



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA PRODUCIDA POR DOS BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS AISLADAS DE UN PRODUCTO CÁRNICO MADURADO
TIPO SALAMI.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

VIANEY ANAHÍ SALAS VILLAGRÁN



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Amelia María de Guadalupe Farrés González-Sarabia

VOCAL: Profesor: Hugo Antonio Hernández Pérez

SECRETARIO: Profesor: Israel García Cano

1er. SUPLENTE: Profesor: Carmina Montiel Pacheco

2do. SUPLENTE: Profesor: Elsi Ideli Juárez Arroyo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio S-132. Área de Bioquímica de Macromoléculas del Departamento de Biotecnología. División de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Israel García Cano

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Edith Ponce Alquicira

SUSTENTANTE:

Vianey Anahí Salas Villagrán



Identificación y caracterización de la actividad antibacteriana producida por dos bacterias ácido lácticas aisladas de un producto cárnico madurado tipo salami.

CONTENIDO

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Productos cárnicos	7
1.1.1. Embutidos crudos fermentados.....	8
1.1.2. Salami	8
1.2. Producción en México.....	9
1.3. Microbiota de los productos cárnicos	10
1.4. Cultivos iniciadores.....	11
1.5. Bacterias ácido lácticas	12
1.5.1. Metabolitos producidos por las bacterias ácido lácticas.....	14
Ácidos orgánicos.....	14
Peróxido de hidrógeno	14
Dióxido de carbono	15
Diacetilo	15
1.6. Peptidoglucano hidrolasas (PGH)	15
1.7. Bacteriocinas	17
Clase I. Péptidos pequeños modificados postraduccionalmente.	18
Clase II. Bacteriocinas sin modificar	20
Clase III.	21
2. ANTECEDENTES	22
2.1. <i>Enterococcus spp.</i>.....	22
2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	2326
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVO GENERAL	26
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	27
6.1. Identificación de las cepas con actividad antimicrobiana.	28
6.1.1. Crecimiento de cepas aisladas.....	28



6.1.2.	Obtención del extracto crudo.....	28
Cada una de las muestras se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C.....		28
6.1.3.	Extracción de DNA.....	28
6.1.4.	Amplificación del gen de referencia 16S del ADNr.....	29
6.1.5.	Secuenciación.....	30
6.2.	Determinación de la actividad antimicrobiana.....	30
6.2.1.	Actividad antagónica en caja Petri.....	30
6.2.2.	Actividad antimicrobiana por difusión en agar.....	31
6.3.	Obtención de las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) y bacteriocinas.....	32
6.3.1.	Ultrafiltración de la PGH.....	32
6.3.2.	Obtención del péptido antimicrobiano (adsorción-desorción).....	32
6.3.3.	Perfil de proteínas y zimogramas para PGHs y bacteriocinas.....	33
6.3.4.	Cuantificación de proteína.....	34
6.4.	Clasificación de la actividad antimicrobiana de PGHs por especificidad de sustrato.....	34
6.4.1.	Determinación de la actividad N-acetilglucosaminidasa.....	34
6.4.2.	Determinación de la actividad de N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa.....	34
6.4.3.	Determinación de la actividad de endopeptidasa.....	35
6.4.4.	Determinación de la actividad de N-acetilmuramidasa.....	35
6.4.5.	Extracción de peptidoglucano de <i>M. lysodeikticus</i>	36
6.5.	Amplificación de genes específicos para PGHs y bacteriocinas.....	36
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
7.1.	Identificación de cepas con actividad antimicrobiana.....	38
7.1.1.	Crecimiento de colonias seleccionadas.....	38
7.1.2.	Extracción de DNA.....	39
7.2.	Determinación de la actividad antimicrobiana.....	41
7.2.1.	Actividad antagónica en caja Petri.....	43
7.2.2.	Actividad antimicrobiana por difusión en agar.....	45
7.3.	Análisis <i>in silico</i>.....	48
7.4.	Identificación de genes de peptidoglucano hidrolasas.....	48
7.5.	Identificación de las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) en las cepas de estudio.....	50
7.5.1.	Concentración de la PGH.....	50
7.5.2.	Actividad antimicrobiana por zimogramas.....	50
7.5.3.	Identificación de proteína por LC-MS/MS.....	52
7.5.4.	Clasificación de la actividad antimicrobiana de PGHs por especificidad de sustrato.....	54
7.6.	Identificación de genes de bacteriocinas.....	55
7.7.	Identificación de bacteriocinas en las cepas de estudio.....	58
7.7.1.	Obtención del péptido antimicrobiano.....	58



8. <i>CONCLUSIONES</i>	60
9. <i>PERSPECTIVAS</i>	60
10. <i>REFERENCIAS</i>	61



RESUMEN

El salami es un producto cárnico, curado y madurado, donde las bacterias ácido lácticas (BAL) son utilizadas como cultivos iniciadores con el fin de conseguir propiedades físico-químicas y organolépticas en el producto. También favorecen su conservación debido al descenso del pH por la producción de ácido láctico y la producción de compuestos con actividad antimicrobiana de origen proteínico, los cuales presentan un efecto antagónico contra microorganismos patógenos y deterioradores.

Ejemplos de estos compuestos con actividad antimicrobiana son las bacteriocinas, que son péptidos no mayores a 30 kDa y las peptidoglucano hidrolasas (PGH) que son enzimas responsables de romper los enlaces del peptidoglucano, las cuales se clasifican de acuerdo al enlace que hidrolizan.

Previamente en el grupo de trabajo se aislaron diferentes BAL en el salami, que presentaron halos de inhibición contra diversas bacterias. Sin embargo, no se conocía el género y especie de los microorganismos aislados, ni la naturaleza de la actividad antibacteriana. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue identificar por medio de la secuenciación del gen de referencia 16S rDNA del microorganismo aislado, así como determinar la naturaleza de la actividad antibacteriana.

Los microorganismos que se identificaron fueron *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum*. Por medio de pruebas antagónicas se encontró actividad contra *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Weissella viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei*. Para conocer si esta actividad es de origen proteínico, se realizaron SDS-PAGE y zimogramas y las bandas con actividad antibacteriana se enviaron a identificar por espectrometría de masas. Posteriormente se obtuvieron productos de amplificación de genes específicos para bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas. Se evaluó la actividad de PGH contra sustratos específicos y se encontró que ambas PGHs presentaron actividad específica de *N*-acetilmuramidasa.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Productos cárnicos

A lo largo del tiempo se han desarrollado una enorme variedad de productos cárnicos con diferentes características. Pese a la diversidad de formas y sabores, muchos de estos productos usan tecnologías de fabricación similares; son elaborados con carne procedente de mamíferos destinada al consumo humano con o sin grasa, picadas, con adición o no de subproductos y/o aditivos permitidos, condimentos, especias, embutidos o no, sometidos a diversos métodos de desecación, cocción o salazón (SAGARPA, 2016).

La clasificación de los productos cárnicos (Tabla 1) se basa en criterios tales como materias primas que los componen, la estructura de su masa, si están o no embutidos, si se someten o no a la acción del calor o algún otro proceso característico en su tecnología de elaboración, la forma del producto terminado y su vida útil. (FAO, 2017).

Tabla 1. Clasificación de productos cárnicos (FAO, 2017).

Tipo	Ejemplo
Productos cárnicos procesados crudos	Carne de hamburguesa, salchicha
Productos cárnicos curados	Jamón serrano, jamón tipo York y jamón Virginia
Productos cárnicos crudos-cocidos	Mortadela, salchicha Frankfurt, salchicha Viena
Productos cárnicos precocinados-cocinados	Paté de hígado, morcillas
Ebutidos crudos-fermentados	Chorizo, salami
Productos cárnicos secos	Tiras de carne jerkey

1.1.1. Embutidos crudos fermentados

Se define a los productos cárnicos fermentados como aquéllos en los cuales se inoculan microorganismos durante su elaboración para asegurar una actividad microbiana controlada y suficiente para modificar las características del producto (Doyle, 2000). La fermentación de alimentos destaca entre los métodos de conservación más antiguos debido a la poca energía que se consume utilizando moléculas combustibles como la glucosa, además de generar como producto un compuesto rico en energía (ATP) y otros productos como son el alcohol, glicerol y CO₂. Durante la fermentación participan microorganismos que le proporcionan estabilidad microbiológica al alimento y contribuyen a sus propiedades organolépticas (Yilmaz, 2009).

La fermentación en cárnicos es un fenómeno biológico complejo, acelerado por la acción de ciertos microorganismos deseables que se van a encontrar en la carne y que pueden competir o actuar de manera sinérgica (Yilmaz, 2009). Los embutidos crudos fermentados son productos elaborados con una mezcla de carne y grasa picadas (habitualmente de cerdo), sal, agentes de curado (nitratos y nitritos), azúcares, especias y aditivos autorizados (Ordoñez y de la Hoz, 2001). La mezcla es embutida en tripas y sometida, generalmente, a un proceso de fermentación hasta obtener el valor de pH deseado para posteriormente realizar el proceso de maduración donde se desarrolla el aroma y textura típicos como consecuencia de numerosos procesos químicos y enzimáticos (Arnau, *et al.*, 2007).

1.1.2. Salami

Según la NOM-145-SSA1-1995 el salami es un producto cárnico troceado, cuya carne fue troceada y picada hasta lograr trozos no menores de 2 mm, pudiendo ser crudos, madurados por medio de cultivos microbianos o de la adición de azúcares cocidos o no.

1.2. Producción en México

En los últimos años se ha producido en México un creciente interés por los productos embutidos crudos fermentados. En el 2013 México ocupó el lugar número 8 en la producción de alimentos cárnicos procesados, registrando un aumento importante en su producción con un incremento anual del 4.0%. Dentro del volumen producido la mayor participación la genera el rubro de embutidos y conservas de carne de ave con 45.0%, seguido de carnes frías y embutidos con 35.0% y en tercer lugar jamones de carnes rojas con 20.0%. En cuanto a la balanza comercial, la exportación de carne mejoró entre 2010 y 2013. La exportación de productos procesados de carne pasó de 16,115 toneladas en 2010 a 18,009 toneladas (COMECARNE, 2016).

En México, el consumo de carne por persona (bovino, cerdo, ave, ovina y caprina en conjunto) actualmente es de 63 kg al año, según datos de la Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2010). Por su parte, se informa que la carne más consumida es la de pollo, seguida por la de bovino y finalmente, la de cerdo, como se puede observar en la figura 1, donde se muestran los porcentajes del consumo *per cápita*.

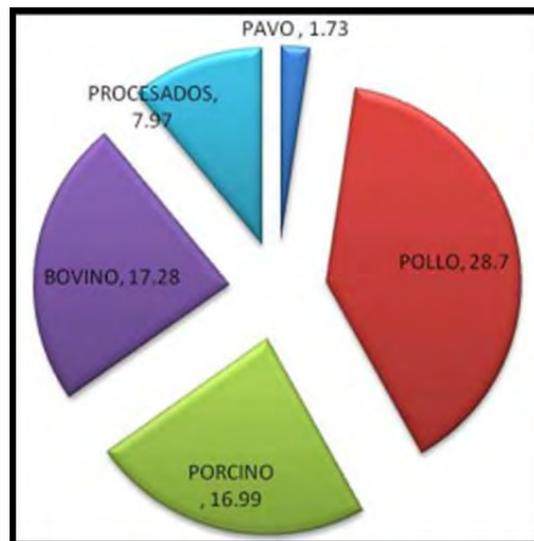


Figura 1. Distribución porcentual del consumo per cápita de productos cárnicos en 2010 (SAGARPA).

En la figura 1 se muestra que el consumo de carnes procesadas representa casi un 8% sobre el total de consumo de carne en México. Cabe resaltar que las carnes procesadas incluyen todo tipo de embutidos, pavo, jamones cocidos, chorizo o jamón curado y salami, siendo éste una pequeña proporción en comparación con los otros tipos de carnes.

1.3. Microbiota de los productos cárnicos

La carne es un importante elemento de la dieta humana y está considerada dentro del grupo de los alimentos altamente perecederos debido a sus características microbiológicas y su composición química. Es un excelente medio para el crecimiento de muchos microorganismos, a pesar de que el músculo es prácticamente estéril. Los alimentos preparados a base de carne son muy susceptibles a la contaminación. La propiedad más importante que presenta es su alto valor de actividad de agua (a_w), su abundancia en proteínas, péptidos, aminoácidos, factores de crecimiento y minerales, además de tener un pH favorable para el crecimiento de microorganismos (Holck, 2017).

Dentro del amplio grupo de microorganismos de la carne pueden diferenciarse tres categorías:

- Microorganismos patógenos: pueden causar infecciones y toxiinfecciones alimentarias.
- Microorganismos deterioradores: pueden alterar las propiedades organolépticas de la carne.
- Microorganismos de interés tecnológico: son microorganismos que conducen a la fermentación e influyen de manera determinada en características finales del embutido como su textura, color, aroma y gusto.

Los microorganismos deterioradores y patógenos adquieren gran importancia durante el eviscerado de la canal ya que es probable que muchos microorganismos de la superficie y de las vísceras del animal, como *Salmonella spp.* y otras enterobacterias, lleguen a entrar en contacto con el músculo. Los

microorganismos que se conocen como patógenos en la carne, incluyen *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens* y *Yersinia* (Koochmaraie, et al., 2005). La mayoría de los microorganismos que provocan alteraciones se pueden agrupar dentro de los psicrótrofos aerobios como son los géneros *Pseudomonas* y *Moraxella* y especies anaerobias facultativas como enterobacterias psicrótrofas, *Aeromonas spp.*, *Shewanella putrefaciens* y *Bochothrix thermosphacta*, también podemos encontrar a microorganismos Gram-positivos que son los causantes de infecciones como *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter spp.* y *Listeria monocytogenes* (Juárez, 2005). Dentro del grupo de los microorganismos de interés tecnológico que conducen a la fermentación se encuentran principalmente las bacterias ácido lácticas (BAL).

1.4. Cultivos iniciadores

La incorporación de bacterias ácido lácticas como cultivos iniciadores en las fórmulas de los embutidos altera dramáticamente la microbiota y las características de los productos terminados. Para esto es necesario la incubación de los embutidos a la temperatura óptima de crecimiento del cultivo iniciador. En un ambiente pobre en oxígeno las BAL generan la disminución del pH debido a una rápida conversión de la glucosa a ácido láctico, provocando la inhibición de microorganismos como las *Pseudomonas* psicrótrofas, microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* y la mayoría de los patógenos (Doyle, 2000).

La inoculación se lleva a cabo mediante uno de estos tres métodos:

- Fermentación natural: utiliza la microbiota presente de forma natural en la carne como inóculo.
- Fermentación a partir del producto anterior (retroinóculo): consiste en la adición de una porción de carne procedente de un lote previo de embutidos al lote presente, esto es, de un lote madre de embutido crudo.
- Fermentación a partir de cultivos iniciadores: consiste en la adición de una/s cepa/s pura/s de bacterias ácido lácticas a carne sin fermentar.



Las características de los cultivos iniciadores comerciales utilizados en la producción de productos cárnicos consisten en que sean homofermentativos, tengan la capacidad de transformar anaeróbica y rápidamente la glucosa o sacarosa a ácido láctico, con un crecimiento sostenido a pH 4.5, tolerantes a concentraciones de sales (KCl, NaCl) de hasta el 6 % y que sean capaces de crecer en presencia de nitrito o nitrato sódico o potásico, son cultivos acidúricos, capaces de crecer a temperaturas de 21 a 43°C, no proteolíticos, no lipolíticos (Doyle, 2000).

1.5. Bacterias ácido lácticas

Las BAL son un grupo de microorganismos que están relacionados con hábitats ricos en nutrientes como cereales, frutas, vegetales, leche y carne. Además de contribuir en la bioconservación de los alimentos debido a la producción de una gran variedad de compuestos como: ácidos orgánicos, etanol, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, etc., los cuales actúan de manera sinérgica para prevenir o eliminar la contaminación bacteriana; mejoran las características organolépticas como el sabor, olor, textura y aumentan la calidad nutritiva de los alimentos (Grosu-Tudor, *et al.*,2014).

Las BAL forman parte de las bacterias Gram-positivas, pertenecen a la familia de los Firmicutes, en el orden de los *Lactobacillales* (Tsakalidou, 2011). Son anaerobias aerotolerantes, normalmente no móviles, no formadoras de esporas, catalasa negativa, ácidotolerantes, con morfología de coco, coco-bacilo o bacilo y estrictamente fermentativas obteniendo principalmente como producto final ácido láctico durante la fermentación de carbohidratos, están formadas por un grupo bastante heterogéneo. Entre los géneros incluidos se encuentran: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* (Salminen, 2004).

El papel principal de las BAL es convertir azúcares en ácido láctico por medio de la fermentación y de este modo contribuir con la seguridad del producto creando



1.5.1. Metabolitos producidos por las bacterias ácido lácticas.

Los productos finales de la fermentación de las BAL de mayor interés en la industria cárnica son los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno, el dióxido de carbono, el diacetilo.

Ácidos orgánicos

El ácido láctico y el ácido acético son los principales ácidos orgánicos obtenidos como producto final del catabolismo de los carbohidratos en las bacterias ácido lácticas. Se ha observado que los ácidos débiles tienen mayor poder antimicrobiano a bajos pH comparándolo con un pH neutro, así, el ácido acético es un inhibidor más fuerte y tiene un amplio espectro de actividad, inhibiendo hongos, levaduras y bacterias. Sin embargo, si mezclamos ácido láctico con ácido acético reducen el crecimiento de *Salmonella typhimurium* más que cualquiera de los dos ácidos solos, lo cual sugiere una actividad sinérgica (Salminen, 2004).

Se asume que el efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos es causado principalmente por la forma no-disociada de la molécula, la cual es la forma tóxica de los ácidos débiles, permitiendo que atraviesen la membrana celular hacia el citosol y de esta manera interferir en funciones metabólicas esenciales. Entre los efectos tóxicos de estos ácidos se encuentran la reducción del pH intracelular y la disipación del potencial de membrana (Habjanic, 2010).

Peróxido de hidrógeno

La actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno es atribuida a su fuerte efecto de oxidación sobre las células bacterianas y la destrucción de estructuras moleculares básicas de las proteínas celulares. Esto se lleva a cabo debido a que en presencia de oxígeno, las bacterias ácido lácticas son capaces de generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir de la acción del contenido de flavoproteína oxidasas, NADH oxidasas y superóxido dismutasa. Sin embargo, su principal efecto antimicrobiano es el bloqueo de la glucólisis, ya que inhibe el transporte de glucosa, la actividad de la hexocinasa y la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilo de estas enzimas, siendo esta última enzima el blanco principal (Salminen, 2004; Habjanic, 2010).



Dióxido de carbono

La actividad inhibitoria atribuida al dióxido de carbono se debe a que la formación de este compuesto puede crear un ambiente anaeróbico evitando el crecimiento de microorganismos. No se tiene mucha información acerca de su mecanismo de acción, pero se sugiere que inhibe las descarboxilaciones enzimáticas y su acumulación en la bicapa lipídica causa una disfunción en la permeabilidad. Sin embargo, a bajas concentraciones puede estimular el crecimiento de algunos microorganismos (Salminen, 2004).

Diacetilo

El diacetilo es producido por las cepas de las especies del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, así como otros microorganismos. La formación de este compuesto se puede producir si el citrato es metabolizado y es convertido vía piruvato a diacetilo y su efecto es más efectivo a pH menor a 7 (Salminen, 2004).

1.6. Peptidoglucano hidrolasas (PGH)

Otros compuestos con actividad antimicrobiana producidos por las bacterias ácido lácticas son las peptidoglucano hidrolasas (PGH), que son enzimas responsables de hidrolizar los enlaces del peptidoglucano (PG) (Vollmer, 2008).

El PG es el principal componente de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, forma múltiples capas, presenta una conformación tridimensional que origina una pared celular muy fuerte y rígida, garantizando la integridad y la forma de la célula. Está constituido por cadenas de glicano formados principalmente por los ácidos *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y *N*-acetilmurámico (MurNAc) unidos por el enlace β -1,4 (Chapot-Chartier, 2012). Las cadenas peptídicas están unidas covalentemente a través de su N- terminal y el grupo lactil del MurNAc, y pueden variar en su composición dependiendo la especie bacteriana. En BAL, la secuencia de amino ácidos del péptido es L-Ala- γ -D-Glu-X-D-Ala, donde el tercer amino ácido (X) es un di-amino ácido, siendo frecuentemente L-Lys (*L. lactis* y en la mayoría de los lactobacilos) (Chapot-Chartier, 2014). Cabe mencionar que la pared celular puede estar asociada a otro tipo de compuestos, como son los



ácidos teicoicos y lipoteicoicos y/o polisacáridos, diferenciándola de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, las cuales están constituidas por una sola capa delgada y no contienen ácidos teicoicos ni lipoteicoicos (García-Cano, 2013).

Estas enzimas pueden tener más de una función fisiológica, entre ellas, la regulación del crecimiento de la pared celular, el crecimiento celular, donde la separación de los enlaces del PG son necesarios para insertar el PG sintetizado, la separación de las células hijas durante la división celular, el proceso de autólisis, en particular cuando las células experimentan condiciones de estrés (Vollmer, 2008; Chapot-Chartier, 2014).

Estas enzimas pueden clasificarse en cuatro grupos, dependiendo del enlace del peptidogluano que hidrolizan (figura 3).

- i. ***N*-acetilmuramidasa (muramidasa).** Hidrolizan el enlace β -1,4 entre el *N*-acetilmurámico (MurNAc) y el *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), dejando como producto terminal un extremo ácido *N*-acetilmurámico reductor libre, un ejemplo de estas enzimas son las lisozimas.
- ii. ***N*-acetilglucosaminidasa (glucosaminidasa).** Hidrolizan el enlace β -1,4 entre el *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y el *N*-acetilmurámico (MurNAc) dejando un extremo *N*-acetilglucosamina reductor.
- iii. ***N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (amidasa).** Hidrolizan el enlace entre el grupo lactil del *N*-acetilmurámico (MurNAc) y el α -amino del L-ala, el cual es el primer amino ácido de la cadena lateral peptídica.
- iv. **Peptidasas.** Hidrolizan varios enlaces del PG y dentro de esta clase se encuentran las endopeptidasas (rompen los enlaces formados por los péptidos) y las carboxipeptidasas (hidrolizan el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos).

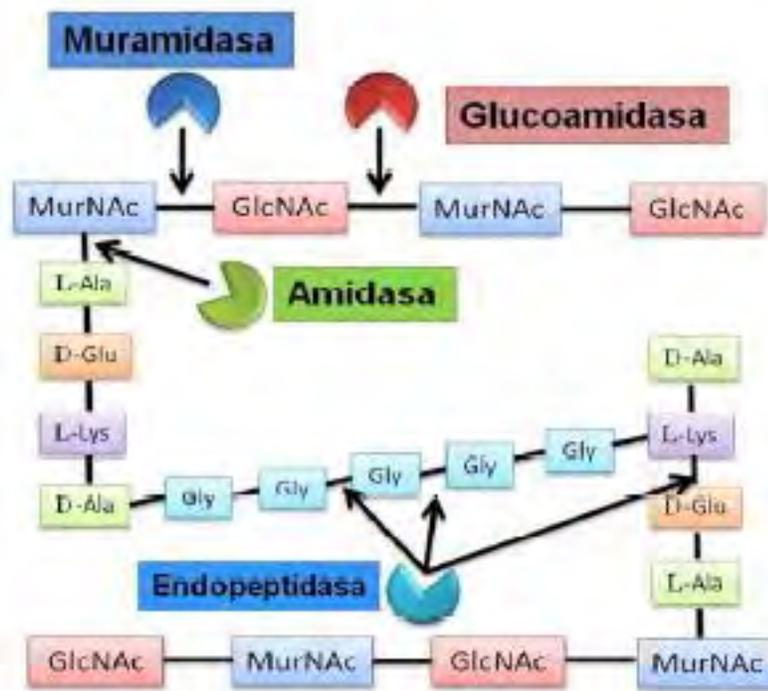


Figura 3. Estructura del peptidoglucano de *S. aureus*. Las flechas indican el tipo de enlace que hidrolizan sobre la pared bacteriana (García-Cano, 2013).

1.7. Bacteriocinas

El término bacteriocina se aplica a un amplio grupo de péptidos antibacterianos que pueden inhibir el crecimiento de microorganismo patógenos y de otras bacterias estrechamente relacionadas o no filogenéticamente con las bacterias productoras (Todorov, 2015). Su espectro antimicrobiano incluye varios microorganismos deterioradores y patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (De Vuyst and Leroy, 2007; Sip *et al.*, 2012; Zendo, 2013).

Son sustancias de naturaleza proteínica con actividad antibacteriana sintetizadas ribosomalmente, se producen durante la primera fase del crecimiento del microorganismo o en la fase estacionara (Todorov, 2015), los genes responsables de su producción generalmente están agrupados en operones. Usualmente tienen bajo peso molecular (raramente mayor a 10 kDa), presentan o no modificaciones postraduccionales y pueden ser fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas. Son moléculas generalmente catiónicas, anfifílicas, tienen un punto isoeléctrico

elevado y contienen tanto dominios hidrófobos como hidrófilos, son péptidos permeabilizantes de membrana y tienen mayor actividad a valores de pH bajos, lo que significa que su adsorción en la superficie celular de las bacterias Gram-positivas incluyendo la producción celular es dependiente del pH (Zacharof, 2012).

Klaenhammer en 1993 propuso la primera clasificación de las bacteriocinas, donde las englobaba en al menos cinco categorías y a partir de esta clasificación han sido propuestos diferentes esquemas. Cotter en el 2005 propuso que, dentro de todas las clasificaciones, la mayoría de las bacteriocinas entran dentro de las clases I y II (lantibióticos y no lantibióticos, respectivamente), las cuales también se dividen en subclases. Sin embargo, han sido descubiertos nuevos subgrupos de péptidos modificados postraduccionalmente (RiPPs) con actividad antimicrobiana, que no están dentro de estas clasificaciones a pesar de entrar en la definición de bacteriocinas (Alvarez-Sieiro, 2016).

Investigaciones recientes proponen un ajuste en la clasificación de las bacteriocinas acomodando las subclases novedosas que están apareciendo destacando una lista de clusters de bacteriocinas putativas que incluyen péptidos producidos ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs) que no habían sido identificados previamente en las BAL (Alvarez-Sieiro, 2016), basándose principalmente en el mecanismo de biosíntesis y actividad biológica concordando con las clasificaciones previas (Cotter, 2013).

Clase I. Péptidos pequeños modificados postraduccionalmente.

Esta clase de bacteriocinas engloba péptidos que se sometieron a modificaciones enzimáticas durante su biosíntesis. Consisten en un péptido líder el cual tiene la función de enzima de reconocimiento, transporte y mantiene el péptido inactivo, el cual es procesado a péptido nuclear (Arnison, 2013). Se dividen en seis subclases basándose en sus estructuras similares (figura 4).

➤ Clase Ia. Lantipéptidos (tipos I, II, III y IV).

Son péptidos que poseen aminoácidos inusuales como la lantionina y/o (metil)lantionina. Los lantipéptidos son sometidos a modificaciones

postraduccionales y los genes involucrados en el proceso de maduración se encuentran localizados en el mismo operón. Estos lantipéptidos se pueden dividir en cuatro tipos diferentes, pero solo los tipos I (LanBC-modificado) y II (LanM-modificado) pueden ser considerados lantibióticos, los tipos III y IV no presentan actividad antimicrobiana conocida (Alvarez-Sieiro, 2016).

El mecanismo de acción de la mayoría de los lantibióticos se basa en la formación de poros en la membrana citoplasmática de especies sensibles, en adición a esto pueden inhibir la biosíntesis de la pared celular a través del enlace lipídico II, etapa en la que probablemente sucede la formación de poros (Cotter, 2005).

➤ **Clase Ib. Péptidos ciclados de cabeza a cola.**

Son grupos de RiPPs cuyo N- y C- terminal están unidos por un enlace peptídico haciendo así una molécula circular. La ciclación tiene lugar durante el transporte involucrando la actividad de la ATPasa que provee la energía necesaria para la formación del enlace peptídico. Contienen segmentos de α -hélices y comparten una estructura similar con una saposina plegada. A pesar de la similitud de su estructura tienen mecanismos de acción diferentes, pero ambos involucran la formación de poros en la membrana (Alvarez-Sieiro, 2016).

➤ **Clase Ic. Sactibióticos**

Se refiere a los sactipéptidos como sactibióticos cuando estos poseen actividad antimicrobiana. Son péptidos que contienen sulfuro- α -carbono, es poco el conocimiento que se tiene de esta clase, en BAL solamente se han caracterizado clusters putativos que han sido identificados *in silico* (Alvarez-Sieiro, 2016).

➤ **Clase Id. Azoles**

Son péptidos que poseen diferentes combinaciones de anillos heterocíclicos de tiazoles y metiloxiazoles los cuales son derivados de la cisteína, serina y residuos de treonina por una vía dependiente de ATP, ciclodeshidratación y una subsecuente deshidrogenación dependiente de flavín mononucleótido.

➤ **Clase Ie. Glicinas.**

Son bacteriocinas que contienen residuos glicosilados.

➤ **Clase If. Péptidos lasso.**

Son un grupo de RiPPs, que muestran como su principal característica la presencia de un enlace amida entre el primer aminoácido en la cadena peptídica nuclear y un residuo cargado negativamente, generando un anillo que engloba el carbono terminal lineal como parte del polipéptido.

No se han reportado este tipo de péptidos en BAL, pero se ha predicho que ocurren en streptococci (Alvarez-Sieiro, 2016).

Clase II. Bacteriocinas sin modificar

Son grupos de bacteriocinas que no presentan modificaciones inusuales, es decir no requieren enzimas para su maduración, y se puede subdividir en tres tipos (figura 4):

➤ **Clase IIa. Pediocinas**

Este tipo de bacteriocinas presentan un amplio espectro de inhibición, pero destaca su actividad contra *Listeria*. Se subdividen en 8 grupos, la bacteriocina más representativa de esta clase es la pediocina PA-1 y el cluster de genes de esta pediocina está codificado en un plásmido. Su modo de acción comprende de tres pasos básicos: primero la pediocina se une a los receptores del sistema transportador manosa fosfotransferasa (Man-PTS), luego estas se insertan dentro de la membrana citoplasmática y finalmente forman un poro complejo.

➤ **Clase IIb. Bacteriocinas de dos péptidos.**

Esta clase se refiere a bacteriocinas de dos componentes, es decir, que se requiere de dos péptidos para trabajar sinérgicamente con el fin de obtener actividad antimicrobiana.

Su mecanismo de acción propone que los péptidos formen una estructura hélice-hélice que penetra la membrana e interactúa con un receptor de la membrana sensible, causando una fuga.

➤ **Clase IIc. Bacteriocinas sin péptido líder.**

Son sintetizadas sin un péptido líder N-terminal, el cual tiene como funciones la secuencia de reconocimiento para una secreción, modificación y mantiene a la bacteriocina inactiva dentro de la célula productora.

➤ **Clase IId. Bacteriocinas de un solo péptido o no pediocinas.**

Consiste en un grupo heterogéneo de bacteriocinas peptídicas lineales simples no relacionadas, con diferentes estructuras, mecanismos de secreción y maneras de acción, como son lactococcina 972, lactococcina A y enterocina B.

Clase III.

Son bacteriocinas que no sufren modificaciones, con pesos moleculares mayores a 10 kDa y con mecanismos de acción bacteriolítico o no lítico (figura 4).

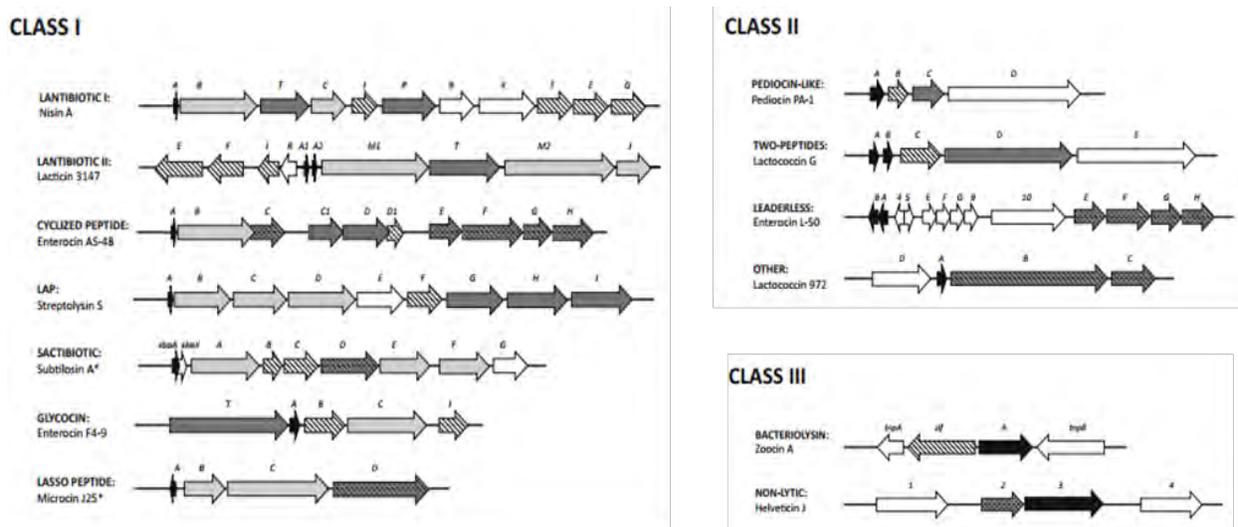


Figura 4. Representación esquemática de clusters de bacteriocinas. Negro, genes estructurales; Gris oscuro, genes estructurales; Gris claro, genes de maduración y modificación; Barras, genes de inmunidad; Blanco, otros (Tomado de Alvarez-Sieiro, 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1. *Enterococcus spp.*

El género *Enterococcus* se puede encontrar en diferentes alimentos y se cree que contribuye directamente al sabor del producto. Sin embargo, es el grupo más controversial de las BAL, ya que se han asociado algunas cepas con resistencia a antibióticos, factores de virulencia relevantes en humanos y su asociación con enfermedades transmitidas por alimentos, así como la producción de aminas biógenas. Las diferencias entre un enterococo patógeno y una cepa aparentemente segura para su uso en alimentos no son claras, sin embargo, se sabe que la incidencia de factores de virulencia y resistencia a antibióticos está muy relacionada con el nicho ecológico al que pertenecen (Moreno, *et al.*, 2006; Olvera-García, 2013; Kröckel, 2013).

El grupo de los enterococos engloba a aquellos microorganismos en forma de cocos Gram-positivos que se agrupan en parejas o en cadenas cortas, anaerobios facultativos, quimiorganototrofos, no esporulados, no móviles, no formadores de pigmentos, catalasa, reductasa y oxidasa negativos. Es un organismo homofermentativo con respecto a las hexosas y heterofermentativo para las pentosas y algunos otros sustratos y por tanto son llamados heterofermentativos facultativos (Salminen, 2004; Olvera-García, 2013).

Se ha sugerido el uso de las cepas de *Enterococcus faecium* en la industria cárnica, para controlar el crecimiento de microorganismos no deseables, como *Listeria spp.*, y no sólo sobre el producto sino también sobre materiales y superficies, debido a que este género produce bacteriocinas, llamadas enterocinas, así como peptidoglucano hidrolasas (Moreno y *et al.*, 2006; Kröckel, 2013).

Las enterocinas son pequeñas, estables a la temperatura, no lantibióticas y con un fuerte efecto antilisterial; como la mayoría de las bacteriocinas tienen como objetivo principal la membrana citoplasmática. Éstas forman poros en la

membrana celular, con lo que agotan el potencial transmembranal y/o gradiente de pH, dando como resultado la fuga de moléculas indispensables intracelularmente (Moreno, 2006).

Se han caracterizado peptidoglucano hidrolasas de algunas especies de este género, por ejemplo: García-Cano y col. en el 2014 identificaron una *N*-acetilglucosaminidasa de 54 kDa en una cepa de *Enterococcus faecalis* y una *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de 81 kDa en una cepa de *Enterococcus faecium*.

2.2. *Lactobacillus plantarum*

Las especies de BAL de *Lactobacillus plantarum* muestran una amplia flexibilidad y versatilidad, permitiendo crecer en diferentes nichos ecológicos como pueden ser vegetales, carnes, pescado, sustratos lácteos y el tracto intestinal humano. Es por eso que tiene aplicaciones en diferentes áreas tanto de la salud como de la industria de alimentos (Kröckel, 2013).

Lactobacillus plantarum es comúnmente usado en el proceso de fermentación industrial como cultivo iniciador debido a que dentro del grupo de las BAL son las más ácido tolerantes (Salminen, 2004). Se sabe que esta especie se ha usado en salchicha fermentada y salamis por décadas y algunas cepas son marcadas como probióticas por sus efectos benéficos en la salud, así como por su capacidad de producir bacteriocinas llamadas plantaricinas y peptidoglucano hidrolasas (Kröckel, 2013).

Numerosas cepas productoras de bacteriocinas han sido aisladas de diferentes alimentos y varias plantaricinas han sido descritas en la literatura, pero éstas solo han sido parcialmente caracterizadas, por lo que aún quedan muchas sin identificar. La mayoría de estas bacteriocinas tienen un peso molecular bajo, son catiónicas, termoestables y tienen muy buena actividad antimicrobiana a bajo pH (Todorov, 2015), su mecanismo de acción es parecido al ya descrito anteriormente para las enterocinas.

Messi (*et al.* 2001) aislaron más de cien bacterias ácido lácticas provenientes de salchicha italiana y fueron probadas para la producción de sustancias antimicrobianas, de las cuales solo el 6 % presentaron actividad contra microorganismos blancos cercanamente relacionados, otros estudios muestran que se aislaron 68 cepas presentes en aceitunas y 15 de ellos mostraron producir bacteriocinas las cuales presentaron actividad antagónica contra otras BAL así como contra bacterias deterioradoras y patógenas (Maldonado, 2002).

Contrario a las plantaricinas, muy pocas PGHs con actividad antimicrobiana han sido identificadas en cepas de *Lactobacillus plantarum*. Chapot-Chartier en el 2012, exploró el papel que jugaban las PGHs presentes en el genoma de este microorganismo. Se encontraron 12 PGHs codificadas en el genoma de las cuales solamente dos muestran tener un papel fisiológico importante durante las condiciones de crecimiento. Las PGHs identificadas fueron una *N*-acetilglucosaminidasa, que es la principal autolisina, y una D,L-endopeptidasa que es una pieza importante en la morfología de *Lactobacillus plantarum*. Quedaría pendiente evaluar la actividad antagónica contra diferentes microorganismos de estas dos enzimas.

La empaedora Murgati solicitó hace un tiempo al grupo de trabajo la identificación de manera tradicional de los microorganismos presentes en el salami que produce, en una etapa inicial de descomposición. Se manejaron dos presentaciones de salami, salami entero y salami rebanado, de las cuales se trabajó con la pasta y el exudado presente en el empaque, obteniéndose cuatro muestras: pasta de salami entero, pasta de salami rebanado, exudado de salami entero y exudado de salami rebanado (Palafox, 2015). Cabe resaltar que las muestras presentaban signos de decoloración, olor desagradable, presencia de exudado y abombamiento de empaques, como se muestran en las figuras 5 y 6.



Figura 5. Salami rebanado (Palafox, 2015)



Figura 6. Salami entero (Palafox, 2015)

Las pruebas microbiológicas se hicieron utilizando el medio de cultivo Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) para crecimiento de enterobacterias, *Streptococcus* agar base (KF) para el crecimiento de *Enterococcus*, agar nutritivo para bacterias mesófilas aerobias y Man Rugosa Shape (MRS) para bacterias ácido lácticas.

Se aislaron en total 22 colonias representativas, donde en el medio MRS fue el que presentó mayor número de UFC/g muestra, lo que indicaba una gran cantidad de bacterias ácido lácticas en el salami, las cuales además presentaban halos translúcidos alrededor que fueron de gran interés, indicando la posible producción de compuestos antimicrobianos, dando pie a este trabajo.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Palafox (2015) aisló diferentes microorganismos del salami Murgati, donde las BAL prevalecieron sobre otro tipo de bacterias, lo cual probablemente se debe a la actividad antagónica que ejercen este tipo de género. Sin embargo, no se identificaron las BAL con actividad antagónica, ni la naturaleza de dicha actividad, que probablemente sea de origen proteínico como las peptidoglucano hidrolasas y bacteriocinas.

4. HIPÓTESIS

Las bacterias aisladas en salami que presentan halos translúcidos corresponderán a BAL con carácter GRAS y presentarán actividad antimicrobiana de origen proteínico.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar si los microorganismos aislados del salami corresponden a bacterias ácido lácticas para determinar la naturaleza de la actividad antimicrobiana.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar molecularmente las bacterias ácido lácticas aisladas del salami por medio de la amplificación del gen 16S rDNA.
- Identificar si las cepas de estudio presentan genes específicos que codifican para bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas.
- Confirmar la presencia de actividad antimicrobiana mediante pruebas antagónicas contra un grupo diverso de microorganismos, e identificar si es de origen proteínico y si presenta actividad hacia sustratos específicos la actividad de peptidoglucano hidrolasas.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

✚ Esquema general de trabajo

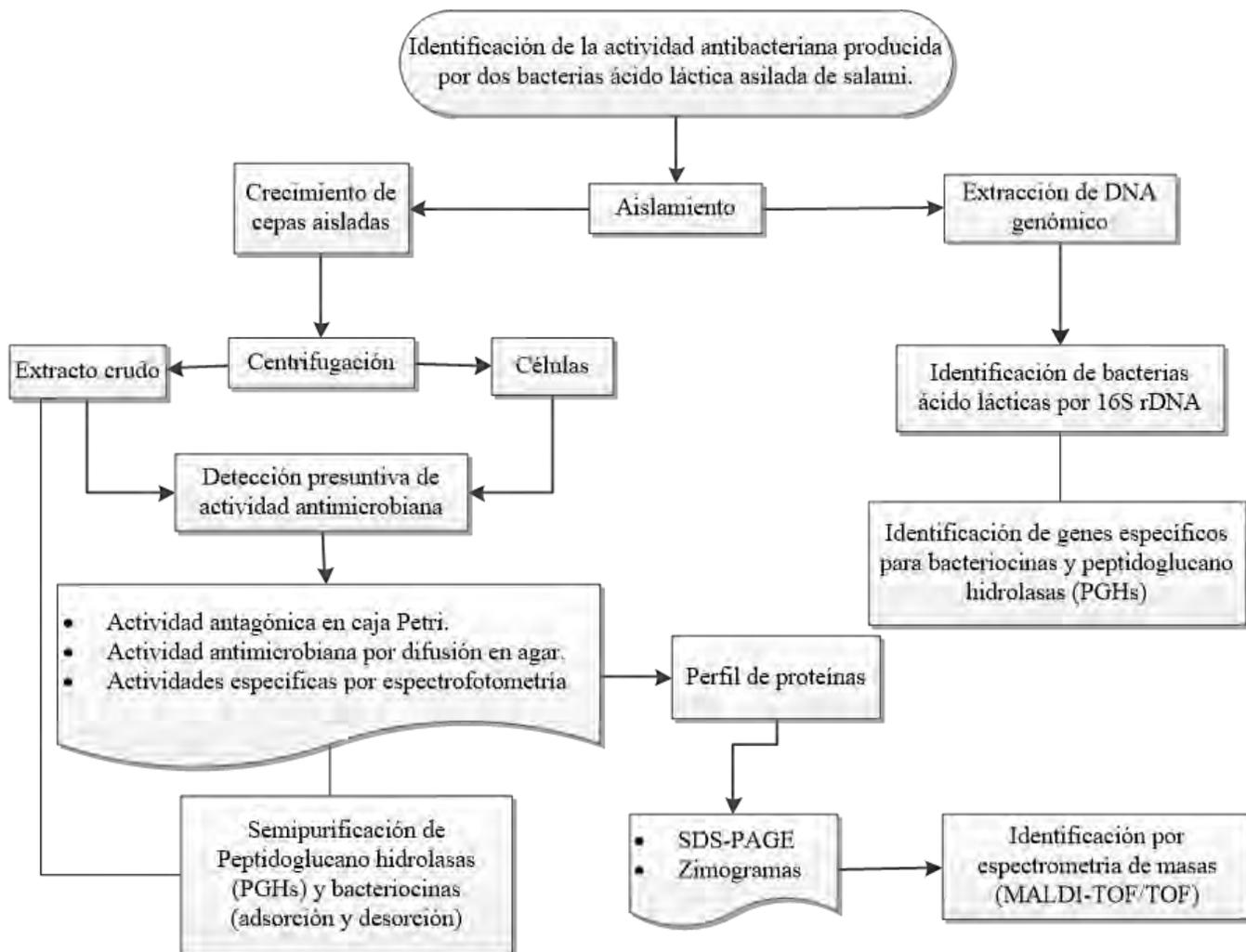


Figura 7. Esquema general de trabajo

6.1. Identificación de las cepas con actividad antimicrobiana.

6.1.1. Crecimiento de cepas aisladas

Se seleccionaron nueve colonias aisladas en el agar Man Rugosa Shape (MRS) (Difco, E.U.A) que presentaron halo translúcido alrededor de ellas y que además tenían características morfológicas diferentes entre ellas. Estas colonias se picaron con palillos estériles y fueron cultivadas en Caldo Glucosa Caseína (CGB) (peptona biotriptasa 49.8 %, glucosa 25 %, extracto de levadura 12.45 %, citrato de amonio 4.98 %, fosfato disódico 4.98 %, sulfato de magnesio 0.24 %, sulfato de manganeso 0.124 %, Tween 80 2.49 %; pH 7.0) a 29°C durante 12 h en condiciones estáticas.

6.1.2. Obtención del extracto crudo

Cada una de las muestras se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C (Eppendorf 5810R, Hamburgo, Alemania), obteniendo sobrenadantes libres de células a los cuales se les ajustó el pH a 7.0 (potenciómetro Orion Versa Star, E.U.A). Posteriormente se filtraron a través de membranas estériles con tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore, Darmstad, Alemania). El filtrado obtenido se denominó extracto crudo.

6.1.3. Extracción de DNA

De los cultivos crecidos de 12 h se tomaron alícuotas de 1.5 mL las cuales se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min (Eppendorf 5810R, Hamburgo, Alemania) para obtener el pellet que contiene el DNA. Se realizó un lavado con 1 mL de sacarosa 10.3 %, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se le adicionó al pellet 1 mL de amortiguador SET (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 50 mM y sacarosa 20 %), 100 µL de lisozima (10 mg/mL) para ayudar a romper la pared celular y 10 µL de RNAsa (10 mg/mL), se mezcló y se incubó a 37°C durante 1 h en agitación suave (Incubadora orbital Prendo INO 650V-9, Puebla, México). Se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 µL de sacarosa 10.3 %. Se adicionaron 5 µL de EDTA 0.5 M, 80µL de SDS 10 % y se mezclaron



perfectamente, se añadieron 300 μ L de NaCl 5 M y se incubó a 4°C durante 30 min. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL limpio y estéril. Posteriormente se precipitó el DNA con 800 μ L de isopropanol y se incubó a 4°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó dos veces el pellet con 800 μ L de etanol 70 % y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Una vez terminados los lavados se dejó a temperatura ambiente hasta notar ausencia de etanol. Se suspendió el DNA obtenido en 50 μ L de amortiguador Tris 50 mM, pH 8.0 disuelto en agua grado biología molecular, se calentó a 50°C durante 15 min y se evaluó la integridad del DNA en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001 %). La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 40 min, utilizando como marcador el GeneRule 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). La visualización del gel se realizó en un Molecular Image® Gel Doc™ XR+ Imaging System (Bio Rad). La concentración se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro para Microplacas (Epoch Biotek modelo Synergy HT, Vermont, E.U.A) (Hernández, 2017).

6.1.4. Amplificación del gen de referencia 16S del ADNr

El DNA genómico extraído se utilizó para llevar a cabo la reacción de la polimerasa (PCR) para la amplificación del rDNA 16S con la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Thermo Scientific) utilizando amortiguador de la enzima 10X, dNTPs 10 μ M, agua grado biología molecular y los cebadores que se observan en la tabla 2, bajo las condiciones que se enlistan en la tabla 3. Las condiciones se programaron en un termociclador (Eppendorf Mastercycler, Hamburgo, Alemania) (García-Cano *et al.*, 2014).

Tabla 2. Cebadores para la amplificación del gen de referencia 16S del ADNr.

Cebadores	Secuencia 5'- 3'	T de alineación (Tm)
Fd1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	40°C
Rd1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC	40°C

Tabla 3. Condiciones de la reacción de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	0.5 min	35
Alineación	40°C	0.5 min	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	5 min	1

Para verificar que se obtuvieron los amplicones esperados de 1,500 pb se realizó un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001 %), se cortó la banda de interés y finalmente el producto obtenido de la reacción fue purificado utilizando un kit comercial (GeneJET Gel Extraction kit, Thermo Scientific).

6.1.5. Secuenciación

Los productos de PCR puros fueron enviados para su secuenciación a los laboratorios de MacroGen Inc (Seúl, Corea del Sur). Posteriormente cada una de las secuencias fue sometida a un alineamiento múltiple utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleótidos del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

6.2. Determinación de la actividad antimicrobiana

6.2.1. Actividad antagónica en caja Petri

Cada uno de los microorganismos aislados se inoculó como una línea al centro de la caja Petri conteniendo el medio agar Soya Tripticaseína (TSB) (Difco, E.U.A). Las cajas inoculadas se incubaron a 29°C durante 24 h. Una vez crecidas las cepas se estriaron con las cepas de los microorganismos prueba (figura 8) (Guzman-Trampe, 2012). Los microorganismos prueba empleados fueron *Salmonella thyphimurium* ATCC 2753, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria innocua* CFQ-B-232, *Weissella viridiscens* UAM-MGS, *Leuconostoc*

mesenteroides (Dra. Gloria Díaz, cepario de la F.Q., UNAM) y *Lactobacillus sakei* UAM-MGJPI.

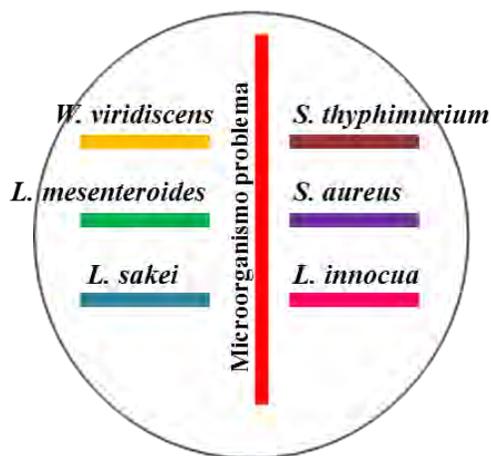


Figura 8. Esquema de las pruebas antagonicas en caja Petri. Se muestra el microorganismo a evaluar en el centro de la caja. Se estriaron las cepas de microorganismos blanco a cada lado del microorganismo a evaluar.

6.2.2. Actividad antimicrobiana por difusión en agar

Se determinó la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas aisladas en contra de bacterias patógenas y bacterias deteriorantes (*S. thyphimurium* ATCC 2753, *S. aureus* ATCC 6538, *L. innocua* CFQ-B-232, *W. viridiscens* UAM-MGS, *L. mesenteroides* (Dra. Gloria Díaz, cepario de la F.Q., UNAM) y *L. sakei* UAM-MGJPI). En cajas Petri se colocaron 10 mL de agar Brain Heart Infusion (BHI, Difco, E.U.A) al 1.5% (m/v) y se dejó solidificar para posteriormente colocar sobre esta primera capa 20 mL de agar BHI al 0.8 % (m/v) con 2 μ L de células de los microorganismos seleccionados, esto para las bacterias patógenas y para las bacterias deterioradoras se siguió el mismo procedimiento utilizando agar CGB. Se hicieron pozos sobre la segunda capa de agar y en cada pozo se agregaron 50 μ L de las muestras obtenidas con actividad antibacteriana. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h (Incubadora orbital Prendo INO 650V-9, Puebla, México). Los halos de inhibición de los microorganismos se midieron con ayuda de un vernier y se calculó la actividad específica en mm/mg de proteína (Contreras, 2013).

6.3. Obtención de las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) y bacteriocinas.

6.3.1. Ultrafiltración de la PGH

Los extractos crudos obtenidos se sometieron a ultrafiltración con una membrana de tamaño de corte de 30 kDa (Amicon® Millipore, Darmstadt, Alemania). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.3.2. Obtención del péptido antimicrobiano (adsorción-desorción)

Los cultivos de 18 h de las cepas aisladas fueron sometidos a un tratamiento térmico a 70°C durante 30 min (Boekel Scientific, Pennsylvania, E.U.A). Se ajustó el pH del cultivo a 5.0 con una solución 10 M de NaOH y se mantuvo en agitación moderada durante 24 h a 4 °C para permitir la adsorción del compuesto antimicrobiano a la superficie celular bacteriana. Después, los cultivos se centrifugaron a 3,100 rpm durante 20 min a 4°C y se recuperó el pellet, se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos (5 mM fosfato de sodio, pH 6.5). Posteriormente, las células se resuspendieron (5% del volumen original) en una solución 100 mM de NaCl pH 1.0 (ajustada con ácido fosfórico al 5 %); lo que favoreció la desorción del compuesto antimicrobiano desde la membrana celular de las bacterias hacia el medio. Las células se mantuvieron en agitación a 4°C durante 4 h y posteriormente se sometieron a centrifugación a 3,100 rpm durante 20 min a 4°C para descartar células y retener el sobrenadante con la bacteriocina, se neutralizó el pH del sobrenadante y se dializó empleando membranas de celulosa (Spectra Por7® Arizona, E.U.A) con un tamaño de poro de 1 kDa hasta eliminar las sales presentes y se filtró a través de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45 µm. Posteriormente, el sobrenadante se liofilizó (Labconco, Kansas, E.U.A). Los liofilizados se resuspendieron en 300 µL de amortiguador (Tris-HCl 100 mM pH 8.0). Finalmente se almacenaron a -20 °C (Olvera-García, 2013).

6.3.3. Perfil de proteínas y zimogramas para PGHs y bacteriocinas

El peso molecular de las proteínas de interés se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida co-polimerizada en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Se prepararon SDS-PAGE Tris-glicina al 10 % con los reactivos necesarios (Bis-acrilamida 30 %, Tris-HCl 2 M, pH 8.8, SDS 10 %, H₂O, TEMED y APS 10 %) para las PGHs y Tris-tricina al 10 % con los reactivos necesarios (Bis-acrilamida Tris-tricina, buffer de gel, H₂O, glicerol 80 %, TEMED, APS 10 %) para bacteriocinas (Olvera-García, 2013). Se tomaron 35 µL de la muestra a evaluar y se les adicionaron 15 µL de amortiguador de carga (50 mM de Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 2.5 % glicerol, 0.5 % β-mercaptoetanol y 0.5 % de azul de bromofenol). Los geles se colocaron en un cámara de electroforesis de proteínas (Mini-Protean 3Cell, Bio-Rad, California, E.U.A). El gel Tris-glicina se corrió a 80 V durante 30 min y 120 V durante 1.5 h y el gel Tris-tricina se corrió a 80 V durante 30 min y 120 V durante 4.5 h a 4°C. Después de la electroforesis, el gel se lavó con agua desionizada y se tiñó con azul de Coomassie (0.1 % azul de Coomassie G-250, 45 % metanol, 10 % ácido acético glacial, 80 % agua desionizada (v/v) y se destiñó con 10% metanol, 10% ácido acético glacial y 80 % agua (v/v). El peso molecular de las bandas de proteína se determinó por la comparación con un marcador de alto peso molecular (Bio-Rad) y un polipéptido (Bio-Rad) para PGHs y bacteriocinas, respectivamente.

Para la elaboración del zimograma, se prepararon geles SDS al 10 % de poliacrilamida co-polimerizada con 0.2 % de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, E.U.A) como sustrato, posteriormente, las células se resuspendieron con los reactivos necesarios para la elaboración de los geles (Tris-glicina y Tris-tricina). Una vez transcurrida la electroforesis, el gel se lavó con agua desionizada y se incubó a 37°C con amortiguador de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 con Tritón X-100 1 %) durante 12 h. Finalmente el gel se tiñó con azul de metileno (0.01 % de KOH y 0.1 % de azul de metileno) durante 20 min y se destiñó con agua destilada (García-Cano, 2013).

6.3.4. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976; Bio-Rad Protein Assay) a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (Epoch Biotek modelo Synergy HT, Vermont, E.U.A). Se colocaron 160 μ L de la dilución y 40 μ L de reactivo de Bradford concentrado en un pozo de la microplaca y se homogenizó. Se incubó 5 min a temperatura ambiente para posteriormente hacer las mediciones. La curva patrón se realizó con albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich).

6.4. Clasificación de la actividad antimicrobiana de PGHs por especificidad de sustrato

6.4.1. Determinación de la actividad N-acetilglucosaminidasa

La determinación de *N*-acetilglucosaminidasa se realizó siguiendo el protocolo de Sigma-Aldrich, utilizando como sustrato al 4-nitrofenil *N*-acetil- β -D-glucosaminida. Se utilizó una microplaca de 96 micropozos y para cada prueba se adicionaron 80 μ L de amortiguador de citrato de sodio pH 4.8 (80 mM), 10 μ L de una solución de 4-nitrofenil *N*-acetil- β -D-glucosaminida (NP-GlcNAc, Sigma-Aldrich) (1 mg/mL) y 10 μ L de la muestra. El blanco consistió en 10 μ L del sustrato y 90 μ L del amortiguador. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 20 min y se detuvo adicionando 100 μ L de carbonato de sodio (140 mM). Se determinó la absorbancia en un lector de microplacas (Epoch Biotek modelo Synergy HT, Vermont, E.U.A) a 405 nm (García-Cano, 2015).

6.4.2. Determinación de la actividad de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa

La actividad de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, se determinó siguiendo el protocolo descrito por García-Cano (2015). Se utilizó una microplaca de 96 pozos, para cada prueba se colocan 80 μ L de amortiguador Tris-HCl pH 8.0 (50 mM) con 10 μ L del sustrato L-alanina-*p*-nitroanilida hidrocloreuro (1 mg/mL) y 10 μ L de muestra de interés. La reacción se incubó a 37°C por 10 min y se determina la

absorbancia en un lector de microplacas (Epoch Biotek modelo Synergy HT, Vermont, E.U.A) a 405 nm.

6.4.3. Determinación de la actividad de endopeptidasa

La actividad de endopeptidasa se determinó mediante el método de Cd²⁺-ninhidrina (Doi *et al*, 1981). En un tubo se colocaron 50 µL de la muestra de enzima y se adicionaron 15 µL de soluciones preparadas de Leu-Gly-Gly y Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (Sigma-Aldrich) en concentraciones 20 mM en HEPES (Sigma-Aldrich) pH 7.0. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 150 µL con amortiguador de trabajo y se incubó a 37°C por 1 h. Posteriormente se adicionaron 150 µL del reactivo Cd-ninhidrina (0.8 g ninhidrina, 80 mL de etanol 99.5 %, 10 mL de ácido acético y 1 g de CdCl₂) y nuevamente se incubó la mezcla a 85°C por 5 min. Después se centrifugó cada tubo para evitar la turbidez que pudiera interferir en la medición y se determinó la liberación del grupo amino. El ensayo se realizó transfiriendo 200 µL de cada tubo en una microplaca con 96 pozos, se utilizó el lector de microplacas (Epoch Biotek modelo Synergy HT, Vermont, E.U.A) y se realizaron las lecturas a 507 nm. El control positivo fue la lisostafina (20 µg/mL) y como control negativo se utilizó amortiguador de trabajo; ambos controles fueron tratados en las mismas condiciones del ensayo (Valenzuela, 2012).

6.4.4. Determinación de la actividad de N-acetilmuramidasa

Para llevar a cabo la determinación de la actividad de N-acetilmuramidasa se utilizaron 75 µL de peptidoglucano (siguiente apartado) tratado enzimáticamente y diluido en agua (4 mg/mL), 25 µL de la muestra y 400 µL de agua. La reacción se dejó a 37°C por 1 h a 70 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó 1 min a 14,000 rpm para eliminar el peptidoglucano insoluble. De cada tubo se tomaron 400 µL que se aforaron con 100 µL de agua. Cada muestra se colocó en un tubo de vidrio con rosca de un volumen de 15 mL, a cada tubo se le adicionaron 3 mL de H₂SO₄ concentrado y se calentó a ebullición por 10 min. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron a cada tubo 50 µL de CuSO₄ (4 %) y 100 µL de pPp (p-fenilfenol, Sigma-Aldrich) (1.5 % en etanol al 96 %). La reacción se incubó por 30 min a temperatura ambiente y la actividad se cuantificó a 570nm (Taylor, 1995).

6.4.5. Extracción de peptidoglucano de *M. lysodeikticus*

Se obtuvo un cultivo bacteriano de *M. lysodeikticus* en medio BHI incubado 12 h a 37°C y 250 rpm y se centrifugó a 8500 rpm por 15 min a 4°C para cosechar las células. Las células fueron lavadas con agua estéril (1/10, p/v) hasta la obtención de un precipitado blanco, el cual se disolvió en ácido tricloroacético (TCA) al 10 % y se colocó en ebullición por 60 min, una vez concluido este tiempo la solución se centrifugó a 8,500 rpm por 20 min a 4°C.

El pellet se resuspendió e incubó con un amortiguador de acetatos (ácido acético 0.5 M y acetato de sodio 0.2 M pH 4.5), cloroformo y metanol en una relación 4:5:10, pH 4.6 toda la noche y después se centrifugó a 8,500 rpm por 10 min a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 con 4000 U de tripsina (Sigma-Adrich) y se incubó en baño de agua a 37°C y 140 rpm por 12 h. U

Una vez transcurrido el tiempo la solución se centrifugó a 8,500 rpm por 20 min a 4°C. El sedimento se lavó 4 veces con agua estéril, se liofilizó y se almacenó a -20°C (Tian, *et al.*, 2015).

6.5. Amplificación de genes específicos para PGHs y bacteriocinas

La amplificación de los genes específicos se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando las enzimas que se muestran en la tabla 4. Las condiciones se programaron en un termociclador (Eppendorf Mastercycler, Hamburgo, Alemania). En la tabla 5 se muestran los diferentes tipos de cebadores diseñados con base a secuencias de dichos genes presentes en la base de datos para obtener las secuencias de interés. Para verificar que se obtuvieron los amplicones esperados se realizó un gel de agarosa al 0.8 y 2 %, para los genes de PGHs y bacteriocinas respectivamente, teñidos con bromuro de etidio (Bio-Rad 0.001 %). Los productos amplificados se purificaron y se enviaron para su secuenciación a MacroGen Inc (Seúl, Corea del Sur).

Tabla 4. DNA polimerasas y condiciones de la reacción de PCR

Gen	Enzima	Condiciones		
		Paso	Temperatura	Tiempo
entA	<i>Pfu</i>	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
		Desnaturalización	95°C	0.5 min
		Alineación	55°C	0.5 min
		Extensión	72°C	2 min
		Extensión final	72°C	5 min
p54	<i>Pfu</i>	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
		Desnaturalización	95°C	0.5 min
		Alineación	59°C	1 min
		Extensión	72°C	1.5 min
		Extensión final	72°C	10 min
bacLbp	PhusionHotStar	Desnaturalización inicial	98°C	2 min
		Desnaturalización	98°C	0.5 min
		Alineación	48°C	0.5 min
		Extensión	72°C	1.15 min
		Extensión final	72°C	10 min
lbP90	Dream Taq	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
		Desnaturalización	95°C	0.5 min
		Alineación	45°C	0.5 min
		Extensión	72°C	2.5 min
		Extensión final	72°C	10 min

Tabla 5. Cebadores para la amplificación de genes

Gen	Cebadores	Secuencia	Tm	Tamaño esperado
entA	<i>entAf</i> (5'-3')	GGCAGACACAACCTTATCTATGGGG	57.0 °C	171 pb
	<i>entAr</i> (3'-5')	GCGTCCAGGGAAGTGCTAA	53.1 °C	
p54	<i>P54f</i> (5'-3')	GCCGGATCCGAAAAAGAGTTTAATATCAGC	60.3°C	1500 pb
	<i>P54r</i> (3'-5')	GAGCTCGAGCATGCTGACAGC	58.3°C	
bacLbp	<i>BacLbpf</i> (5'-3')	GGATGACTGTGAACAAAATGAT	49.2°C	174 pb
	<i>BacLbpr</i> (3'-5')	ATTATAATCCCTTGAACCACC	48.5°C	
lbP90	<i>Lbp90f</i> (5'-3')	GCGTTTAAATCACAAAATCCA	46.5°C	2583 pb
	<i>Lbp90r</i> (3'-5')	GCCAATCTTAGCAACGTA	45.8°C	



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación de cepas con actividad antimicrobiana

7.1.1. Crecimiento de colonias seleccionadas

Se seleccionaron nueve colonias de las bacterias ácido lácticas que fueron aisladas del salami, que presentaron dos tipos diferentes de morfología y halos de inhibición alrededor de ellas. En la Figura 9 se muestran las colonias seleccionadas y que fueron cultivadas en medio MRS.

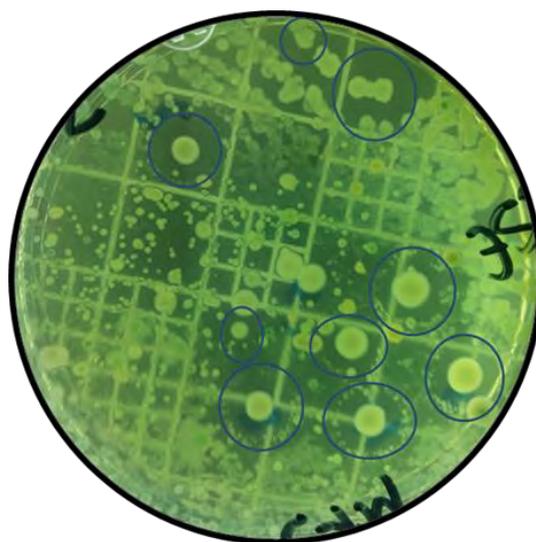


Figura 9. Colonias que presentaron halo de inhibición alrededor de ellas en medio MRS-Verde de bromocresol

En la tabla 6 se describen las características morfológicas de las cepas que se hicieron crecer en medio líquido MRS.

Tabla 6. Características de las colonias aisladas.

Características
Colonias pequeñas, circulares de color verde intenso
Colonias grandes, circulares con las orillas blancas de color verde claro

7.1.2. Extracción de DNA

Estas colonias fueron sembradas en caldo MRS para su enriquecimiento y extracción de DNA. En la figura 10 se observa el DNA extraído, ya que solo hay una banda definida, la cual se encuentra por arriba de los 10 kb.

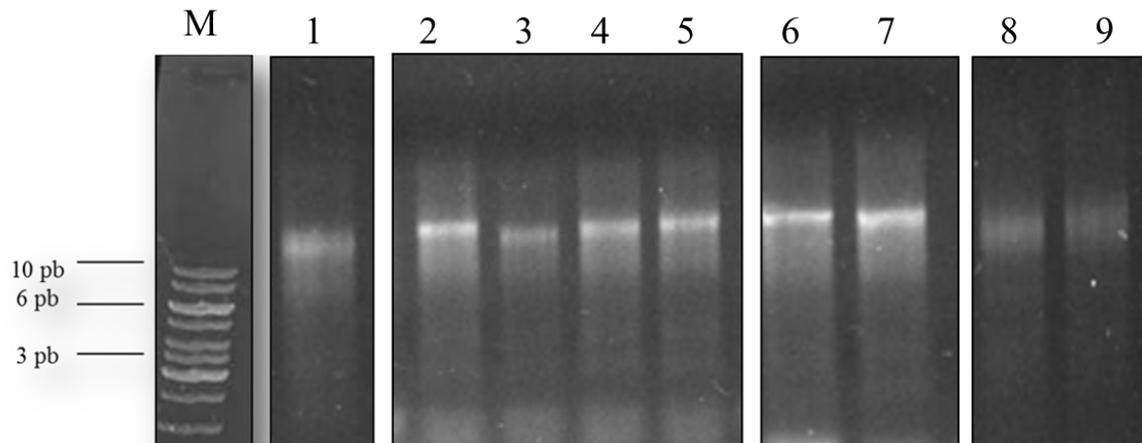


Figura 10. Integridad de DNA. Carril M, marcador de peso molecular; carril 1, DNA extraído de la colonia 1; carril 2, DNA extraído de la colonia 2; carril 3, DNA extraído de la colonia 3; carril 4, DNA extraído de la colonia 4; carril 5, DNA extraído de la colonia 5; carril 6, DNA extraído de la colonia 6; carril 7, DNA extraído de la colonia 7; carril 8, DNA extraído de la colonia 8; carril 9, DNA extraído de la colonia 9.

Se determinó la concentración de DNA a una relación de $Abs_{260/280nm}$, considerando que para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se necesitan de 10 a 200 ng/ μ L se deben obtener al menos una concentración de 5 ng/ μ L de DNA de cada muestra (Cornejo *et al.*, 2014), por lo que nuestras concentraciones son aceptables para llevar a cabo la reacción. Una vez determinada la calidad y la concentración del DNA extraído se realizó una amplificación de la región del 16S del rDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

El tamaño esperado del amplicón era de alrededor de 1,500 pb. En la figura 11 se muestran los amplicones obtenidos, los cuales se pueden observar como una banda intensa alrededor de los 1,500 pb.

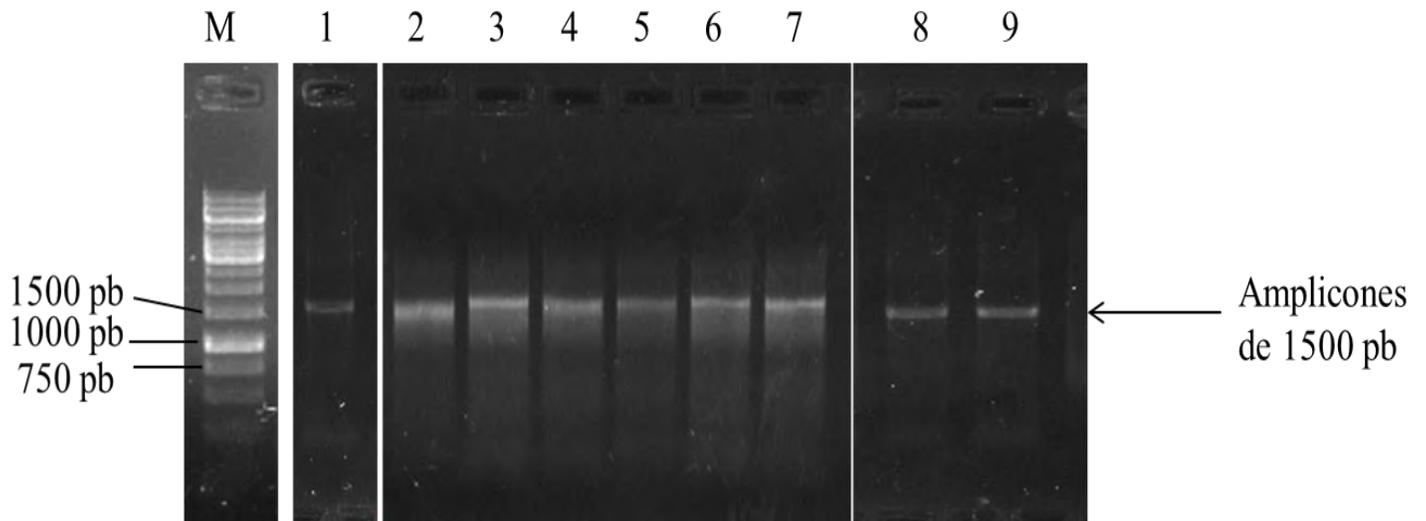


Figura 11. Amplicones del 16S del rDNA con peso molecular de 1,500 pb. Carril M, marcador de peso molecular; carriles del 1 al 9, amplicones de las colonias 9 colonias, respectivamente.

Una vez obtenidos los amplicones de las dos muestras se cortó la banda del gel y se realizó la purificación de cada uno de ellos para su envío y posterior secuenciación, comparación e identificación en la base de datos.

En la tabla 7 se muestran los nombres de los microorganismos identificados y el porcentaje de similitud de la secuencia problema con la secuencia de referencia que se encuentra en la base de datos. Una vez realizado el alineamiento se debe verificar que sea significativo y en la tabla se indica el valor E-value (Expect) que representa la probabilidad de que el resultado de alineamiento se haya dado al azar; este valor depende de la base de datos empleada y de la longitud de la secuencia (Camacho, 2014).

Tabla 7. Identificación de las cepas problema.

Clave de la cepa	Nombre	Cepa	Similitud	E-value
1	MRS SE 3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99 %	E-170
2	MRS ESR 3	<i>Lactobacillus nudensis</i>	100 %	0.0
3	MRS ESE 5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98 %	E-110
4	MRS SR 3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98 %	E-105
5	MRS ESR 32	<i>Enterococcus faecium</i>	100 %	0.0
6	MRS ESR 5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100 %	0.0
7	MRS ESE 3	<i>Enterococcus faecium</i>	99 %	3E-178
8	MRS SR 5	<i>Enterococcus faecium</i>	99 %	E-134
9	MRS ESR 31	<i>Enterococcus faecium</i>	99 %	9E-80

Se puede observar que los microorganismos predominantes son *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* con porcentajes de similitud entre 98-100 %.

7.2. Determinación de la actividad antimicrobiana

Al tener solo dos tipos de microorganismos, se decidió analizar la actividad antimicrobiana de todas las cepas, mediante zimogramas al 10 % de poliácridamida empleando *M. lysodeikticus* al 0.2 %, como sustrato.

Se observaron bandas de actividad inhibitoria producidas por casi todas las cepas con pesos moleculares en dos tamaños diferentes, de las cuales solo fueron seleccionadas dos cepas para su estudio que presentaron mayor actividad en gel, que en la figura 12 se muestran dentro de un cuadro de color rojo.

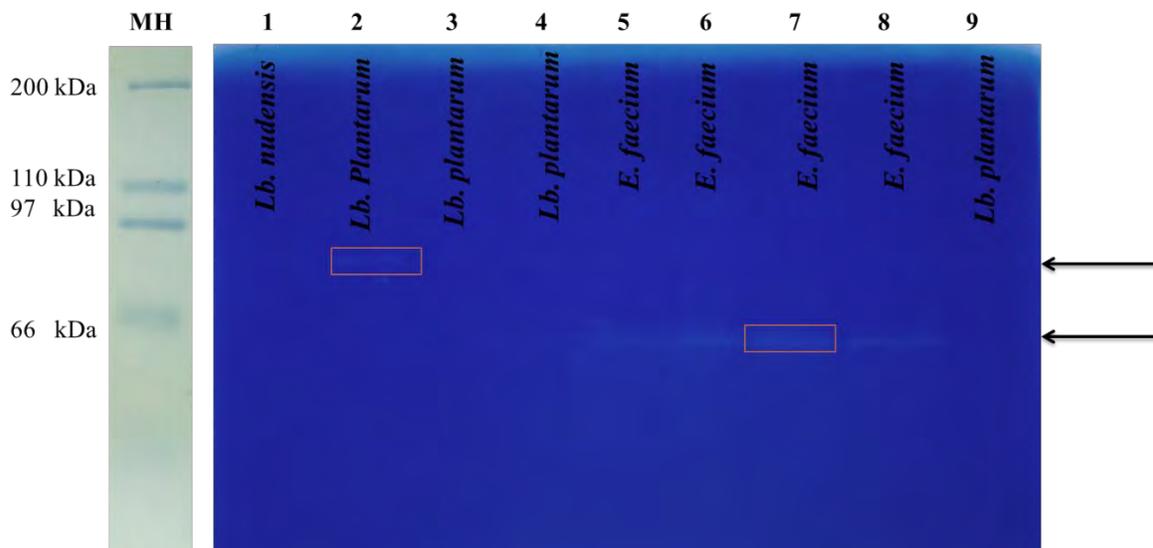


Figura 12. Actividad antimicrobiana de cepas problema en zimograma al 10 % de poliacrilamida empleando *M. lysodeikticus* al 0.2 % en condiciones desnaturalizantes.

En la tabla 8 se muestran las cepas que obtuvieron mayor actividad en zimograma y que fueron seleccionadas para estudio.

Tabla 8. Cepas seleccionadas para estudio.

Clave de la cepa	Cepa
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
5	<i>Enterococcus faecium</i>

Para la identificación de la naturaleza antibacteriana se realizaron diferentes tipos de pruebas en ambas cepas.

7.2.1. Actividad antagónica en caja Petri.

Se realizaron pruebas de inhibición presuntivas en agar TSB de cada una de las cepas de estudio contra diferentes microorganismos blanco.

En las figuras 13 y 14 se observan las placas de agar TSB de las cepas de estudio *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*, enumeradas como 4 y 5 respectivamente, donde apreciamos la estria vertical en el centro, del lado izquierdo se indican las bacterias deterioradoras y del lado derecho se indican los patógenos. Se observa el efecto antagónico positivo al ver que se reduce el crecimiento en el astriado de los microorganismos tanto patógenos y deterioradoras al estar mas cerca de la cepa de estudio.

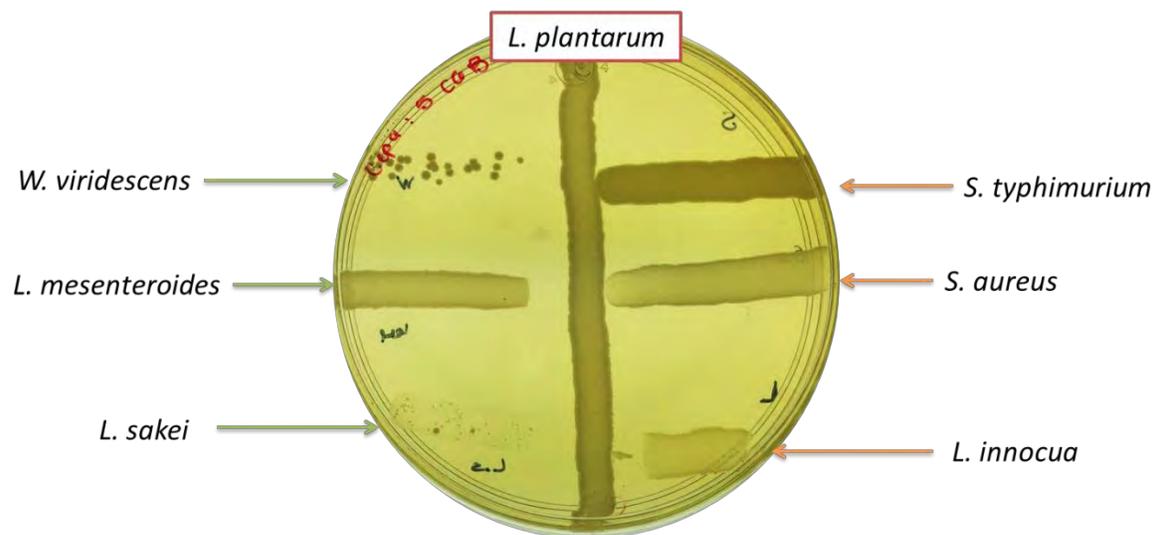


Figura 13. Actividad antagónica de *L. plantarum* en agar TSB contra diferentes microorganismos.

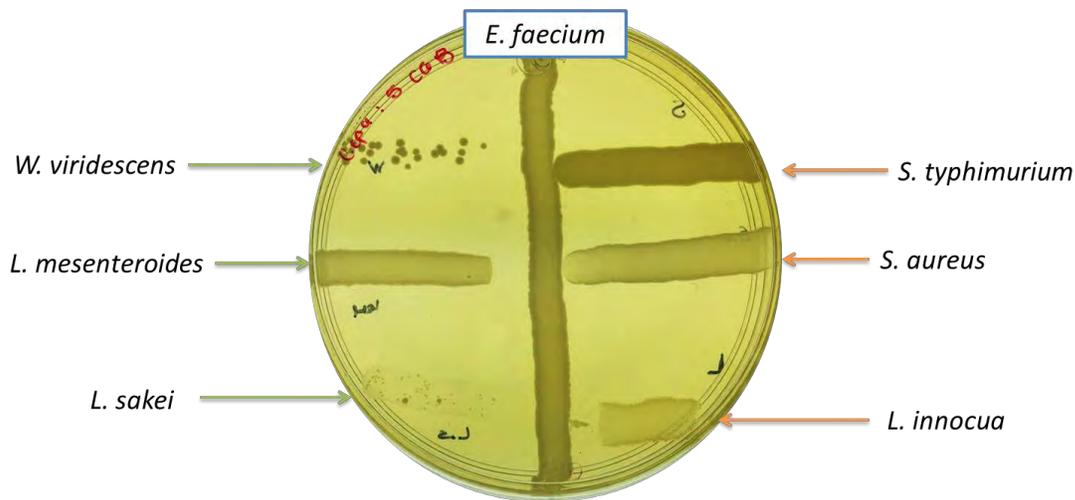


Figura 14. Actividad antagónica de *E. faecium* en agar TSB contra diferentes microorganismos.

En la tabla 9 podemos observar que ambos microorganismos aislados presentan actividad antagónica contra un microorganismo, que es *L. innocua*, relacionado con uno de los principales patógenos de alimentos, y contra los tres microorganismos deterioradores *L. mesenteroides*, *L. sakei* y *W. viridescens*.

Tabla 9. Actividad antagónica de las cepas aisladas de salami.

Número	Cepa	Microorganismos blanco					
		S. <i>typhimurium</i>	S <i>aureus</i>	L. <i>innocua</i>	L. <i>mesenteroides</i>	L. <i>sakei</i>	W. <i>viridescens</i>
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+	+	+	+
5	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	+	+	+	+

Se eligió el medio TSB debido a que es un medio de enriquecimiento utilizado para el cultivo de microorganismos aerobios no exigentes. El digerido enzimático de caseína y la harina de soya presentes proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas complejas, mientras que el cloruro de sodio sirve para

mantener el equilibrio osmótico y el fosfato de potasio dibásico actúa como amortiguador para controlar el pH, este medio cuenta con menor concentración de glucosa, no contiene un surfactante en su formulación y el aporte de sales es bajo lo que refleja un descenso leve del pH (Contreras, 2013). Esto nos indica que la actividad antagonista observada no es debido al pH del medio sino a compuestos producidos por estas cepas durante la fermentación donde se reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y como resultado se obtienen una gama de metabolitos con bajo y alto peso molecular con actividad antimicrobiana (Salminen, 2004).

7.2.2. Actividad antimicrobiana por difusión en agar

Por otra parte se realizaron pruebas de inhibición de crecimiento en difusión en agar de las cepas aisladas empleando el extracto crudo libre de células, contra los mismos microorganismos blanco y se determinó la actividad específica.

En la figura 15 se observan los halos de inhibición producidos por las cepas de *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum*, que se midieron para determinar la actividad específica de las fracciones empleadas. Estos se pueden apreciar como un halo translúcido alrededor de los pozos donde se adicionaron los extractos crudos.

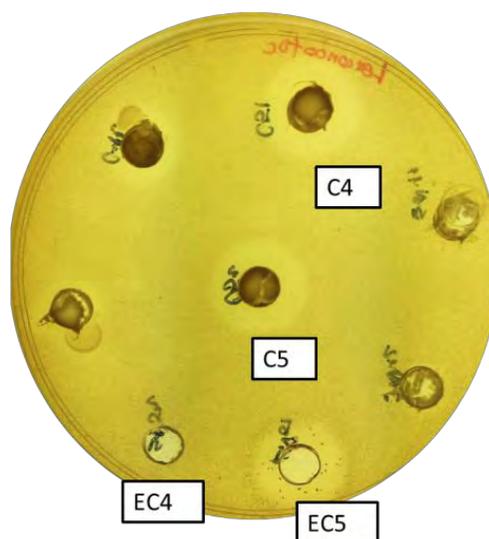


Figura 15. Actividad antimicrobiana por difusión en agar de extractos crudos de *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* contra *Listeria innocua*.

En la tabla 10 se observan los resultados de la actividad específica (mm/mg) de las cepas aisladas contra los diferentes microorganismos. En la figura 16 se observa que la mayor actividad inhibitoria de ambas cepas es contra tres microorganismos patógenos (*L. innocua*, *S. aureus* y *S. typhimurium*). Comparando estos resultados con la literatura se ha encontrado que el género *Enterococcus* tiene la capacidad de producir bacteriocinas conocidas de forma general como enterocinas, estos péptidos exhiben actividad antimicrobiana frente a especies Gram-positivas. Las enterocinas de clase II son las más frecuentemente halladas en cepas de enterococos y se dividen en 2 subclases: las enterocinas que se sintetizan sin péptido líder y las relacionadas con la pediocina con un fuerte efecto antilisterial (Reyes, 2015).

Algunos autores han determinado que diferentes bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* poseen efecto antagónico ante organismos Gram-positivos, se ha reportado que la plantaricina F, producida por *Lactobacillus plantarum* B F001, es efectiva frente a *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella* y *Pseudomonas* (Suarez, 2008).

Tabla 10. Actividad específica contra diferentes microorganismos

Cepa	Fracción	Espectro antibacteriano (mm/mg)				
		Microorganismos blanco				
		S.	S.	L.	L.	W.
		<i>typhimurium</i>	<i>aureus</i>	<i>innocua</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>viridescens</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Extracto crudo	73.20	180.18	180.1	72.07	36.03
<i>Enterococcus faecium</i>	Extracto crudo	54.11	353.0	302.57	151.28	100.85

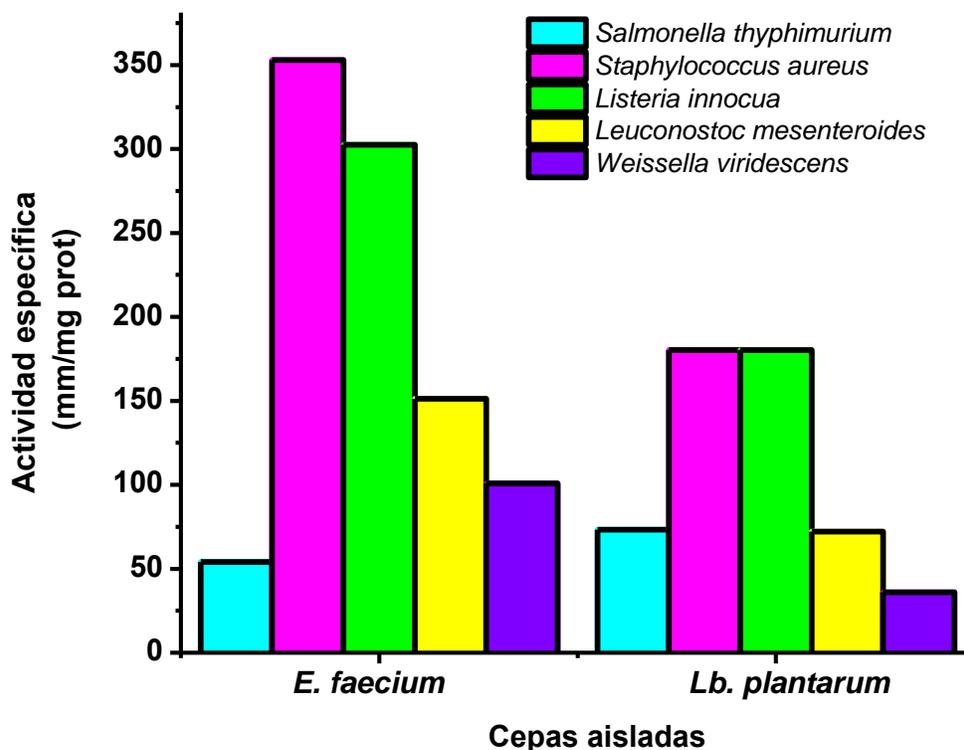


Figura 16. Actividad específica (mm/mg proteína) de extractos de *E. faecium* y *L. plantarum* contra diferentes microorganismos patógenos y deteriorantes.

Se observa que *S. typhimurium* fue el microorganismo menos inhibido por ambas cepas utilizadas, esto puede ser debido a que es un microorganismo Gram-negativo y la composición de su pared celular es diferente a los microorganismos Gram positivos, ya que además de tener una pared de peptidoglucano, tiene una membrana interna y una membrana externa de lipolisacáridos y fosfolípidos, que actúan como una barrera permeable contra macromoléculas y solutos como las bacteriocinas (Rodgers, 2001), lo que la hace más resistente. Para corroborar esto, se podrían hacer pruebas con diferentes bacterias Gram-negativas, como *E. coli* o *Pseudomonas sp.* García y colaboradores (2014) afirman que la susceptibilidad de las bacterias Gram-negativas a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas es mucho más limitada y hasta hace poco no se conocían bacteriocinas producidas por bacterias lácticas de origen alimentario activas naturalmente frente a bacterias Gram-negativas (Vázquez *et al.*, 2009). En el caso de *W. viridescens* se observa que *E. faecium* es capaz de inhibirla, esto puede ser

debido a que las proteínas que dan la actividad antimicrobiana tienen un mecanismo de acción diferente a las encargadas de la actividad antimicrobiana de *L. plantarum*.

7.3. Análisis *in silico*

Una vez obtenidos estos resultados y confirmar la presencia de actividad antimicrobiana, se realizó un análisis *in silico*, sobre las posibles PGHs y bacteriocinas presentes en las cepas de estudio, comparándolos con la literatura, para poder realizar una predicción sobre cuáles son las proteínas que presentan esta actividad, y de esta manera buscar los genes que las codifican y si se encuentran en su genoma, quedándonos con los genes mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Genes seleccionados en análisis *in silico*.

Microorganismos	Genes de PGHs	Genes de bacteriocinas
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>p54</i>	<i>entA</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>p90</i>	<i>BacIbp</i>

7.4. Identificación de genes de peptidoglucano hidrolasas

Se realizó la identificación de genes para conocer si las cepas de *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* presentaban en su genoma los genes que codifican para las peptidoglucano hidrolasas, por lo que se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los cebadores específicos para cada microorganismo. Como controles positivos se utilizaron las siguientes cepas: *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*.

En la figura 17 se muestran los productos de la PCR en un peso de 1,500 pb para la cepa de *E. faecium* y de 2,583 pb para la cepa de *L. plantarum*. Una vez obtenidos los amplicones de las dos muestras se cortaron las bandas del gel, se purificaron para su envío y posterior comparación e identificación en la base de

datos, los cuales confirman la presencia de los genes que codifican la expresión de las proteínas P54 y P90 respectivamente.

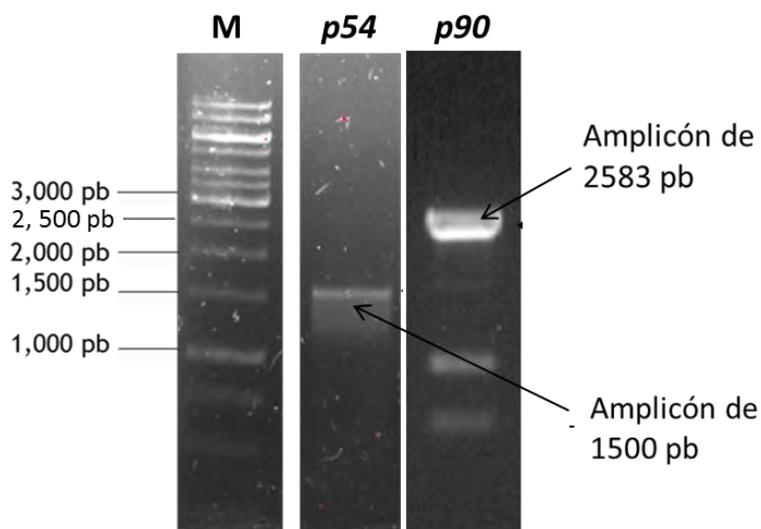


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. M, marcador 1 kb (Thermo scientific); *p54*, producto de PCR para el gen de la proteína P54 utilizando DNA molde de *E. faecium*; *p90*, producto de PCR para el gen de la proteína P90 utilizando DNA molde de *L. plantarum*.

En la tabla 12 se muestran los nombres de los genes identificados y el porcentaje de similitud de la secuencia problema con la secuencia de referencia que se encuentra en la base de datos.

Tabla 12. Identificación de los genes de interés.

Cepa	Gen	Gen identificado	Similitud	E-value
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>p54</i>	Protein P54 [<i>Enterococcus faecium</i>]	99%	1e-70
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>p90</i>	Lysozyme [<i>Lactobacillus plantarum</i>]	99%	2e-123

Como se observa en la tabla 12 para la cepa de *E. faecium* la secuencia encontrada al comparar en la base de datos de la NCBI fue la proteína P54 con una identidad del 99%. Esta proteína fue identificada por García-Cano y colaboradores (2014). Ellos observaron que tiene un péptido señal del aminoácido 1 al 26, un sitio catalítico de *N*-acetilglucosaminidasa del aminoácido 196 al 357 y un dominio CHAP del aminoácido 370 al 487, estos dominios son frecuentemente asociados a otros dominios catalíticos en PGHs lo que permite a la molécula tener actividad hidrolítica.

En el caso de la cepa de *L. plantarum* se obtuvo una similitud con el gen de una lisozima con un 99% de identidad. Las lisozimas se encuentran dentro de la clasificación de las peptidoglucano hidrolasas en el grupo de las *N*-acetilmuramidasa (muramidasa), estas se encargan de degradar la pared celular catalizando la hidrólisis de los enlaces $\beta - 1,4$ entre el *N*-acetilmurámico y el *N*-acetilglucosamina y pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas 25.

7.5. Identificación de las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) en las cepas de estudio.

7.5.1. Concentración de la PGH

Una vez que se confirmó la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana se concentraron las proteínas por medio de ultrafiltración con un tamaño de corte de 10 kDa para *E. faecium* y 30 kDa para *Lb. plantarum*, esto se decidió debido a los pesos moleculares aproximados observados previamente en zimograma.

7.5.2. Actividad antimicrobiana por zimogramas

Después de concentrar la proteína se realizaron zimogramas Tris-glicina al 10 % de acrilamida con SDS, con 0.2 % de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* para determinar la actividad antimicrobiana del extracto crudo de las cepas de estudio.

En la figura 18 se puede observar el zimograma de los extractos crudos ultrafiltrados de las cepas aisladas de *L. plantarum* y *E. faecium* donde se presentaron dos bandas de actividad lítica en 90- y 54- kDa respectivamente. Esto podría corresponder al gen previamente identificado (7.4.1.) que codifican para proteínas con actividad lítica como son las peptidoglucano hidrolasas (PGH).

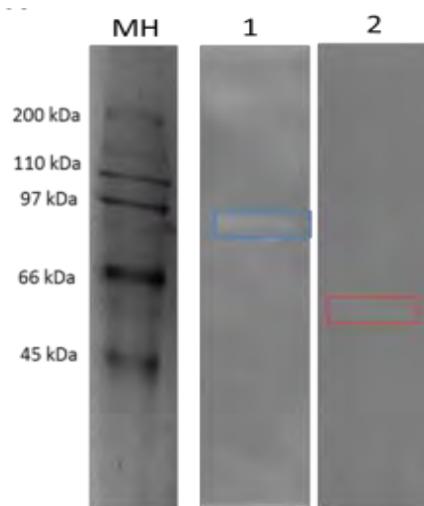


Figura 18. Zimograma contra *M. lysodeikticus* en geles Tris-glicina al 10 %. MH, marcador de alto peso molecular; carril 1, extracto de *L. plantarum*; carril 2, extracto de *E. faecium*.

Las bandas obtenidas en el SDS-PAGE para *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* se muestran en las figuras 19 y 20, respectivamente, estas se cortaron y se enviaron a identificar por espectrometría de masas al Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt-UNAM). Las secuencias en aminoácidos se analizaron en el sitio web National Center for Biotechnology Information utilizando la herramienta BLAST.

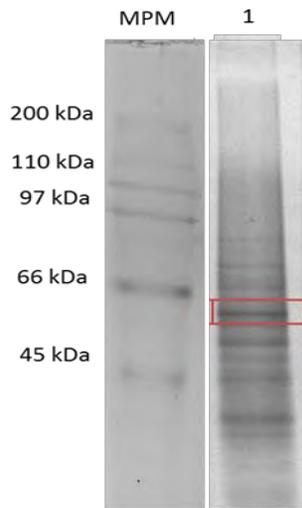


Figura 19. SDS-PAGE de extracto de *Enterococcus faecium*; MPM, marcador de alto peso molecular; 1, extracto crudo ultrafiltrado de *Enterococcus faecium*.

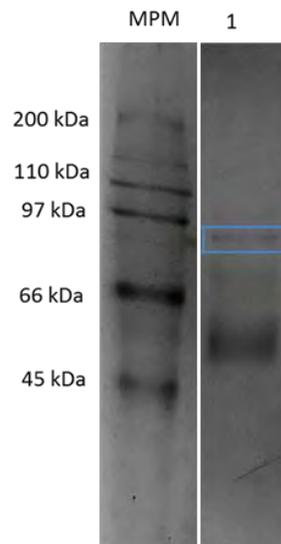


Figura 20. SDS-PAGE de extracto de *Lactobacillus plantarum*, MPM, marcador de alto peso molecular; 1, extracto crudo ultrafiltrado de *Lactobacillus plantarum*.

7.5.3. Identificación de proteína por LC-MS/MS

La identificación de las proteínas se llevó a cabo por el método de espectrometría de masas, generando péptidos a partir de la digestión con tripsina (Hernández, 2017). Se obtuvo un porcentaje de cobertura del 11% con una proteína de 516 aminoácidos y un peso molecular teórico de 54.59 kDa, el cual corresponde a la proteína P54 de *Enterococcus faecium*.

En la tabla 13 se muestra la proteína identificada y el porcentaje de cobertura de las secuencias de aminoácidos obtenidos.

Tabla 13. Similitud de secuencias obtenidas aminoácidos.

Cepa	Proteína identificada	Expectancia	Cobertura
<i>Enterococcus faecium</i>	Protein P54 [<i>Enterococcus faecium</i>]	0.0	11%

Se puede observar que la única proteína que se pudo identificar fue la P54 de *E. faecium* (acceso: WP_010737285.1, Protein BLAST), que es una PGH con actividad de N-acetilmuramoli-L-alanina amidasa, a pesar de tener un porcentaje de cobertura muy bajo, 3 secuencias de los péptidos identificados tienen el 100% de identidad con la proteína P54 encontrada en el genoma de esta bacteria ácido láctica (Figura 21).

P54_ENTFC (100%), 54,595.8 Da					
Protein P54 OS=Enterococcus faecium PE=3 SV=2					
6 exclusive unique peptides, 6 exclusive unique spectra, 83 total spectra, 57/516 amino acids (11% coverage)					
MKKSLLSAVM	LSSIALTAVG	SPIAAAADDF	DSQIQQQDKK	IADLQNNQAS	AQSQIEALEG
QVSAINTKAQ	DLLTKQDTLR	KESAQLKQEI	KDLQERIEKR	EATIQQQARE	TQVKNTSSNY
IDAVLNADSL	ADAVGRIQAM	STIVKANQDL	VQQQKEDKQA	VEAKKAENEA	KQKELADNQA
ALESQKGDLL	AKQADLNVLK	TSLA AEQATA	EDKKADLNR	KAEAEAEQAR	IREQARLAEQ
ARQQA AQEKA	EKEAREQAAA	QAAQTQALSS	ASTTTSSSA	AQSSSEESKA	PESSTTEEST
STESSTTTEN	SSTGSSSTES	SSTEESTVPE	SSTQESTPAN	TESSSSSSNT	NVNNNTNNS
NNSTNNSTTN	NNNNNTVTP	APTPTPTPAP	APAPNPSGSV	NGAAIVAEAY	KYIGTPYVWG
GKDP S G F D C S	G F T R YVYLQV	TGR D I G G W T V	P Q E S A G T K IS	VSQAKAGDLL	FWGSAGGTYH
V A I S L G G G Q Y	I H A P Q P G E N V	K V G S V Q W Y T P	D F A V S M		

Figura 21. Secuencia de la proteína P54 reportada en el genoma de *E. faecium*, los péptidos identificados por LC-MS/MS.

Para el caso de *L. plantarum* no fue posible hacer la identificación de la proteína; sin embargo, en diferentes investigaciones se ha reportado la presencia PGHs como las N-acetilmuramidasa que pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas 25 donde podemos encontrar los sitios Lys1 y Lys2 que contribuyen al proceso de autólisis (Rolain, 2012). También Chapot-Chartier (2012) encontró dos PGHs clave para la morfología de *L. plantarum*, una N-acetilglucosaminidasa Acm2 la cual comprobó participa en el último paso de la división celular, además



de ser la principal autolisina para la cepa de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 y una D,L-endopeptidasa LytA que mantiene la integridad y forma de la célula.

7.5.4. Clasificación de la actividad antimicrobiana de PGHs por especificidad de sustrato.

Las peptidoglucano hidrolasas se pueden clasificar en: endopeptidasas, *N*-acetilglucosaminidasas, *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasas y *N*-acetilmuramidadas, dependiendo el tipo de enlace que estas enzimas rompan. Una vez que se identificó la naturaleza antimicrobiana de las cepas problema y se identificaron los genes en su genoma se procedió a identificarla por medio de especificidad de sustrato, dándonos un resultado positivo en la prueba de *N*-acetilmuramidasa (Figura 22) y negativo en la actividad de *N*-acetilglucosaminidasa y *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, los cuales coinciden con los resultados previamente mostrados.

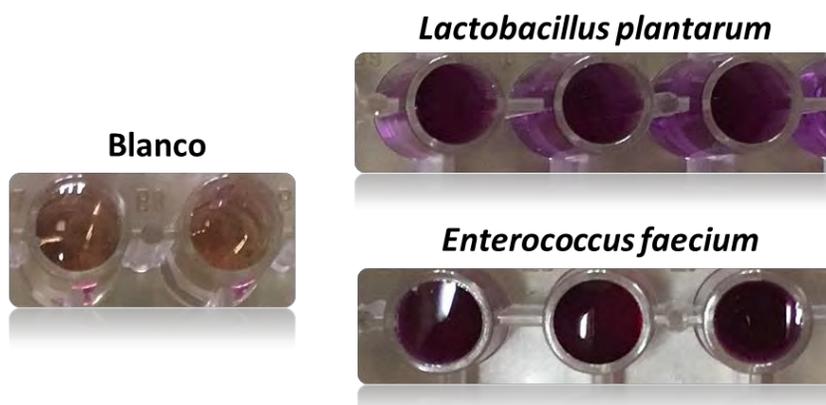


Figura 22. Blanco y resultado positivo por triplicado para *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium* para la prueba de *N*-acetilmuramidasa.

Una vez obtenidos estos resultados y de haber confirmado la producción de peptidoglucano hidrolasas por las cepas de estudio, se decidió realizar zimogramas Tris-glicina al 10 % de poliacrilamida para continuar con la búsqueda de compuestos antimicrobianos de peso molecular bajo, como las bacteriocinas.

El zimograma se muestra en la figura 23, donde podemos observar bandas con actividad lítica a bajo peso molecular, lo cual nos podría indicar la presencia de bacteriocinas.

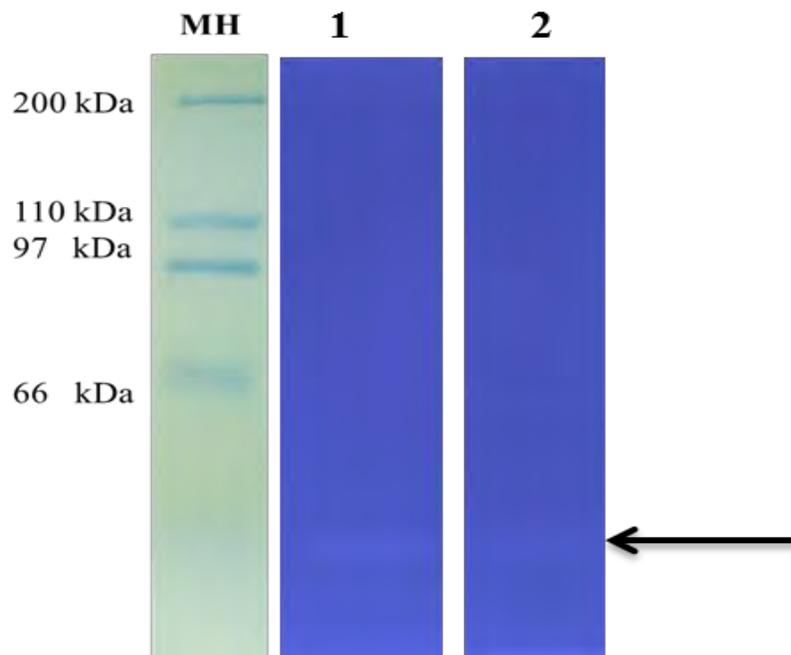


Figura 23. Zimograma de actividad antimicrobiana de extractos crudos de *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum*. Carril MH, marcador de alto peso molecular; carril 1, extracto crudo de la cepa *Enterococcus faecium*; carriles 2, extracto crudo de la cepa de *Lactobacillus plantarum*.

7.6. Identificación de genes de bacteriocinas.

Al igual que para las peptidoglucano hidrolasas se realizó la identificación de genes para conocer si las cepas de *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* presentaban en su genoma los genes que codifican para las bacteriocinas, por lo que también se llevó a cabo una PCR con los cebadores específicos para gen de estudio. Para el caso de la identificación del gen *entA* se tomaron los cebadores específicos diseñados por Reyes (2015). Como controles positivos se utilizaron las mismas cepas mostradas anteriormente en la identificación de genes de las peptidoglucano hidrolasas.

En la figura 24 se muestran los productos de la PCR en un peso de 171 pb para la cepa de *E. faecium* y 174 pb para la cepa de *L. plantarum* los cuales eran los tamaños de amplicón esperados, indicándonos la posible presencia de los genes que codifican la expresión de las proteínas EntA y BacLbp, estas bandas fueron cortadas y purificadas para su posterior comparación e identificación en la base de datos.

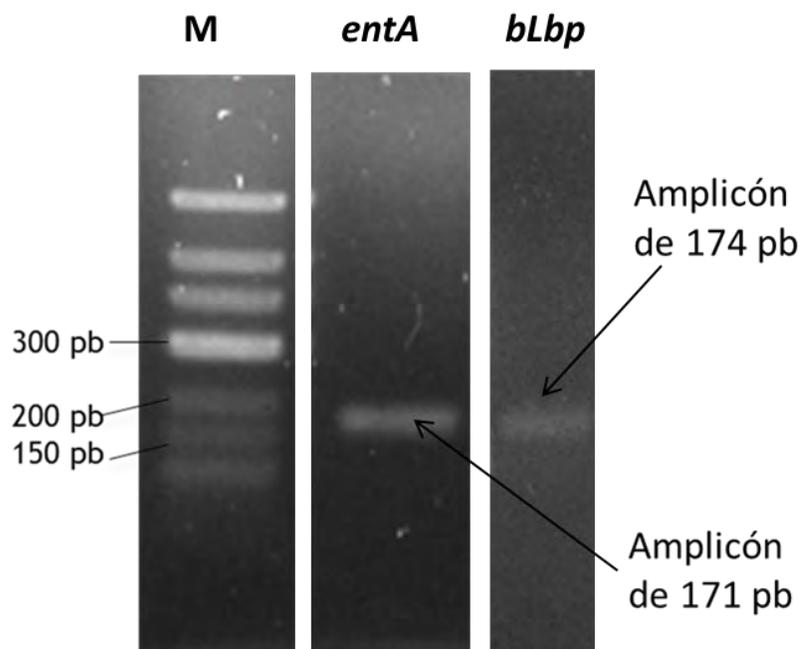


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %. M, marcador de 100 pb (Thermo scientific); *entA*, gen de la proteína EntA utilizando DNA molde de *E. faecium*; *bLbp*, gen de la proteína BLbp utilizando DNA molde de *L. plantarum*.

En la tabla 14 se muestran los genes identificados y el porcentaje de similitud de la secuencia problema con la secuencia de referencia que se encuentra en la base de datos.

Tabla 14. Identificación de los genes de interés.

Cepa	Gen	Gen identificado	Similitud	E-value
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>entA</i>	Class IIa bacteriocin EntA [<i>Enterococcus faecium</i>]	97%	1e-16
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Baclbp</i>	Ribosomal protein S6 [<i>Lactobacillus plantarum</i>]	83%	0.009

En la tabla 14 se observa que para la cepa de *E. faecium* se encontró una similitud con la enterocina A con una identidad del 97 %. Para el caso de *L. plantarum* nos da una similitud con una proteína ribosomal con una identidad del 83 %, posiblemente se trate de una bacteriocina que aún no ha sido reportada en la base de datos, explicando el bajo porcentaje de identidad que se tiene.

Meng *et al.*, 2015 intentaron expresar una nueva Plantaricina Pln1 de 145 pb y un peso molecular de 4 kDa, la cual se ha comprobado tiene actividad antagónica contra bacterias ácido lácticas, *L. innocua* y *S. aureus*, ellos encontraron que la mayoría de los péptidos antimicrobianos, en este caso las plantaricinas, se encuentran en rangos de tamaño de entre 7 - 60 aminoácidos y con una longitud de DNA que van de las 60 a las 200 pb (incluyendo péptidos señal). Esta bacteriocina fue obtenida de la cepa de *Lactobacillus plantarum* 163, cuyo genoma es altamente similar a la cepa de *Lactobacillus plantarum* WCSF1, que fue utilizado como molde para el diseño de cebadores específicos para la identificación de la bacteriocina *Baclbp* en este trabajo. El amplicón esperado fue de 174 pb, que al compararlo con el trabajo previamente mencionado podría darnos un indicio de que el gen identificado en la base de datos como Ribosomal

protein S6 [*Lactobacillus plantarum*] sea una nueva plantaricina, sin una función específica establecida

7.7. Identificación de bacteriocinas en las cepas de estudio.

7.7.1. Obtención del péptido antimicrobiano

Para confirmar la actividad producida por las bacteriocinas se siguió el método de adsorción y desorción para la obtención de los péptidos antimicrobianos de interés. Posteriormente, se realizaron zimogramas de poliacrilamida Tris-tricina al 10 %, cabe mencionar que se utilizan este tipo de geles ya que proporcionan una mejor resolución en la separación de las proteínas con pesos moleculares de 1 a 100 kDa (Olvera-García, 2013).

En la figura 25 se observa que *L. plantarum* y *E. faecium* presentaron bandas de actividad lítica en 3- y 5-kDa en geles Tris-tricina, respectivamente, lo que nos indica la posible producción de bacteriocinas.

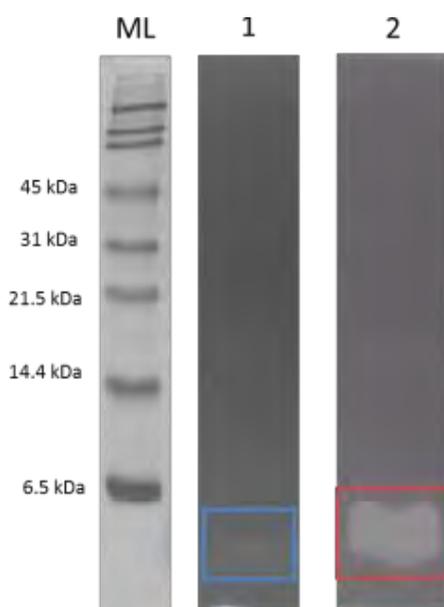


Figura 25. Zimograma contra *M. lysodeikticus* en geles Tris-tricina al 10%. ML, marcador de bajo peso molecular; carril 1, extracto de *L. plantarum*; carril 2, extracto de *E. faecium*.

Las bandas obtenidas en el SDS-PAGE para *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* se cortaron y se enviaron a identificar por espectrometría

de masas al IBT. Las secuencias en aminoácidos se analizaron en el sitio web NCBI utilizando la herramienta BLAST (Reyes, 2015).

Se puede observar en el zimograma que la banda de 5 kDa correspondiente a la EntA de *E. faecium* presenta una actividad lítica muy gruesa, lo que podría indicar la presencia de una segunda bacteriocina, ya que algunas veces la enterocina A trabaja sinérgicamente con la enterocina B, pero no necesariamente se deben producir ambas (Olvera-García, 2013).

Para el caso de *L. plantarum*, existen diversos reportes sobre la actividad antimicrobiana producida por plantaricinas contra diferentes microorganismos patógenos, principalmente *Listeria*. Barbosa, *et al*, (2015) aislaron de un salami tipo italiano proveniente de Brasil, una cepa de *L. plantarum* productora de una bacteriocina de un peso aproximado de 2.5 kDa identificada como Plantaricina W, muy similar a la Plantaricina S descrita por Jiménez-Díaz, *et al.*, en 1993, la cual también presentaba actividad contra *Listeria*. Pongsak, en 2006, aisló una bacteriocina de aproximadamente 8 kDa, con el mismo tipo de actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* además de tener un amplio espectro contra otras bacterias Gram-positivas. Messi, en 2001, demostró que la cepa de *Lactobacillus plantarum* 35d aislada de salchichas italianas presentaba la máxima actividad antagónica contra microorganismos patógenos incluyendo a *L. monocytogenes* y *S. aureus*, él observó que esta plantaricina parecía estar asociada a una banda de actividad lítica de aproximadamente 4.5 kDa, al igual que la Plantaricina NC8, que se identificó con un peso aproximado de 3.5 kDa (Maldonado, 2004).

Por lo tanto, con los reportes descritos anteriormente y con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos suponer que la proteína con la que se está trabajando corresponde a una plantaricina.

Con este trabajo se da pie a posteriores investigaciones para la caracterización de estas proteínas y su aplicación en la industria de alimentos, ya que hasta el momento la única PGH y bacteriocina utilizada en alimentos es la lisozima y la nisina.

8. CONCLUSIONES

- Las cepas de estudio se identificaron como *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* por medio de métodos moleculares, obteniendo porcentajes de similitud de 99% y 100%. Mostraron actividad antagónica contra *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Weissella viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei*.
- Se demostró que la actividad antagónica se debe a que ambas cepas producen una PGH (*p54*) y una bacteriocina (*entA*); que para *Enterococcus faecium* se identificaron los genes, se detectó y se demostró la producción de ambos compuestos. Sin embargo, para *Lactobacillus plantarum* únicamente se identificaron los genes correspondientes a una PGH (*p90*) y a una bacteriocina (*Baclbp*).
- Los resultados indican que estas dos cepas pueden tener potencial como agentes de control de microorganismos alterantes.

9. PERSPECTIVAS

- Obtener la secuencias de aminoácidos por espectrometría de masas para las proteínas de *Lactobacillus plantarum*
- Hacer la caracterización bioquímica de las proteínas obtenidas de *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*
- Medir la expresión de las PGHs y las bacteriocinas

10. REFERENCIAS

- Alvárez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D., Kuipers P.O . (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family . *Applied Microbiology Biotechnology*, 2939-2951.
- Arnau J., Serra X., Comaposada J., Gou P., Garriga M . (2007). Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products . *Meat Science* , 77, 81-89.
- Arnison P.G., Bibb M.J., Bierbaum G., Bowers A.A., Bugni T.S., Bulaj G., Camarero J.A., Campopiano D.J., Challis G.L., Clardy J., Cotter P.D., Craik D.J., Dawson M., Dittmann E., Donadio S., Correstein P.C., Entian -D., Fischbach M.A., Garavelli J.S. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 108-160.
- Barbosa M.S., Todorov S.D., Ivanova I.V., Belguesmia Y., Choiset Y., Rabesona H., Chobert J-M., Haertle T., Franco B.D.G.M. (2016). Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. *Food Control* , 103-112.
- Chapot-Chartier M.P., Kulakauskas S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacterial. *Microbial Cell Factories*, 186.
- Consejo Mexicano de la Carne (COMECARNE). (2016). Atlas de la carne. México. Consultado en línea el 07 de julio del 2017. Disponible en https://mx.boell.org/sites/default/files/hbs_ac_122016_web_pages.pdf
- Contreras Cruz, M. (2013). *Efecto del medio de cultivo en la producción de Enzimas de interés biotecnológico por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042*. Facultad de Química UNAM : Tesis de Licenciatura .



- Cornejo R.A., Serrato D.A., Aguilar B.R., Munive M.G.R. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología. Aspectos teóricos y prácticos. En *SEMARNAT, INECC, UAM-I. 1a Edición* . 274.
- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews*, 777-788.
- Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature Microbiology Reviews*, 95-105.
- De Vuyst, L. and Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.
- Doyle M. P., B. L. (2000). *Microbiología de Alimentos*. Acribia SA.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2017). Grupos de productos cárnicos. Consultado en línea el 13 de junio del 2017. Disponible en http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/processing_product.html
- García-Cano I., Campos-Gomez M., Contreras-Cruz M., Serrano-Maldonado C.E., González-Canto A., Peña-Montes C., Rodríguez-Sanoja R., Sanchez S., Farrés A. (2015). Expression, purification and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(20), 8563-8573.
- García-Cano I., Serrano-Maldonado C.E., Olvera-García M., Delgado-Arciniega E., Peña-Montes C., Mendoza-Hernández G., y Quirasco M. (2014). Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product. Cotija cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 26-34.
- García-Cano, I. (2013). *Peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042; detección, localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano*. Facultad de Química UNAM: Tesis de Doctorado .

- Grosu-Tudor S.S., Stancu M.M., Pelinescu D., Zamfir M. (2014). Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods . *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2459-69.
- Guzmán Trampe, S. (2012). *Evaluación de la capacidad de microorganismos asociados a Magnolia de albata Zucc. para producir compuestos con actividad biológica*. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM: Tesis de Maestría .
- Habjanick K., Suskovic J., Kos B., Beganovic J., Pavunc AL., Matosie S . (2010). Antimicrobial activity - the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria . *Food Technology and Biotechnology*, 48(3): 296-307.
- Hernández Castro, C. (2017). *Aislamiento e identificación molecular de los microorganismos presentes en huevo procesado e inhibición de la microbiota por diversos compuestos con actividad antimicrobiana*. Facultad de Química UNAM: Tesis de Licenciatura.
- Hernández Maldonado, M. (2017). *Caracterización de Enzimas con actividad antimicrobiana de Bacillus pumilus GMA1*. Facultad de Química UNAM: Tesis de Licenciatura .
- Holck A., Axelsson L., McLeod A., Rode M. T., Heir E. (2017). Health and Safety Considerations of Fermented Sausages. *Journal of Food Quality* , 25.
- Juárez, B. (2005). *Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica*. Universitat de Girona: Tesis de Doctorado.
- Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiology Reviews* 12:, 39-85.

- Koohmaraie M., T. Arthur, J. Bosilevac, M. Guerini, S. Shackelford, T. Wheeler. (2005). Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science*, 71: 79-91.
- Kröckel, L. (2013). The role of lactic acid bacteria in safety and flavor development of meat and meat products. En M. Kongo (ed). *Lactic Acid Bacteria- R&D for Food, Health and Livestock Purposes*, págs. 129-152. INTECH Croatia:
- Laemmli, V. (1970). Cleavage of structure of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259), 680-685.
- Larpent, J. (1995a). Las bacterias lácticas . En *ICMSF, Microbiología Alimentaria Vol. 2., Las fermentaciones alimentarias* (págs. 3-17). Zaragoza. España : Editorial Acribia S.A.
- Maldonado A., Ruiz-Barba JL., Jiménez-Díaz R. (2004). Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Archives of Microbiology* , 8-16.
- Meng F., Zhao H., Zhang C., Lu F., Bie X., Lu Z. (2016). Expression of a novel bacteriocin - the Plantaricin Pln1 - in *Escherichia coli* and its functional analysis . *Protein Expression and Purification* 119, 85-93.
- Messi P., Bondi M., Sabia C., Battini R., Manicardi G. (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology* , 193-198.
- Moreno M., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E. y De Vust L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-4.
- Moreno M., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., y De Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106, 1-24.

- Norma Oficial Mexicana. NOM-145-SSA1-1995. (1995). Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- Olvera García, M. (2013). Evaluación de la inocuidad de *Enterococcus spp.* aislados del queso Cotija. Facultad de Química UNAM: Tesis de Maestría .
- Ordóñez, J.A. y de la Hoz, L. (2001). Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones. En Bejarano, M. (Ed.),. En *Enciclopedia de la carne y productos cárnicos* (págs. 1063-1090). Ediciones Martín & Macías, Madrid.
- Palafox Berrios, M. (2015). *Identificación molecular de los microorganismos de descomposición en productos cárnicos*. Instituto Tecnológico de los Mochis, Informe de Residencia Profesional .
- Pongsak R., Parichat P. (2006). Isolation and Preliminary Characterization of a Bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* N04 isolated from Nham, a Traditional Thai Fermented Pork. *Journal of Food Protection Vol. 69, No. 8*, 1937-1943.
- Reyes Cortés, J. (2015). *Identificación de la actividad antimicrobiana de cepas bacterianas del género Enterococcus*. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa : Tesis de Maestría.
- Robles Camacho, T. (2014). *Identificación molecular de microorganismos aislados del queso Cotija y de sus materias primas*. Facultad de Química UNAM: Tesis de Licenciatura .
- Rodgers, S. (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-review. *Trends in Food Science and Technology* 12(8), 2776-284.
- Rolain T., Bernard E., Courtin P., Bron P.A., Kleerebezem M., Chapot-Chartier M.P., Hols P. (2012). Identification of key peptidoglycan hydrolases for morphogenesis, autolysis, and peptidoglycan composition of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories*, 1475-2859.

- Rolain T., Bernard E., Courtin P., Bron PA., Kleerebezem M., Chapot-Chartier M.P., Hols P. (2012). Identification of key peptidoglycan hydrolases for morphogenesis, autolysis, and peptidoglycan composition of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories*, 137.
- Salminen S., Von Wright A., y Ouwehand A. (2004). Lactic Acid Bacteria. En *Microbiological and Functional Aspects. 3a edition* . U.S.A: Marcel Dekker.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), (2016). Elaboración de Productos Cárnicos. Consultado en línea el 30 de mayo del 2017. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Elaboraci%C3%B3n%20de%20productos%20c%C3%A1rnicos.pdf>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), (2010). Proyecciones para el sector agropecuario en México. Consultado en línea el 30 de mayo del 2017. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Escenariobase09.pdf>
- Sip A., Wieckowickz M., Olejnik-Schmidt A., and Grajek W. (2012). Anti-Listeria activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control* 26, 117-124.
- Taylor, K. (1996). A Simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid . 56.
- Tian P.J., Li L., Shan Y.J., Zhang J.N., Chen J.Y., Yu M., y Zhang L.W. (2015). Extraction of Peptidoglycan from *L. arcasei* subsp. *paracasei* X12 and its Preliminary Mechanisms of Inducing Immunogenic cell Death in HT-29 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 20033-20049.
- Todorov S.D., Malheiros P.S., Sant'Anna V., Franco B. (2015). Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a . *Brazilian Journal of Microbiology*, 825-834.

- Tsakalidou, E. (2011). Part III: Milk and Dairy Foods. En L.M. Nollet & F. Toldra (ed)s. *Microbial flora. Safety Analysis of Foods o Animal Origin* CRC Press, Boca Raton, págs. 781-798 .
- Valenzuela Rosas, A. (2012). *Caracterización de las peptidoglucano hidrolasas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042*. Facultad de Química UNAM: Tesis de Licenciatura.
- Vásquez S.M., Suárez M.H., Zapata S.B. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición* 36(1), 64-71.
- Voller W., Joris B., Charlier P., y Foster S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 259-286.
- Yilmaz I., M. H., Velioglu (2009). Fermented meat products. En Yilmaz I (ed). *Quality of meat and meat products*. Transworld Research Network. Kerala, India, págs. 2-13.
- Zacharof M.P., Lovitt R.W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria . *APCBEE Procedia* 2, 50-56.
- Zendo, T. (2013). Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 77, 893-899.