.5.1. Características de las bacterias Acido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de organismos compuestos por distintas especies de bacterias Gram positivas, no esporuladas, catalasa y oxidasa negativos, de difícil cultivo, acidúricas y estrictamente fermentativas con producción de ácido láctico como producto final de su metabolismo (Vaughan *et al.*, 2005), puede desarrollarse desde los 2 hasta 53°C, siendo su temperatura óptima entre los 30-40°C (Parada *et al.*, 2007). Salminen y Wright (1993) reportan un intervalo de temperatura de crecimiento de 10°C a 45°C. Dichos organismos carecen de Fe⁺-enzima y por lo tanto, no poseen porfirinas, sistema de citocromo y fosforilación oxidativa, obtienen energía únicamente por fosforilación a nivel del sustrato y sólo a partir de azúcares por medio de la fermentación (Vaughan *et al.*, 2005).



Las BAL son microorganismos los cuales pueden fermentar el sustrato por dos vías metabólicas: una es la conocida como Embden-Meyerhof con generación exclusiva de ácido láctico por lo cual se le ha llamado homofermentadores y los llamados heterofermentadores donde a partir del 6-fosfogluconatofosfocetolasa, se obtiene como productos finales el etanol, acetato y CO₂ (Fernández, 2009). Estas rutas metabólicas sirven como un criterio para su aplicación y para su identificación. Un esquema de las rutas metabólicas de las bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas se muestra en la Figura 02.

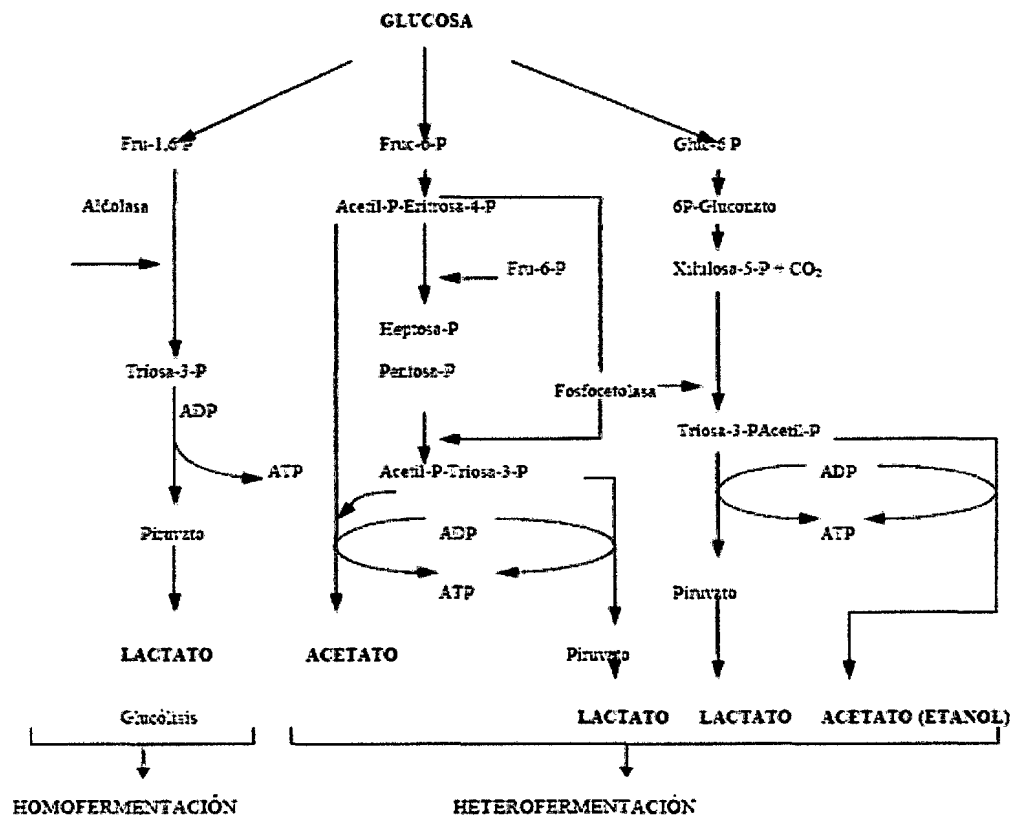


Figura 02. Rutas de fermentación de azúcares por bacterias lácticas (Kandler, 1983).



Las especies de BAL más comúnmente utilizadas como probióticos o encultivos iniciadores son: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* sp., *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus plantarum* (Parvez, 2006).

En el siguiente cuadro se especifica las características del género *Lactobacillus*:

Cuadro 04: Características del género *Lactobacillus*. (Adaptado de Axelsson, 1998)

| CARACTERÍSTICAS | GRUPO I Homo fermentativos Obligados | GRUPO II Hetero fermentativos Facultativos | GRUPO III Hetero fermentativos Obligados |
|---------------------|--|--|---|
| | <i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. Salivarius</i> <i>L. jensenii</i> | <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. Sake</i> <i>L. alimentarius</i> | <i>L. brevis</i> <i>L. buchmeri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. kéfir</i> |
| Fermentación de: | Hexosas | Hexosas, también pueden fermentar las pentosas | Hexosas, también pueden fermentar las pentosas |
| Vía de fermentación | Embden Meyerhoff | Embden Meyerhoff Fosfocetolasa (pentosas) | Embden Meyerhoff Fosfocetolasa (pentosas) |
| Producto | Acido láctico | Acido láctico, acido acético, etanol. | Acido láctico, acido acético, etanol. |

Fuente: Axelsson, (1998)

2.5.2. Metabolitos y mecanismos de inhibición microbiana

Varios son los productos metabólicos de las bacterias lácticas que presentan actividad antimicrobiana y cada uno de estos compuestos tiene características bioquímicas que determinan su mecanismo de



inhibición microbiana y el espectro de microorganismos sobre los que actuarán. Un resumen sobre estos compuestos, sus mecanismos de inhibición y los microorganismos sensibles se muestra en el cuadro 05.

Cuadro 05: Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular obtenidos a partir de bacterias lácticas.

| Compuesto | Microorganismos Productores | Microorganismos Sensibles |
|-----------------------|---|--|
| Ácido láctico | Todas las bacterias lácticas | Todos los microorganismos |
| Ácido acético | Bacterias lácticas heterofermentativas | Todos los microorganismos, dependientes del pH |
| Alcoholes | Levaduras, bacterias lácticas heterofermentativas | Todos los microorganismos |
| Dióxido de carbono | Bacterias lácticas heterofermentativas | La mayoría de microorganismos |
| Diacetilo | <i>Lactococcus</i> sp. | Levaduras, bacterias Gram (-) a concentraciones 200ppm, bacterias Gram (+) a concentraciones 300 ppm |
| Peróxido de hidrógeno | Todas las bacterias lácticas | Todos los microorganismos |
| Reuterina | <i>Lactobacillus reuteri</i> | Amplio espectro: bacterias Gram (+), bacterias Gram (-), hongos. |
| Ácido mevalónico | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Pantonea agglomerans</i> (bacteria Gram (-)), <i>Fusarium avenaceum</i> |

Fuente: Haelander, *et al.*, (1997)

2.5.3. Cinética de crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Se denominación celular, al proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del material de la bacteria, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por bipartición de la



bacteria para dar lugar a dos células hijas. La duración del ciclo celular coincide con el tiempo de generación y depende, en general, de los mismos factores de los que depende este. El crecimiento equilibrado es aquél en el que toda la biomasa, número de células, cantidad de proteínas, de ADN, etc., evolucionan en paralelo. Las bacterias crecen siguiendo una progresión geométrica en la que el número de individuos se duplica al cabo de un tiempo determinado denominado tiempo de duplicación, velocidad específica de crecimiento y número de generaciones por hora (Adams y Moss, 1997).

➤ **Velocidad específica de crecimiento (μ)**

Se define como el aumento de la masa celular de los cultivos respecto del tiempo de incubación y se calcula a partir de la ecuación de la recta de regresión de una gráfica que representa la masa celular de los cultivos en función del tiempo de incubación (figura 03). Adams y Moss, (1997)

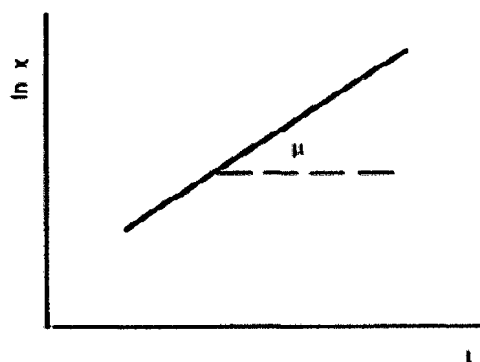


Figura 03. Representación gráfica teórica del incremento de la masa celular de los cultivos en función del tiempo de incubación.



De la figura 03 se deduce que:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Siendo “x” la densidad óptica de los cultivos en unidades Klett, “t” el tiempo de incubación en horas y “μ” la velocidad específica de crecimiento.

Asimismo,

$$\int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{x} = \int_0^t \mu dt$$

Integrando:

$$\ln \frac{x_2}{x_1} = \mu t$$

$$\mu = \frac{\ln \frac{x_2}{x_1}}{t}$$

➤ **Tiempo de duplicación (td)**

Se define como el tiempo que tardan los cultivos en duplicar su masa celular a una temperatura de incubación determinada. Su valor se calcula de la expresión:

$$\ln \frac{x_2}{x_1} = \mu t, \text{ cuando } x_2 = 2x_1$$

$$\ln \frac{2x_1}{x_1} = \mu t_d$$

$$\ln 2 = \mu t_d$$

$$t_d = \frac{0.693}{\mu}$$

➤ **Número de generaciones por hora (g/h)**

Este término indica el número de generaciones microbianas de los cultivos en una hora a una temperatura determinada y su valor se corresponde con el inverso del tiempo de duplicación (td). (Adams y Moss, 1997)

2.5.4. Fases del crecimiento bacteriano

En un cultivo bacteriano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:(Adams y Moss, 1997)

- **Fase lag o de adaptación:** Durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial.
- **Fase exponencial o logarítmica:** en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima. La evolución del número de células durante esta fase se explica con el modelo matemático descrito anteriormente.
- **Fase estacionaria:** en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de

exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones producidas por bacterias.

Los microorganismos entran en fase estacionaria bien porque se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en muchos ambientes naturales.

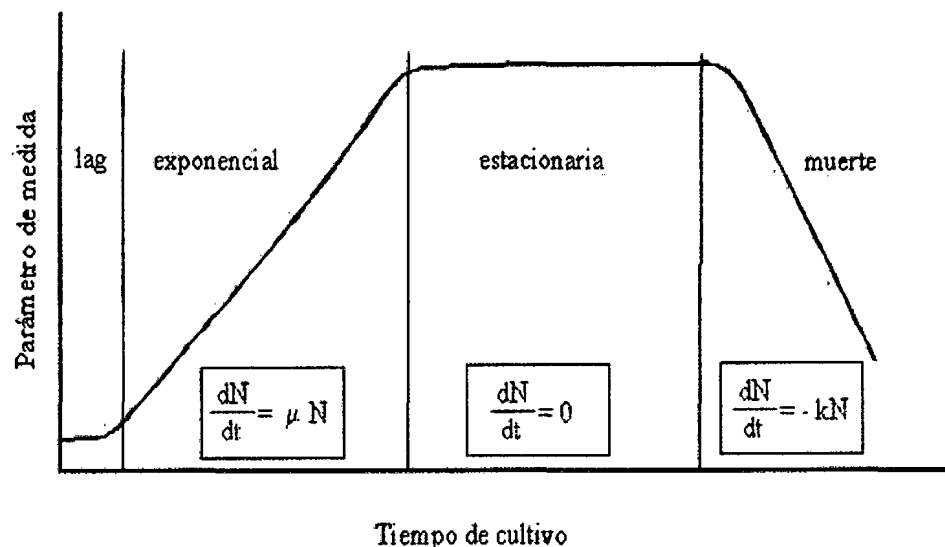


Figura 04. Representación gráfica de las fases de incremento de la masa celular de los cultivos en función del tiempo de incubación.

- **Fase de muerte:** se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

Las fases, parámetros y cinética de crecimiento discutidas para el caso de los medios líquidos se presentan también en los sólidos. La cinética de crecimiento, en este caso, sólo se puede seguir utilizando unos sistemas de detección especiales siendo el más sencillo, la medida del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa.

2.5.5. *Lactobacillus plantarum*

Es una bacteria Gram positiva, no esporulada, aerotolerante que puede crecer desde 15°C hasta 37°C y produce ambos isómeros del ácido láctico tanto el D como L. *Lactobacillus plantarum* es la bacteria más común usada en los procesos de inoculación para la producción de alimentos (Magonova, 2007).

Durante condiciones anaerobias estos organismos dominan rápidamente la población microbiana y transcurrido 48 horas empiezan a producir ácidos tanto lácticos como acéticos por la ruta de Embden-Meyerhof, disminuyendo su competencia. Bajo estas condiciones *Lactobacillus plantarum* produce altos niveles de proteínas heterólogas que han presentado una alta competitividad (Magonova *et al.*, 2007).

En condiciones aerobias consume el oxígeno y lo convierte en peróxido de hidrógeno que resulta tóxico para otros microorganismos (Kleerebezem *et al.*, 2003).

La actividad que tiene *Lactobacillus plantarum* para producir sustancias antimicrobianas le ayuda a sobrevivir en el tracto gastro intestinal. Estas sustancias antimicrobianas han mostrado un efecto bastante significativo sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Magonova *et al.*, 2007).

Cuadro 06: Clasificación científica de *Lactobacillus plantarum*.

| | |
|--------------|-------------------------|
| Reino | Bacteria |
| División | <i>Firmicutes</i> |
| Clase | <i>Bacilli</i> |
| Orden | <i>Lactobacillales</i> |
| Familia | <i>Lactobacillaceae</i> |
| Género | <i>Lactobacillus</i> |
| Especie | <i>L. plantarum</i> |

Fuente: Kleerebezem, *et al.*, (2003)

Otros microorganismos tolerantes al oxígeno acumulan cantidades milimolares de manganeso, el cual es usado por *Lactobacillus plantarum* como una pseudo catalasa para bajar los niveles de oxígeno y de esta manera impedir el crecimiento de estos organismos (Kleerebezem, *et al.*, 2003).



2.5.6. Componentes antimicrobianos producidos por *Lactobacillus plantarum*

Las BAL tienen la habilidad para acidificar el medio y producir una gran variedad de compuestos con amplio espectro antimicrobianos como: ácido láctico, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, y compuestos de bajo peso molecular (Ouweland, 1998; Cataloluk, 2001). *Lactobacillus plantarum* es capaz de producir diferentes compuestos con actividad antimicrobiana (ácido fenil láctico, 4-hidroxifenil láctico, benzoico, 5-metil-2, 4-imidazolidinediona, tetrahidro-4-hidroxifenil-4-metil-2H-pirano-2-ona y 3-(2-metilpropil)-2,5-piperazinediona), los cuales son efectivos contra lactobacilos, lactococos, algunos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* (Enan *et al.*, 1996; Suma *et al.*, 1998) y algunos hongos como *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. oxysporum* (Niku-Paavola *et al.*, 1999; Lavermicocca *et al.*, 2000; Laitila *et al.*, 2002).

2.6. Bacteriocinas

Las bacteriocinas se definen como proteínas o complejos de naturaleza proteica con acción bactericida en microorganismos filogenéticamente muy próximos a la bacteria productora (Tagg *et al.*, 1976).

Este grupo heterogéneo de sustancias, generados tanto por microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos, varía mucho en propiedades bioquímicas, espectro antimicrobiano y mecanismo de acción.

2.6.1. Características Generales

Las bacteriocinas son proteínas o péptidos producidos por algunas bacterias y que poseen actividad antimicrobiana, letal o inhibidora, frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados con los que las producen. Su naturaleza química permite que puedan ser consideradas conservadores naturales.

El término bacteriocinogenicidad está definido como la capacidad de las bacterias de sintetizar y eliminar al exterior proteínas antagónicas de otros microorganismos, por lo que se podría deducir que las BAL tienen esta característica bien definida.

Las bacteriocinas son proteínas o péptidos bactericidas sintetizados en el ribosoma de las BAL, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. 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 (Stiles, 1996). Las bacteriocinas de bacterias lácticas son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen. (Stiles, 1996)

Algunos autores han considerado que el espectro de inhibición de estas proteínas es reducido, generalmente sobre microorganismos relacionados taxonómicamente, de forma que presentan actividad bactericida solamente frente a cepas sensibles. La producción de bacteriocinas con un espectro de inhibición relativamente amplio, es propia de bacterias de origen alimentario incluidas las de la carne y sus derivados. El espectro de inhibición de las bacteriocinas o sus extractos, puede verse afectado según el tratamiento a que son sometidos, como liofilización, concentración del sobrenadante, purificación y neutralización entre otros (Stiles, 1996).

En el caso particular de los extractos de bacteriocinas, la actividad es mayor cuando son concentrados, pero es necesario tener en cuenta la termoresistencia para evitar la alteración de la funcionalidad de la bacteriocina. Además la acción combinada de dos o más bacteriocinas puede reforzar considerablemente la acción inhibitoria (Stiles, 1996).

Las bacteriocinas producidas por las BAL presentan una serie de características que las convierten en candidatos adecuados para ser usadas como conservantes de alimentos, tales como el presentar:

- Naturaleza proteica, que hace que sean inactivadas por los enzimas proteolíticos del tracto gastrointestinal.

- Una general termorresistencia (sobre todo las bacteriocinas de pequeño tamaño) lo que determina que conserven la actividad antimicrobiana tras ser sometidas a temperaturas similares a las de pasteurización y esterilización de la leche y otros alimentos.
- Un amplio espectro antimicrobiano, siendo activas a bajas concentraciones (generalmente inferiores a 10 ppm) frente a la mayoría de las bacterias Gram-positivas patógenas, toxicogénicas o alterantes, más frecuentes en los alimentos.

2.6.2. Diferencia entre bacteriocinas y antibióticos

Técnicamente los antibióticos son metabolitos secundarios sintetizados por enzimas que presentan acción clínica. En el caso de las bacteriocinas, estas son proteínas ribosómicamente sintetizadas producidas en la fase Logarítmica del crecimiento microbiano. Se ha considerado a las bacteriocinas como antibióticos, por la acción bactericida que produce al consumir alimentos conservados por estas sustancias, sin embargo Montville, (1998), menciona que los antibióticos y bacteriocinas tienen diferentes mecanismos de acción. Células resistentes a antibióticos son sensibles a la bacteriocina (nisina), y células resistentes a la nisina son sensibles a los antibióticos, en el cuadro 07 se muestra las principales diferencias entre bacteriocina y antibiótico.

Cuadro 07: Principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos.

| Características | Bacteriocinas | Antibióticos |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Modo de producción | Síntesis ribosomal | Sintetizado por enzimas |
| Fase de producción | Metabolismo primario | Metabolismo secundario |
| Mecanismo de acción | Membrana citoplasmática | Diversos |
| Aplicación clínica | No | Si |
| Resistencia microbiana | Fueron encontradas cepas resistentes | Fueron encontradas cepas resistentes |
| Acción de enzimas proteolíticas en el sistema digestivo humano | Son digeridos | No son digeridos |

Fuente: Montville, (1998)

2.7. Clasificación de las bacteriocinas

La clasificación de las bacteriocinas de acuerdo a características físicas, químicas y genéticas es descrita por varios autores. A continuación se presenta la clasificación de estos compuestos propuesta por Kemperman *et al*, (2003).

Clase I: Lantibióticos, llamados así por contener aminoácidos modificados como Lantionina o β -metil Lantionina. Con un tamaño menor a los 5kDa. Este grupo a su vez se subdivide en Lantibióticos del tipo A y B. Los Lantibióticos del tipo A, grupo al cual pertenece la Nisina, actúan mediante la despolarización de la membrana citoplasmática. Los Lantibióticos del tipo B, funcionan por medio de la inhibición enzimática (Seppo, 1998).

Clase II: Bacteriocinas no modificadas, de pequeño tamaño y estables al calor. Es el grupo más numeroso y comprende las bacteriocinas de tamaño inferior a 10kDa, son termoestables y sin aminoácidos modificados en su estructura a diferencia de las bacteriocinas del tipo I.

Clase III: Bacteriocinas no modificadas, de gran tamaño y sensibles al calor. Son las bacteriocinas de mayor tamaño (más de 30kDa). Termolábiles. Son las de menor interés industrial.

Por su abundancia y sus posibles usos en la industria alimenticia las bacteriocinas pertenecientes a las clases I y II han sido las más estudiadas (Seppo *et al*; 1998).

A continuación se muestra un cuadro de clasificación de las bacteriocinas.

Cuadro 08: Clasificación de las bacteriocinas

| Grupo | Características | Bacteriocinas (grupo representativo) |
|-------|---|--|
| I | Lantibioticos, péptidos pequeños (<5kDa) conteniendo lantionina o β - metil lantionina. | Nisina, lacticina 481, lactocina S, etc. |
| II | IIa | Presentan un espectro de actividad estrecho pero presentan una alta actividad específica contra <i>Listeria monocytogenes</i> |
| | IIb | Requieren la actividad combinada de dos péptidos (α , β) y presentan un mecanismo de acción que implica la disipación del potencial de membrana, pérdida de iones y/o disminución de las concentraciones intracelulares de ATP (Garneau, <i>et al.</i> 2002). |
| | IIc | Las bacteriocinas pertenecientes a esta clase se agrupan sobre la base de presentar la unión de un enlace covalente de sus extremos C y N, dando lugar a una estructura cíclica. |
| III | Moléculas grandes sensibles al calor | Enterocina AS-48. Reuterina 6 |
| IV | Moléculas complejas constituidas por proteínas de una o más moléculas como lípidos o carbohidratos. | Helvetecina J |

Fuente: Cleveland *et al.* (2001)

2.7.1. Bacteriocinas representativas

Nisina

La nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos; es la bacteriocina más estudiada y ha sido aprobada en Estados Unidos de

Norteamérica como aditivo seguro GRAS, para su adición en alimentos (Nettles y Barefoot, 1993).

Pediocina

Es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidolactic* es utilizada como conservador en productos vegetales cárnicos y se ha observado una elevada actividad contra especies de *Listeria*. Dada su alta actividad contra especies de *Listeria* esta bacteriocina tiene un alto potencial para ser utilizado como conservador en alimentos lácteos (Fernández, 2005; Wirawanet *al.*, 2007).

Plantaricinas E/F y J/K

Son bacteriocinas del grupo IIb producidas por *Lactobacillus plantarum* que tienen actividad antimicrobiana cuando interactúan como un sistema de 2 péptidos. La síntesis de la plantaricina es sumamente compleja, esta regulada por la acción de 5 operones con 21 genes diferentes, existen un sin número de reportes que asocian a la existencia de plásmidos para la producción de esta bacteriocina. (Mourad, 2007).

Divergicina A

Es una bacteriocina producida por *Caernobacterium divergens* LV13 que se caracteriza por poseer un sistema de secreción que involucra la presencia de un péptido señal. Con un peso molecular de 4.6 kDa, la divergicina A es un péptido pequeño, de naturaleza hidrofóbica y termoestable. A diferencia de las bacteriocinas de la clase II que tienen



un sitio de rompimiento característico Gli-Gli, esta bacteriocina poseen su extremo N-terminal un sitio de rompimiento Ala-Ser-Ala y actúa como péptido señal para el uso del sistema de secreción de la célula (Maldonado y Llanca, 2007).

Helveticina J

Esta bacteriocina es producida por *Lactobacillus helveticus*, microorganismo que se encuentra de manera natural en quesos madurados. La bacteriocina presenta actividad antibacteriana contra especies relacionadas. Es una proteína de 37 kDa termolábil (30 min. a 100°C) y el gen que la produce se localiza en el DNA cromosomal. Poco se conoce de las características bioquímicas de la bacteriocina y de su modo de acción (Cintas *et al*, 2001).

2.8. Biosíntesis y Producción de Bacteriocinas.

Las bacteriocinas son sintetizadas por la gran mayoría de los grupos bacterianos, de hecho, se ha propuesto que el 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina. El estudio de la producción de bacteriocinas de las BAL se ha enfocado generalmente en tres áreas principales, tales como:

- Identificación y descripción de nuevas bacteriocinas
- Expresión, producción y modo de acción de las bacteriocinas
- Caracterización de las bacteriocinas.



La biosíntesis de bacteriocinas ocurre en la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma y, en la mayoría de los casos guarda relación con la biomasa producida (Piard y Desmazeaud, 1992), si bien la producción máxima en los medios de cultivo puede ocurrir en diferentes fases del ciclo de crecimiento (Tagg *et al.*, 1976).

Algunos investigadores han señalado que ciertos componentes específicos del medio de cultivo interfieren sensiblemente en la producción de alguna bacteriocina individual. Así, varios trabajos indican la necesidad de algunos nutrientes, como extracto de levadura, aminoácidos, manganeso y manitol para aumentar, disminuir o suprimir la producción de diversas bacteriocinas (Rogers, 1972; Clarke *et al.*, 1975; Tagg *et al.*, 1975).

Las variaciones de las condiciones de cultivo, como por ejemplo temperatura y tiempo, ejercen un profundo efecto en la producción de bacteriocinas activas. Generalmente, se producen más bacteriocina cuando la cepa productora se cultiva a su temperatura óptima de crecimiento (Tagg *et al.*, 1976).

El desarrollo de la cepa productora a temperaturas elevadas puede suprimir completamente la producción de bacteriocina (Dajoni, 1974. Tagg *et al.*, 1975) y, algunas veces eliminar irreversiblemente esta propiedad (Dajoni, 1974; Jetten y Vogels, 1973).

Schlegel y Siade, (1973) demostraron que la producción de estreptocina era máxima en la fase logarítmica descendiendo algo cuando el cultivo entraba en la fase estacionaria.

Por otro lado, Tagg *et al.*, (1976) observó que la producción de estreptococcina A se iniciaba al final de la fase logarítmica del desarrollo de la cepa productora y que dicha actividad disminuía lentamente tras un período de incubación prolongado.

Otras investigaciones también han descrito pérdidas sustanciales en la actividad de las bacteriocinas de cultivos incubados durante mucho tiempo. Este efecto puede deberse a la existencia de inactivadores específicos de las bacteriocinas, digestión enzimática o a la reabsorción de la bacteriocina por la cepa productora (Tagg *et al.*, 1976).

2.9. Mecanismo de acción de las bacteriocinas

En relación al modo de acción de las bacteriocinas este ha sido poco investigado, sin embargo, Klaenhammer, (1993) afirma que la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles sería un mecanismo de acción común presentado por las bacteriocinas producidas por las BAL en su forma bactericida o bacteriostática.

Por otro lado, mientras que muchas bacteriocinas parecen presentar regiones anfóteras que contribuyen a la formación de poros, la especificidad en el espectro de acción de estos compuestos puede estar regida por la presencia de diferentes zonas en las bacteriocinas, es decir, la secuencia en que se presentan los aminoácidos (Ojcius y Young, 1991).



Por otra parte, en relación al modo de acción antimicrobiano de la bacteriocina, Andersson *et al.* (1988), lo divide en dos etapas:

- Adsorción de la bacteriocina a receptores específicos de la célula
- Muerte de la célula por daño de la membrana

La primera etapa es reversible, donde la bacteriocina adsorbida puede inactivarse con proteasas y la célula resulta viable, en cambio la segunda es irreversible, debido a que el efecto letal en ocasiones no parece ir asociado a la lisis celular, ya que se ha comprobado la acción bactericida sin reducción de la densidad óptica (Medina *et al.*, 1992).

Las bacterias productoras de bacteriocinas poseen proteínas que las protegen de la acción de sus propios péptidos. Se desconocen los mecanismos moleculares exactos por los que estas proteínas les confieren protección a las bacterias productoras; sin embargo, se han propuesto dos sistemas de protección, los cuales, en algunos casos actúan en la misma bacteria (Kleerebezem, 2004).

La mayoría de las bacteriocinas ejercen su acción antimicrobiana desestabilizando y permeabilizando la membrana citoplasmática de las células sensibles (Gravesen *et al.*, 2004; Bruno y Montville, 1993; Rojas y Vargas, 2008; Barefoot y Nettles, 1993).

El blanco primario de acción de las bacteriocinas parece ser la membrana plasmática. Éstas alteran la permeabilidad selectiva de la membrana de las



células vegetativas sensibles, provocando la inmediata e inespecífica liberación de iones, compuestos de bajo peso molecular y algo más tarde del ATP intracelular. Estas alteraciones provocan la disipación completa o parcial de la fuerza protón motriz (PMF) ocasionando desórdenes metabólicos secundarios que, en último término, inhiben la generación de energía y la síntesis de macromoléculas, lo que supone la muerte celular (Soomro *et al.*, 2002; Barefoot y Nettles, 1993; Castellano *et al.*, 2003). En la figura 05 se muestra el posible mecanismo de acción de las bacteriocinas.

La composición y distribución de los fosfolípidos de la membrana celular influye en la eficiencia de la asociación de la bacteriocina con el citoplasma, su inserción y la formación del poro, es por este fenómeno que se debe la resistencia de los microorganismos a las bacteriocinas (Cintas *et al.*, 2001).

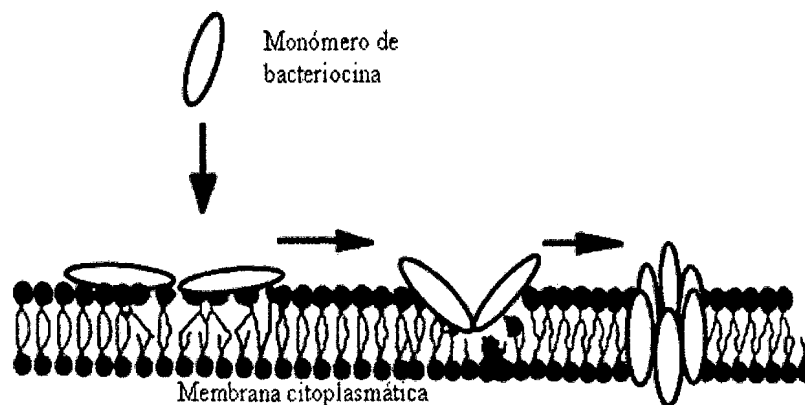


Figura 05. Mecanismo de acción de las bacteriocinas por la formación de poros en la membrana bacteriana. Ruiz *et al.*, (2006).

Otro aspecto importante en el modo de acción de las bacteriocinas es la presencia de iones como Mg^{+2} , Ca^{+2} , los cuales neutralizan la carga negativa de

los fosfolípidos. Esto induce a una condensación fosfolípida que incrementa la rigidez de la membrana citoplasmática evitando la acción antimicrobiana de la bacteriocina (Rodgers, 2001). La membrana externa de las bacterias Gram negativas, contiene lipopolisacáridos y no fosfolípidos, que actúan como una barrera permeable contra macromoléculas y solutos hidrofóbicos como las bacteriocinas (Rodgers, 2001), esto las hace más resistentes y tiende a que los investigadores manifiesten que las bacteriocinas ejercen su acción ante bacterias Gram positivas. Sin embargo, Elegado *et al* (2004), encuentran en su estudio sobre el espectro de acción de *Lactobacillus plantarum* BS que la bacteriocina de esta bacteria láctica puede actuar ante bacterias Gram negativas.

Esto permite considerar la acción de las bacteriocinas ante un espectro más grande de microorganismos de deterioro presentes en la industria alimentaria. Sumado a lo descrito por Ogunbanwo, *et al.* (2003) que describen la producción de las bacteriocinas por Gram negativas y Gram positivas.

Por otro lado, Bizani *et al* (2005) demuestran en su estudio que el número de células viables decrece conforme aumenta la concentración de bacteriocina, por ello es importante determinar la concentración a la cual la bacteriocina será efectiva ante el control de crecimiento microbiano en la industria alimentaria.

2.10. Propiedades bioquímicas

Las bacteriocinas de las BAL presentan una serie de propiedades bioquímicas comunes como, la sensibilidad a la acción de ciertas enzimas proteolíticas y su tolerancia a temperaturas elevadas y condiciones de pH bajo. Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas son inactivadas por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático y algunas de origen gástrico, como la pepsina y tripsina. Esta característica resulta interesante con respecto a su utilización como aditivos en productos alimenticios, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos en el organismo. Ello resulta muy favorable ya que no se producen los efectos negativos y riesgos conocidos y relacionados con el uso de antibióticos, (Lloyd y Drake, 1975).

La termotolerancia de las bacteriocinas producidas por BAL es generalmente elevada, aunque puede reducirse significativamente después de su purificación (Davey y Richardson, 1981; Barefoot y Klaenhammer, 1983). Algunas bacteriocinas termolábiles, poseen mayor peso molecular y probablemente una estructura molecular más compleja. La termorresistencia generalizada de las bacteriocinas permite que permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización (63°C por 30 min. ó 72°C por 15 seg.), lo que supondría una ventaja adicional para su utilización en productos pasteurizados, como por ejemplo los productos lácteos (Piard y Desmazeaud, 1992).

Tolerancia de las bacteriocinas a enzimas y pH

De acuerdo con su definición, las bacteriocinas se inactivan, al menos por un enzima proteolítico, entre los que conviene citar los de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y gástrico (pepsina). Algunas bacteriocinas son sensibles a otros enzimas como lipasas, amilasas y fosfolipasas, lo que indica la heterogeneidad de las bacteriocinas y la influencia de los compuestos no proteicos en su estructura y actividad (Jimenez, *et al.*, 1990; Lewus, *et al.*, 1992; Upreti y Hindili, 1973).

Las bacteriocinas son generalmente estables a pH ácido o neutro, aunque existen excepciones interesantes. Así por ejemplo, la solubilidad y estabilidad de la nisina decrece desde un pH óptimo de 2 a un pH de 6, lo que constituye un inconveniente tecnológico importante para su utilización como aditivo en los alimentos no ácidos, como carne y pescados enlatados y derivados lácteos.

2.11. Factores que limitan la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos

No obstante, la producción y eficacia de las bacteriocinas producidas por las BAL puede verse limitada por varios factores que deben ser tenidos en cuenta a la hora de abordar el estudio de la aplicación potencial de cualquier bacteriocina:

En relación a la producción (Daeschel, 1993)

- Que el ambiente (pH, temperatura, nutrientes, etc.) sea inadecuado para su producción en el alimento.

- Que ocurra la pérdida espontánea de la capacidad productora de bacteriocina.
- Que la cepa productora sea inactivada por infección por fagos.
- Que la cepa productora sufra antagonismo por otros microorganismos presentes en los alimentos.

En relación a la eficacia (Schillinger *et al.*, 1996)

- Que se desarrollen patógenos o bacterias deterioradoras resistentes a la bacteriocina.
- Que concurren condiciones que desestabilicen su actividad biológica.
- Que se adhiera a los componentes de los alimentos tales como las partículas de grasa.
- Que sea inactivada o antagonizada por otros aditivos.
- Que sea poco soluble y/o se distribuya irregularmente en la matriz del alimento.
- Que el pH del alimento tenga efecto negativo sobre la estabilidad, la solubilidad y la actividad de la bacteriocina.

El crecimiento de las bacterias está limitado en gran medida también por las variaciones de las condiciones externas que pueden soportar y las condiciones óptimas para su desarrollo, entre las que se encuentran: Disponibilidad de elementos nutrientes, humedad del medio, actividad de agua, temperatura, oxígeno, acidez y concentración de sales (Madrid, 2001).



2.12. Métodos de identificación de una bacteriocina.

Las técnicas empleadas en la identificación, detección y cuantificación de las bacteriocinas pueden dividirse en tres grandes grupos (Martínez, 2000): Pruebas biológicas, Pruebas genéticas, Pruebas inmunológicas. Las pruebas biológicas constituyen, habitualmente, el punto de partida en la búsqueda de bacterias productoras de bacteriocinas. Los bioensayos más empleados son la prueba de difusión en agar y los métodos turbidométricos, basados en la inhibición del desarrollo de un microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora (Cintas *et al.*, 2000).

2.13. Purificación de las bacteriocinas

En la caracterización bioquímica parcial de las bacteriocinas se necesita su purificación previa a partir del medio de cultivo libre de células en el que se encuentra la sustancia inhibidora. Con esta purificación se pretende separar la sustancia activa del resto de componentes del medio de cultivo y de las células que en él crecieron. Debido a la heterogeneidad de estas sustancias es muy difícil establecer un protocolo modelo de purificación, cada tipo de bacteriocina requiere una técnica específica que debe determinar empíricamente, al igual que las condiciones de cultivo, (Tagg y col., 1976).

En general, el primer paso de la purificación de las bacteriocinas consiste en concentrarlas en el medio de cultivo neutralizado mediante precipitación con sales, ácidos o etanol, diálisis o liofilización.

Una vez obtenido el concentrado, se procede a la separación de los distintos compuestos por su tamaño molecular (cromatografía de filtración, ultrafiltración, centrifugación, etc.) o por su distinto potencial eléctrico (cromatografía de intercambio iónico, electroforesis, etc.)

El único punto en el que coinciden todos los métodos de purificación es en la pérdida de actividad, a veces masiva, durante la purificación de las bacteriocinas (Tagg, *et al.*, 1976). Por eso es importante determinar, en cada paso del proceso de purificación, la cantidad de proteína y su actividad específica (actividad inhibidora/mg de proteína) a fin de evitar aquellos pasos que impliquen una gran pérdida de actividad (Tagg, *et al.*, 1976).

2.14. Técnicas de purificación.

De acuerdo a lo descrito por Stoffels *et al.*, (1992), para la purificación de las bacteriocinas producidas por las BAL se utilizan diversos métodos, comenzando siempre por el cultivo de la cepa productora y separación de las células por centrifugación (Jimenez *et al.*, 1993). Al sobrenadante se le neutraliza el pH, para descartar efectos de acidez y posteriormente se eliminan las células remanentes mediante la esterilización por filtración del sobrenadante. Para la purificación se utiliza la técnica de precipitación con sulfato de amonio, donde las sales son separadas mediante una cromatografía de filtración por tamiz (Barefoot y Klaenhammer, 1983; Stoffels *et al.*, 1992; Jimenez *et al.*, 1993; Jack *et al.*, 1996; Coventry *et al.*, 1996; Ivanova *et al.*, 2000).

Para poder obtener una bacteriocina concentrada y con un mayor poder inhibitorio se han utilizado métodos como la diálisis y ultrafiltración, obteniendo excelentes resultados inhibitorios frente a cepas competidoras como por ejemplo *L. monocytogenes* (Pucci *et al.*, 1988; Ahn y Stiles, 1990).

La mayoría de los investigadores primero someten a pré-purificación los sobrenadantes tras su precipitación con sales o solventes. Estos investigadores creen que la sales actuarían tanto disociando la bacteriocina nativa en monómeros más activos, como cambiando su conformación.

Aunque es difícil generalizar y establecer un método único de purificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, los mejores resultados se obtiene con el basado en:

1. Concentración de los sobrenadantes libres de células con sulfato amónico,
2. Cromatografía de intercambio iónico.

2.15. Acción inhibitoria de las bacteriocinas

El campo de acción inhibitorio de la bacteriocina se realiza haciendo diferentes pruebas de inhibición *in vitro*. Moreno, *et al.* (2008), describen dos técnicas ampliamente utilizadas: antagonismo directo e indirecto. La primera consiste en hacer crecer la cepa productora de la sustancia inhibidora junto a una cepa indicadora o sensible y, observar, luego de la incubación la formación de halos de inhibición.

La segunda tipo de antagonismo consiste en hacer crecer en primer lugar la cepa productora de la sustancia inhibidora, de esta forma se permite que libere la sustancia y solo entonces se siembra la cepa contra la cual se desea observar el efecto antagónico.

Estos métodos sin embargo, no demuestran por si solo que la inhibición sea producida específicamente por una bacteriocina ya que la cepa productora puede también inhibir a la cepa indicadora por producción de ácidos orgánicos, H₂O₂, antibióticos o por competencia por los nutrientes (Schillinger y Lücke, 1991).

Como parte de la acción antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas, pueden referirse numerosos ejemplos que ilustren esta actividad. De esta forma, *Lactobacillus plantarum* la cepa más frecuentemente productora de bacteriocinas, lo cual explica su habilidad para controlar otros microorganismos, incluyendo los patógenos (Olesupo, Olukoya y Odunfa, 1995).

2.15.1. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMB se define como la concentración mínima de bacteriocina que permite la muerte de 99,9% del cultivo inicial. Para su determinación, se adicionan diferentes concentraciones de bacteriocina a los cultivos líquidos y se determina el número de células viables, tanto en el momento de la adición como tras 24 h de incubación.



La CMI es la concentración mínima de la bacteriocina que permite la inhibición visible del crecimiento después de 24 horas (Song, 1997). Para su determinación, se adicionan diferentes concentraciones de bacteriocina a los cultivos y se sigue la evolución de los mismos, midiendo la absorbancia a una longitud de onda específica o mediante la medición de los halos de inhibición.

De esta forma, también se pueden definir índices parciales, como la MIC90 y MIC50:

MIC90 = concentración mínima inhibitoria que inhibe al 90% de microorganismos

MIC50 = concentración mínima inhibitoria que inhibe al 50% de microorganismos

2.16. Aplicaciones de las bacteriocinas en la industria alimentaria

Algunos de los desafíos a los que se enfrenta la industria alimentaria en la actualidad incluyen la demanda de alimentos libres de microorganismos patógenos, alimentos con una larga vida de anaquel y alimentos que no contengan conservadores químicos.

En la actualidad, la nisina y la pediocina PA1 se utilizan de manera comercial como bioconservadores de alimentos, en los cuales la nisina ha sido utilizada en la forma de “nisaplina”. El uso de estas bacteriocinas está cubierto por diversas patentes norteamericanas y europeas. A pesar de que



solamente estas dos bacteriocinas se utilizan de manera comercial, se considera que esta tendencia comenzará a cambiar en el futuro cercano conforme se incrementen los avances en las capacidades biotecnológicas y se establezcan los mecanismos de acción de las bacteriocinas parcialmente caracterizadas. (Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. 2005.)

En cerveza la nisina se ha utilizado en el control del crecimiento de lactobacilos y en productos enlatados tales como vegetales, permite disminuir la temperatura de esterilización al incrementar la sensibilidad a la temperatura de algunos microorganismos. Daeschel (1991), propuso también utilizar la nisina en el control de la fermentación maloláctica en vinos producidas por lactobacilos o micrococos.

En carne tiene un uso restringido, debido a que es muy poco soluble al pH de ésta, además, si se inoculara la cepa *L. lactis* spp *lactis*, productora de nisina, ésta no podría desarrollarse, debido a que no crece en carnes a temperaturas de refrigeración (Stiles y Hastings, 1991). Las bacteriocinas también han sido usadas en carne curada, leche, queso y pasta de soya.

2.17. Investigación sobre bacteriocinas a partir de alimentos de elaboración artesanal en el Perú.

En Perú, existen diversos alimentos fermentados, elaborados artesanalmente que pueden ser productores de bacterias ácido lácticas con capacidad de producción de bacteriocinas. Estos alimentos son: queso, yogurt, chicha de jora, masato, por mencionar algunos.

Francia *et al.* (2002) realizaron un trabajo similar al propuesto acerca de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas aisladas de quesos frescos artesanales de Lambayeque. Las bacterias lácticas que aislaron correspondieron a los géneros *Lactobacillus.*, *Pediococcus* y *Lactococcus*. Las cepas productoras de bacteriocinas se reconocieron mediante la inhibición del crecimiento de *Listeria* utilizada como cepa indicadora. El 90% de las cepas de *Lactobacillus plantarum* y el 50% de *Lactobacillus casei* inhibieron el crecimiento de *Listeria*. La mayor producción de bacteriocina se observó con *Lactobacillus plantarum*.

2.18. Importancia de las bacteriocinas en la industriaalimentaria

La nueva generación de productos mínimamente procesados al vacío y empacados en atmósferas modificadas está ganando popularidad, siendo un sector del mercado muy dinámico. Estos productos pueden ser reformulados o se puede rediseñar el proceso para asegurar el crecimiento de las especies productoras de bacteriocinas (Fimland, 1996). Pueden ser sintetizadas a partir del reconocimiento de su secuencia de aminoácidos y, así, determinar la actividad específica de la bacteriocina o sabiendo su comercialización (Fimland, 1996).

En productos marítimos, retoma importancia debido a que, tanto en empaque al vacío como en atmósfera modificada tienen un alto riesgo de botulinum, el uso de bacteriocinas ha demostrado ser efectivo en productos como langosta en el control de *Listeria monocytogenes* (Delves y Broughton, 2006).



En alimentos producidos a base de arroces importante controlar la presencia de *Bacillus cereus*, bacteria capaz de producir tipos de desórdenes gastrointestinales: uno de vómito causado por la ingestión de una toxina preformada en el alimento, y el síndrome diarreico causado por una toxina diferente que puede ser producida en el alimento o en el intestino delgado (Grande, *et al*, 2006). También pueden verse implicados con esta bacteria productos de carne, leche, salsas y postres.

En este tipo de productos, la enterocina resulta ser una bacteriocina apropiada para el control de *Bacillus cereus*, ya que en estudios realizados por Grande, *et al*. (2006), se demuestra su estabilidad y efectividad a distintas temperaturas de almacenamiento, iniciando con un 90% de actividad y luego de 14 días presenta una actividad de 71% en muestras almacenadas a 6 °C. Al inocular estas muestras con *B. cereus*, se refleja una rápida reducción del recuento de bacterias en tan solo 8 horas.

2.19. Patógenos bacterianos asociados a los alimentos

La principal causa del deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos, pero existen microorganismos patógenos que frecuentemente producen alteraciones que conllevan al deterioro de los alimentos, entre los más comunes se encuentran patógenos del género *Salmonella sp.*, *Bacillus sp.*, y *Staphylococcus aureus*, que se encuentra en la mayoría de los alimentos causando intoxicaciones alimentarias.



2.19.1. *Salmonella* sp. Las Salmonellas son bacterias entéricas, bacilo Gram negativo, aerobio y anaerobio facultativo, pequeño y con gran capacidad de adaptación a ambientes adversos, como altas concentraciones de sal y valores de pH de 4,5 a 9. Los alimentos de origen animal son su principal vehículo. Puede producir gastroenteritis, fiebre tifoidea y septicemia (Roberts *et al.*, 1996).

Su presencia en leche es normalmente atribuida a prácticas higiénicas incorrectas, pudiendo desarrollarse durante la elaboración del queso y sobrevivir durante la maduración, especialmente a bajas temperaturas (Leyer y Johnson, 1992, 1993; Spahr *et al.*, 1994).

Este microorganismo ha causado brotes asociados al consumo de quesos Cheddar con dosis infectivas tan bajas como 10-102 células (Fontaine *et al.*, 1980; D'Áoust *et al.*, 1985). En Europa y América del Norte está aumentando la incidencia de toxiinfecciones causadas por *Salmonella Typhimurium* resistente a agentes antimicrobianos como ampicilina, cloranfenicol, estreptomycinina o tetraciclina, y muchas son ocasionadas por consumo de queso fresco elaborado a partir de leche cruda (Cody *et al.*, 1999; Villar *et al.*, 1999; Daly *et al.*, 2000).

2.19.2. *Bacillus cereus*. Es un microorganismo patógeno, Gram-positivo, móvil, formador de esporas y aerobio, aunque pueden crecer anaeróbicamente a expensas de azúcares. Las esporas y las formas vegetativas de *Bacillus cereus* se pueden encontrar en el suelo, polvo, agua y sedimentos, así como en diversos tipos de alimentos como

cereales y derivados, leche y productos lácteos, alimentos desecados, especias, productos cárnicos y vegetales (Kramer y Gilbert, 1989).

En leche y productos lácteos el problema radica en la contaminación de las ubres de la vaca con bacterias procedentes del suelo y hierba. Por otro lado, las esporas de *Bacillus cereus* pueden sobrevivir al tratamiento de pasteurización o UHT, pudiendo aparecer como contaminante de los productos lácteos en plantas de procesamiento (Robertson *et al.*, 1996; Eneroth *et al.*, 2001; Faille *et al.*, 2001).

La toxina producida durante el crecimiento del microorganismo en el alimento (Kramer y Gilbert, 1989), provoca vómitos, y diarreas, estos síntomas generalmente son leves no mayor a 24 horas.

2.19.3. *Staphylococcus aureus*. Es un microorganismo Gram-positivo, catalasa-positivo, muy resistente a condiciones adversas, siendo considerado una de las principales causas de gastroenteritis del mundo. Cabe destacar su osmotolerancia, pudiendo crecer en medios que contengan el equivalente a 3,5 M de NaCl y sobrevivir con actividad de agua inferior a 0,86 (Jablonski Bohach, 1997).

Staphylococcus aureus produce diversas enterotoxinas termoestables que provoca un síndrome gastrointestinal de rápida aparición (2 a 3 horas tras la ingesta del alimento contaminado) (Gómez-Lucía *et al.*, 1992). Estas enterotoxinas no se inactivan por las proteasas del tracto



gastrointestinal. *S. aureus* sea la frecuente de leche y productos lácteos (Little y Louvois, 1999).

Donnelly *et al.* (1968), menciona que la leche pasteurizada es incluso más susceptible de contaminación que la leche cruda. Los quesos de leche cruda pueden resultar contaminados con *S. aureus*, puede sobrevivir durante la fabricación y maduración de quesos de leche cruda (Nuñez *et al.*, 1988).

Muy recientemente en Japón, se produjo una intoxicación masiva por consumo de leche y productos lácteos contaminados con toxina estafilocócica que afectó a unas 13.000 personas (Food Safety Network, 2000).



CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de ejecución

Esta investigación se desarrolló en los laboratorios de Microbiología y Biotecnología Agroindustrial de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

3.2. Activación y conservación de las cepas

La cepa *Lactobacillus plantarum 32plp* se conservó en tubos inclinados de agar Lactobacilli a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$., para activarlas, fue suspendido en caldo Lactobacilli e incubada a $30^{\circ}\text{C}\pm 1$, por 48 horas sin agitación y en anaerobiosis y repicado en agar Lactobacilli e incubado a $30^{\circ}\text{C}\pm 1$ (primera siembra), para luego realizar la preparación del inóculo con la única finalidad de obtener un cultivo en fase exponencial para ser adicionada a la chicha de jora que será sustrato para realizar la fermentación propiamente dicha.

Para *Salmonella* sp., fue conservada en tubos inclinados de agar Mc Conkey a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, y activadas en caldo nutritivo e incubada a $30^{\circ}\text{C}\pm 1$, por 24 horas para su posterior uso. En cuanto a las cepas de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* fueron aislados de alimentos fermentados y conservadas en tubos inclinados de agar TSA (Trypticasa Soya) a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, y activadas en caldo nutritivo e incubada a $30^{\circ}\text{C}\pm 1$, por 24 horas para su posterior uso.

3.3. Sustrato empleado

Se empleó chicha de jora fermentada artesanalmente, previo a la utilización como sustrato para la fermentación láctica se sometió a dos tipos de tratamiento térmico: pasteurización (temperatura de ebullición por 30 minutos) y esterilización (en autoclave a 121°C por 15 minutos).

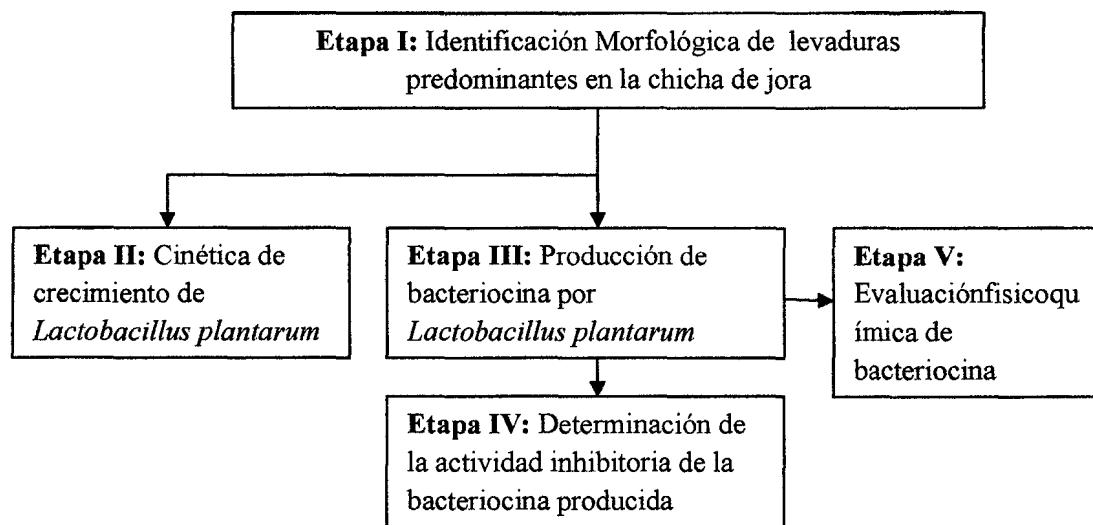
3.4. Metodología (etapas del proceso de la investigación)

La investigación realizada es de tipo aplicada ya que involucró la realización de proceso científico y tecnológico como una alternativa de solución a problemas como el deterioro de alimentos causado en su mayoría por patógenos y al mismo tiempo aprovechar la chicha de jora como una nueva fuente de sustrato viable para producir bacteriocinas.

Es de nivel experimental, porque se manipulo variables independientes (tipo de tratamiento térmico, temperatura, tiempo) en la fermentación de la chicha de jora para obtener bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum*, verificando su efecto en las variables dependientes como la concentración de bacteriocinas obtenidas y la capacidad inhibitoria *in vitro* de las mismas en patógenos más frecuentes como *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*.

La investigación consistió en cinco etapas las cuales se detalla a continuación.





Etapa I. Identificación morfológica de levaduras predominantes en la chicha de jora, aislamiento de cepas bacterianas patógenas procedentes de alimentos

a. Características generales para la identificación de levaduras

Se realizaron dos tipos de pruebas, para poder diferenciarlas:

- Observación macroscópica de las colonias
- Observación microscópica de las colonias

a.1. Observación macroscópica de las colonias. Las colonias se describieron para su mejor diferenciación de acuerdo a sus características morfológicas que se describen en el anexo 03. (Mendo, 2003).

a.2. Observación microscópica de las colonias de levaduras. Se realizó con el empleo de un microscopio óptico y visualizado mediante el programa Motic.



b. Aislamiento y mantenimiento de cepas bacterianas

Se utilizaron cuatro cepas: *Lactobacillus plantarum 32plp* del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Facultad de ciencias Biológicas), *Salmonella sp.* (Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias Biológicas).

Cuadro 10: Aislamiento de bacterias utilizadas

| Cepa | Medio de cultivo | Fuente |
|--------------------------------------|---|---|
| <i>Lactobacillus plantarum 32plp</i> | Cepa productora Agar lactobacilli | Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga |
| <i>Bacillus cereus</i> | Cepa indicadora Agar TSA | Arroz cocido y fermentado |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Cepa indicadora AGAR TSA | Suero de queso |
| <i>Salmonella sp.</i> | Cepa indicadora Agar Hierro / Lisina y Caldo nutritivo | Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco |

Fuente: Elaboración propia (2011)

Las cepas de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, que fueron aislados a partir de arroz cocido y fermentado, suero de queso elaborado artesanalmente, evaluándose características morfológicas y pruebas presuntivas de confirmación de las cepas aisladas.

b.1. Observación microscópica de las cepas bacterianas (Tinción de Gram). Diferenciación de bacterias entre Gram negativas y Gram positivas. (Prescott, *et al.*, 2002).

Fundamento.-El fundamento radica en las diferencias estructurales de la pared celular de ambos grupos bacterianos. Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared,



mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipopolisacárida externa.

Al añadir alcohol-acetona se arrastrará el colorante sólo en las Gram negativas, mientras que en las Gram positivas queda retenido y las células permanecerán de color violeta. Las células Gram negativas se teñirán de color rosado por el colorante de contraste utilizando (safranina).

Técnica.- Se extiende una colonia bacteriana sobre un cubreobjetos con una gota de agua y se fija en la llama. Se realiza la tinción con el primer colorante (cristal violeta) y se deja en contacto 2 minutos.

Se lava con agua, eliminando el exceso de colorante. Se añade lugol y se mantiene en contacto durante un 1 minuto. Nuevamente se lava con agua y se trata con alcohol-acetona. Posteriormente se añade safranina durante 1 minuto (colorante de contraste). Se seca a calor suave y se procede a la observación bajo microscopio óptico.

b.2. Aislamiento de *Bacillus cereus*

El procedimiento para el aislamiento de *Bacillus cereus*, se realizó con ayuda de cucharas estériles, para pesar 10g. de muestra de arroz fermentado en 90 ml de agua de peptona, realizándose posteriormente las respectivas diluciones seriadas a la cual se sembraron en agar Manitol Yema de huevo (MYP), y diseminadas con la espátula



Drigalsky sobre toda la superficie del agar. Las placas de petri ya sembradas se incubaron invertidas a $35^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas.

Las colonias que presentaron bordes entrecortados y rodeados de un amplio halo de hidrólisis de lecitina se trasplantaron a tubos con agar Tripticasa de Soya (TSA), puestas a incubación a $35^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas.

A partir de estos cultivos puros que presentaron crecimiento se realizaron: tinción de Gram, las pruebas de confirmación de fermentación de la glucosa y licuefacción de la gelatina.

- **Licuefacción de la gelatina.** Se trasplantó a tubos que contenían medio de gelatina, incubándose a $35^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas. Realizándose previo a la lectura durante dos horas mantenido en refrigeración. La licuefacción del medio caracteriza una reacción positiva cuando *Bacillus cereus* hace líquida la gelatina.
- **Fermentación de la Glucosa.** También se trasplantó a tubos que contenían agar glucosa, incubándose a $35^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas. Cuando es positiva el agar glucosa presenta una coloración amarilla.

b.3. Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

El procedimiento para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*, se realizó con ayuda de cucharas estériles, para pesar 10ml. de suero de queso en 90 ml de agua de peptona, realizándose posteriormente las respectivas diluciones seriadas a la cual se sembraron en agar Manitol



salado – Rojo Fenol y diseminadas con la espátula Drigalsky sobre toda la superficie del agar. Las placas de petri ya sembradas se incubaron invertidas a $35^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas. Este agar al ser un medio de cultivo selectivo y diferencial permite diferenciar *Staphylococcus aureus* de otros *Staphylococcus*.

Las colonias que presentaron un amplio halo amarillo luminoso se trasplantaron a tubos con agar Trypticase de Soya (TSA), puestas a incubación a $35^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas. A partir de estos cultivos puros que presentaron crecimiento se realizaron: tinción de Gram, las pruebas de confirmación de catalasa y prueba de la Coagulasa (+).

- **Prueba de la catalasa.** Se dispone una alícuota de una colonia sobre un portaobjetos (no se le añade agua). Se añadió a la colonia unas gotas de agua oxigenada al 10 %. La reacción positiva de la catalasa, implica desprendimiento de oxígeno a la cual *Staphylococcus aureus* reacciona positivamente.
- **Prueba de Coagulasa positiva.** Se trasplantó las colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* a caldo Cerebro Corazón (BHI), incubándose a $35^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación se transfirió 0.1 ml de cultivo BHI mas 0.3 ml de plasma de sangre volviéndose a incubar a $35^{\circ}\text{C}\pm 1$ durante 6 horas. Se evaluaron los tubos, donde la aparición de un coagulo bien definido es indicativo de la actividad de *Staphylococcus aureus*.



c. Materiales, equipos y medios de cultivo

Se utilizan diferentes medios de cultivo para cada uno de las bacterias aisladas tal como se muestra en el cuadro 11.

Cuadro 11: Preparación de Medios de cultivo.

| Medios de cultivo | Preparación | Usos |
|--------------------------------------|---------------|--|
| Agar lactobacilli | ** | Propagación de la cepa productora de bacteriocina |
| Agar- manitol – sal común rojo fenol | 108 g/1000ml | Medio selectivo y diferencial para aislar <i>Staphylococcus aureus</i> . |
| Bacillus cereus agar base | 20.5 g/475 ml | Medio selectivo para aislar <i>Bacillus cereus</i> |
| Agar Mac conkey | 50 g/1000 ml | Medio selectivo para conservación de <i>Salmonella sp.</i> |
| Agar TSA | 54 g/1000 ml | Medios para conservación de cepa aislada de <i>Bacillus cereus</i> |
| Agar nutritivo | 20g/1000 ml | para recuento de colonias y método de difusión en agar |
| Agar YGC | 40g/100 ml | Para identificación de levaduras presentes en la chicha de jora |
| Agar glucosa | 25g/1000 ml | Para confirmación de <i>B. cereus</i> , mediante la fermentación. |
| Caldo nutritivo | 8 g/1000 ml | Enriquecimiento de las cepas bacterias |

** . Anexo 01

Materiales utilizados en la etapa I:

Equipos y Especificaciones

materiales

Balanza analítica : Citizen (capacidad 200gr.)

Autoclave

Microscopio : Con portaobjetos y cubreobjetos

Contador de colonias : Lente de aumento

Mechero bunsen

Placas petri : De vidrio (marca Giardino)

Tubos de ensayo : Vidrio (Pirex) de 5ml y 20 ml



| | |
|--------------------------------|---|
| Pipetas | : Vidrio de 1ml, 5ml y 10 ml |
| Espátula drigalski | : De vidrio |
| Asa de nicrom | |
| Hisopos | : Esterilizados para diseminar cepas bacterianas |
| Soluciones y colorantes | |
| Solución raulin | : Permite el crecimiento de levaduras y no de bacterias |
| Cristal violeta | : Para tinción Gram |
| Lugol | : Para tinción Gram |
| Alcohol – acetona | : Para tinción Gram |
| Safranina | : Para tinción Gram |

Etapa II. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum 32plp*

En esta etapa se describe la metodología que se empleó para realizar la cinética de crecimiento en sistema modelo (caldo Lactobacilli) y sustrato de chicha de jora evaluándose la variación de pH, % de acidez, °Brix, D.O. (560 nm), recuento de colonias viables; con el objetivo de verificar el crecimiento de *Lactobacillus plantarum 32plp*, y la adecuación a otro medio.

a. Tolerancia al etanol de *Lactobacillus plantarum*

Para esta etapa se partió del último cultivo de 12 horas de crecimiento del inóculo, se transfirió 0.5 ml a 40 ml de caldo Lactobacilli a fin de obtener una D.O. = 0.1-0.2, para determinar el parámetro de crecimiento denominado máxima población relativa (%). A cultivo obtenido se vertió en tubos con diferentes concentraciones de etanol partiéndose de 4%, 8%, 10% de etanol puro (95%), otra evaluación de 0% (sin etanol) que es la muestra

patrón con cual se realiza la comparación de la curva de crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. Las muestras se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerofilia.

La evaluación se realizó cada 6 horas hasta 96 horas, donde se realizaron lecturas de la D.O. a 560 nm metodología seguida de Alegria *et al.*, (2004). Después se realizó el ensayo de difusión en agar contra las cepas patógenas. Para el reporte de los resultados finales (método propuesto por Alegria *et al.* 2004) se utilizaron los máximos valores de densidad óptica alcanzados por cada cultivo en crecimiento en Caldo Lactobacilli a pH 6,5 sin etanol y con etanol a diferentes concentraciones para calcular un parámetro de crecimiento denominado máxima población relativa. Sedano, (2006), menciona que la mayoría de las cepas de *Lactobacillus* finalizan la fase logarítmica de crecimiento entre las 20-24 horas, alcanzando su máximo valor de D.O. en Caldo MRS pH 6,5 sin etanol, dicho valor representó el 100% y fue considerado como un valor de referencia control.

b. Equipos y materiales

| Equipos y materiales | Especificaciones |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Espectrofotómetro | : Marca GENESIS 20 |
| Potenciómetro | : Marca SCHOTT (rango de 0 -14) |
| Centrifuga | : LW Scientific Ultra – 8 v |
| Refrigeradora | : Marca SANSUMG capacidad 15 L. |
| Balanza analítica | : Citizen (capacidad 600gr. X 0.01) |
| Contador de colonias | : Lente de aumento |
| Mechero bunsen | |



| | |
|------------------------|---|
| Placas petri | : De vidrio (marca Giardino) |
| Vasos precipitados | : De vidrio de 100 ml |
| Matraces de Erlemmeyer | : De 250 y 500 ml |
| Tubos de ensayo | : Vidrio (Pirex) de 5ml y 20 ml |
| Pipetas | : Vidrio de 1ml, 5ml y 10 ml |
| Espátula drigalski | : De vidrio |
| Asa de nicrom | |
| Discos de papel filtro | : Esterilizados para la evaluación de halos de inhibición |
| Hisopos | : Esterilizados para diseminar cepas bacterianas |
| Etanol | : 96% de pureza |

Etapa III. Producción de bacteriocina por *Lactobacillus plantarum* 32plp

a. Preparación del sustrato (chicha de jora)

En este proceso se realizó el acondicionamiento del sustrato para la fermentación láctica, puesto que la chicha de jora en su estado de fermentación natural posee una microflora predominante de levaduras que continúan consumiendo los nutrientes presentes, al inocular cepas de *Lactobacillus plantarum* entrarían en competencia por los nutrientes que dificultaría en la producción de bacteriocina. Quillama, (1998), menciona que las bacterias lácticas en especial *Lactobacillus plantarum* se desarrollan junto con levaduras pero son inhibidas o su crecimiento se ve afectado con el contenido de alcohol durante el proceso de fermentación, es por ello que se planteó dos tipos de tratamiento térmicos para eliminar las levaduras presentes en la chicha de jora.



a.1. Pasteurización. Se realizó la pasteurización de la chicha de jora a temperatura de $85^{\circ}\text{C}\pm 2$ (ebullición), por 30 minutos (Florio, E. 1998). Con la finalidad de debilitar o destruir los microorganismos presentes en la chicha de jora.

a.2. Esterilización. En este proceso se sometió a temperatura de esterilización (121°C), por un tiempo de 15 minutos. Dichos parámetros de esterilización se emplean en conservas los cuales fueron tomados como referencia, con la finalidad de eliminar cualquier tipo de microorganismos presentes en la chicha de jora y además de destruir enzimas, precipitar proteínas que causan turbidez y concentración del mosto (Florio, E. 1998).

b. Propagación de inóculo (*Lactobacillus plantarum* 32plp)

Se realizó la propagación de la cepa de *Lactobacillus plantarum*, según Loreto, A. (2002), se preparó dos tubos de 10 ml con caldo Lactobacilli a las cuales se inocularon entre 3 a 4 asadas para ser incubados a $30^{\circ}\text{C}\pm 1$, por 24 horas. Posteriormente estos dos tubos se inocularon en dos matraces con 450 ml de caldo Lactobacilli e incubados a $30^{\circ}\text{C}\pm 1$, por 24 horas. Se trabajó con 8 litros de chicha de jora fermentada y una concentración de inóculo de 1% (Loreto, A. (2002).

Cuadro 12: Composición del medio para la fermentación por tratamiento.

| Composición | Cantidad |
|------------------|----------|
| Chicha de jora | 1750 ml |
| Inoculo | 240 ml |
| Zumo de tomate * | 10 ml |
| Total | 2000 ml |

* Fue centrifugado y esterilizado (1ml/L)

c. Proceso de fermentación para la producción de bacteriocina

Las muestras de chicha de jora, esterilizadas y pasteurizadas fueron ajustadas a pH de 6.5, para iniciar la fermentación. Para este proceso, se trabajaron con dos temperaturas de fermentación (25°C y 35°C). Se consideraron estos dos parámetros puesto que las bacterias lácticas se desarrollan en un amplio rango de temperaturas entre 15 y 40 °C, como menciona Magonova, (2007). *Lactobacillus plantarum* es la bacteria más común usada en los procesos de inoculación para la producción de bacteriocinas. A los cuales se ajustaron las temperaturas para la fermentación propiamente dicha.

Se efectuaron cuatro tratamientos con el sustrato para la fermentación (cuadro 12) inoculados, y un tratamiento (blanco) sin adición de inoculo. La fermentación se llevó a escala de laboratorio en un proceso anaerobio a temperaturas de 25 y 35 °C acondicionados en incubadoras, para cada tratamiento fueron provistas de una válvula para poder extraer muestras con



finés de evaluación y evitar posibles contaminaciones con otro tipo de microorganismos, trabajándose con materiales previamente esterilizados.

Durante este proceso se evaluó: % de acidez, pH, °Brix, las lecturas al espectrofotómetro (D.O.= 560 nm) y el recuento de colonias se realizaron a intervalos de 12 horas durante el tiempo de fermentación. (Sedano, 2006).

d. Purificación parcial de las bacteriocinas

Los extractos crudos (bacteriocina sin purificación) de cada tratamiento, fueron sometidos a centrifugación por 20 minutos a 4000 rpm, previamente refrigerados en temperaturas de $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, con una solución de sulfato de amonio al 65%, método seguido de Lama, (2002) A continuación se muestra el diagrama de flujo para la producción de bacteriocinas mencionándose las etapas en donde se presentan las variables intervinientes.



Diagrama de flujo para Producción de Bacteriocina utilizando como sustrato chicha de jora

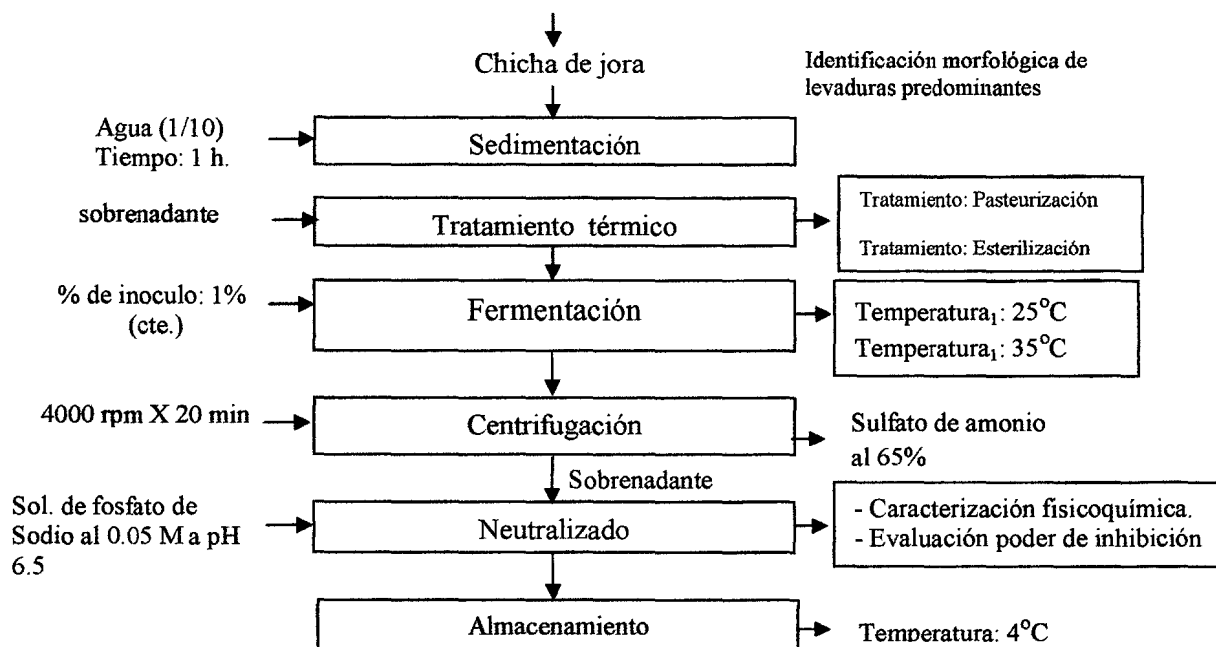


Figura 06: Diagrama de flujo para la obtención de bacteriocinas chicha de jora, Adaptado de: Lama (2002).

d.1. Determinación del ácido láctico por el método de acidez titulable.

Se midió 1 ml de muestra en un vial y se diluye agregando 9 ml de agua destilada hasta obtener un volumen de muestra de 10 ml. Se mide el pH inicial de la muestra y se añade una gota de solución de fenolftaleína al 1% y se titula con Hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosado que persistirá de 15 a 30 segundos. Se determinó el pH final de la muestra. Los resultados se reportaron en g/ml. En donde la acidez en la muestra expresada como ácido láctico se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez g/ml (ácido láctico)} = V \times N \times 90 / M$$



Donde:

- V= Volumen de solución de hidróxido de sodio 0.1N gastado en la titulación de la muestra, en ml.
- N= Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.
- M=Volumen de la muestra en ml.
- **Nota:** un ml de NaOH 0.1N es igual a 0.0090 g de ácido láctico.

d.2. Determinación del pH

Previo uso del potenciómetro, se realiza la calibración con las soluciones reguladoras de pH 4 y pH 7, lavando los electrodos con agua destilada neutra antes y después de cada lectura y secando los electrodos con papel suave, sin rasparlos. Colocar suficiente muestra en un vaso precipitado de 100 ml.

d.3. Evaluación de °Brix

Para la evaluación de °Brix, se realiza mediante el uso del refractómetro, al cual se coloca una gota de muestra en la superficie para la lectura directa, contando con un rango de 0 °Brix hasta 65 °Brix.

d.4. Determinación de la Densidad Óptica (D.O.)

La espectrofotometría UV-visible que es una técnica analítica que permitió determinar la concentración de partículas referente a la biomasa fermentada. Las moléculas del medio fermentativo absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida



depende de forma lineal de la concentración que tiene este. En el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida (Baeza, 2007). En la presente investigación se realizó la medida de la densidad óptica mediante el empleo de un espectrofotómetro verificándose la turbidez del medio, que indicara el crecimiento de la cepa productora de bacteriocina.

d.5. Recuento de colonias.

Se realizó la determinación de unidades formadoras de colonia por mililitro, con el objetivo de verificar la curva de crecimiento en función al tiempo, también se realizó diferentes diluciones para facilitar el conteo de colonias, que estas serán multiplicadas por el factor de dilución que se haya realizado.

e. Equipos y materiales

| Equipos y materiales | Especificaciones |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Espectrofotómetro | : Marca GENESIS 20 |
| Potenciómetro | : Marca SCHOTT (rango de 0 -14) |
| Centrifuga | : LW Scientific Ultra – 8 v |
| Refrigeradora | : Marca SANSUMG capacidad 15 L. |
| Balanza analítica | : Citizen (capacidad 600gr. X 0.01) |
| Refractómetro | : Marca ATAGO (Brix 0 ~ 32%) |
| Contador de colonias | : Lente de aumento |



| | |
|------------------------|---|
| Mechero bunsen | |
| Placas petri | : De vidrio (marca Giardino) |
| Vasos precipitados | : De vidrio de 100 ml |
| Matraces de Erlemmeyer | : De 250 y 500 ml |
| Tubos de ensayo | : Vidrio (Pirex) de 5ml y 20 ml |
| Pipetas | : Vidrio de 1ml, 5ml y 10 ml |
| Espátula drigalski | : De vidrio |
| Asa de nicrom | |
| Discos de papel filtro | : Esterilizados para la evaluación de halos de inhibición |
| Hisopos | : Esterilizados para diseminar cepas bacterianas |

Etapas IV. Determinación de la actividad inhibitoria de la bacteriocina

La determinación de la actividad inhibitoria se realizó siguiendo el método de difusión en agar nutritivo (Tagg, 1971), utilizando sobrenadantes parcialmente purificados y sin purificar de las muestras obtenidas a lo largo de crecimiento en el proceso de fermentación. Se utilizó como cepas sensibles *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. El pico de máxima producción de sustancia inhibitoria se determinó haciendo las lecturas de diámetros de los halos de inhibición en milímetros que se detallaran más adelante.

a. Siembra en placas de las bacterias patógenas

Cada suspensión bacteriana de *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* en caldo nutritivo, fue absorbida con un hisopo de algodón estéril. El exceso de líquido se descartó oprimiendo el algodón contra la pared del tubo. Para inocular las placas, se aplicó el hisopo sobre la superficie de las mismas, efectuando estrías en direcciones diferentes. Se dejaron secar las placas durante unos cinco minutos antes de proceder a aplicar los discos. Metodología adaptada de Lord, E. (2002)

b. Preparación de los discos de sensibilidad

Se emplearon discos de papel filtro (Watman N° 40) de 6 mm de diámetro esterilizados mediante un periodo de 15 minutos de autoclavado a 121°C con 15 libras de presión, y secados en la estufa durante un periodo de 15-20 minutos, éstos se introdujeron dentro de los sobrenadantes purificados parcialmente y sin purificación parcial. (Lord, E. 2002)

c. Aplicación de los discos de sensibilidad

Una vez impregnados con la solución inhibidora se colocaron 4 discos por placa, sobre la superficie del agar nutritivo por medio de una pinza estéril, según el tratamiento con una distancia suficiente entre ellos para evitar la superposición de los halos de inhibición. Se tuvo el cuidado, que los discos hicieran buen contacto con la superficie del agar, ejerciendo para ello, ligera presión sobre los mismos, se realizaron tres repeticiones por tratamiento con cada una de las combinaciones posibles entre las concentraciones.



Transcurridos 30 minutos de la colocación de los discos, las placas se incubaron invertidas en la incubadora a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 24-48 horas. (Lord, E. 2002)

d. Medida de las zonas de inhibición

Para la lectura de los halos de inhibición no se tomó en cuenta sólo su presencia o su ausencia, en todos los casos se tomó el diámetro de los halos, ya que estos varían según la inhibición provocada por la sustancia inhibitoria. Para medir los halos se utilizó una regla milimétrica. Se midió el diámetro total en milímetros del halo incluyendo el disco. De tal manera, la ausencia total de inhibición fue el borde del disco, es decir 6 mm de lectura (Shiva, 2007).

La actividad inhibitoria se calcula por la medida del valor de inhibición, calculado como:

$$\text{Valor de inhibición} = \frac{(I - DC)}{2}$$

Para una correcta interpretación de la fórmula, debe tenerse en cuenta que:

DC = Diámetro del Disco (mm).

I=Diámetro de Inhibición (mm).

e. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

La concentración inhibitoria mínima (CIM), definida como la dilución más baja en la cual se observa inhibición del crecimiento microbiano, se determinó por el método de la dilución crítica en placas. Para ello, sobre placas de agar nutritivo inoculadas con el microorganismo alterante a evaluar, se colocaron discos de



sensibilidad con sobrenadantes con sus diluciones seriadas, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:32, esto empleando la técnica de Gota sobre césped propuesta por Barefoot y Klaenhammer, (1993). Las placas se incubaron bajo condiciones óptimas para cada alterante a evaluar.

Calculo de las unidades de actividad de la bacteriocina en el sobrenadante

Las unidades arbitrarias de actividad se calcularon de la siguiente forma:

$$UA/ml = (1/d) (1/m) (f)$$

Donde:

- UA = unidades de actividad
- d = dilución donde se detecta un halo de inhibición de 1 mm
- f = factor de conversión (1000 μ l/ 1 ml)
- m = volumen de muestra (ml)

f. Equipos y materiales

| Equipos y materiales | Especificaciones |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Spectrofotómetro | : Marca GENESIS 20 |
| Potenciómetro | : Marca SCHOTT (rango de 0 -14) |
| Centrifuga | : LW Scientific Ultra – 8 v |
| Refrigeradora | : Marca SANSUMG capacidad 15 L. |
| Balanza analítica | : Citizen (capacidad 600gr. X 0.01) |
| Refractómetro | : Marca ATAGO (Brix 0 ~ 32%) |
| Autoclave | |
| Incubadora | |
| Contador de colonias | Lente de aumento |



Mechero bunsen

Placas petri : De vidrio (marca Giardino)

Vasos precipitados : De vidrio de 100 ml

Matraces de Erlemmeyer : De 250 y 500 ml

Tubos de ensayo : Vidrio (Pirex) de 5ml y 20 ml

Pipetas : Vidrio de 1ml, 5ml y 10 ml

Espátula drigalski : De vidrio

Asa de nicrom

Discos de papel filtro : Esterilizados para la evaluación de halos de inhibición

Hisopos : Esterilizados para diseminar cepas bacterianas

Etapas V. Evaluación fisicoquímica de la bacteriocina producida

En esta etapa se realizó la evaluación fisicoquímica para la confirmación que el sobrenadante parcialmente purificado, indique que la sustancia inhibitoria no sea por otros metabolitos que también puedan ejercer efecto inhibitorio ya sea por ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, etanol (Delgado, 2008).

a. Sensibilidad a catalasa

A los sobrenadantes que presentaron actividad antibacteriana y con pH ajustados a 6.5 con NaOH 2.5N, se trataron con una solución estéril de catalasa, a una concentración de 2 mg/ml, usando como diluyente de la enzima el buffer fosfato sódico 0.01 M, pH 7.2. Las muestras se incubaron a



37 °C por 1 hora. Después se realizó el ensayo de difusión en agar. La prueba de sensibilidad a catalasa se aplica para descartar que la actividad inhibitoria sea debido a la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

b. Estabilidad a diferentes pH

A los sobrenadantes de las muestras activas se les ajustaron el pH a 4 con NaOH 2.5 N y se incubaron a 30 °C por 2 horas. Luego del tratamiento, se ensayó la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión por agar. Se procedió de la misma manera para los valores de pH 6.5 y 9. La medición de pH se realizó usando un potenciómetro.

3.5. Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos térmicos sobre la estabilidad de los compuestos antimicrobianos se utilizó análisis de varianza de un factor (ANOVA) para la comparación en significancia entre los tratamientos en el paquete de Statgraphics *Plus* Versión 8.0.

Los resultados de los halos de inhibición expresados en valor de inhibición obtenidos de cada tratamiento frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp., se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza multifactorial con un nivel de confianza de un 95%. Al registrarse diferencia significativa se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar el tratamiento más efectivo sobre cada cepa sensible. Se utilizó el Software Statgraphics *Plus* Versión 8.0.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se presentan los principales resultados y discusión de las mismas en cada una de las etapas del trabajo de investigación y se da un análisis estadístico del efecto inhibitorio de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* 32plp sobre 3 cepas patógenas: *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.

4.1. Características para la Identificación de levaduras y cepas bacterianas

4.1.1. Observación macroscópica de las colonias

Las colonias fueron evaluadas a partir de cultivos puros, las características a considerar en la diferenciación y/o comparación son como se muestra en el cuadro 13.

✓ Color de las colonias

Según el cuadro 11 el color predominante de las colonias formadas en el cultivo fue blanco, este color caracteriza al género de levaduras *Saccharomyces*, *kloeckera*, *Cándida albicans* y *Hansenula anomala* como lo menciona Quintana (1993); la presencia de colonias coloreadas como rojo-anaranjado son características de otras especies como el género *Rhodotorula*, color que manifiesta esta levadura por su riqueza en carotenoides (Linares *et al.*, 2001), identificándose este tipo de levadura en la chicha de jora.



Cuadro 13: Características generales para la Identificación de levaduras como colonias predominantes en la microflora de la chicha de jora.

| Características morfológicas de levaduras predominantes en la chicha de jora | |
|--|--------------------------------|
| Forma | Circular |
| Tamaño | Medianas |
| Superficie | Lisa |
| Elevación | Convexa |
| Borde | Entero |
| Color | Blanco, crema, rojo-anaranjado |
| Opacidad | Transparente |
| Consistencia | Cremosa |




Figura 07: Vista macroscópica de levaduras en Agar YGC.

✓ **Forma de la colonia**

La forma predominante de las colonias que se desarrollaron en el medio de cultivo para levaduras fueron circulares, que caracteriza a los géneros de levadura, *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Cándida stellata*, y *Pichia* como lo indica Estela (2007), en la investigación realizada se encontró la forma circular (ver figura 07) de todas las colonias y colonias con forma lanceolada, que según Linares *et al*, (2001), son levaduras pertenecientes a *Saccharomyces ellipsoideus*.

4.1.2. Observación microscópica de las colonias (Tinción simple)

A continuación se presentan los principales resultados de la morfología que presentan las levaduras presentes en la chicha de jora vistas en microscopio.

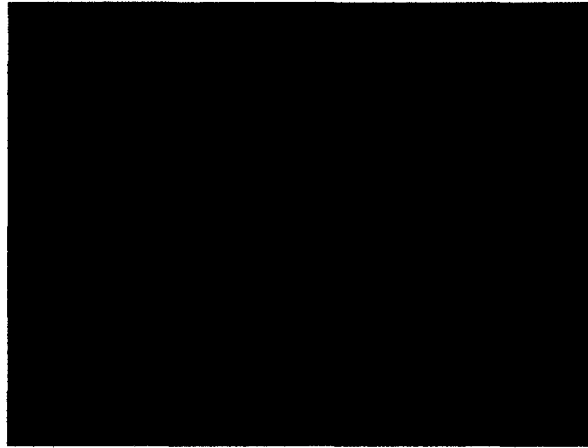


Figura 08: Aspecto microscópico de levaduras. Presentan células de forma ovalada

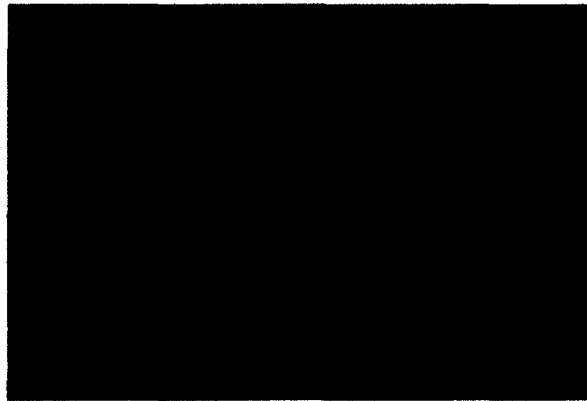


Figura 09: Aspecto microscópico de levaduras, presentan células de forma de salchicha

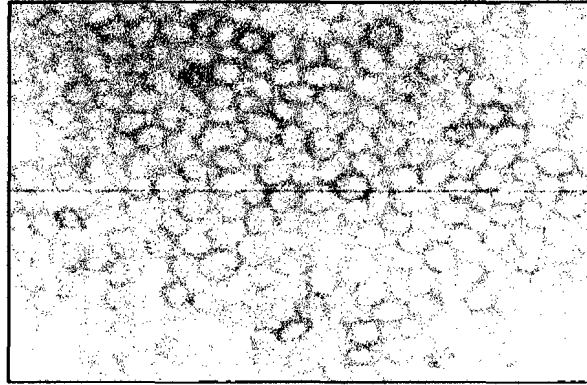


Figura 10: Aspecto microscópicode levaduras, presentan forma esférica.

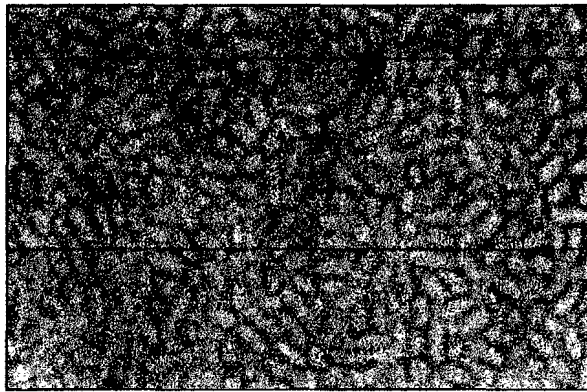


Figura 11: Aspecto microscópicode levaduras, de forma ovalada.

✓ **Forma de la célula**

Las células de las distintas levaduras pueden ser esféricas, ovoides, alargadas, elípticas, apiculatas en forma de botella, triangulares, etc. A veces es característica de un género(Leveau y Bouix, 2000). La forma de la célula ovalada, elipsoidal y cilíndrico es característico de las *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces* y la forma elipsoidal y ojival es característico de los géneros *Brettanomyces* y *Dekkera*, al igual la

forma apiculatas (como limón) pertenece a *Hanseniaspora* y *Kloeckera* esto según Kocková-Kratochvilová (1982).

Quintana (1993), aisló e identificó las levaduras con las siguientes formas: esféricas que es característico del género *Torula*, *Saccharomyces* y *Candida*, la forma de salchichay ovaladas a *Pichia*, *Saccharomyces*.

En el cultivo realizado se observó las siguientes formas de células: ovaladas, elipsoidales, esféricas y forma de salchicha como se muestra en las figuras, por lo tanto por la forma que presentaron son levaduras de géneros *Saccharomyces cerevisiae*, *Torula*, *Candida*, *Pichia*

Cuadro 14: Características macroscópicas generales para la Identificación de cepas bacterianas.

| Características morfológicas | <i>Lactobacillus plantarum</i> 32plp | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Salmonella</i> sp. |
|------------------------------|---|------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Forma | Circular | Irregular | Irregular | Circular |
| Tamaño | Pequeñas | Mediano | Grande | Pequeñas |
| Superficie | Lisa | Granular | Granular | Lisa |
| Elevación | Cúpula | Convexa | Chata | Convexa |
| Borde | Entero | Entrecortado | Lobado | Entero |
| Color | Colonias incoloras | Crema | Amarillo luminoso | Incoloras, con centro negro |
| Opacidad | Transparente | Opaca | Opaca | Transparente |
| Consistencia | Cremosa | Friable | Viscosa | Friable |



4.1.3. Aislamiento de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.

Los resultados para la identificación de estos patógenos fueron los siguientes como se muestra a continuación en el siguiente cuadro:

Cuadro 15: Características como resultado de las pruebas presuntivas realizadas para la Identificación de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.

| Pruebas | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|---|-----------------------------------|------------------------------|
| Coloración Gram | Gram-positivo | Gram-positivo |
| Prueba de catalasa (H ₂ O ₂) | ----- | POSITIVO |
| Prueba de Coagulasa + | ---- | POSITIVO |
| Fermentación de Glucosa | POSITIVO (coloración amarilla) | ---- |
| Licuefacción de gelatina | POSITIVO | ---- |

4.1.4. Observación microscópica de las colonias (Tinción Gram)

A continuación se muestran figuras vistas al microscopio las características de las bacterias patógenas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp.) y la cepa productora de bacteriocina *Lactobacillus plantarum* 32plp.



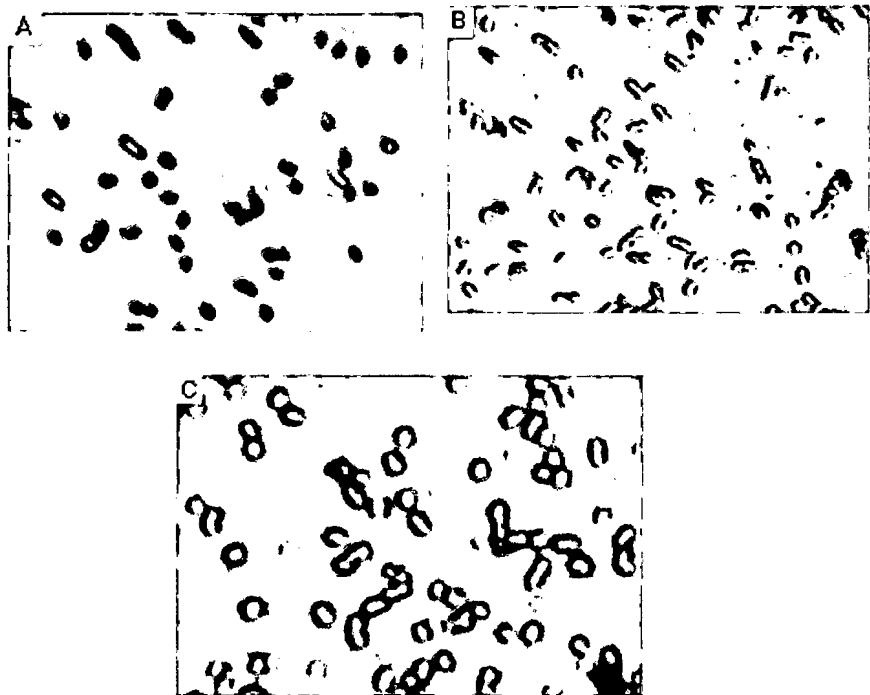


Figura 12: Características microscópicas de bacterias patógenas: A. *Bacillus cereus*, B. *Staphylococcus aureus*, C. *Salmonella* sp.

Cuadro 16: Características microscópicas realizadas para la Identificación de cepa *Lactobacillus plantarum* y cepas sensibles.

| Cepa | Coloración Gram | Forma celular |
|---|-----------------|-----------------------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 32plp | Positivo | Cocobacilos de cadena corta |
| <i>Bacillus cereus</i> | Positivo | Bacilos |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Positivo | Cocos |
| <i>Salmonella</i> sp. | Negativo | Bacilos |

4.2. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 32plp

En esta etapa la curva de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 32plp en medio de cultivo líquido (caldo Lactobacilli), que sirvió como patrón de referencia para la adecuación a otro sustrato como la chicha de jora.

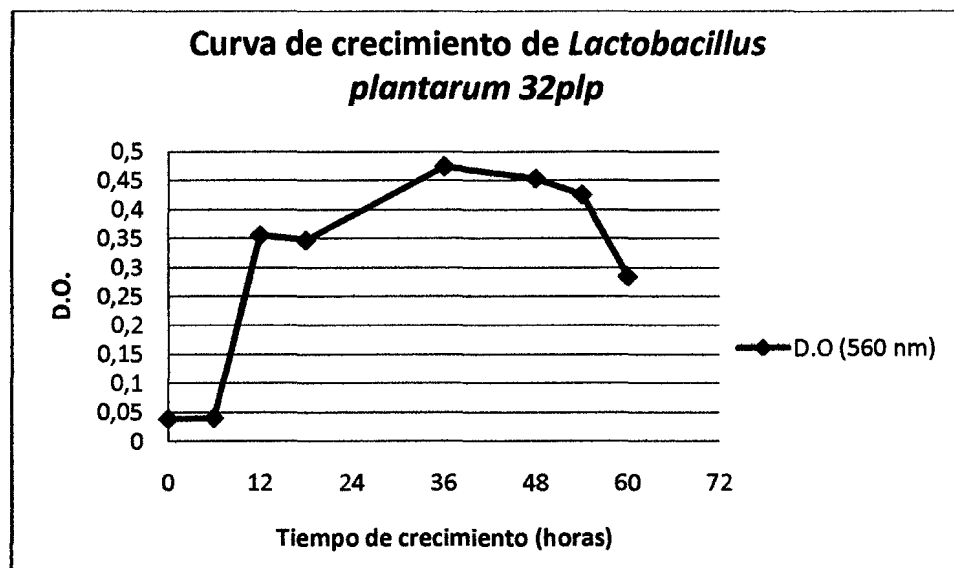


Figura 13: Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en caldo Lactobacilli.

Como se puede ver en la figura 13, presentó un patrón de producción relacionado con el crecimiento bacteriano iniciando en la fase de latencia (fase Lag), con una duración de solo 6 horas, esto demuestra que el inóculo se encontró en condiciones metabólicas activas, a esto se puede aportar que la concentración del inóculo (1%), propuesto por Loreto, (2002), es el adecuado para que la fase Lag sea corta, y a la vez que la cepa de *Lactobacillus plantarum* 32plp, se adapta muy rápidamente a este medio.



La fase de crecimiento exponencial (fase logarítmica) empieza con 0.04 a 0.48 de absorbancia esto en 6 horas de iniciada el crecimiento, ello demuestra que las células del inóculo presentaron un aumento del número de células, en esta fase conforme va incrementando la biomasa generada existe también la producción de metabolitos primarios y secundarios.

Zamfir, *et al.*, (2000) mencionan que el crecimiento microbiano se detiene debido posiblemente a que la fuente de carbono, principalmente glucosa, fue consumida totalmente.

Mostrando luego una fase estacionaria donde la tasa de crecimiento específica se hace constante (0.003/h) este periodo dura desde las 36 a 48 horas de iniciado el crecimiento, es en esta fase donde se observa un incremento en la actividad de la bacteriocina contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.*, como se puede ver en la fig. 14.



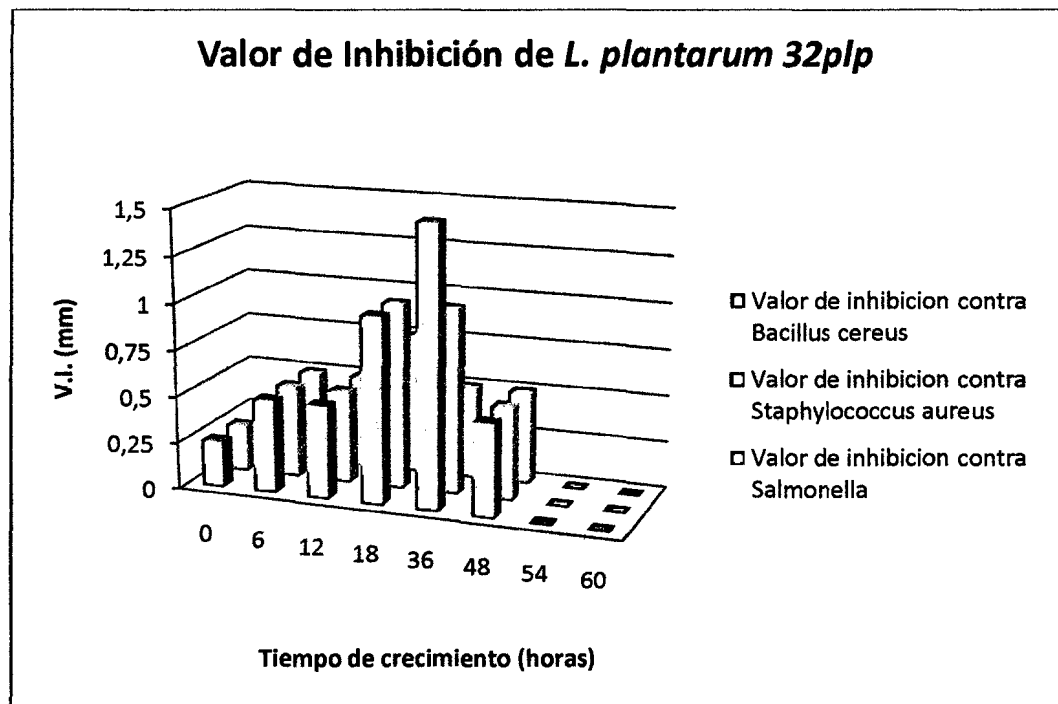


Figura 14: Formación de halos de inhibición de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* en caldo Lactobacilli frente a tres tipos de patógenos. Como se muestra en la figura la producción de la sustancia inhibidora (bacteriocina), donde existen mayores valores de inhibición se presenta al final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria esto con respecto a las 3 cepas sensibles a las cuales se desea verificar su efecto inhibitorio.

De Vuyst, *et al.*, (1996) mencionan que la producción de bacteriocinas, está relacionada con una cinética de producción de metabolito primario, con el crecimiento bacteriano. Este fenómeno se presenta en la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, siendo muy pocos los casos en que la producción se realiza durante la fase estacionaria (Kozak *et al.*, 1978; Biswas *et al.*, 1991; Jiménez-Díaz, *et al.*, 1993).



Con respecto a la producción de la bacteriocina producida por *L. plantarum* 32plp en medio Lactobacilli, presenta mayor poder de inhibición (1.5 mm) frente *Bacillus cereus*, cuando esta tratado con sobrenadante de bacteriocina sin purificar a 36 horas de crecimiento y una temperatura de 35 °C.

Sin embargo para *Staphylococcus aureus*, la bacteriocina producida entre 18 – 36 horas a 35°C, presentan mayores halos de inhibición (1 mm). Para *Salmonella sp.*, la producción de bacteriocina a 18 horas es la que presenta mayor valor de inhibición (0.75 mm).

4.3. Tolerancia al etanol de *Lactobacillus plantarum*

4.3.1. Crecimiento de la cepa

La curva de crecimiento que sigue a diferentes concentraciones 4, 8, 10 % de etanol se muestra en la figura 15. Donde se ve muestra la influencia de la concentración de etanol, siendo esto que a mayor % de etanol adicionado al medio disminuye la multiplicación celular.



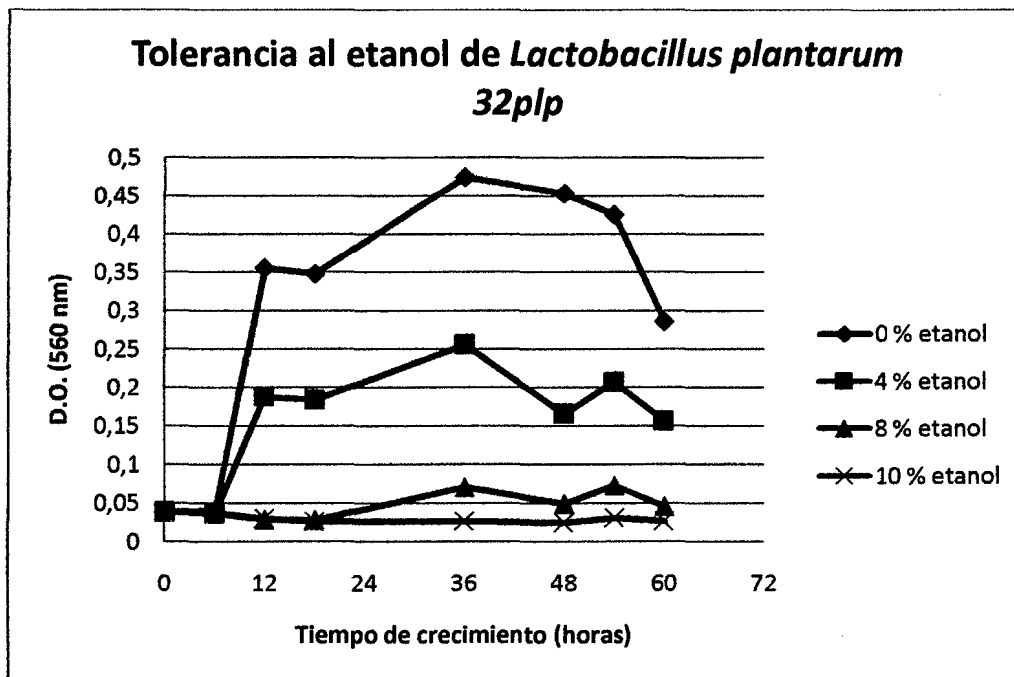


Figura 15: Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* a diferentes concentraciones de etanol. (Densidad óptica cte. = 560 nm)

4.3.2. Máxima población relativa y nivel de tolerancia

En cuanto a la determinación del nivel de tolerancia de la cepa *Lactobacillus plantarum* 32plp, mostró sus máximas tasas de crecimiento creciendo en Caldo Lactobacilli sin etanol a 35°C, el 100% de las cepas tuvieron un crecimiento total, pero conteniendo etanol a concentraciones de 4 v/v, el 53.9% de las cepas mostraron tener un buen nivel de tolerancia, para 8% v/v solo el 15.4% mostraron crecimiento considerándose que la cepa productora de bacteriocina llega a una tolerancia no mayor a 8%, puesto que a 10% no existió crecimiento (figura 16, Cuadro 17).

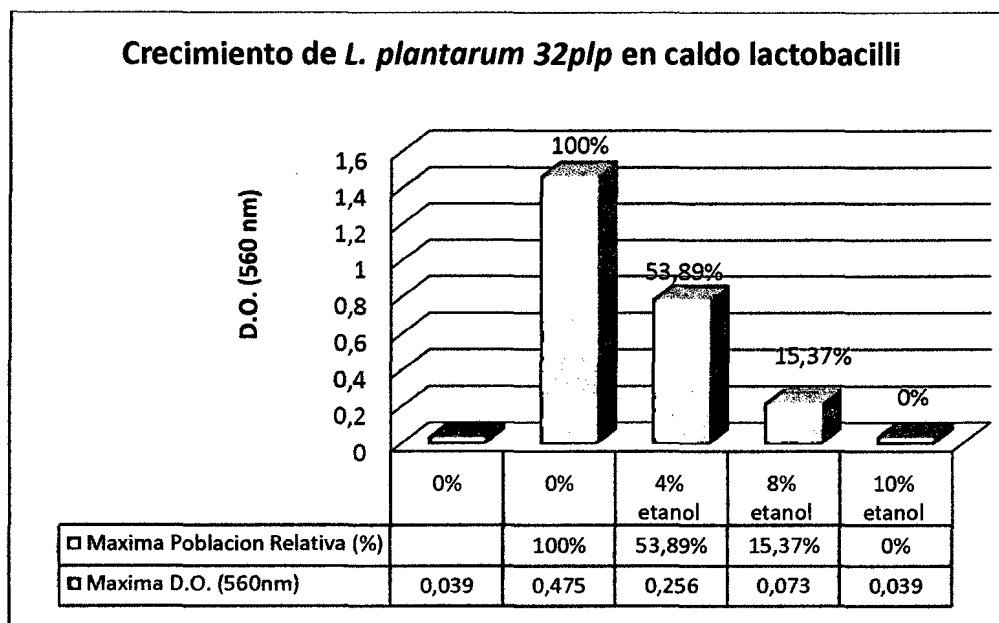


Figura 16: Máxima población relativa en el crecimiento de *L. plantarum* 32plp a diferentes concentraciones de etanol

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* 32plp obtenidas demostraron poseer tolerancia a concentraciones de hasta 8 % de etanol (v/v) presentes en el caldo de cultivo mostrando una máxima población cuando crecieron en caldo Lactobacilli, libre de etanol a 35°C, cuando el medio fue suplementado con 4% de etanol, presenta crecimiento en un 53.8 %, se puede decir que *L. plantarum* 32plp, tolera hasta una concentración de 4 %, para un crecimiento mayor de 50 % de la población.

Mientras que al incrementar el contenido de etanol de hasta 8% se produjo una supresión del crecimiento notable en un alto porcentaje de cepas y solo un 15.4% del total de cepas se mantuvieron tolerantes a esta última concentración.

Cuadro 17: Calculo de los máximas poblaciones relativas y determinación del nivel de tolerancia de etanol para *Lactobacillus plantarum* 32plp.

| Tratamiento | Máxima D.O. (560nm) | Máxima Población Relativa (%) |
|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| Caldo Lactobacilli sin etanol | 0.039 ¹ | |
| Caldo Lactobacilli sin etanol | 0.475 ² | 100 |
| Caldo L .+ 4% v/v etanol | 0.256 | 53.89 |
| Caldo L .+ 8% v/v etanol | 0.073 | 15.37 |
| Caldo L .+ 10% v/v etanol | 0.39 ³ | 0 |

¹: Densidad óptica del cultivo al inicio del ensayo

²: Máximo valor de D.O. alcanzado por la cepa a lo largo de su curva de crecimiento (60horas).

³: Valor menor de D.O. que al iniciar (no hay crecimiento), por consiguiente la cepa tolera hasta un 4% v/v de etanol.

Por su parte Alegría et al., (2004) obtuvieron un considerable número de cepas de *Lactobacillus plantarum* tolerantes a 12% de etanol aisladas de vinos rojos españoles proponiendo la utilización de las mismas como cultivos iniciadores para la inducción de la fermentación maloláctica en la producción industrial de vinos.

Observaciones de Alegría et al., (2004) quienes reportaron el mismo efecto con 7% de etanol (v/v) en el caldo de cultivo. La mayoría de cepas no fueron inhibidas por concentraciones de 4 % de etanol en el medio de cultivo, lo que



indica una tolerancia significativa de las cepas de *Lactobacillus plantarum* cuando este se encuentre en otro sustrato como la chicha de jora, podrá tener un crecimiento tolerable de hasta 4% de etanol que se pueda generar en dicho sustrato.

4.3.3. Valor de inhibición de *L. plantarum* 32plp a diferentes concentraciones de etanol frente a *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella* sp..

La cepa de *Lactobacillus plantarum* 32plp con capacidad antagónica o inhibitoria y tolerantes al etanol entre 4 y 8% (v/v) producen pequeños valores de inhibición no mayores a 1mm como se muestra en las fig. 17 y 18.

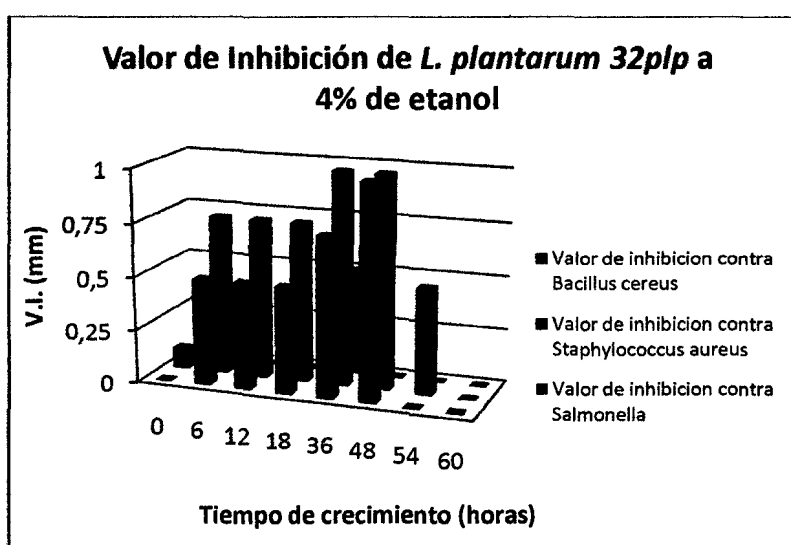


Figura 17: Formación de halos de inhibición de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* a 4% de etanol frente a tres tipos de patógenos

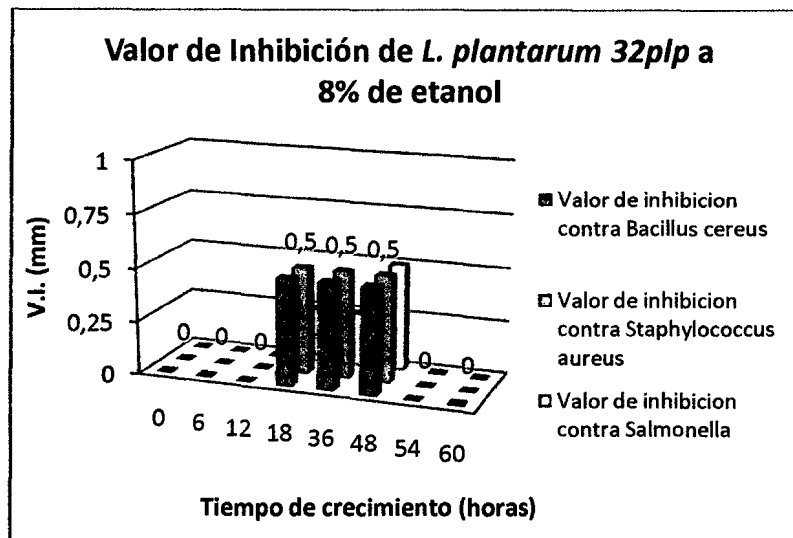


Figura 18: Formación de halos de inhibición de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* a 8% de etanol frente a tres tipos de patógenos

Con respecto a la producción de la bacteriocina producida por *L. plantarum* 32plp a 4% de etanol presenta mayor poder de inhibición (1 mm) que a concentraciones de 8% de etanol con 0.5 mm de inhibición frente *Bacillus cereus*, cuando esta tratado con sobrenadante de bacteriocina sin purificar a 48 horas de crecimiento y una temperatura de 35 °C.

Sin embargo para *Staphylococcus aureus*, la bacteriocina producida entre 36 – 48 horas a 35°C, presentan mayores halos de inhibición (1 mm), esto a 4% de etanol y de 0.5 mm en una concentración de 8%. Para *Salmonella sp.*, sucedió que tanto para 4 y 8% de etanol inhibió no mayor de 0.5mm esto a 48 horas de crecimiento de la cepa productora de bacteriocina.



Por último, el incremento en concentración de etanol, tiene un efecto negativo en el aumento de la cinética de crecimiento de *L. plantarum* y en la producción de bacteriocina, por ende en el valor de inhibición frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*es bajo. Esto hace constatar que la concentración de etanol no influye en la formación de los halos de inhibición o el poder inhibitorio sea a causa de etanol.

4.4. Producción de bacteriocina por *Lactobacillus plantarum* 32plp en chicha de jora.

Se obtuvieron los siguientes resultados durante el proceso de fermentación de la chicha de jora con *L. plantarum* 32plp, que se detallaran a continuación:

Cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 32plp en chicha de jora

Se realizó el conteo de colonias, medición del pH, % de acidez, °Brix y medición de la densidad óptica (560 nm). En los 4 tratamientos T₁ = (Pasteurización, 25°C), T₂ = (Pasteurización, 35°C), T₃ = (Esterilización, 25°C), T₄ = (Esterilización, 35°C).

En la figura 19 se muestra el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 32plp, para los cuatro tratamiento realizados.



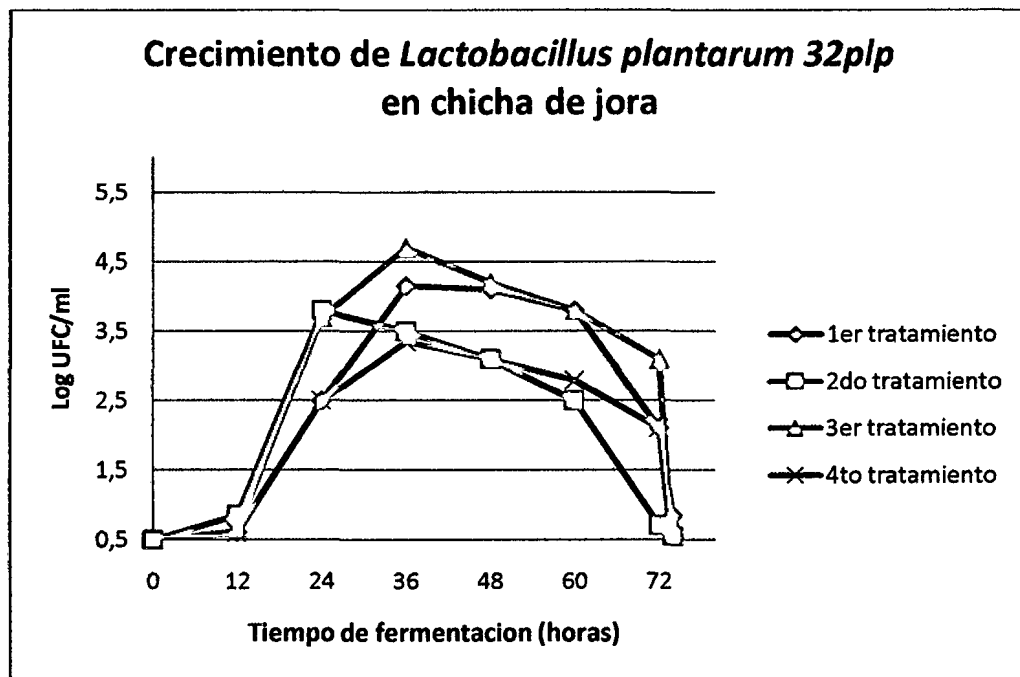


Figura 19: Recuentos (UFC/ml) de *Lactobacillus plantarum* 32plp en chicha de jora durante el tiempo de fermentación para 4 tratamientos.

De la figura se observa que la población microbiana en la chicha de jora, se detallara por cada tratamiento realizado.

1^{er} TRATAMIENTO. (Tratamiento térmico₁ = Pasteurización, Temperatura de fermentación₁ = 25°C)

En este tratamiento se trabajó a una temperatura de fermentación de 25°C en un sustrato como es la chicha de jora previamente expuesta a un tratamiento térmico de pasteurización cte. (85°C/30 min). Observándose un crecimiento en aumento de ciclos logarítmicos de 0.6 a 4.15 en fase exponencial y una prolongada fase estacionaria. Así como se muestra en el cuadro 18 y figura 20 el valor de inhibición para las tres cepas patógenas o sensibles.



Cuadro 18: Producción de bacteriocina en la fase de crecimiento de *L. plantarum 32plp* en chicha de jora para el primer tratamiento y el efecto de inhibición frente a 3 patógenos.

| Tiempo de producción de bacteriocinas (h) | Máximo Valor de inhibición (mm) | Cepa sensible | Fase en la que aparece mayores valores de inhibición |
|---|-----------------------------------|------------------------------|--|
| 12 a 36 horas | 2.5 mm a 12 horas de fermentación | <i>Staphylococcus aureus</i> | Inicio de la fase exponencial |
| 48 horas | 2 mm | <i>Bacillus cereus</i> | En la fase estacionaria |
| 48 horas | 1.44 mm | <i>Salmonella sp.</i> | En la fase estacionaria |

Existe un aumento de ciclos logarítmicos en un periodo de 36 horas debido a la temperatura de fermentación de 25°C empleada que prolonga la fase exponencial, produciéndose una mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* que decrece conforme transcurre la curva de crecimiento, sin embargo a 48 horas del periodo de fermentación donde la población de *L. plantarum 32plp*, se encuentra en una fase estacionaria donde la velocidad específica de crecimiento se encuentra cte. produce actividad antibacteriana frente a *Bacillus cereus* y *Salmonella sp.*



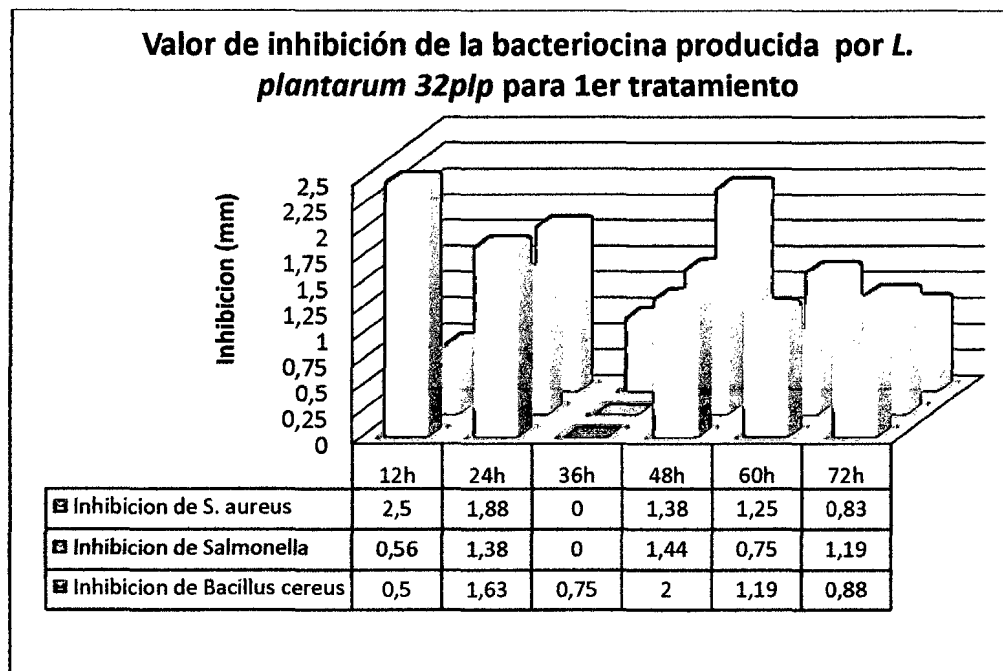


Figura 20: Valor de inhibición de la bacteriocina producida frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp.y *Bacillus cereus* para el 1er tratamiento

2^{do} TRATAMIENTO. (Tratamiento térmico₁ = Pasteurización, Temperatura de fermentación₂ = 35°C)

En este tratamiento se trabajó a una temperatura de fermentación de 35°C presentando una fase exponencial y estacionaria corta; a esta temperatura la curva de crecimiento no es prolongada en ninguna fase (ver fig. 19), en sustrato como es la chicha de jora previamente expuesta a un tratamiento térmico de pasteurización cte. (85°C/30 min). Observándose un crecimiento en aumento de ciclos logarítmicos de 0.85 a 3.5 en fase exponencial y una

corta fase estacionaria. Así como se muestra en el cuadro 19, figura 21, y el valor de inhibición para las tres cepas patógenas o sensibles.

Cuadro 19: Producción de bacteriocina en la fase de crecimiento de *L. plantarum 32plp* en chicha de jora para el segundo tratamiento y el efecto de inhibición frente a 3 patógenos.

| Tiempo de producción de bacteriocinas (h) | Máximo Valor de inhibición (mm) | Cepa sensible | Fase en la que aparece mayores valores de inhibición |
|--|--|------------------------------|---|
| 48 horas | 1.63 mm | <i>Staphylococcus aureus</i> | Termino de la fase estacionaria |
| 60 horas | 1.69 mm | <i>Bacillus cereus</i> | Termino de la fase estacionaria |
| 48 horas | 2.38 mm | <i>Salmonella sp.</i> | Termino de la fase estacionaria |

Existe un aumento de ciclos logarítmicos en un periodo de 24 horas, que se considera la fase exponencial, pero la actividad antibacteriana en esta fase de crecimiento exponencial es inferior a 1 mm frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* viéndose un ligero aumento de la actividad antibacteriana producida en esta fase 1.38 mm frente a *Bacillus cereus*; sin embargo a 48 horas del periodo de fermentación donde la población de *L. plantarum 32plp*, se encuentra en término de la fase estacionaria produce una mayor actividad



antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Salmonella* sp.; como se muestra en la fig. 21.

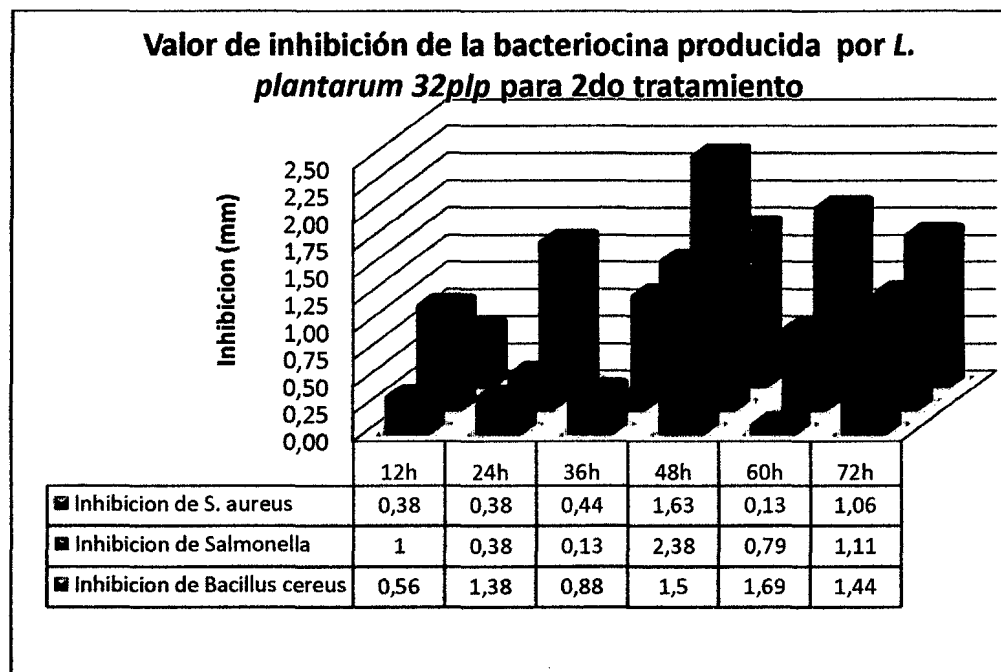


Figura 21: Valor de inhibición de la bacteriocina producida frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp.y *Bacillus cereus* para el 2do tratamiento

3^{er} TRATAMIENTO.(Tratamiento térmico₂ = Esterilización, Temperatura de fermentación₁ = 25°C)

En este tratamiento se trabajo a una temperatura de fermentación de 25°C presentando una fase exponencial y estacionaria prolongada; a esta temperatura la curva de crecimiento prolongada (ver fig. 19), en sustrato como es la chicha de jora previamente expuesta a un tratamiento térmico de Esterilización cte. (121°C/15 min a 15 PSI). Observándose un crecimiento en



aumento de ciclos logarítmicos de 0.63 a 4.7 en fase exponencial y una prolongada fase estacionaria. Así como se muestra en el cuadro 20, figura 22, y el valor de inhibición para las tres cepas patógenas o sensibles.

Cuadro 20: Producción de bacteriocina en la fase de crecimiento de *L. plantarum 32plp* en chicha de jora para el tercer tratamiento y el efecto de inhibición frente a 3 patógenos.

| Tiempo de producción de bacteriocina (h) | Máximo Valor de inhibición (mm) | Cepa sensible | Fase en la que aparece mayores valores de inhibición |
|--|---------------------------------|------------------------------|--|
| 48 horas | 1.95 mm | <i>Staphylococcus aureus</i> | fase estacionaria |
| 12 horas | 1.8 mm | <i>Bacillus cereus</i> | Inicio de la fase exponencial |
| 60horas | 1.3 mm | <i>Salmonella sp.</i> | Termino de la fase estacionaria |

Existe un aumento de ciclos logarítmicos en un periodo de 36 horas, que se considera la fase exponencial, donde la actividad antibacteriana en esta fase de crecimiento exponencial solo se presente frente *Bacillus cereus* (1.8 mm); sin embargo frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* la actividad antibacteriana máxima la presenta en la fase estacionaria al inicio y termino respectivamente; como se muestra en la fig. 22.



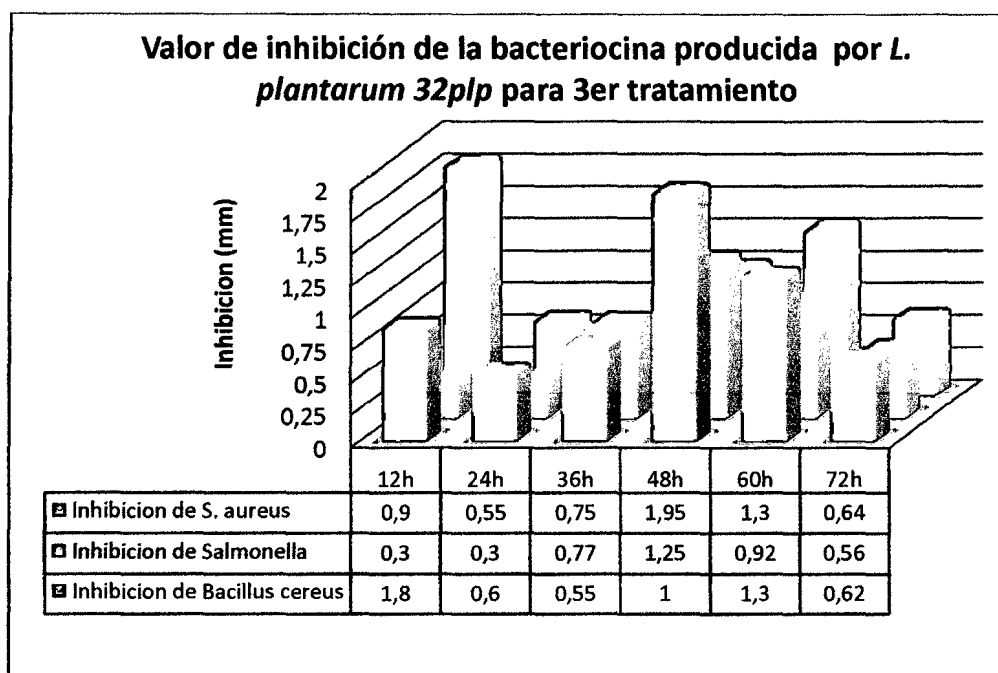


Figura 22: Valor de inhibición de la bacteriocina producida frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* y *Bacillus cereus* para el 3er tratamiento.

4^{to} TRATAMIENTO. (Tratamiento térmico₂ = Esterilización, Temperatura de fermentación₂ = 35°C)

En este tratamiento se trabajó a una temperatura de fermentación de 35°C presentando una fase exponencial y estacionaria prolongada; a esta temperatura la curva de crecimiento prolongada (ver fig. 19), en sustrato como es la chicha de jora previamente expuesta a un tratamiento térmico de Esterilización cte. (121°C/15 min a 15 PSI). Observándose un crecimiento en aumento de ciclos logarítmicos de 0.6 a 3.35 en fase exponencial y una prolongada fase estacionaria. Así como se muestra en el cuadro 21, figura 23, y el valor de inhibición para las tres cepas patógenas o sensibles.

Cuadro 21: Producción de bacteriocina en la fase de crecimiento de *L. plantarum 32plp* en chicha de jora para el cuarto tratamiento y el efecto de inhibición frente a 3 patógenos.

| Tiempo de producción de bacteriocina (h) | Máximo Valor de inhibición (mm) | Cepa sensible | Fase en la que aparece mayores valores de inhibición |
|--|---------------------------------|------------------------------|--|
| 12 y 60 horas | 0.75 y 1.1 mm | <i>Staphylococcus aureus</i> | Fase inicio de la fase exponencial e inicio de la fase muerte. |
| 12 horas | 1 mm | <i>Bacillus cereus</i> | Inicio de la fase exponencial |
| 12 horas | 0.6 mm | <i>Salmonella sp.</i> | Inicio de la fase exponencial |

Existe un aumento de ciclos logarítmicos en un periodo de 12 horas baja debido a la influencia de la temperatura en el proceso de fermentación de 35°C, que se considera la fase exponencial, donde la actividad antibacteriana en esta fase de crecimiento exponencial solo se presente frente *Bacillus cereus* (1 mm) y *Salmonella sp.*(0.6 mm); sin embargo frente a *Staphylococcus aureus*, la actividad antibacteriana máxima la presenta en la fase de inicio exponencial y termino respectivamente; como se muestra en la fig. 23.



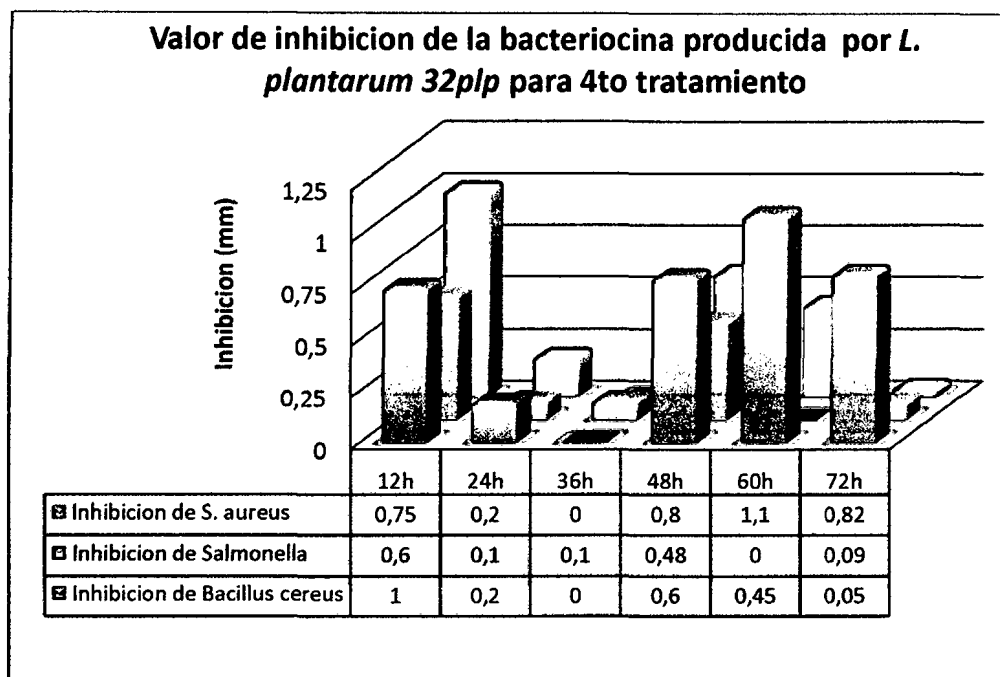


Figura 23: Valor de inhibición de la bacteriocina producida frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp.y *Bacillus cereus* para el 4to tratamiento

Cuadro 22: Resumen de los valores máximos de inhibición de la bacteriocina producida por *L. plantarum* 32plp en chicha de jora, frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp.y *Bacillus cereus*.

| Tratamientos | Cepas sensibles | | |
|-----------------|------------------------------|------------------------|-----------------------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Salmonella</i> sp. |
| 1er tratamiento | 2.50 mm (IFE) | 2.00 mm (Fe) | 1.44 mm (Fe) |
| 2do tratamiento | 1.63 mm (TFe) | 1.69 mm (TFe) | 2.38 mm (TFe) |
| 3er tratamiento | 1.95 mm (Fe) | 1.80 mm (IFE) | 1.30 mm (TFe) |
| 4to tratamiento | 0.70–1.11mm(IFE - IFM) | 1.00 mm (IFE) | 0.60 mm (IFE) |

IFE = Inicio de la Fase Exponencial, Fe = Fase estacionaria, TFe =

Termino de la Fase estacionaria, IFM = Inicio de la Fase de Muerte

- ✓ Zapata, *et al.* (2009), trabajo con *Lactobacillus plantarum* LBPM10, donde menciona que presenta actividad antimicrobiana constitutiva con un máximo a las 12 horas, correspondientes al final de la fase exponencial. El máximo de actividad se mantuvo constante durante 12 horas y comenzó a decrecer a las 27 horas demostrando que la producción de bacteriocinas depende de la fase de crecimiento y es estable en el medio de producción durante largos periodos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Nissen- Meyer *et al.* (1993) y González *et al.* (1999), quienes reportan que la actividad antimicrobiana de *L. lactis* y *L. plantarum* comienza a decaer una vez comienza la fase estacionaria. Sin embargo en la presente investigación la cepa de *Lactobacillus plantarum* 32plp presenta un amplio rango de actividad antimicrobiana durante su cinética de crecimiento, desde el inicio de la fase exponencial, estacionaria y el inicio de la fase de muerte o decadencia.
- ✓ Sedano, (2006) menciona que la máxima producción de la sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus plantarum* M4, se observó entre las 20-24 horas de crecimiento microbiano, y coincidió con la finalización de la fase exponencial. Resultados similares fueron obtenidos por Quillama, (1998) quien comprobó que *Lactobacillus plantarum* E2 aislado de Chicha de jora, bebida fermentada a base de un cereal rico en almidón (maíz germinado), presentaba una cinética de máxima producción del compuesto antimicrobiano durante la fase logarítmica tardía.



A través de este estudio, se pudo comprobar que la sustancia inhibitoria producida por *Lactobacillus plantarum* 32plp mostró un espectro de actividad amplio a especies Gram positivas y Gram negativas, además se observó que la sustancia inhibitoria inhibió el crecimiento de bacterias patógenas contaminantes de alimentos (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp.). Estos resultados coinciden con Zapata, *et al.* (2009), que menciona que el extracto libre de células de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 mostró un efecto antibacterial frente a bacterias Gram positivas como *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* (ATCC7644) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 1395); y bacterias Gram negativas como *Salmonella* sp. *Tiphy* (ATCC 6539), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella* sp. Y *Serratia marcescens*.

El efecto bactericida del extracto frente a las bacterias Gram negativas es interesante ya que pocos extractos de bacterias acidolácticas han mostrado actividad antimicrobiana frente a este grupo de bacterias. En *L. plantarum* se ha reportado actividad frente a bacterias Gram negativas con la plantaricina 35d (Messi, *et al.*, 2001) y las bacteriocinas producidas por las cepas ST194BZ, ST414BZ y ST664BZ (Torodov, *et al.*, 2005).



4.5. Variación del pH de la chicha de jora durante la fermentación

Con respecto a la disminución del pH, el sustrato (chicha de jora), fue ajustado a 6.5 de pH, para todos los tratamientos. Como se muestra en la figura 24.

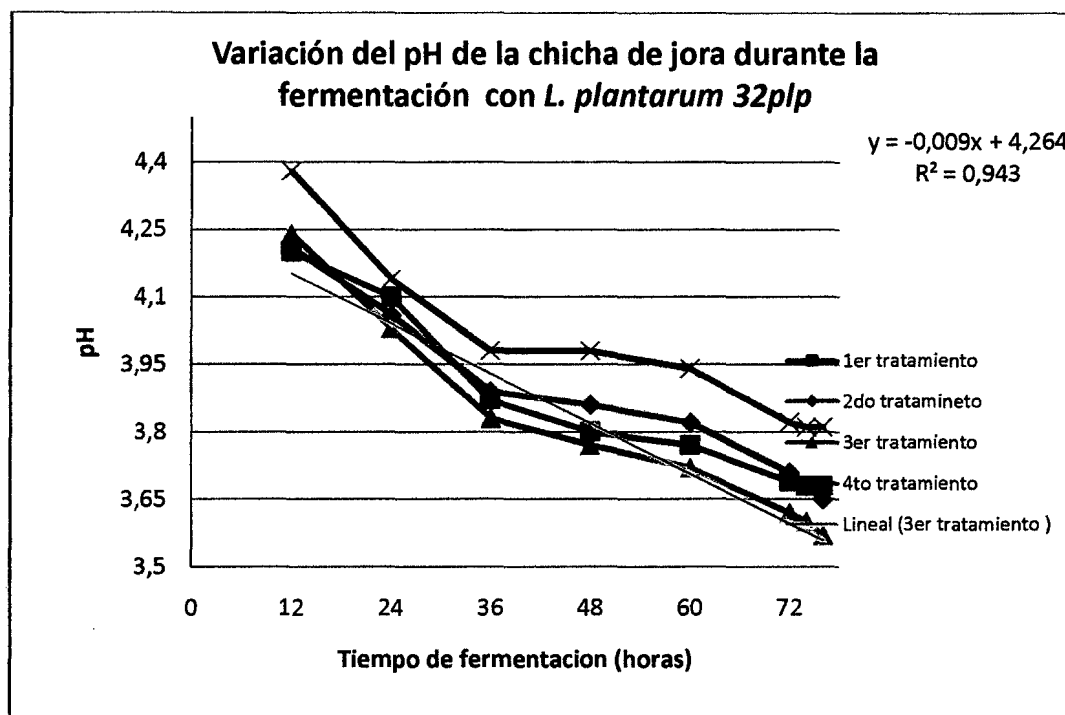


Figura 24: Variación del pH de la chicha de jora inoculado con *L. plantarum 32plp* para los 4 tratamientos con respecto al tiempo.

Como se observa de la figura la disminución del pH se debe sobre todo que *L. plantarum 32plp*, al encontrarse en crecimiento transforma los azúcares en ácido láctico y producir ácidos orgánicos hacen que el medio se acidifique, logrando llegar hasta 3.62 de pH mínimo a 72 horas de iniciada la fermentación para el tercer tratamiento (Esterilización, con 25°C de temperatura de fermentación). Donde se ajusta a una ecuación lineal, con un coeficiente de variabilidad de 0.943,

dando como resultado que el pH, se encuentra en una disminución progresivamente lineal a medida que pasa el tiempo.

4.6. Porcentaje de Acidez (ácido láctico)

El porcentaje de ácido láctico se ve influenciado por características como la temperatura de fermentación (25 y 35°C), concentración del inóculo, fuente de nutrientes asimilables para la cepa de *L. plantarum 32plp*. Por lo que respecta al porcentaje de acidez titulable, el comportamiento es contrario al pH, mientras el pH disminuye el porcentaje de acidez aumenta en los 4 tratamientos, obteniéndose como un máximo de 0.76 g/l para el 1er tratamiento se muestra en la figura 25.

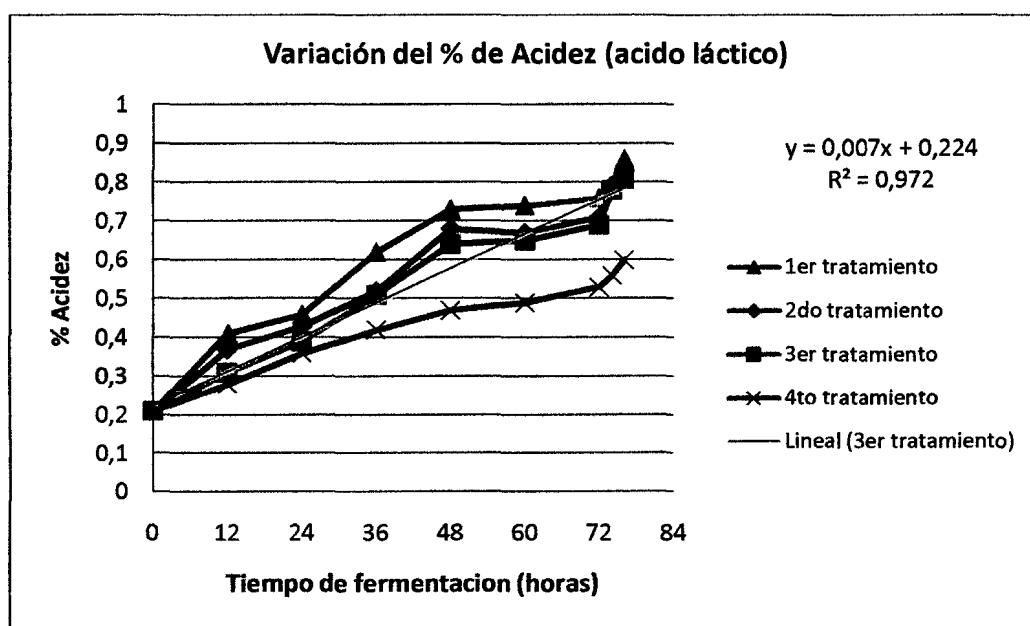


Figura 25: Comportamiento de la acidez titulable a lo largo del periodo de fermentación de la chicha de jora inoculado con *L. plantarum 32plp* para los 4 tratamientos.

Como se observa, el incremento del % de acidez para el tercer tratamiento que se considera como el más adecuado según la comparación estadística entre los factores independientes, presenta una ecuación lineal que se ajusta con un coeficiente de correlación significativo a 0.97, donde el % de acidez en función de ácido láctico incrementa progresivamente sin variación.

4.7. Comportamiento de la D.O. durante la fermentación

La variación de la densidad óptica es medida directamente como resultado la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm iniciando con 0.5 para los 4 tratamientos, en la figura 26 se muestra la variación de la D.O. para los 4 tratamientos.

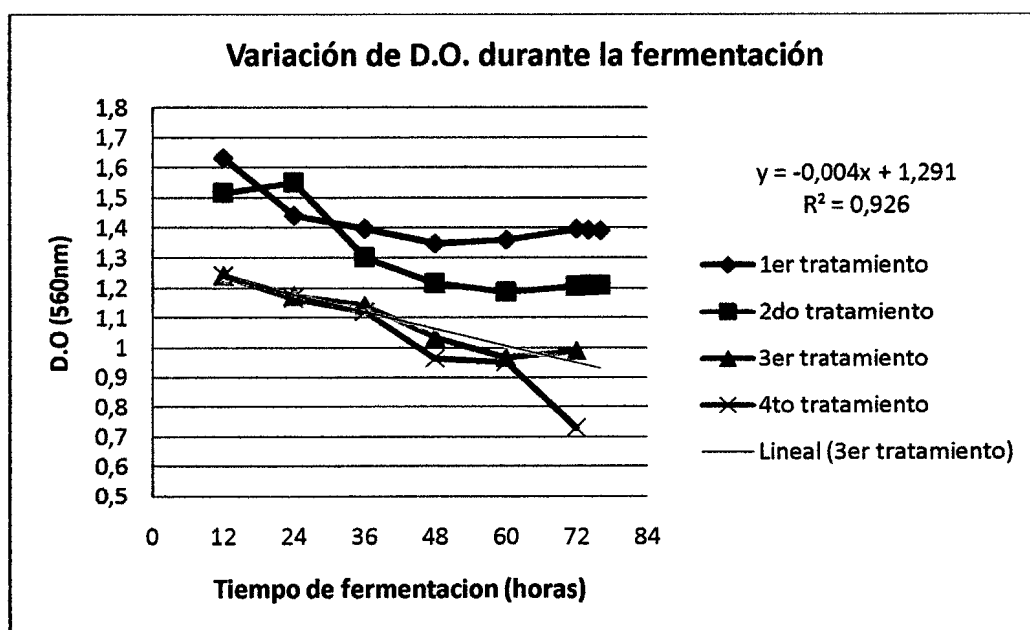


Figura 26: Comportamiento de D.O. a lo largo del periodo de fermentación de la chicha de jora inoculado con *L. plantarum 32plp* para los 4 tratamientos.

Como se observa en la fig. 26, la densidad óptica de la suspensión es proporcional a la masa de las partículas suspendidas, sin embargo en la figura se observa que esta disminuye en función al tiempo debido a que el sustrato de la chicha de jora al estar sometido a una fermentación anaeróbica y tipo batch ocurra la sedimentación de la biomasa y clarificación por muerte de los microorganismos al ser inhibidas por el incremento del porcentaje de acidez. En cuanto a la disminución de la D.O., al ajustarle a una ecuación lineal presenta un coeficiente de variabilidad de 0.92, indicando que la disminución del la población bacteriana se reduce en 1.291 relativamente al tiempo.

4.8. Purificación parcial de bacteriocina de *Lactobacillus plantarum* 32plp en chicha de jora.

A los sobrenadantes, extraídos sin purificar (bacteriocinas crudas), se sometieron a un proceso de purificación parcial que consistió en la separación por centrifugación y concentración mediante la adición de Sulfato de amonio al 65%, obteniéndose sobrenadante libre de células concentradas. Evaluándose estos sobrenadantes de bacteriocinas parcialmente purificadas frente a las 3 cepas sensibles: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* Como se muestran las figuras 27, 28, 29 respectivamente.

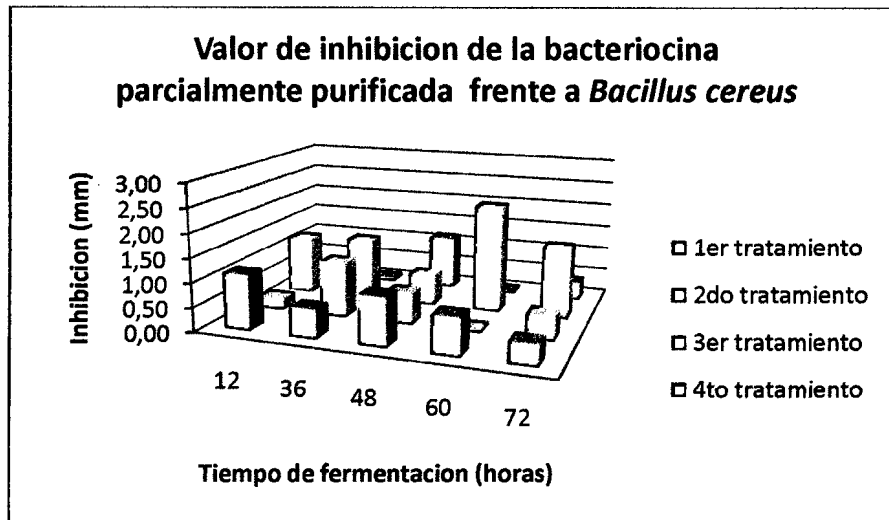


Figura 27: Valor de inhibición de la bacteriocina parcialmente purificada frente a *Bacillus cereus* para los 4 tratamientos durante el tiempo de fermentación.

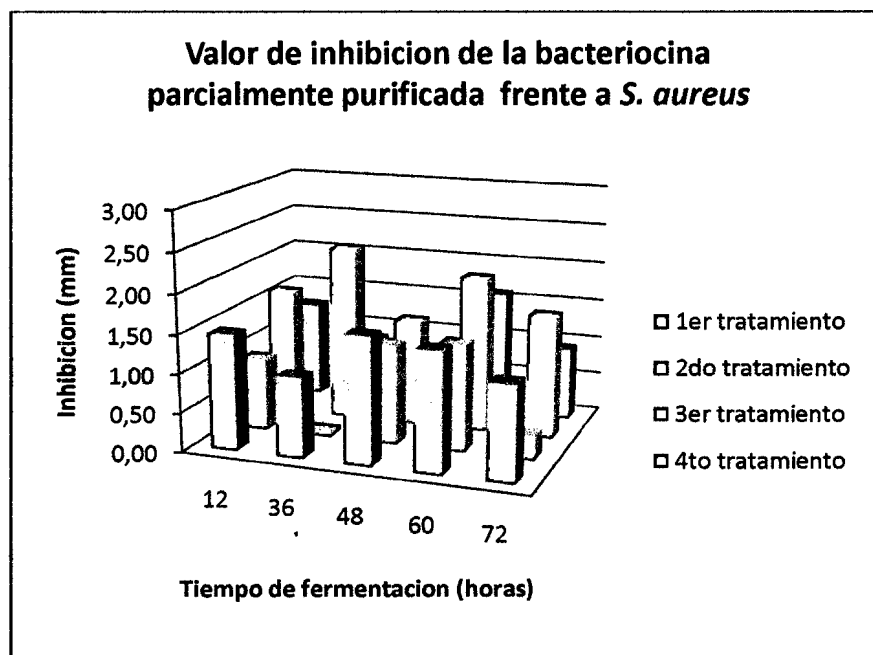


Figura 28: Valor de inhibición de la bacteriocina parcialmente purificada frente a *Staphylococcus aureus* para los 4 tratamientos durante el tiempo de fermentación.

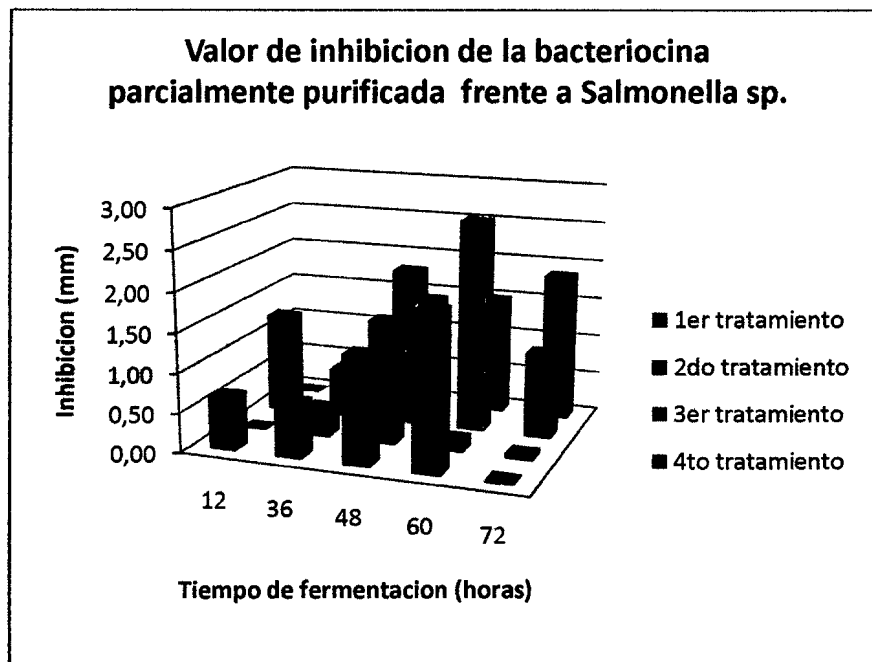


Figura 29: Valor de inhibición de la bacteriocina parcialmente purificada frente a *Salmonella sp.* para los 4 tratamientos durante el tiempo de fermentación.

Con respecto a la fase de desarrollo de la cepa productora en la cual se detectó producción de bacteriocina, ésta se observó desde principios de la fase exponencial decrecimiento del microorganismo y al término de dicha fase, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Bórquez (2000), en la producción de esta bacteriocina a escala de laboratorio. La actividad de la bacteriocina aumentó en la medida en que se fue multiplicando la cepa

productora. Ello estaría indicando que la bacteriocina correspondería a un metabolito primario, es decir, su síntesis ocurre durante la fase primaria del crecimiento del microorganismo, y también cerca de la fase final o fase estacionaria, lo que correspondería según Brock (1999) a un metabolito secundario.

Siendo el tercer tratamiento (Esterilización, con fermentación a 25°C) quien presenta mejores resultados en formación de halos de inhibición, para lo cual se realizó la evaluación fisicoquímica, y en comparación del 1er tratamiento (Pasteurización, con fermentación a 25°C) para verificar la estabilidad de la bacteriocina a diferentes pH, y para descartar que la inhibición sea por peróxido de hidrogeno, se realizó la prueba de la sensibilidad a la catalasa.

4.9. Evaluación fisicoquímica de la bacteriocina

4.9.1. Sensibilidad a catalasa

Después de su tratamiento con catalasa, todos los sobrenadantes tratados presentaron actividad inhibitoria frente *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.*. Como se muestra en las siguientes figuras 30, 31.



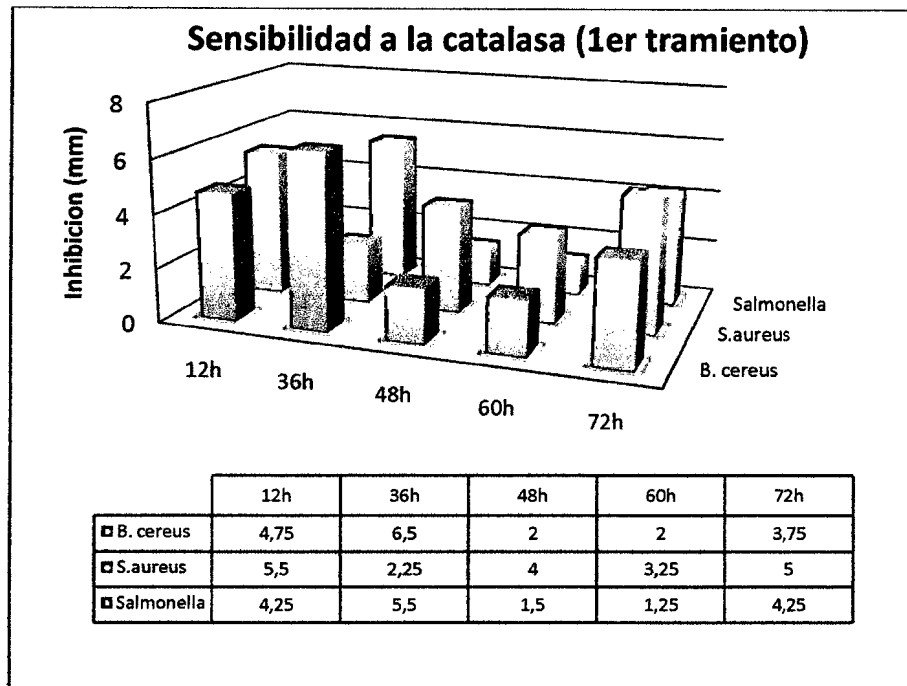


Figura 30: Sensibilidad a la catalasa (peróxido de hidrogeno) de la bacteriocina producida por *L. plantarum* y evaluación sobre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* mediante los halos de Inhibición.

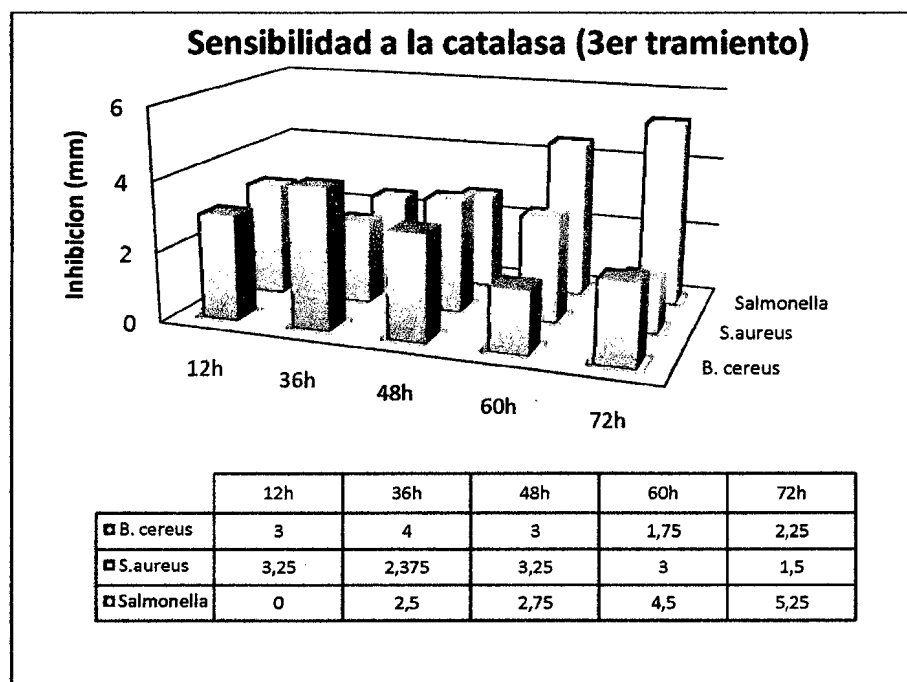


Figura 31: Sensibilidad a la catalasa (peróxido de hidrogeno) de la bacteriocina producida por *L. plantarum* y evaluación sobre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* mediante los halos de Inhibición

Sedano, (2006), menciona que cuando el sobrenadante libre de células conteniendo la sustancia inhibitoria producida por *Lactobacillus plantarum* M4 fue tratado con NaOH y catalasa, se pudo también observar que la actividad antimicrobiana se mantuvo estable, indicando que la inhibición frente a la cepa sensible *Lactobacillus fermentum* CHJ4C, no fue debida a la acción de ácido orgánico ni peróxido de hidrógeno. Obteniéndose resultados similares cuando se trabajó con la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum 32plp* se mantuvo estable frente a las pruebas como sensibilidad a la catalasa, pH (acción de ácido orgánico) frente a las tres cepas patógenas en las que se evaluaron.

Klaenhammer, (1993) ha reportado que algunas especies de *Lactobacillus* fueron antagónicas frente a especies de bacterias Gram positivas debido a la producción de bacteriocinas de reducido espectro inhibitorio.

4.9.2. Estabilidad a diferentes pH

Frente a la estabilidad de la bacteriocina producida por *L. plantarum 32plp* se muestran los resultados que se probaron a pH de 4.0, 6.5, 9.0 solo para el 1er

y 3er tratamiento que fueron las que mostraron mayor inhibición frente a las 3 cepas patógenas; verificándose como resultado la variación del efecto inhibitorio sobre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* (Figuras 32, 33, 34).

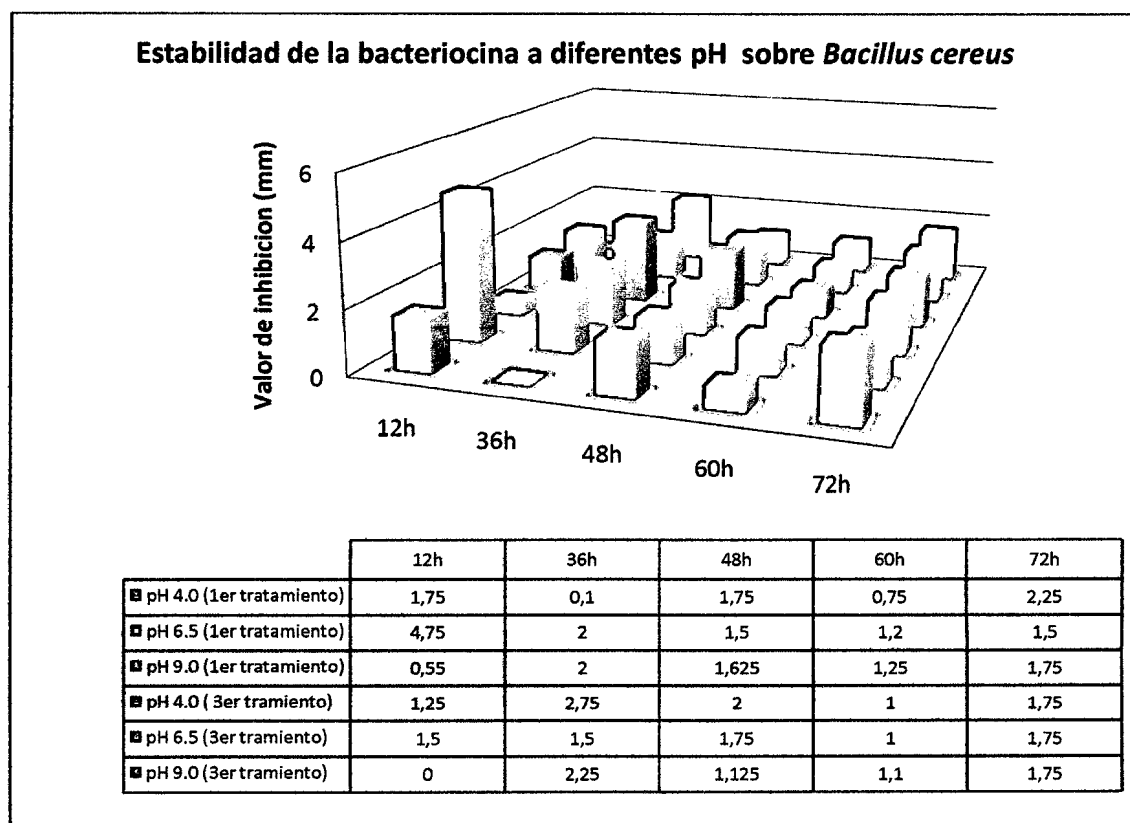


Figura 32: Estabilidad de la bacteriocina en diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0), evaluadas frente a *Bacillus cereus*, para el 1er y 3er tratamiento, probados mediante los halos de inhibición.

De la figura se observa que tanto para el 1er y 3er tratamiento muestran mejor estabilidad a pH 6.5 por tanto mayor valor de inhibición frente a *Bacillus*

cereus que descarta la posibilidad de que la inhibición sea por efecto de ácido láctico. También se ve que es estable a pH 9.0.

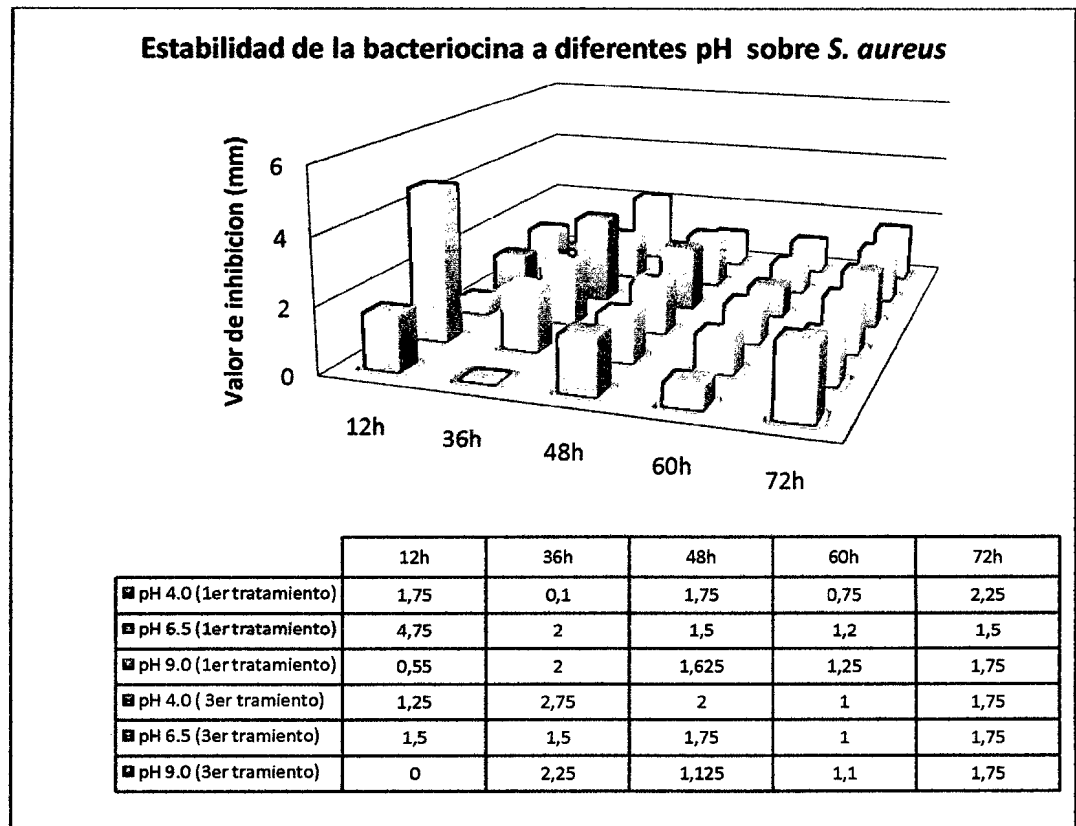


Figura 33: Estabilidad de la bacteriocina en diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0), evaluadas frente a *Staphylococcus aureus*, para el 1er y 3er tratamiento, probados mediante los halos de inhibición.

De la figura tanto para 1er y 3er tratamiento, muestran mejores resultados cuando se trabaja pH 6.5 y 9.0 que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Por otro lado, Agarry et al., (2005) comprobaron que la sustancia inhibitoria producida por la especie *Lactobacillus brevis* aislada de yuca, fue

ácidoorgánico, porque al ser neutralizado el sobrenadante a pH 6,5 desapareció la zona de inhibición.

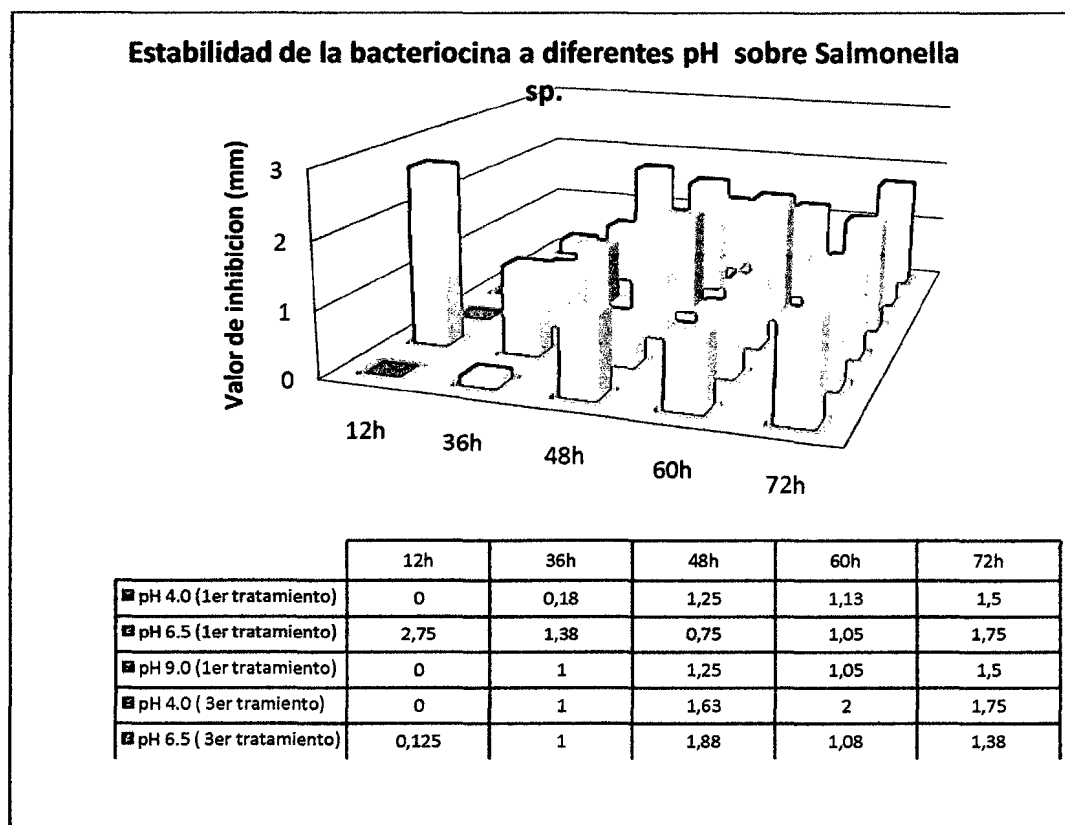


Figura 34: Estabilidad de la bacteriocina en diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0), evaluadas frente a *Salmonella* sp., para el 1er y 3er tratamiento, probados mediante los halos de inhibición.

Sedano, (2006), comprobó que cuando el sobrenadante libre de células producido por *Lactobacillus plantarum* M4 a diferentes pH (3,5-9,5), la actividad inhibitoria se mantuvo estable; similares resultados mostraron Ivanova *et al.* (2000) al evaluar la respuesta de la bacteriocina Bozacin 14

producida por una cepa de *Lactococcus lactis* aislada de “boza”, una bebida búlgara tradicional a base de cereales.

Estas características representarían un interés biotecnológico e industrial adicional dada su condición de sustancia inhibitoria resistente a variaciones considerables de pH.

4.10. Concentración Mínima Inhibitoria

Los resultados obtenidos con respecto a la determinación de la CIM para las BAL se muestran en las Figuras 32, 34 y 36 para el primer tratamiento (pasteurización, 25°C) y las figuras 33, 35 y 37; para el 3er tratamiento (esterilización, 25°C). Para la realización de CMI los sobrenadantes de bacteriocina se ajustaron a pH 6.5 en buffer fosfato de sodio para estabilizar el pH. Como puede observarse, existe una marcada variabilidad no sólo en los valores de CIM hallados, sino también en la proporción de aislamientos sensibles a una misma concentración de bacteriocina.



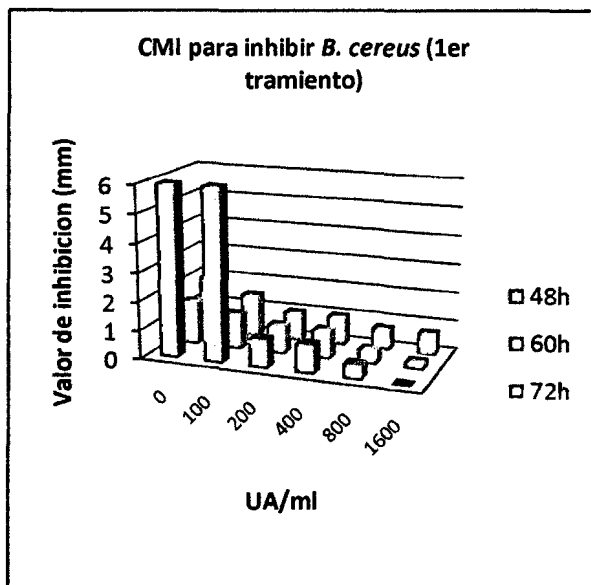


Fig. 35: Concentración mínima inhibitoria para inhibir *Bacillus cereus* trabajándose a 25°C de fermentación

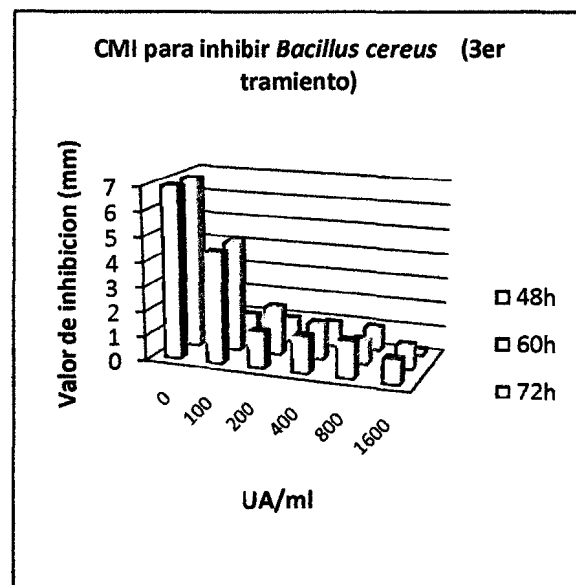


Fig. 36: Concentración mínima inhibitoria para inhibir *Bacillus cereus* trabajándose a 25°C de fermentación

Como se puede observar de las figuras para inhibir a *Bacillus cereus* se puede emplear hasta 1600 UA/ml, para inhibir 0.75 mm de inhibición a 72 horas de fermentación trabajando a una temperatura de 25°C con un tratamiento de pasteurización previamente a la chicha de jora.

De la misma manera para inhibir a *Bacillus cereus* se puede emplear hasta 1600 UA/ml para inhibir 0.25 mm de inhibición a 48 horas de fermentación trabajando a una temperatura de 25°C con un tratamiento de pasteurización previamente a la chicha de jora

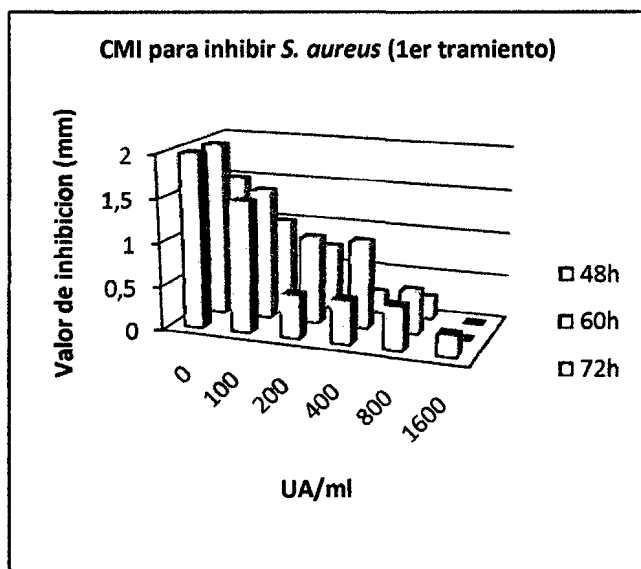


Fig. 37: Concentración mínima inhibitoria para inhibir *Staphylococcus aureus* trabajándose a 25°C de fermentación

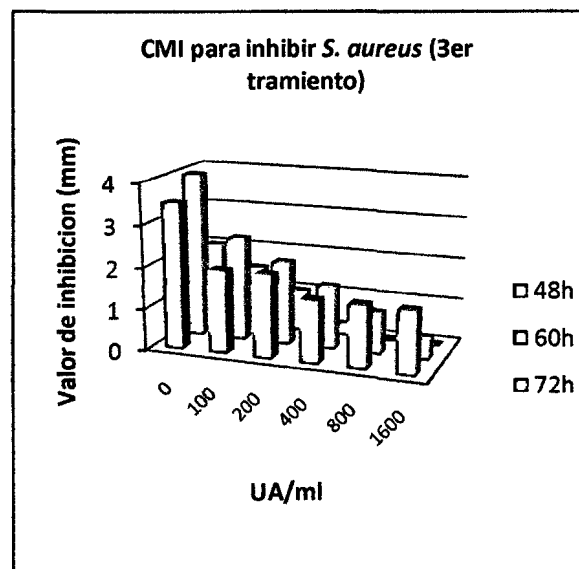


Fig. 38: Concentración mínima inhibitoria para inhibir *Staphylococcus aureus* a 25°C de fermentación

Como se puede observar de las figuras para inhibir a *Staphylococcus aureus* se puede emplear hasta 1600 UA/ml, produciendo 0.25 mm de inhibición a 72 horas de fermentación trabajando a una temperatura de 25°C con un tratamiento de pasteurización previamente a la chicha de jora.

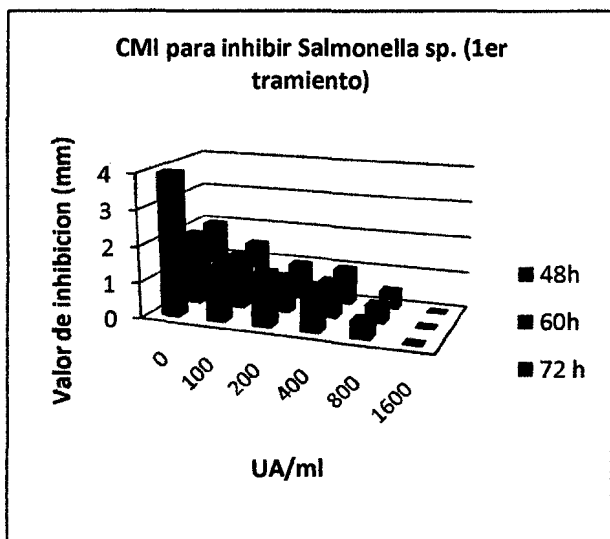


Fig. 39: Concentración mínima inhibitoria para inhibir *Salmonella sp.* trabajándose a 25°C de fermentación

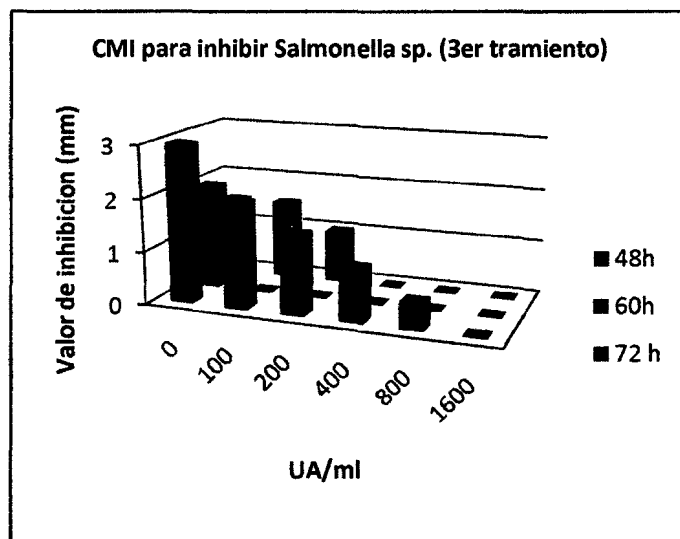


Fig. 40: Concentración mínima inhibitoria para inhibir *Salmonella sp.* trabajándose a 25°C de fermentación

Como se puede observar de las figuras para inhibir *Salmonella sp.* se puede emplear hasta 800 UA/ml, para inhibir 0.5 mm de inhibición a 72 horas de fermentación trabajando a una temperatura de 25°C con un tratamiento de pasteurización previamente a la chicha de jora. Sin embargo para el 3er tratamiento (esterilización, 35°C de fermentación), también se puede emplear hasta 800 UA/ml a 48 horas de fermentación. Debido a que la acción inhibitoria de la bacteriocina se ve afectada por ser un patógeno Gram negativo característica de poseer un espacio periplasmático grande, lo que dificulta la inserción del bacteriocina y por ende una concentración mínima de 800 UA/ml.

Schillinger *et al.* (1993), utilizaron para la producción de *C. piscicola* LV61 caldo MRS a 25°C, comprobaron que cuando el pH se mantenía en 6,5 hubo un aumento del nivel de actividad de la bacteriocina, de 400 UA/ml a 3.200 UA/ml. Además los autores señalados estudiaron el efecto de la temperatura en la producción de la bacteriocina de la BAL, presentándose un aumento de actividad (3.200 UA/ml) cuando el cultivo se realizó a 25°C durante 24 horas.

En cuanto a los resultados obtenidos la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum 32plp*, presento también estabilidad e incremento del nivel de la actividad inhibitoria. Por otro lado los análisis de unidades de actividad en la CMI, mostraron que la bacteriocina producida por *L. plantarum 32plp*, es activo aun en diluciones altas, lo que significa que la bacteriocina producida tiene actividad inhibitoria a muy pequeñas concentraciones, resultado importante ya que puede ser una alternativa de emplearse como bioconservante en alimentos que presentan alto contenido de agua.

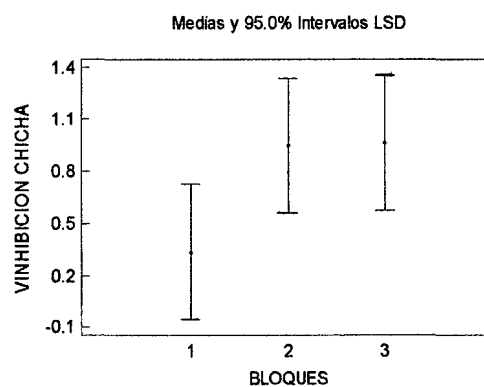
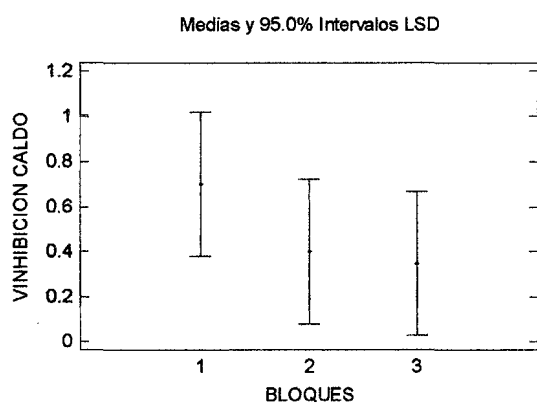
4.11. Resumen del análisis estadístico

Cuadro 23: Resumen de los valores ANOVA, de los valores de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* y *Bacillus cereus* en caldo Lactobacilli y chicha de jora.

| CALCULOS | V. INHIBICION CALDO | V. INHIBICION CHICHA |
|---------------------------|---------------------|----------------------|
| Recuento | 15 | 15 |
| Promedio | 0.483333 | 0.750667 |
| Desviación Estándar | 0.447879 | 0.688295 |
| Coefficiente de Variación | 92.6645% | 91.6911% |
| Mínima | 0.0 | 0.0 |
| Maxima | 1.5 | 1.88 |

Cuadro 24: Resumen de los valores ANOVA, de los valores de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* y *Bacillus cereus*.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo | 9.64364 | 6 | 1.60727 | 4.73 | 0.0006 |
| Residuo | 17.9912 | 53 | 0.339457 | | |
| Total (Corr.) | 27.6348 | 59 | | | |



Donde bloques 1, 2, 3 son valores de inhibición sobre *B. cereus*, *S aureus*, *Salmonella sp.* respectivamente a una temperatura cte. de 35°C en tiempos de 12h, 36h, 48h, 60h y 72h.



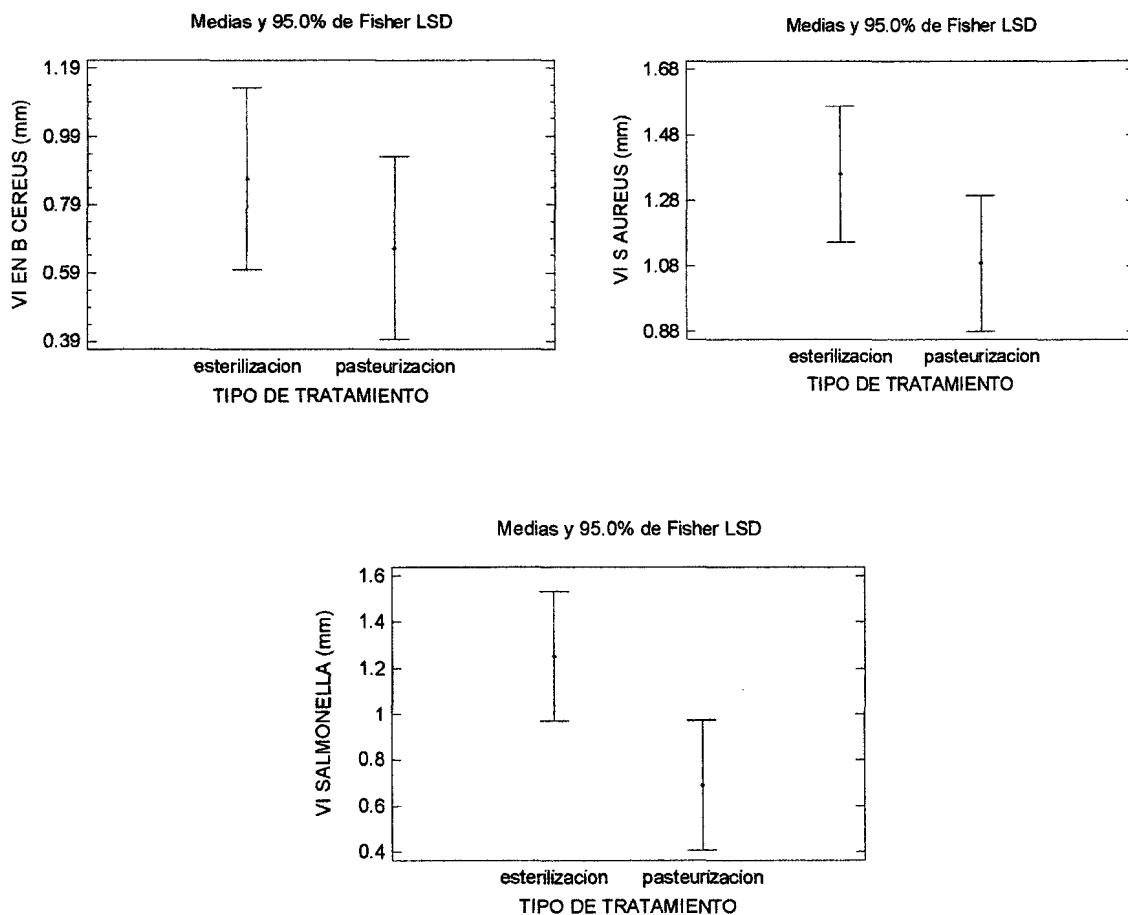
Cuadro 25: Suma de Cuadrados Tipo III, de los valores de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* y *Bacillus cereus*.

| FACTORES | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón- F | Valor- P |
|--------------------------------|-------------------|----|----------------|----------|----------|
| Tipo tratam | 0.154763 | 1 | 0.154763 | 0.46 | 0.5025 |
| Temperatura | 6.08017 | 1 | 6.08017 | 17.91 | 0.0001 |
| Tiempo | 0.447206 | 1 | 0.447206 | 1.32 | 0.2562 |
| Tipo tratam*temperatura | 0.197105 | 1 | 0.197105 | 0.58 | 0.4494 |
| Tipo tratam*tiempo | 0.000488688 | 1 | 0.000488688 | 0.00 | 0.9699 |
| Tipo tratam*temperatura*Tiempo | 0.0298897 | 1 | 0.0298897 | 0.09 | 0.7678 |
| Residuo | 17.9912 | 53 | 0.339457 | | |
| Total (corregido) | 27.6348 | 59 | | | |

La segunda tabla ANOVA para V INHIBICION en bloques (*B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella sp.*), prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Nótese que el valor-P más alto es 0.9699, que corresponde a A*C (tipo de tratamiento térmico en relación al tiempo de fermentación). Dado que el valor-P es mayor o igual que 0.05, ese término no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%.



Pruebas de Múltiple Rangos por TIPO TRATAMIENTO para *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella sp.*



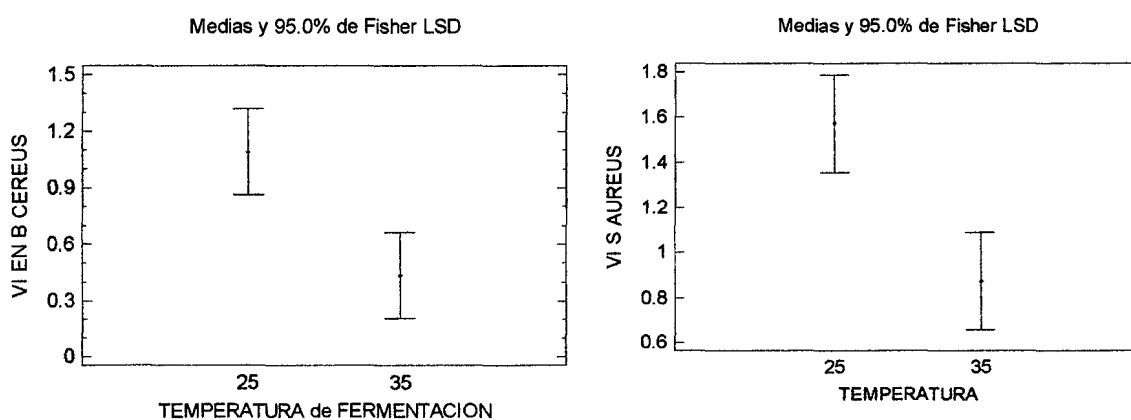
El ANOVA, evaluándose el factor por tipo de tratamiento entre la temperatura de fermentación muestra una diferencia significativa con un Valor $-P$ 0.0193 en los valores de inhibición sobre *B. cereus*, y un Valor $-P$ 0.0028 sobre el valor de inhibición en *S. aureus*. Puesto que un valor- P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo con un 95.0% de nivel de confianza. Lo que no ocurre con *Salmonella sp.*, la interrelación



entre tipo de tratamiento y temperatura de fermentación no es significativo por tener un Valor P- 0.0544.

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

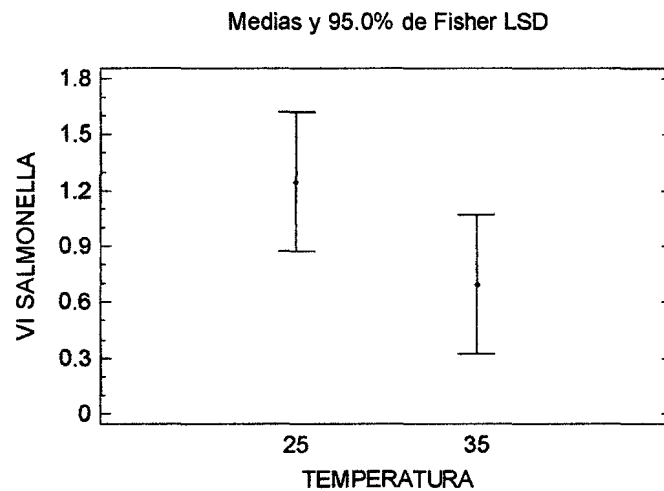
Pruebas de Múltiple Rangos para TEMPERATURA DE FERMENTACION sobre Valor de inhibición frente a *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella sp.*.



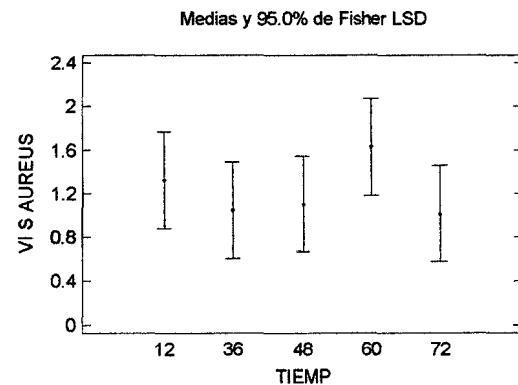
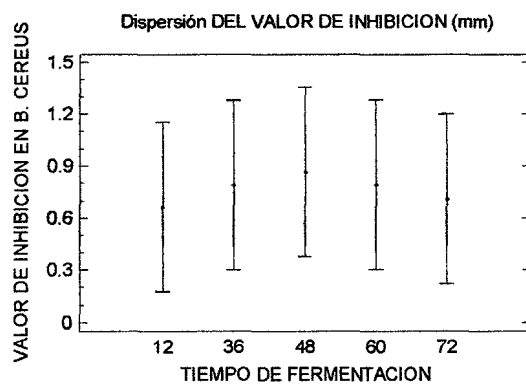
La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables (25°C y 35°C), con respecto al valor de inhibición sobre *B. cereus* y *S. aureus*, con un nivel del 95.0% de confianza. Sin embargo el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05,



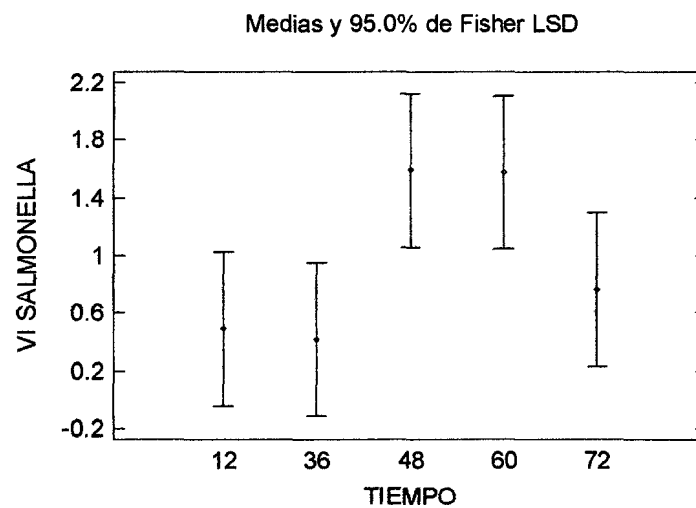
no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables (25°C y 35°C), no existe influencia significativa en el valor de inhibición sobre *Salmonella sp.*, con un nivel del 95.0% de confianza.



Pruebas de Múltiple Rangos para TIEMPO DE FERMENTACION sobre Valor de inhibición frente a *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella sp.*



Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 5 variables del tiempo de fermentación (12h, 36h, 48h, 60h y 72h) con un nivel del 95.0% de confianza en el valor de inhibición sobre (*B. cereus* y *S. aureus*).



En la comparación de la influencia del tiempo de fermentación encuentran dos pares (12h y 36h), muestran diferencias estadísticamente significativas en el valor de inhibición frente *Salmonella sp.* con un nivel del 95.0% de confianza.

Cuadro 26: Resumen de los valores máximos de inhibición de la bacteriocina producida por *L. plantarum 32plp* en chicha de jora, con factores óptimos, frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* y *Bacillus cereus*.

| Factores | <i>Bacillus cereus</i> | | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | <i>Salmonella sp.</i> | | | |
|-----------------------------|------------------------|------|----------------|------|------------------------------|------|----------------|------|-----------------------|------|----------------|------|
| | Pasteurización | | Esterilización | | Pasteurización | | Esterilización | | Pasteurización | | Esterilización | |
| Tipo de tratamiento | | | * | | | | * | | | | * | |
| Temperatura de fermentación | 25°C | 35°C | 25°C | 35°C | 25°C | 35°C | 25°C | 35°C | 25°C | 35°C | 25°C | 35°C |
| Tiempo de fermentación | | | | | | | | | | | | |
| 12h | | | | | | | | | | | | |
| 36h | | | | | | | | | | | | |
| 48h | | | * | | | | | | | | * | |
| 60h | | | | | | | * | | | | * | |
| 72h | | | | | | | | | | | | |

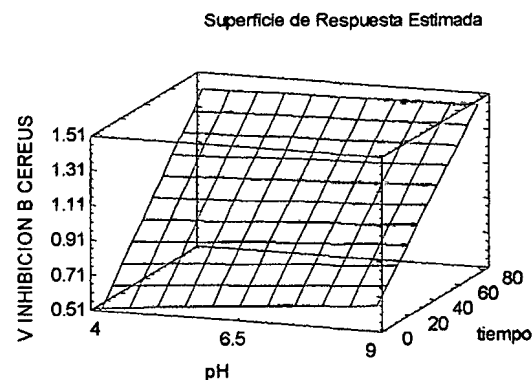
Donde: □ muestran diferencias significativas entre los factores para cada patógeno.

* Mayores Valores de Inhibición y elección de factores óptimos.

RESUMEN ESTADÍSTICO DE ESTABILIDAD DE LA BACTERIOCINA A DIFERENTES pH.

Análisis de Varianza para bloque1(*B. cereus*)

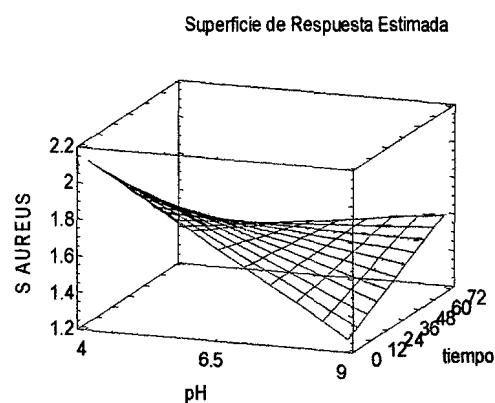
| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Modelo | 1.50616 | 3 | 0.502053 | 1.08 | 0.3750 |
| Residuo | 12.0902 | 26 | 0.465008 | | |
| Total (Corr.) | 13.5964 | 29 | | | |



En la comparación de la influencia del tiempo de fermentación en la estabilidad de la bactericina a diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0) encuentran que el tratamiento a 12h de fermentación a pH 4.0, muestran diferencias estadísticamente significativas frente a un grupo de 36h – 60h de fermentación a pH 6.5- 9.0 en el valor de inhibición frente *B. cereus*, con un nivel del 95.0% de confianza.

Análisis de Varianza para bloque 2 (*S. aureus*)

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Modelo | 0.725666 | 3 | 0.241889 | 0.31 | 0.8176 |
| Residuo | 20.2568 | 26 | 0.779106 | | |
| Total (Corr.) | 20.9824 | 29 | | | |

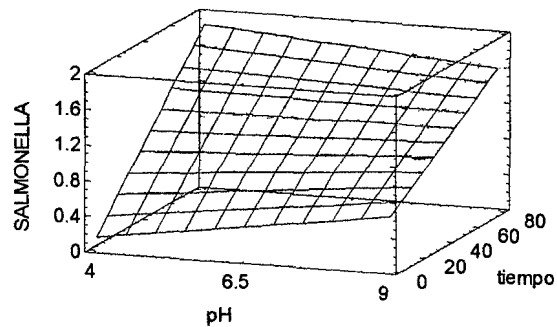


En la comparación de la influencia del tiempo de fermentación en la estabilidad de la bactericina a diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0) encuentran que en los tiempos finales fermentación (36-60h) presentan mayores halos de inhibición a pH 4.0, muestran que no existe diferencias estadísticamente significativas frente a un grupo de 36h – 60h de fermentación a pH 6.5- 9.0 en el valor de inhibición frente *S. aureus* con un nivel del 95.0% de confianza.

Análisis de Varianza para bloque 3 (*Salmonella sp.*)

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Modelo | 3.80841 | 3 | 1.26947 | 3.67 | 0.0251 |
| Residuo | 9.00138 | 26 | 0.346207 | | |
| Total (Corr.) | 12.8098 | 29 | | | |

Superficie de Respuesta Estimada



En la comparación de la influencia del tiempo de fermentación en la estabilidad de la bactericina a diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0) encuentran que en los tiempos finales fermentación (12 h) presentan mayores halos de inhibición a pH 4.0, muestran que existe diferencias estadísticamente significativas frente a un grupo de 36h – 60h de fermentación a pH 6.5- 9.0 en el valor de inhibición frente *Salmonella sp.* con un nivel del 95.0% de confianza.

CAPITULO V: CONCLUSIONES

1. En la chicha de jora, se identificaron cuatro levaduras el género *Hanseniaspora* con características de tamaño: grande, color: blanco, forma: circular, elevación: convexa, margen: entero, superficie: lisa y brillante, consistencia: mantecosa, forma de la célula (apiculatas) ;el género *Rhodotorula* con tamaño: mediana, color: rojo, forma: circular, elevación: cúpula, margen: entero, superficie: lisa y brillante, consistencia: mantecosa, forma de la célula : ovaladas,el género *Saccharomyces* con tamaño: pequeño, color: blanco, forma: circular, elevación: convexa, margen: entero, superficie: lisa y brillante, consistencia: mantecosa, forma de la célula: elipsoidales, *Candida* con forma de célula en forma de salchicha.
2. La cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum 32plp*, en sistema modelo (caldo Lactobacilli), inicio con fase exponencial a 18 horas y una máxima de 1.24×10^3 UFC/ml a 36 horas de crecimiento donde la producción de la sustancia inhibitoria, está relacionada con una cinética de producción de metabolito primario. Sin embargo el crecimiento en sustrato de chicha de jora favorecen significativamente ($P < 0.05$) en la fácil adaptabilidad y crecimiento de 0.6 a 4.7×10^3 UFC/ml a partir de las 12 horas para los cuatro tratamientos de iniciado la fermentación con termino de fase exponencial de 36 horas, con una producción de metabolito primario y secundario; durante el proceso de

fermentación existió una disminución de pH de 6.5 a 3.57; incremento del ácido láctico de 0.21% a 0.8%.

3. La cepa *Lactobacillus plantarum* 32plp mostro un nivel de tolerancia a diferentes concentraciones de etanol presentes en sistema modelo (caldo Lactobacilli). Mas del 50% toleraron 4% de etanol, mientras que 15.4% del total de cepas toleraron una concentración del 8% (v/v) de etanol.
4. El factor tipo de tratamiento térmico no influye significativamente en el valor de inhibición, sin embargo la interacción de los factores: temperatura y tiempo de fermentación presentan diferencias significativamente ($P < 0.05$), en la producción de sustancia inhibitoria, obteniéndose al 3er tratamiento (esterilizado, 25 °C de fermentación), como mejor tratamiento para inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.*.
5. La capacidad inhibitoria a tiempos de 48 horas y 60 horas de producida la bacteriocina presenta valores de inhibición promedio máximos de $2.25 \pm 0,29$ mm para inhibir *Bacillus cereus*, $2.00 \pm 0,41$ mm frente a *Staphylococcus aureus* y $2.69 \pm 0,38$ mm para inhibir el crecimiento de *Salmonella sp.*.
6. La variación de pH en la estabilidad de la bacteriocina favorecieron significativamente ($P < 0.05$) en el incremento del valor de inhibición, frente *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.*, la bacteriocina

producida se mantuvo estable a la acción de la catalasa, indicando que la inhibición fue por la bacteriocina producida y no por peróxido de hidrogeno.

7. La concentración mínima inhibitoria (CMI), de bacteriocina necesaria para inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* es de 1600 UA/ml y 800 UA/ml para *Salmonella sp.*.

CAPITULO V

RECOMENDACIONES

- Realizar la purificación y caracterización bioquímica de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum 32plp*.
- Realizar estudios de producción de bacteriocina a escala industrial y determinación de parámetros óptimos para su empleo como bioconservante.
- Evaluar el efecto inhibitorio frente otros patógenos Gram negativos de interés industrial.
- Utilizar y realizar el empleo de la bacteriocina parcialmente purificada en conservación de alimentos como bioconservante.
- La chicha de jora como sustrato para la producción de bacteriocina fermentación para obtener mejores resultados se recomienda trabajar con el sobrenadante, separados por sedimentación a temperaturas de 4°C y finalizar por filtración para eliminar la biomasa de levaduras producidas para minimizar el efecto que puedan alterar el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*.
- Para obtener halos de inhibición más claros o transparentes, centrifugar a 8000 rpm por 20 minutos a temperatura de 4°C para mejor separación de las células viables y no viables.



BIBLIOGRAFÍA

- ABBE, T., LOTHAR, K. y HILL, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28.
- AGUILAR, A. (1991). Biotechnology of lactic acid bacteria: an European perspective. *Food Biotechnology, in the press*: 1 – 8.
- ARTHEY, D. y ASHURT, P. (1999). *Procesos de conservación de alimentos*. Editorial Acirbia. S. A., Zaragoza, España. 273p.
- ASHENAFI, M.; BUSSE, M. (1989). Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* on *Salmonella infantis*, *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli* during tempeh fermentation.
- AXELSSON T.; CHUNG, C.; DOBROGOSZ, J. and LINDGREN, E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*.
- AXELSSON, L. (1998). Lactic Acid bacteria: Classification and Physiology. In: *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional aspects*.
- BAREFOOT, S; KLAENHAMMER, T. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*.
- BAREFOOT, S. and KLAENHAMMER, T. (1994). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B.
- BORQUEZ, P. (2000). Producción Continua y Purificación parcial de la bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* L103, utilizando un fermentador modular. Tesis Lic.Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias.
- BROCK, T. (1999). *Biología de los microorganismos*. Editorial Grafyllus. España. 986pp.
- BROWN, A. (1990). Fed-batch and continuous culture. En: *Fermentation a practical approach*. Edited by McNeil, B. and Harvey, L. M. Glasgow. pp. 113 – 130.
- BRUNO, M., Montville, T. (1993). Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59(9), 3003-3010.



- BURGEOIS, C. y MAFART, P. (1995). La cerveza. En: Microbiología alimentaria, volumen II: Fermentaciones alimentarias. Bourgeois, C. y Larpent, J, Edit. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 73 – 88.
- BUSH. C. (1952). Consideraciones Médico-Sociales de la Chicha de Jora. Periódico Excelsior N 217, mayo-junio. Lima-Perú, páginas 25-27.
- CASTELLANO, P. (2003). Mode of action of Lactocin705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei*CRL705. *International Journal of Food Microbiology* 85, 35-43.
- CASTELLANOS, M.; CHAUVET, A; DESCHAMPS, A. and BARREAU, C. (1996). PCR methods for specification and specific detection of probiotic acid lactic bacteria.
- CHUNG, C; AXELSSON, T; LINDGREN, E. and DOBROGOSZ, W. (1989). *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillu sreuteri*.
- CONWAY, P & KEJELLEBERG, S. (1986). Patente sueca. N0 557029.
- DAESCHEL, M. (1993). Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages, p. 63-91. In D. G. Hoover and L. R. Steenson. Bacteriocins of acid lactic bacteria. Academic Press, Inc, New York.
- DAJONI, A. y WANNAMAKER, W. (1969). Demostration of a bactericidal substance against beta-hemolytic streptococci in supematant fluids of staphylococcal cultures.
- DAVIDSON, M. and HOOVER, D. (1993). In “Lactic Acid Bacteria”, Marcel Dekker Inc; New York. P: 127.
- De VUYST, L. (1994). Bacteriocins and bacteriocin-like substances from *Lactobacillus*, p. 319- 329.
- DELGADO, R. (2001). Efecto de una bacteriocina de *Carnobacterium piscícola* parcialmente purificada sobre salmón fresco refrigerado. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 141 p.
- DOLZ, M. (2008). Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE. *Nutr. Clindehosp.* 28 (3), 20-37.
- FLORIO, R. Enrique. Docente de la facultad de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann – Tacna Perú



- FUJISAWA, T; BENNO, Y; YAESHIMA, T. and MITSUOKA, T. (1992). Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsoni* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al, 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nokamura, 1981). Inst. J. Syst. Bacteriol. 42: 487-491.
- FULLER, R. (1993). Probiotics – an overview. International Poultry Production: 13-17.
- JAGNOW, G. y DAWID, W. (1991). Experimentos modelos. En: Biotecnología introducción con experimentos modelos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp.
- JIMÉNEZ, R; RUIZ, L; CATHCART, D; HOLO, H; NES, F; SLETTEN, H. and WARNER, P. (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides.
- KANDLER, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 49: 209-224.
- KLAENHAMMER, T. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70: 337.
- KLAENHAMMER, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.
- KUNZ, B. (1986). Cultivo de microorganismos para la producción de Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 125 p.
- LAMA, P. (2002). Caracterización de una bacteriocina producida por una bacteria ácido láctica de carne envasada al vacío. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. pp 29-30-44.
- LARPENT, J. (1995). Los microorganismos de las fermentaciones. En: Microbiología alimentaria volumen II: Fermentaciones alimentarias. Bourgeois, C. y Larpent, J. Edit. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 1 – 16.
- LEWUS, C, KAISER, A. y MONTVILLE, T. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environm. Microbiol, 58: 143-149.



- LEWUS, C; MONTVILLE, J. (1992). Further characterization of bacteriocin plantaricin BN, bavaricin MN and pediocin A. *Food Biotechnol.* 6: 153-174.
- LOVETT, J. y TWEDT, R. (1988). Bacteria associated with Food borne diseases, *Listeria*. *Food Technol.* April: 181 – 190.
- MADRID, A. (1994). *Análisis De Los Alimentos Métodos Oficiales De Análisis De Los Alimentos* Editorial: Mundi Prensa Libros S.A.
- MALDONADO, A., GUTIERREZ, L., MONTOYA, O. (2005). Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Escuela de Biociencias. Facultad de Ciencias.* 34, 45-56.
- MARIN, J. (2003). Evaluación de métodos de conservación para cepas de hongos filamentosos con actividad enzimática amilolítica. Tesis de pregrado. Microbiología industrial. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 46-50.
- Mc Donald, L. C; Fleming, H. P. and Hassan, H. M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environm. Microbiol.* 56: 2120-2124.
- McMULLEN, L. y STILES, M. (1996). Potencial for used of Bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Protec. Suppl:* 64 – 72.
- MEDINA, M., GAYA, P. y NUÑEZ, M. (1992). Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. *Revista Española de Lechería.* Febrero 28-33.
- MONTVILLE, T. (1998). Mecanismos de accion de pediocina y nisina.
- MURIANA, P. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria* spp. In *Food. J. Food Protec. Suppl:* 54 – 63.
- MURILLO, M. (2008). Realizo estudios sobre la “actividad antimicrobiana y funcional de recubrimientos comestibles adicionados con bacteriocinas” Universidad Autónoma Metropolitana Tesis Para Obtener El Grado de Maestra En Biotecnología Universidad Austral De Chile
- NETTLES, C. y BAREFOOT, S. (1993). Biochemical and Genetic characteristics of bacteriocins of Food-Associated lactic acid bacteria. *J. Food Protec.* 56 (4): 338 – 356.



- NILSSON, L., GRAM, L. y HUSS, H. (1999). Growth Control of *Listeria monocytogenes* on Cold-smoked salmon using a Competitive Lactic Acid bacteria flora. *J. Food Protec.* 62 (4): 336 – 342.
- OLESUPO, A; OLUKOYA, K. and ODUNFA, A. (1995). Studies on bacteriocinogenic *Lactobacillus* isolates from selected Nigerian fermented foods. *J. Basic. Microbiol.* 35.
- PETERSON, M., PELROY, G., PARANJPYE, R., POYSKY, F., ALMOND, J. y EKLUND, M. (1993). Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in smoked fishery products: sodium chloride and packaging, method. *J. Food Protec.* 56 (11): 938 – 943.
- RAY, B. and DAESCHEL, M. (1994). Bacteriocins of starter culture bacteria, p. 133-165. In V. M. Dillon and R. G. Board (ed.). *Natural antimicrobial systems and food preservation.* CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- REQUENA, T. y PELAEZ, C. (1995). Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista española de ciencia y tecnología de los Alimentos.*
- SAAVEDRA, J. (1995). Microbes to fight microbes: a not so novel approach to controlling diarrheal disease. *J. Ped. Gastroenterol. Nut.* 21: 125-129
- SAHM, H. (1993). Biological Fundamentals. En *Biotechnology. A Multi-Volume Comprehensive Treatise.* Volumen 1. 2ª Edición. Rehm, H. J. Y Reed, G. Ed, VCH. Weinheim, RFA. pp.150 – 158.
- SALMINEN, S; ISOLAURI, E. and SALMINEN, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:347-358.
- SAUCIER, L. y GREER, G. (2001). Description of a simple Detection Assay for in situ production of Bacteriocin on Meat. *J. Food Protec.* 64 (2): 264 – 267.
- SCHILLINGER, U. (1990). Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*
- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. (1991). El empleo de bacterias láctica como cultivosProtores en productos cárnicos. *Fleisch wirtsch (español).* :35-40.



- SCHILLINGER, U. y STILES, E. (1993). Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *Int. Journal of Food Microbiol.* 20, 131-147.
- SEDANO, J. (2006). Selección de cepas nativas de *Lactobacillus* con actividad inhibitoria y tolerantes al etanol aisladas de “masato”. [Informe]. - Lima, Perú : [s.n.], 2006.
- SHRESTHA H., NAND K. Y RATI E. Microbiological profile of murch a starters and physico-chemical characteristics of pokko, a rice based traditional fermented food product of nepal [publicación periódica]. - [s.l.] : food biotechnology, 2002. - 1 : vol. 16.
- STILES, M. y HASTINGS, J. (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.*, 2: 247-251.
- STOFFELS, G., NISSEN-MEYER, J., GUDMUNDSDOTTIR, A. SLLETTEN, K., HOLO, H. y NES, I. (1992). Purification and Characterization of a New bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(5):1417 – 1422.
- STOFFELS, G., SAHL, H. y GUDMUNDSDÓTTIR, A. (1993). Carnocin UI49, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: large scale purification and activity against various gram-positive bacteria including *Listeria* sp. *Int. J. Food Microbiol.*
- TAGG, J. T., DAJANI, A. S. y WANNAMAKER, L. (1976). Bacteriocins of Gram positive bacteria. 40 (3): 722 – 756.
- TANIGUCHI, M., HOSHINO, K., URASAKI, H. y FUJH, M. (1994). Continuous production of an antibiotic Polypeptide (nisin) by *Lactococcus lactis* using a bioreactor coupled to a Microfiltration Module. *J. Fermentations and Bioengineering.* 77.
- VALLEJO, M. *et al* (2009). Realizaron estudios sobre la actividad antilisteria de bacterias ácidos lácticos aislados de peces marinos.
- VAUGHAN, E; DALY, C. and FITZGERALD, F. (1992). Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*.



- VENEMA, G; HUIS, J. and HUGENHOLTZ, J. (1996). Lactic Acid Bacteria: Genetics, metabolism and applications. Antonie van Leeuwenhoek. Volume 70. Nos. 2-4: 299-316.
- VIÑAS, Eduardo (1956). La Composición Química de las Diferentes Chichas que se Consumen en el Perú. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, departamento de Nutrición. Servicio Cooperativo Internacional de Salud Pública, Págs. 1-3. Lima-Perú.
- VUYST and VANDAMME E. (1999). Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic& Professional, London.
- WAGNER, L. (1993). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Universidad complutense de madrid.
- WEST, C and WARNER, J. (1988). Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. FEMS Microbiol. Lett. 49: 163-165.
- ZÚÑIGA, A. (2002). Producción continua de bacteriocina de *Carnobacterium piscícola* a escala pre-piloto y estudio de su efecto antagónico en contra de *Listeria monocytogenes*. Tesis presentada en Ingeniería en Alimentos. Valdivia (Chile).



ANEXOS

ANEXO 01: Composición del medio de cultivo Lactobacilli utilizado para la propagación de *Lactobacillus plantarum* 32plp.

| Composición | Cantidad |
|--|-----------------|
| Peptona de leche | 15.0 g |
| Extracto de levadura | 5.0 g |
| Glucosa | 10.0 g |
| Fosfato de potasio monobisodico | 2.0 g |
| Jugo de tomate | 5.0 ml |
| Agar - agar | 15.0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Fuente: GARCIA, P. (2011)



ANEXO 02: Datos obtenidos para la cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 32plp.

PRIMER TRATAMIENTO

Tabla 03: Resultados de evaluaciones realizadas, con sustrato (chicha de jora) pasteurizada y fermentado a 25°C.

| N° de evaluación | Tiempo de fermentación (h) | Recuento de colonias (Log UFC/ml) X 10 ³ | pH | %de acidez | Sólidos solubles (°Brix) | D.O. |
|------------------|----------------------------|---|------|------------|--------------------------|-------|
| 0 | 0 | 0.5 | 6.5 | 0.21 | 5 | 0 |
| 1 | 12 | 0.61 | 4.2 | 0.41 | 4.5 | 1.632 |
| 2 | 24 | 2.5 | 4.1 | 0.46 | 4.9 | 1.442 |
| 3 | 36 | 4.15 | 3.87 | 0.62 | 4.5 | 1.398 |
| 4 | 48 | 4.1 | 3.8 | 0.73 | 4.6 | 1.35 |
| 5 | 60 | 3.8 | 3.77 | 0.74 | 4.6 | 1.362 |
| 6 | 72 | 2.1 | 3.69 | 0.76 | 4.5 | 1.396 |
| 7 | 74 | 0.85 | 3.68 | 0.78 | 4.5 | 1.392 |
| 8 | 76 | 0.23 | 3.68 | 0.86 | 4.5 | 1.391 |

SEGUNDO TRATAMIENTO

Tabla 04: Resultados de evaluaciones realizadas, con sustrato (chicha de jora) pasteurizada y fermentado a 35°C.

| N° de evaluación | tiempo de fermentación (h) | Recuento de colonias X 10 ³ | pH | %de acidez | Sólidos solubles (°Brix) | D.O. |
|------------------|----------------------------|--|------|------------|--------------------------|-------|
| 0 | 0 | 0.5 | 6.5 | 0.21 | 5 | |
| 1 | 12 | 0.85 | 4.21 | 0.37 | 4.1 | 1.516 |
| 2 | 24 | 3.8 | 4.06 | 0.43 | 4.3 | 1.551 |
| 3 | 36 | 3.5 | 3.89 | 0.52 | 4.6 | 1.302 |
| 4 | 48 | 3.1 | 3.86 | 0.68 | 4.6 | 1.218 |
| 5 | 60 | 2.5 | 3.82 | 0.67 | 4.5 | 1.188 |
| 6 | 72 | 0.7 | 3.71 | 0.71 | 4.5 | 1.207 |
| 7 | 74 | 0.55 | 3.68 | 0.79 | 4.5 | 1.208 |
| 8 | 76 | 0.2 | 3.65 | 0.82 | 4.5 | 1.211 |

ANEXO 03: tolerancia a diferentes concentraciones de etanol de *Lactobacillus plantarum 32plp*

Tabla 05: Resultados obtenidos para nivel de tolerancia a diferentes concentraciones de etanol de *Lactobacillus plantarum 32plp* en caldo Lactobacilli.

| Crecimiento (horas) | TOLERANCIA AL ETANOL por ESPECTROFOTOMETRIA A 560 nm | | | |
|---------------------|--|-------|-------|-------|
| | 0% | 4% | 8% | 10% |
| 0 | 0.039 | 0.039 | 0.039 | 0.039 |
| 6 | 0.041 | 0.037 | 0.036 | 0.038 |
| 12 | 0.356 | 0.188 | 0.029 | 0.03 |
| 18 | 0.348 | 0.184 | 0.028 | 0.026 |
| 36 | 0.475 | 0.256 | 0.071 | 0.027 |
| 48 | 0.454 | 0.166 | 0.049 | 0.025 |
| 54 | 0.426 | 0.207 | 0.073 | 0.031 |
| 60 | 0.286 | 0.157 | 0.046 | 0.027 |

Tabla 06: Datos obtenidos para obtener la máxima población relativa observados una D.O. = 560 nm.

| tratamiento | Máxima D.O. (560nm) | Máxima Población Relativa (%) |
|---------------------|---------------------|-------------------------------|
| 0% etanol al inicio | 0.039 | |
| 0% etanol al final | 0.475 | 100% |
| 4% etanol | 0.256 | 53.89% |
| 8% etanol | 0.073 | 15.37% |
| 10% etanol | 0.039 | 0% |



TERCER TRATAMIENTO

Tabla 05: Resultados de evaluaciones realizadas, con sustrato (chicha de jora) sometido a esterilización y fermentado a 25°C.

| N° de evaluación | tiempo de fermentación (h) | Recuento de colonias X 10 ³ | pH | %de acidez | Sólidos solubles (°Brix) | D.O. |
|------------------|----------------------------|--|------|------------|--------------------------|-------|
| 0 | 0 | 0.5 | 6.5 | 0.21 | 5 | |
| 1 | 12 | 0.63 | 4.24 | 0.31 | 4.7 | 1.242 |
| 2 | 24 | 3.7 | 4.03 | 0.39 | 4.5 | 1.176 |
| 3 | 36 | 4.7 | 3.83 | 0.51 | 4.8 | 1.142 |
| 4 | 48 | 4.2 | 3.77 | 0.64 | 4.8 | 1.035 |
| 5 | 60 | 3.8 | 3.72 | 0.65 | 4.7 | 0.967 |
| 6 | 72 | 3.1 | 3.62 | 0.69 | 4.5 | 0.99 |
| 7 | 74 | 0.3 | 3.6 | 0.78 | 4.5 | |
| 8 | 76 | 0.15 | 3.57 | 0.81 | 4.5 | |

CUARTO TRATAMIENTO

Tabla 04: Resultados de evaluaciones realizadas, con sustrato (chicha de jora) sometido a esterilización y fermentado a 35°C.

| N° de evaluación | tiempo de fermentación (h) | Recuento de colonias X 10 ³ | pH | %de acidez | Sólidos solubles (°Brix) | D.O. |
|------------------|----------------------------|--|------|------------|--------------------------|-------|
| 0 | 0 | 0.5 | 6.5 | 0.21 | 5 | |
| 1 | 12 | 0.6 | 4.38 | 0.28 | 4.7 | 1.242 |
| 2 | 24 | 2.5 | 4.14 | 0.36 | 4.2 | 1.166 |
| 3 | 36 | 3.35 | 3.98 | 0.42 | 4.2 | 1.121 |
| 4 | 48 | 3.1 | 3.98 | 0.47 | 4.8 | 0.963 |
| 5 | 60 | 2.8 | 3.94 | 0.49 | 4.8 | 0.952 |
| 6 | 72 | 2.1 | 3.82 | 0.53 | 4.6 | 0.729 |
| 7 | 74 | 0.2 | 3.81 | 0.56 | 4.6 | |
| 8 | 76 | 0.15 | 3.81 | 0.6 | 4.6 | |

ANEXO 04: Determinación de la actividad inhibitoria de la bacteriocina (medición de los discos con halos de inhibición)

Poder de Inhibición contra *Bacillus cereus*

| tiempo de fermentación (h) | Halos de inhibición (mm) para el 1er tratamiento | | | | Halos de inhibición (mm) para el 2 do tratamiento | | | | Halos de inhibición (mm) para el 3er tratamiento | | | | Halos de inhibición (mm) para el 4to tratamiento | | | |
|----------------------------|--|-----|-----|-----|---|---|-----|----|--|-----|----|----|--|---|-----|-----|
| | 12 | 6 | 6.5 | 6 | 9.5 | 6 | 7 | 7 | 8.5 | 9 | 10 | 10 | 13 | 7 | 8 | 9 |
| 24 | 8 | 8 | 10 | 11 | 8 | 8 | 9 | 10 | 6 | 7 | 8 | 9 | 6 | 6 | 7 | 7 |
| 36 | 7 | 7 | 7 | 9 | 7 | 7 | 8 | 9 | 6 | 7.5 | 8 | 8 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| 48 | 7 | 8 | 12 | 13 | 7 | 8 | 9 | 12 | 7 | 8 | 9 | 10 | 6.5 | 7 | 7.5 | 9 |
| 60 | 7 | 8 | 9 | 9.5 | 9 | 9 | 9.5 | 10 | 8 | 8 | 10 | 11 | 6 | 7 | 7.5 | 8 |
| 72 | 6.5 | 7.5 | 8 | 9 | 7.5 | 8 | 10 | 10 | 6.4 | 6.8 | 8 | 9 | 6 | 6 | 6.2 | 6.3 |

Poder de Inhibición contra *Staphylococcus aureus*

| tiempo de fermentación (h) | Halos de inhibición (mm) para el 1er tratamiento | | | | Halos de inhibición (mm) para el 2 do tratamiento | | | | Halos de inhibición (mm) para el 3er tratamiento | | | | Halos de inhibición (mm) para el 4to tratamiento | | | |
|----------------------------|--|-----|----|-----|---|---|---|-----|--|-----|-----|-----|--|-----|-----|-----|
| | 12 | 6 | 12 | 13 | 13 | 6 | 6 | 6 | 9 | 7 | 7 | 9 | 10 | 6.5 | 7 | 8 |
| 24 | 10 | 10 | 10 | 9 | 6 | 6 | 7 | 8 | 7 | 7 | 7.5 | 8 | 6 | 6 | 7 | 7 |
| 36 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6.5 | 7 | 7 | 7 | 7.5 | 8 | 8 | 8 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| 48 | 7 | 8 | 10 | 10 | 9 | 9 | 9 | 10 | 9 | 9.5 | 10 | 15 | 7 | 8 | 8 | 9 |
| 60 | 7 | 8 | 9 | 10 | 6 | 6 | 6 | 7 | 9 | 9 | 9 | 10 | 6.5 | 8 | 9.5 | 11 |
| 72 | 7 | 7.1 | 8 | 8.5 | 8 | 8 | 8 | 8.5 | 6.8 | 7.4 | 8 | 8.2 | 8 | 8 | 8 | 8.2 |

Poder de Inhibición contra *Salmonella sp.*

| tiempo de fermentación (h) | Halos de inhibición (mm) para el 1er tratamiento | | | | Halos de inhibición (mm) para el 2 do tratamiento | | | | Halos de inhibición (mm) para el 3er tratamiento | | | | Halos de inhibición (mm) para el 4to tratamiento | | | |
|----------------------------|--|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|--|-----|-----|-----|--|-----|-----|-----|
| | 12 | 6.5 | 7 | 7 | 8 | 7 | 8 | 8 | 9 | 6 | 6 | 7.5 | 7.5 | 6 | 7 | 8 |
| 24 | 7 | 8 | 9 | 11 | 6 | 7 | 7 | 7 | 6 | 7 | 7 | 7 | 6 | 6 | 6 | 7 |
| 36 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6.1 | 6.2 | 6.3 | 6.4 | 6 | 6 | 9.7 | 10 | 6 | 6 | 6 | 7 |
| 48 | 8 | 9 | 9 | 9.5 | 10 | 11 | 11 | 11 | 6 | 9 | 9.5 | 12 | 7 | 7 | 7.3 | 7.5 |
| 60 | 6 | 7 | 8 | 9 | 6.3 | 7 | 8 | 9 | 6.2 | 8 | 9 | 10 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| 72 | 8 | 8 | 8.5 | 9 | 8 | 8 | 8 | 8.9 | 6.1 | 6.3 | 8.7 | 8.5 | 6.1 | 6.2 | 6.3 | 6.3 |



ANEXO 05: Medicion de los halos de inhibicion frente

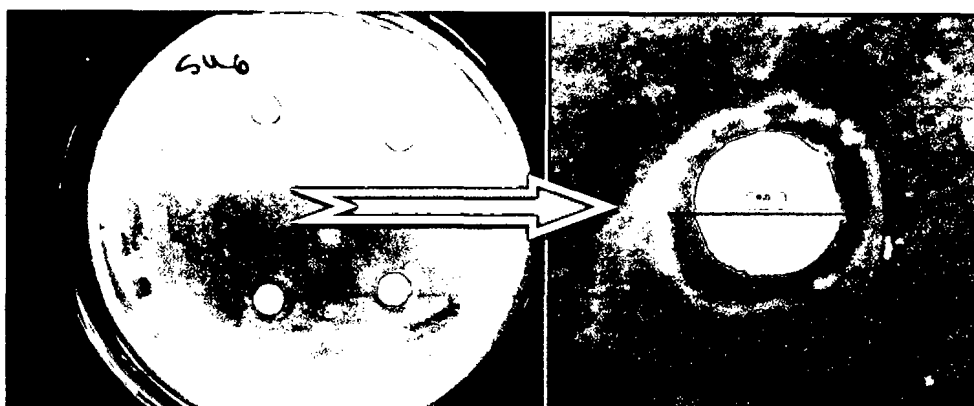


Figura: medida de los halos de inhibicion sobre *Salmonella*

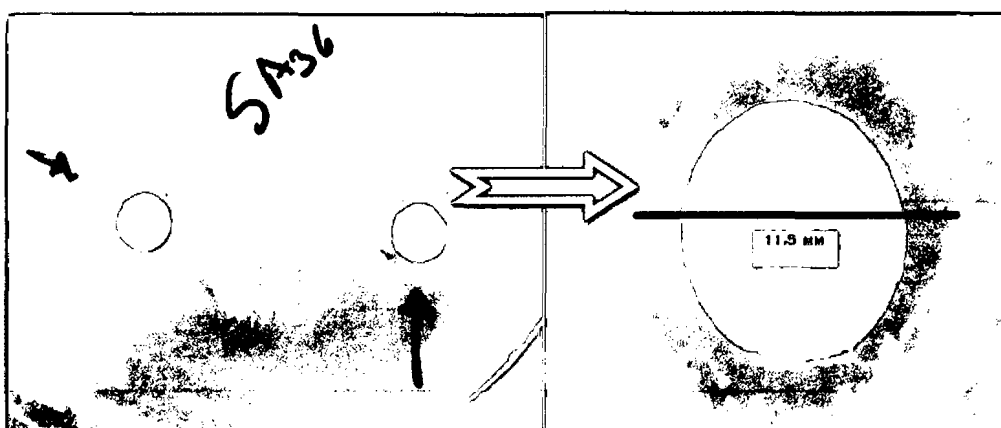


Figura: medida de los halos de inhibicion sobre *Staphylococcus aureus*

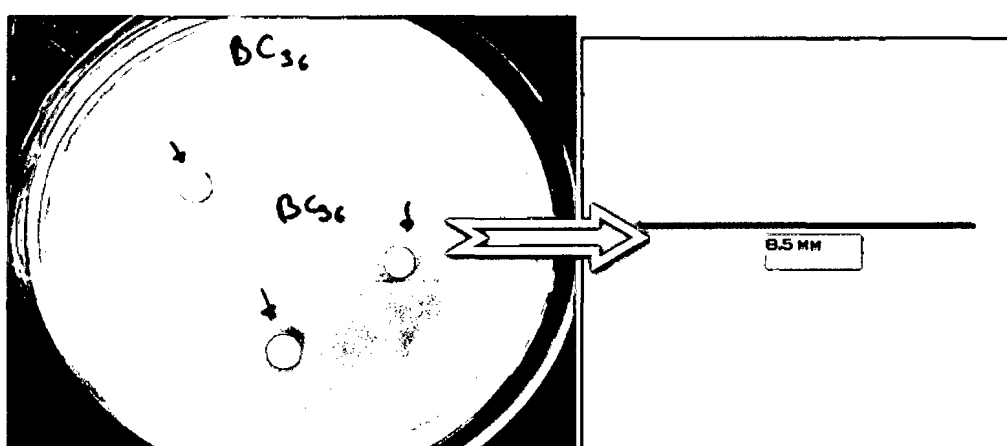


Figura: medida de los halos de inhibicion sobre *Bacillus cereus*

ANEXO 06: Evaluación fisicoquímica de la bacteriocina: prueba de la catalasa y estabilidad a diferentes pH.

Contra *Bacillus cereus*

| Tiempo de fermentación | promedios para el 1er tratamiento | | | | promedios para el 3er tratamiento | | | |
|------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|-----------------------------------|---------|---------|---------|
| | CATALASA | pH= 4.0 | pH= 6.5 | pH= 9.0 | CATALASA | pH= 4.0 | pH= 6.5 | pH= 9.0 |
| 12 | 4.75 | 0 | 3.25 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 6.5 | 0.375 | 1.025 | 1.25 | 4 | 1.75 | 1.55 | 0.975 |
| 48 | 2 | 1 | 1.25 | 1.625 | 3 | 1.125 | 1.125 | 1.75 |
| 60 | 2 | 1.5 | 0.45 | 1 | 1.75 | 1.25 | 1.25 | 1 |
| 72 | 3.75 | 1.125 | 1.5 | 1.5 | 2.25 | 1.25 | 1.25 | 1 |

Contra *Staphylococcus aureus*

| Tiempo de fermentación | promedios para el 1er tratamiento | | | | promedios para el 3er tratamiento | | | |
|------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|-----------------------------------|---------|---------|---------|
| | CATALASA | pH= 4.0 | pH= 6.5 | pH= 9.0 | CATALASA | pH= 4.0 | pH= 6.5 | pH= 9.0 |
| 12 | 5.5 | 1.75 | 4.75 | 0.55 | 3.25 | 1.25 | 1.5 | 0 |
| 36 | 2.25 | 0.1 | 2 | 2 | 2.375 | 2.75 | 1.5 | 2.25 |
| 48 | 4 | 1.75 | 1.5 | 1.625 | 3.25 | 2 | 1.75 | 1.125 |
| 60 | 3.25 | 0.75 | 1.2 | 1.25 | 3 | 1 | 1 | 1.1 |
| 72 | 5 | 2.25 | 1.5 | 1.75 | 1.5 | 1.75 | 1.75 | 1.75 |

Contra *Salmonella*

| Tiempo de fermentación | promedios para el 1er tratamiento | | | | promedios para el 3er tratamiento | | | |
|------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|-----------------------------------|---------|---------|---------|
| | CATALASA | pH= 4.0 | pH= 6.5 | pH= 9.0 | CATALASA | pH= 4.0 | pH= 6.5 | pH= 9.0 |
| 12 | 4.25 | 0 | 2.75 | 0 | 0 | 0 | 0.125 | 0.3 |
| 36 | 5.5 | 0.18 | 1.38 | 1 | 2.5 | 1 | 1 | 1.75 |
| 48 | 1.5 | 1.25 | 0.75 | 1.25 | 2.75 | 1.63 | 1.88 | 1.25 |
| 60 | 1.25 | 1.13 | 1.05 | 1.05 | 4.5 | 2 | 1.08 | 1.25 |
| 72 | 4.25 | 1.5 | 1.75 | 1.5 | 5.25 | 1.75 | 1.38 | 1.75 |

Visualización de la Caracterización fisicoquímica de la bacteriocina: prueba de la catalasa y estabilidad a diferentes pH.

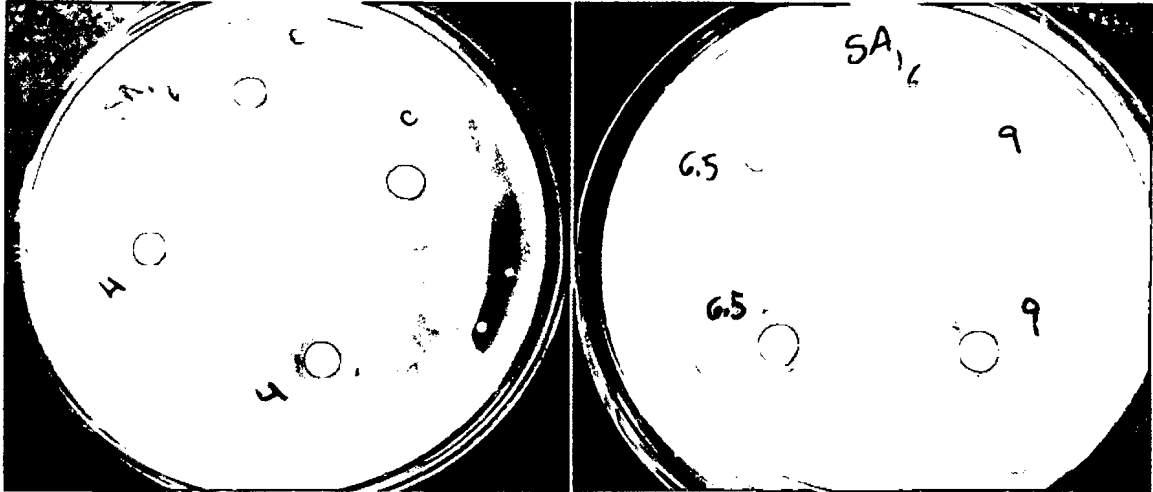


Figura: visualización de la sensibilidad a la catalasa (C izquierda), y evaluación de la estabilidad a diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0) probadas sobre *Staphylococcus aureus*

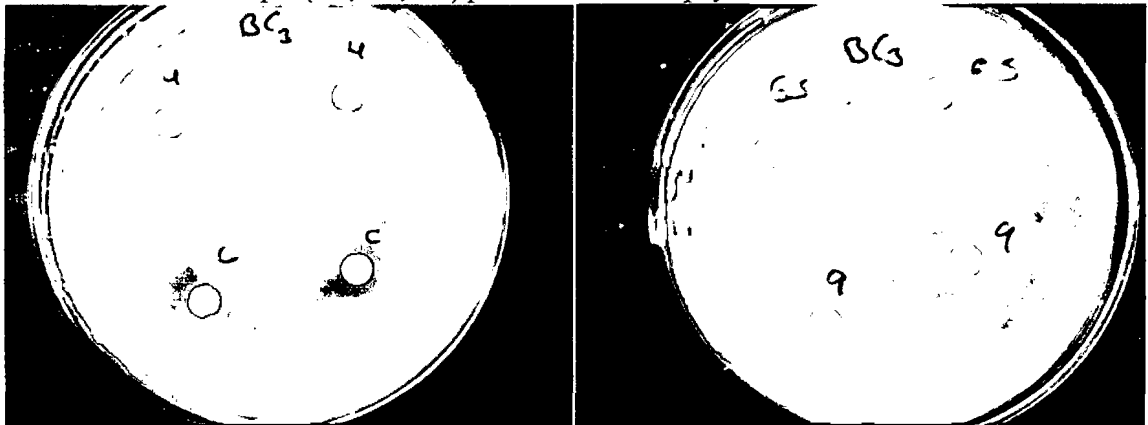


Figura: visualización de la sensibilidad a la catalasa (C izquierda), y evaluación de la estabilidad a diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0) probadas sobre *Bacillus cereus*

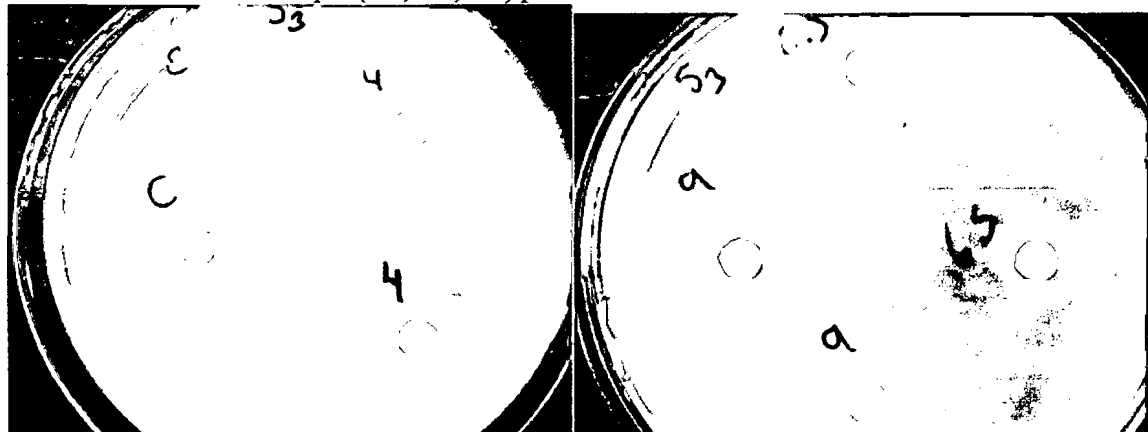


Figura: visualización de la sensibilidad a la catalasa (C izquierda), y evaluación de la estabilidad a diferentes pH (4.0, 6.5, 9.0) probadas sobre *Salmonella* sp.

ANEXO 07: Evaluacion de la concentracion minima inhibitoria (CMI).

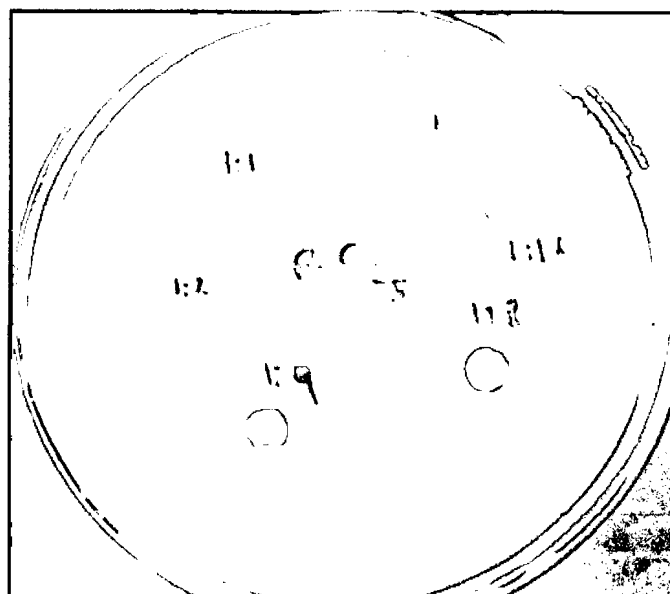


Figura: Evaluacion de la concentracion minima inhibitoria en diferentes diluciones (1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) sobre *Bacillus cereus*

ANEXO 08: Evaluacion de la muestra en blanco

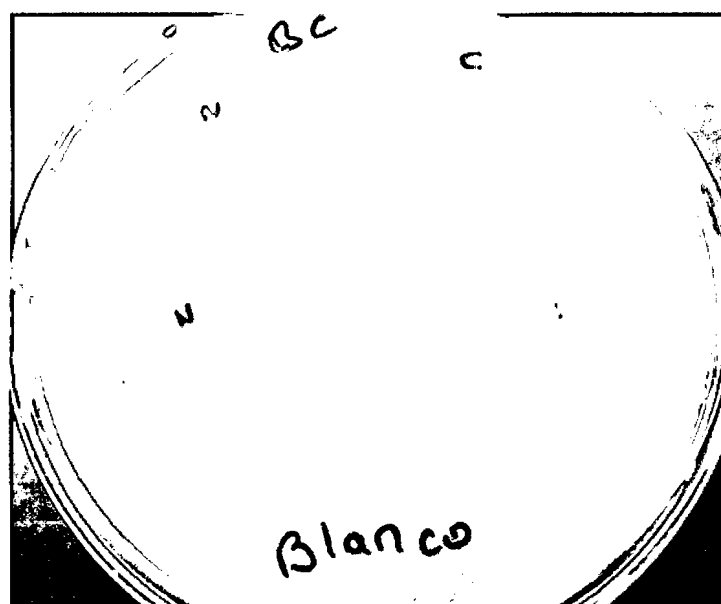


Figura: Evaluacion de Tratamientos de formacion de halos sin inculo de cepa *L. plantarum 32plp* sobre *Bacillus cereus*

ANEXO 09: Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$ para los 4 tratamientos evaluados en tres bacterias patógenas (A: *Bacillus cereus*, B: *Staphylococcus aureus* y C: *Salmonella* sp.)

Inhibición A

HSD de Tukey^a

| Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | |
|-------------|---|------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 17,00 | 4 | ,0000 | | | | |
| 9,00 | 4 | ,0750 | ,0750 | | | |
| 18,00 | 4 | ,0875 | ,0875 | | | |
| 6,00 | 4 | ,2500 | ,2500 | ,2500 | | |
| 20,00 | 4 | ,3875 | ,3875 | ,3875 | ,3875 | |
| 5,00 | 4 | ,4375 | ,4375 | ,4375 | ,4375 | |
| 10,00 | 4 | ,5125 | ,5125 | ,5125 | ,5125 | |
| 2,00 | 4 | ,6000 | ,6000 | ,6000 | ,6000 | |
| 14,00 | 4 | ,6500 | ,6500 | ,6500 | ,6500 | |
| 8,00 | 4 | ,6625 | ,6625 | ,6625 | ,6625 | |
| 4,00 | 4 | ,7750 | ,7750 | ,7750 | ,7750 | |
| 3,00 | 4 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | |
| 1,00 | 4 | 1,1500 | 1,1500 | 1,1500 | 1,1500 | 1,1500 |
| 19,00 | 4 | 1,1500 | 1,1500 | 1,1500 | 1,1500 | 1,1500 |
| 7,00 | 4 | 1,1625 | 1,1625 | 1,1625 | 1,1625 | 1,1625 |
| 11,00 | 4 | | 1,2500 | 1,2500 | 1,2500 | 1,2500 |
| 12,00 | 4 | | | 1,3125 | 1,3125 | 1,3125 |
| 13,00 | 4 | | | 1,3125 | 1,3125 | 1,3125 |
| 16,00 | 4 | | | | 1,5000 | 1,5000 |
| 15,00 | 4 | | | | | 2,2500 |
| Sig. | | ,058 | ,052 | ,128 | ,087 | ,096 |

Inhibición B

HSD de Tukey^a

| Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | |
|-------------|---|------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 7,00 | 4 | ,0625 | | | | |
| 18,00 | 4 | ,1125 | | | | |
| 10,00 | 4 | ,3125 | ,3125 | | | |
| 17,00 | 4 | ,8500 | ,8500 | ,8500 | | |
| 6,00 | 4 | ,9375 | ,9375 | ,9375 | | |
| 20,00 | 4 | ,9375 | ,9375 | ,9375 | | |
| 2,00 | 4 | | 1,0250 | 1,0250 | | |
| 5,00 | 4 | | | 1,2125 | 1,2125 | |
| 16,00 | 4 | | | 1,2500 | 1,2500 | |
| 8,00 | 4 | | | 1,2875 | 1,2875 | |
| 9,00 | 4 | | | 1,3750 | 1,3750 | 1,3750 |
| 13,00 | 4 | | | 1,3750 | 1,3750 | 1,3750 |
| 1,00 | 4 | | | 1,4875 | 1,4875 | 1,4875 |
| 4,00 | 4 | | | 1,5250 | 1,5250 | 1,5250 |
| 15,00 | 4 | | | 1,5875 | 1,5875 | 1,5875 |
| 19,00 | 4 | | | 1,6000 | 1,6000 | 1,6000 |
| 3,00 | 4 | | | 1,6250 | 1,6250 | 1,6250 |
| 11,00 | 4 | | | 1,6250 | 1,6250 | 1,6250 |
| 14,00 | 4 | | | | 2,0000 | 2,0000 |
| 12,00 | 4 | | | | | 2,2500 |
| Sig. | | ,059 | ,282 | ,164 | ,146 | ,059 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Inhibición C

HSD de Tukey^a

| Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | | | |
|-------------|---|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 6,00 | 4 | ,0000 | | | | | |
| 16,00 | 4 | ,0000 | | | | | |
| 17,00 | 4 | ,0000 | | | | | |
| 5,00 | 4 | ,0250 | | | | | |
| 10,00 | 4 | ,0625 | | | | | |
| 9,00 | 4 | ,1500 | ,1500 | | | | |
| 7,00 | 4 | ,3625 | ,3625 | ,3625 | | | |
| 12,00 | 4 | ,6250 | ,6250 | ,6250 | ,6250 | | |
| 1,00 | 4 | ,6875 | ,6875 | ,6875 | ,6875 | | |
| 2,00 | 4 | ,6875 | ,6875 | ,6875 | ,6875 | | |
| 15,00 | 4 | | 1,0875 | 1,0875 | 1,0875 | 1,0875 | |
| 11,00 | 4 | | | 1,2750 | 1,2750 | 1,2750 | |
| 3,00 | 4 | | | | 1,3750 | 1,3750 | |
| 18,00 | 4 | | | | 1,4375 | 1,4375 | |
| 19,00 | 4 | | | | 1,5000 | 1,5000 | |
| 8,00 | 4 | | | | 1,5625 | 1,5625 | |
| 20,00 | 4 | | | | | 1,8750 | 1,8750 |
| 4,00 | 4 | | | | | 1,9750 | 1,9750 |
| 13,00 | 4 | | | | | 2,0000 | 2,0000 |
| 14,00 | 4 | | | | | | 2,6875 |
| Sig. | | ,553 | ,091 | ,115 | ,091 | ,115 | ,259 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Cuadro: Desviación estándar de los valores de Inhibición frente *Bacillus cereus* para los 4 tratamientos

| V. Inhibición 1er tratamiento | V. Inhibición 2do tratamiento | V. Inhibición 3er tratamiento | V. Inhibición 4to tratamiento |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 0,5± 0,84 | 0,56 ± 0,52 | 1,8 ± 0,87 | 1 ± 0,65 |
| 1,63± 0,75 | 1,38 ± 0,48 | 0,6 ± 0,65 | 0,2 ± 0,29 |
| 0,75 ± 0,50 | 0,88 ± 0,48 | 0,55 ± 0,47 | 0 |
| 2 ± 1,47 | 1,5 ± 1,08 | 1 ± 0,65 | 0,6 ± 0,54 |
| 1,19 ± 0,55 | 1,69 ± 0,24 | 1,3 ± 0,75 | 0,45 ± 0,43 |
| 0,88 ± 0,52 | 1,44 ± 0,66 | 0,62 ± 0,59 | 0,05 ± 0,08 |

Cuadro: Desviación estándar de los valores de Inhibición frente *Staphylococcus aureus* para los 4 tratamientos

| V. Inhibición 1er tratamiento | V. Inhibición 2do tratamiento | V. Inhibición 3er tratamiento | V. Inhibición 4to tratamiento |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 2,5± 1,68 | 0,38 ± 0,75 | 0,9 ± 0,75 | 0,75 ± 0,77 |
| 1,88± 0,25 | 0,38 ± 0,48 | 0,55 ± 0,24 | 0,2 ± 0,29 |
| 0 | 0,44 ± 0,13 | 0,75 ± 0,13 | 0 |
| 1,38 ± 0,75 | 1,63 ± 0,25 | 1,95 ± 1,39 | 0,8 ± 0,41 |
| 1,25 ± 0,65 | 0,13 ± 0,25 | 1,3 ± 0,25 | 1,1 ± 0,97 |
| 0,83 ± 0,36 | 1,06 ± 0,13 | 0,64 ± 0,32 | 0,82 ± 0,05 |

Cuadro: Desviación estándar de los valores de Inhibición frente *Salmonella* sp. para los 4 tratamientos

| V. Inhibición 1er tratamiento | V. Inhibición 2do tratamiento | V. Inhibición 3er tratamiento | V. Inhibición 4to tratamiento |
|--|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 0,56± 0,31 | 1 ± 0,41 | 0,3 ± 0,43 | 0,6 ± 0,65 |
| 1,38± 0,85 | 0,38 ± 0,25 | 0,3 ± 0,25 | 0,1 ± 0,25 |
| 0 | 0,13 ± 0,06 | 0,77 ± 1,11 | 0,1 ± 0,25 |
| 1,44 ± 0,31 | 2,38 ± 0,25 | 1,25 ± 1,23 | 0,48 ± 0,12 |
| 0,75 ± 0,65 | 0,79 ± 0,59 | 0,92 ± 0,81 | 0 |
| 1,19 ± 0,24 | 1,11 ± 0,23 | 0,56 ± 0,70 | 0,09 ± 0,05 |