



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Obtención de bacteriocinas a partir del metagenoma bacteriano del queso Cotija

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.A. Alfredo Esquivel López

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
[Facultad de Química, UNAM.](#)

Dra. Clarita Olvera Carranza
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

Ciudad de México. Octubre, 2019.



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.

“Obtención de bacteriocinas a partir del metagenoma bacteriano del queso Cotija”

Reconocimientos.

Esta tesis de maestría se realizó bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch en el laboratorio 312 del conjunto E, del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Clarita Olvera Carranza	Instituto de Biotecnología, UNAM.
Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán	Instituto de Biotecnología, UNAM.

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Carlos Eduardo Serrano Maldonado.

Se agradece el financiamiento del proyecto y la beca otorgada por DGAPA-UNAM-PAPIIT IN222717; el apoyo financiero del PAIP-FQ 5000-9102; se agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); el apoyo financiero del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia a un congreso nacional.

El jurado asignado:

Presidente	Dr. Sergio Sánchez Esquivel - Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Vocal	Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete - Instituto de Biotecnología, UNAM.
Vocal	Dr. Guillermo Gosset Lagarda - Instituto de Biotecnología, UNAM.
Vocal	Dr. José Adelfo Escalante Lozada - Instituto de Biotecnología, UNAM.
Secretario	Dr. Francisco Ruíz Terán - Facultad de Química, UNAM.

**El presente trabajo se encuentra en proceso de solicitud de patente:
MX/a/2018/007923**

Índice.

1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. Bacteriocinas	2
2.1.1. Clase I. Lantibióticos	3
2.1.2. Clase II. Bacteriocinas sin lantionina	4
2.1.2.1. Clase IIa. Bacteriocinas tipo pediocina	5
2.1.2.2. Clase IIb. Bacteriocinas de doble péptido	5
2.1.2.3. Clase IIc. Bacteriocinas circulares	5
2.1.2.4. Clase IId. Bacteriocinas de péptidos lineales individuales diferentes de pediocina	6
2.1.3. Bacteriolisinas	6
2.2. Contexto genómico de bacteriocinas	6
2.3. Mecanismo de acción	8
2.4. Inmunidad	10
2.5. Sistema de secreción	13
2.6. Producción y aplicaciones de las bacteriocinas	13
3. Antecedentes del grupo de trabajo	17
4. Justificación	18
5. Hipótesis	18
6. Objetivo(s)	19
6.1. General	19
6.2. Particulares	19
7. Metodología	20
7.1. Obtención in silico de secuencias candidato codificantes para bacteriocinas	20
7.2. Síntesis de los genes	21
7.3. Células competentes y transformantes de <i>E. coli</i> DH5 α	21
7.4. Reacción de digestión	22
7.5. Reacción de ligación	22
7.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
7.7. Inducción	23
7.8. Ensayo de difusión en agar	24
7.9. Geles de Tris-Tricina-SDS-PAGE y zimogramas	25
7.10. Western blot	26
7.11. Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria	26
7.12. Purificación por cromatografía de afinidad	27
8. Resultados y discusión	28
8.1. Selección de los genes de interés	28
8.2. Información de los genes con anotación de bacteriocina	32
8.3. Información de los genes con anotación de proteína de inmunidad	35
8.4. Síntesis de las construcciones y subclonación	35
8.5. Producción de las bacteriocinas y perfiles electroforéticos	40
8.6. Espectro inhibitorio de las bacteriocinas	44
9. Conclusión	54
10. Perspectivas	54
11. Bibliografía	54
12. Anexos	59

Índice de tablas.

Tabla 1. Esquema de clasificación de Klaenhammer (1993).	3
Tabla 2. Inmunidad asociada a diferentes lantibióticos.	11
Tabla 3. Bacteriocinas comerciales y sus aplicaciones.	15
Tabla 4. Aplicación de bacteriocinas en el área clínica.	15
Tabla 5. Patentes que involucran la aplicación de bacteriocinas.	16
Tabla 6. Composición de reacción de PCR.	23
Tabla 7. Condiciones del termociclador para la PCR.	23
Tabla 8. Composición de Tris-Tricina-SDS-PAGE.	25
Tabla 9. Información de los contigs con genes de bacteriocina y de inmunidad.	28
Tabla 10. Contigs con gen que codifica para bacteriocina y gen que codifica para proteína de inmunidad.	30
Tabla 11. BLAST para los genes con anotación de bacteriocinas.	31
Tabla 12. Secuencia de aminoácidos de bacteriocinas de tipo lactococinas.	33
Tabla 13. Concentraciones de los extractos utilizados.	47

Índice de secuencias.

Secuencia 1. Construcción contig-295 en el vector pUC18.	35
Secuencia 2. Construcción contig-14178 en el vector pUC18.	36
Secuencia 3. Construcción pET28a(+)-contig-295.	38
Secuencia 4. Construcción pET28a(+)-contig-14178.	39

Índice de Figuras.

Figura 1. Biosíntesis de lantibióticos	4
Figura 2. Operones de diferentes bacteriocinas	7
Figura 3. Esquema de los mecanismos de acción de las diferentes clases de bacteriocinas	8
Figura 4. Mecanismo de acción de las microcinas	9
Figura 5. Esquema del mecanismo de inmunidad para la nukacina ISK-1	12
Figura 6. Mecanismo de inmunidad de la lactococcina A	12
Figura 7. Diagrama general de trabajo	20
Figura 8. Contexto genómico de los genes relacionados con bacteriocinas	29
Figura 9. Alineamiento de secuencias de la superfamilia de lactococcinas y las secuencias seleccionadas	33
Figura 10. Digestión de las construcciones en el vector pUC18	36
Figura 11. Amplicones de las clonas seleccionadas con las construcciones en el vector pET28a(+)	37
Figura 12. Sistema de expresión pET y <i>Escherichia coli</i>	40
Figura 13. SDS-PAGE (A) y zimograma (B) de las clonas seleccionadas	42
Figura 14. Transferencia de proteínas de las clonas seleccionadas	43
Figura 15. Difusión en agar contra <i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103	44
Figura 16. Concentración mínima inhibitoria de las bacteriocinas contra <i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103	47
Figura 17. Concentración mínima inhibitoria de <i>E. coli</i> BL21(DE3) con y sin el vector de expresión vacío	48
Figura 18. Perfil proteico y zimograma de la bacteriocina QC2 purificada	52

Resumen.

Las medidas para lograr una inocuidad alimentaria se encuentran en constante cambio para utilizar nuevas metodologías, o bien, mejorar las ya existentes para asegurar alimentos inocuos. Dentro de tales metodologías se encuentra la bioconservación, que comprende la utilización de compuestos bioactivos secretados por microorganismos de diversos nichos ecológicos, como los alimentos fermentados. Dentro de este grupo, se encuentra el queso Cotija, producto que se elabora artesanalmente a partir de leche sin pasteurizar, sin la adición de cultivos iniciadores ni la utilización de procesos térmicos.

Algunos de los microorganismos que se encuentran en este alimento forman parte de las bacterias ácido-lácticas, las cuales son conocidas por contribuir con diferentes características (físicoquímicas, microbiológicas y sensoriales) en los alimentos que se encuentran. Así mismo, impactan en la calidad microbiológica de los alimentos a través de diferentes mecanismos, entre los que se encuentra la producción de bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente por una bacteria, presentan actividad bactericida en contra de otras bacterias tanto de su misma especie como en contra de bacterias de diferente género. Estos péptidos se encuentran en constante investigación por las posibles aplicaciones que tienen en áreas como la de alimentos, clínica, farmacéutica, etc.

A través del estudio de los metagenomas de diferentes nichos ecológicos se puede analizar la diversidad de la microbiota que los compone, elucidar su posible papel dentro de ese ambiente, encontrar y explotar biomoléculas que no se habían descrito con anterioridad, etc. Para el queso Cotija, a través de la secuenciación masiva de ADN metagenómico de una muestra representativa de quesos, se exploró la diversidad bacteriana, su potencial metabólico para generar las características sensoriales del alimento y la producción de bacteriocinas por parte de estas.

A partir de dicha información, este trabajo tuvo como objetivo seleccionar dos marcos de lectura abierta con anotación de bacteriocinas no descritas previamente, clonarlos y expresarlos en *Escherichia coli*, determinar las condiciones en las que se obtuvieran las bacteriocinas funcionales y evaluar su actividad bactericida en contra de microorganismos de importancia en la inocuidad de los alimentos.

Con base en la información analizada, se obtuvieron las bacteriocinas QC1 y QC2 que pudieran ser sintetizadas por *Lactococcus lactis*. Estas bacteriocinas se expresaron heterológamente y tuvieron efecto bactericida exclusivamente contra *Listeria monocytogenes*, con una concentración mínima inhibitoria de 78 µg/mL.

1. Introducción.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) representan un problema económico y de salud pública a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2017), se estima que se presentan 600 millones de casos de ETA alrededor del mundo, lo que provoca un aproximado de 420 000 muertes al año. Dentro de los principales agentes causales de ETA se encuentran *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Listeria monocytogenes*, este último, es un microorganismo con un índice de morbilidad menor en comparación al que presentan los casos asociados con microorganismos entéricos, sin embargo, presentan un índice de mortalidad más alto (Wang *et al.*, 2016).

Para prevenir o actuar de manera correcta ante episodios de ETA, es de vital importancia seguir los estudios epidemiológicos y de trazabilidad que nos permiten dar seguimiento a diferentes brotes. Los estudios mencionados aumentan su complejidad conforme al surgimiento de diferentes microorganismos patógenos emergentes, que adquieren factores de virulencia y así causan daño no sólo en dosis infecciosas bajas; a esto se suma el hecho de que existen microorganismos que presentan algún tipo de resistencia a los métodos de conservación tradicionales (procesos térmicos, conservadores, etc.) y/o a distintos antibióticos (Sofos, 2002).

Existen otros factores como la globalización, cambios en la práctica agrícola y cambios en los hábitos de alimentación de los consumidores que afectan la producción de alimentos y a su vez, a las estrategias para mantenerlos inocuos. Dentro de los cambios en los hábitos de alimentación, en la actualidad, existe la tendencia en los consumidores hacia la adquisición de alimentos sin conservadores, de larga vida de anaquel y mínimamente procesados (Sofos, 2002; Grace, 2015).

Por lo tanto, la industria de alimentos se encuentra en constante cambio para utilizar nuevas metodologías, o bien, mejorar las ya existentes para asegurar alimentos inocuos. Dentro de tales metodologías se encuentra la bioconservación, a través de la utilización de compuestos bioactivos secretados por microorganismos de diversos nichos ecológicos (Doyle *et al.*, 2006).

Dentro de estos nichos ecológicos se encuentran los alimentos fermentados, como productos vegetales, cárnicos y lácteos, que se han consumido a lo largo de la historia y con el paso del tiempo se les han atribuido propiedades benéficas para los consumidores a causa de su microbiota o de los productos metabólicos que se generan a partir de la misma (Doyle *et al.*, 2006). Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman parte de la microbiota característica de este tipo de alimentos y generan, entre otras moléculas con actividad antibacteriana, péptidos denominados bacteriocinas, tal es el caso de la nisina. Ésta presenta un efecto inhibitorio en contra de microorganismos causales de ETA como *L. monocytogenes* y *C. botulinum*, además de ser la única bacteriocina que cuenta con la aprobación de agencias gubernamentales para su utilización como aditivo alimentario y que por su origen es generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) (Chikindas & Montville, 2002).

Existe un interés muy importante hacia la búsqueda de nuevas bacteriocinas, que puedan contribuir a la inocuidad de los alimentos. En consecuencia, en este trabajo se explorará y utilizará, con ayuda de herramientas bioquímicas y moleculares, la información del metagenoma bacteriano de un alimento mexicano artesanal madurado, el Queso Cotija. Las características de sus materias primas y la manera en que se elabora proveen las condiciones idóneas para el desarrollo de BAL, que podrían producir bacteriocinas con un potencial de aplicación industrial.

2. Marco teórico.

2.1. Bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente por una bacteria, presentan actividad bactericida en contra de otras bacterias tanto de su misma especie (espectro reducido) como en contra de bacterias de diferente género (amplio espectro) (Cotter *et al.*, 2005). La primera bacteriocina (colicina V) se descubrió en el año 1925 (Gratia, 2000) (Settanni & Corsetti, 2008), sin embargo, el término bacteriocinas fue utilizado por primera vez en el año 1953 para describir las colicinas producidas por *E. coli* (Rea *et al.*, 2011).

En la literatura se encuentra información vasta acerca de la clasificación de las bacteriocinas, en la Tabla 1 se muestra un primer esquema propuesto por Klaenhammer (1993) en el cual se aprecian cuatro diferentes clases de bacteriocinas con sus respectivas características.

Tabla 1. Esquema de clasificación de Klaenhammer (1993).

Grupo	Descripción	Características
Clase I	Bacteriocinas modificadas post traduccionalmente.	Contienen a los aminoácidos lantionina, β -metil-lantionina y residuos deshidratados.
Clase II	Péptidos no modificados.	Pequeños péptidos (<10 kDa) termoestables que actúan a nivel de membrana.
Clase III	Proteínas no modificadas.	Grandes proteínas (> 30 kDa) sensibles al calor.
Clase IV	Proteínas complejas.	Contienen fracciones de lípidos y carbohidratos.

Tomado de Rea *et al.*, (2011).

Con la generación de conocimiento acerca de las bacteriocinas, la clasificación se ha ido modificando. En la actualidad se reconoce la clasificación de las bacteriocinas dentro de dos principales grupos: Clase I, bacteriocinas modificadas post-traduccionalmente o lantibióticos y las bacteriocinas de Clase II no modificadas o no lantibióticos. En cuanto a las bacteriocinas de mayor tamaño (Clase III) se ha sugerido su papel más como una enzima que como bacteriocina (Cotter *et al.*, 2005).

2.1.1. Clase I. Lantibióticos.

Esta clase de bacteriocinas fue descrita por primera vez en los años 20, fue la nisina la primera bacteriocina descrita con estas características (Dischinger *et al.*, 2013). Son péptidos con 19 a 38 aminoácidos (< 5 kDa), que se denominan como lantibióticos porque dentro de su estructura se encuentra presente el aminoácido lantionina o β -metil lantionina (Zacahrof & Lovitt, 2012).

Su biosíntesis comienza con la deshidratación enzimática de los residuos de serina y/o treonina que generan 2,3-dehidroalanina (Dha) y 2,3-dehidrobutirina (Dhb), posteriormente, la condensación del grupo tiol de un residuo vecino de cisteína con Dha genera lantionina mientras que la condensación con Dhb genera β -metil lantionina. Además, los lantibióticos pueden contener otros residuos inusuales por cambios post-traduccionales que incluyen la sustitución de D-alanina por L-serina (Figura 1) (Cotter *et al.*, 2005; Dischinger *et al.*, 2013).

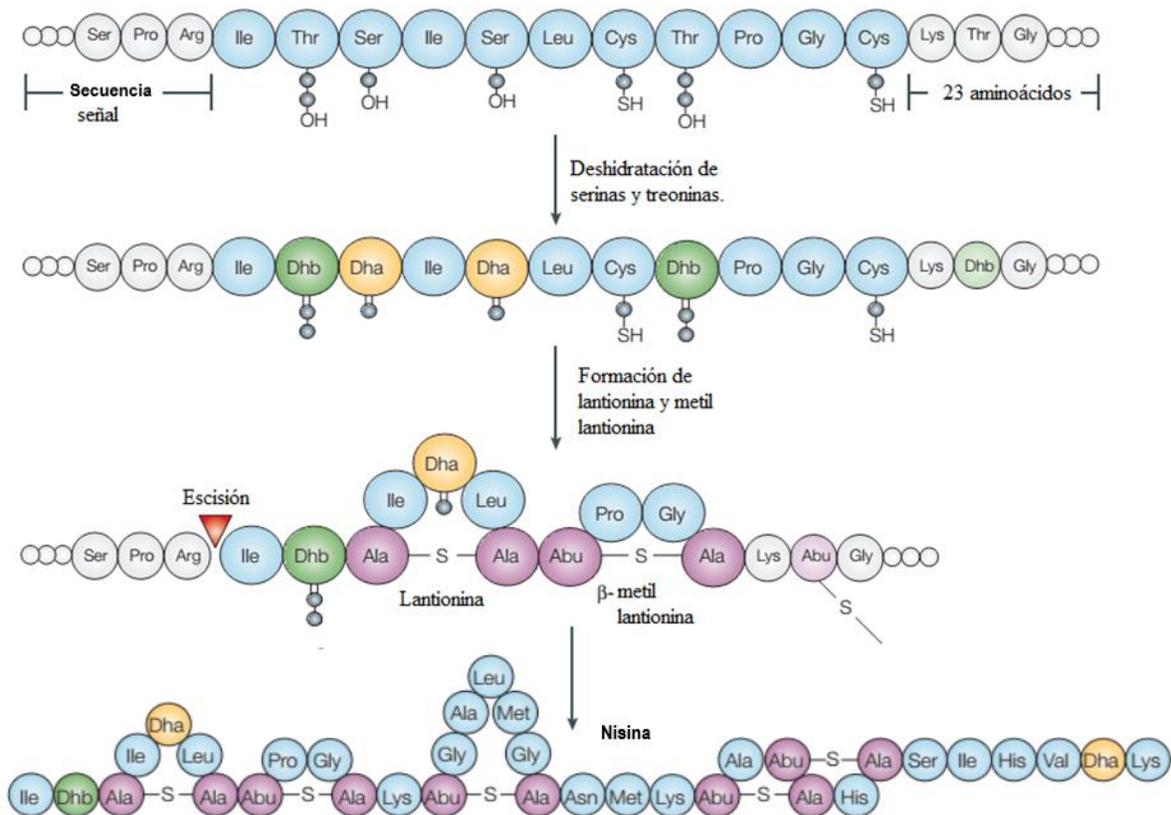


Figura 1. Biosíntesis de lantibióticos.

Abu: aminobutirato. Tomada y modificada de Cotter *et al.* (2005)

Esta clase de bacteriocinas se subdivide en dos grupos, el grupo de lantibióticos elongados, en forma de hélice, catiónicos, anfipáticos y flexibles; mientras que el segundo grupo se caracteriza por ser de configuración generalmente globular y sin carga (Cotter *et al.*, 2005). Esta subclasificación no es suficiente para todas las nuevas bacteriocinas que se han ido descubriendo, por lo que diferentes estudios sugieren que los lantibióticos se pueden subdividir hasta en 12 subclases basados en la naturaleza de las enzimas que utilizan para su modificación o bien, basados en la secuencia que tiene el péptido inactivo antes de ser modificado (Rea *et al.*, 2011).

2.1.2. Clase II. Bacteriocinas sin lantionina.

Estas bacteriocinas poseen alrededor de 30 hasta 70 residuos de aminoácidos (<10 kDa), son estables al calor y originalmente se definen como bacteriocinas no modificadas post traduccionalmente, sin embargo, se ha mostrado que algunas bacteriocinas de esta clase necesitan de formilación o glucosilación en su extremo amino terminal (Nes *et al.*, 2013).

Esta clase se subdivide en 4 diferentes grupos; IIa: bacteriocinas tipo pediocina, IIb: bacteriocinas de doble péptido, IIc: bacteriocinas cíclicas y IId: bacteriocinas de péptidos lineales individuales diferentes de pediocina (Rea *et al.*, 2011).

2.1.2.1. Clase IIa. Bacteriocinas tipo pediocina.

Este tipo de bacteriocina es producido por una amplia variedad de BAL, su microorganismo blanco es *L. monocytogenes* principalmente pero también tiene efecto antimicrobiano en contra de *S. aureus*, *B. cereus* y *C. perfringens* (Rea *et al.*, 2011). Una de las características estructurales que tienen en común es la secuencia consenso del amino terminal KYYGNGL/VXCXKXXCXVDW, que está organizada en una estructura de lámina β antiparalela en forma de S que es estabilizada por un puente disulfuro (Nes *et al.*, 2013). Estos péptidos son sintetizados como prebacteriocina con una señal de doble glicina en el amino terminal y que está involucrada en su proceso de secreción.

2.1.2.2. Clase IIb. Bacteriocinas de doble péptido.

Las bacteriocinas de esta clase están compuestas por dos péptidos con una secuencia de aminoácidos que va de los 15 a 20 residuos cada uno. A pesar de que las secuencias y estructuras de estas bacteriocinas difieren entre sí, tienen un motivo GxxxG presente en cada uno de los péptidos que las componen (Rea *et al.*, 2011).

Como parte de las características que definen a estas bacteriocinas se encuentran las siguientes: se componen por péptidos distintos codificados por genes diferentes, pero localizados de forma adyacente uno del otro; los péptidos de manera individual tienen muy poca o casi nula actividad antimicrobiana, por lo que son necesarios en conjunto para ejercer su actividad de manera completa (Nes *et al.*, 2013).

2.1.2.3. Clase IIc. Bacteriocinas circulares.

El estudio de estas bacteriocinas es menor en comparación con las demás subclases. Su característica principal es la formación del ciclo por unión covalente de sus extremos amino y carboxilo terminales. De manera general se dividen en dos grupos de acuerdo con el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos que compone a las bacteriocinas (Martin-Visscher, 2011).

2.1.2.4. Clase II d. Bacteriocinas de péptidos lineales individuales diferentes de pediocina.

Con relación a esta clasificación, se agrupan las bacteriocinas que no tienen una similitud significativa con las bacteriocinas de las otras subclases. De acuerdo con diferentes investigaciones, esta subclase puede dividirse en tres segmentos: 1) bacteriocinas dependientes del sistema de secreción *sec*; 2) bacteriocinas sin péptido señal; y 3) bacteriocinas no sub-agrupadas (Iwatani *et al.*, 2011).

2.1.3. Bacteriolisinas.

Pese a que se denominaban bacteriocinas de clase III, en la actualidad, ya no se incluyen dentro de las bacteriocinas por las características que describen a estas proteínas: son de alto peso molecular (>30 kDa) (Zacahrof & Lovitt, 2012), su extremo amino terminal tiene homología con endopeptidasas mientras que en su extremo carboxilo terminal se encuentra la función de sitio de reconocimiento del blanco (Cotter *et al.*, 2005).

2.2. Contexto genómico de bacteriocinas.

El contexto genómico de los genes relacionados con la expresión de bacteriocinas se ha definido como un arreglo de operón dentro del genoma bacteriano. Sin embargo, muchos de estos genes se encuentran bajo la regulación de diferentes promotores, lo que técnicamente, no corresponde con la descripción de un operón, así que, la disposición de los genes involucrados en la expresión de bacteriocinas, se da en forma de conjuntos de genes policistrónicos; aunque sí es aceptado el término operón para referirse a la organización de dichos genes (Snyder & Worobo, 2014).

Los conjuntos de genes relacionados con la síntesis de bacteriocinas son complejos, ya que cuentan con genes transcritos divergentemente, codificados en la hebra complementaria de ADN y genes auxiliares codificados en diferentes loci del gen estructural. Generalmente, se componen por el/los genes estructurales, de inmunidad, procesamiento, regulación y transporte (Kotelnikova & Gelfand, 2002; Snyder & Worobo, 2014).

En los conjuntos de genes de bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativo, existe una diferencia en su estructura con respecto a la direccionalidad que tiene el gen de inmunidad (*cxi*) y esto es de acuerdo con el tipo de colicina, formadoras de poros o las que

presentan actividad de nucleasa. Para el primer tipo de colicinas, el gen de inmunidad está codificado en la hebra de ADN complementaria a donde se encuentra el gen estructural (*cxa*); por otra parte, para las colicinas que tienen actividad de nucleasa, el gen de inmunidad es co-transcrito con el gen estructural y se encuentra río abajo del mismo. Al final, para ambos tipos, se encuentra el gen de lisis (*cxl*) que se encarga de iniciar la secreción de la bacteriocina (Figura 2) (Snyder & Worobo, 2014).

Como ejemplo de grupos de genes de bacteriocinas de bacterias Gram positivo, se describen los de la nisina (clase I) y la pediocina PA1 (clase II); el de la nisina está compuesto por 11 marcos de lectura abiertos, dentro de los cuales destacan: *nisA*, gen estructural; *nisB* y *nisC*, enzimas de modificación; una proteína de transporte, *nisT*; el gen de la proteína de inmunidad, *nisI*, así como *nisF*, *nisE* y *nisG* (Figura 2) (Kotelnikova & Gelfand, 2002).

En el caso de la pediocina PA1, por ser bacteriocina de clase II, su operón se conforma por menos genes ya que no se necesita un procesamiento post-traducciona. Aquí, *papA*, es el gen estructural; *papB*, codifica a la proteína de inmunidad y se encuentra contiguo y río abajo del gen estructural; *papC*, codifica la peptidasa encargada de escindir el péptido señal y *papD*, del sistema de secreción (Figura 2) (Snyder & Worobo, 2014)

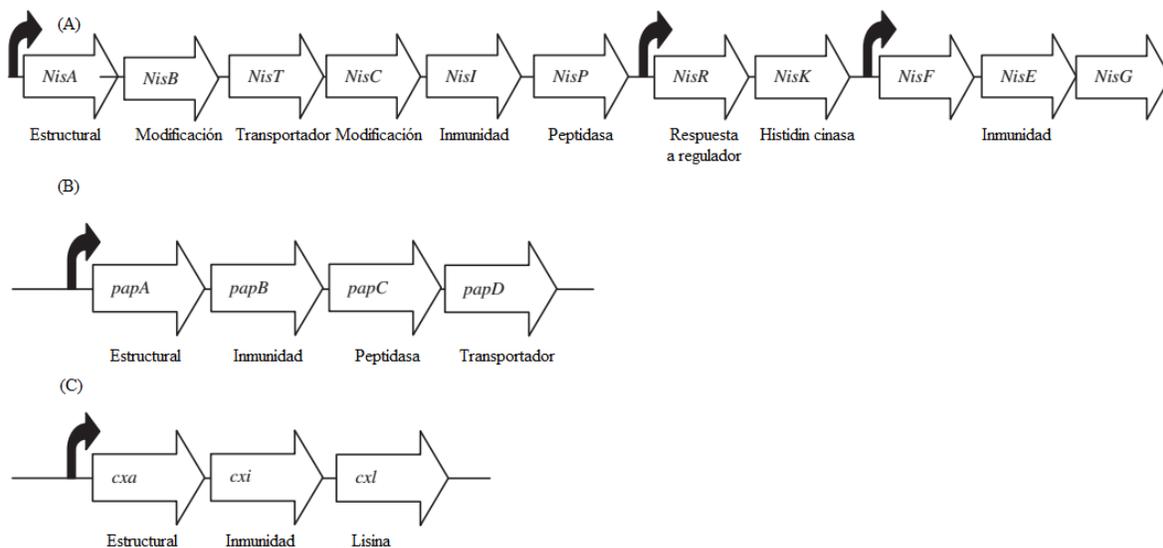


Figura 2. Operones de diferentes bacteriocinas.

(A) Operón de la nisina; (B) Operón de la pediocina PA1; (C) Operón de la colicina. Tomado y modificado de Snyder & Worobo (2014).

2.3. Mecanismo de acción.

La mayor parte de las bacteriocinas tienen efecto sobre la membrana celular de las bacterias Gram positivo, forman poros a través de la interacción con componentes de la membrana o intervienen en la síntesis de pared celular. En la Figura 3 se presenta un esquema representativo en el que se pueden apreciar, de manera general, los diferentes mecanismos de acción de las bacteriocinas. Se observa que para el caso de las bacteriocinas clase I, la nisina como ejemplo, tienen como blanco al lípido II cuya función es transportar las subunidades de peptidoglucano en la síntesis de la pared celular y se encuentra embebido en la membrana celular.

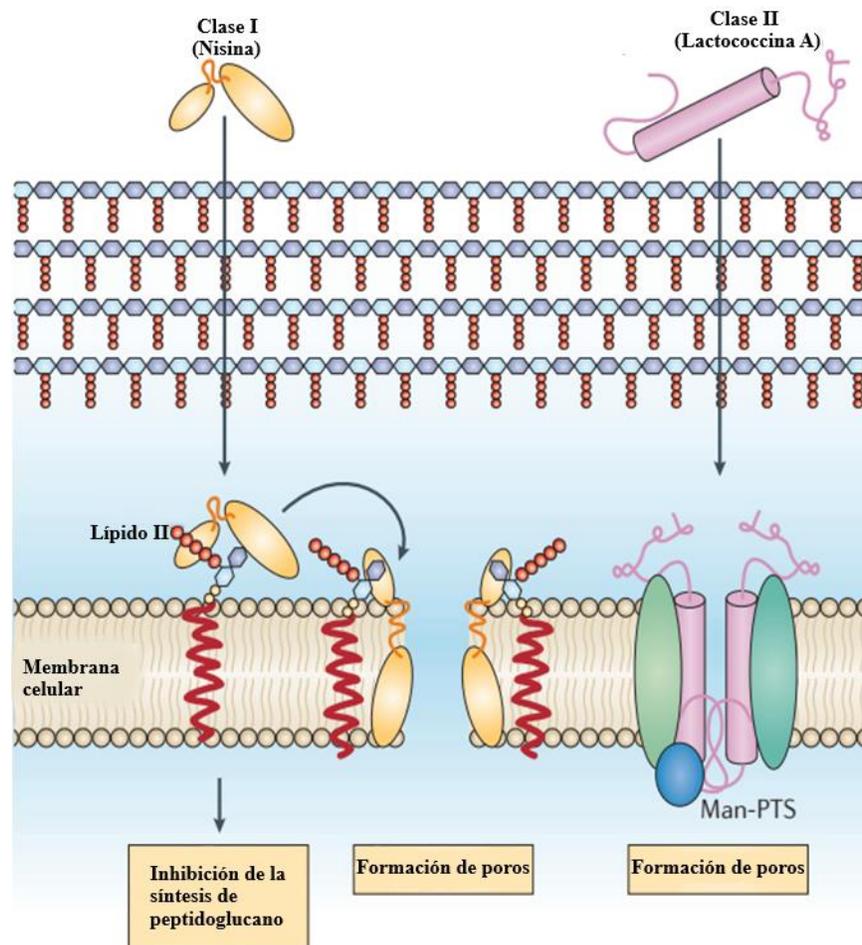


Figura 3. Esquema de los mecanismos de acción de las diferentes clases de bacteriocinas. Tomada y modificada de Cotter *et al.* (2013).

Las bacteriocinas de clase I tienen un mecanismo dual que involucra, en ambos casos, la unión de estos péptidos con el lípido II. En primer lugar, la unión de la bacteriocina con la

molécula mencionada tiene como consecuencia la inhibición de la síntesis de la pared celular y cuando hay un aumento de la concentración de la bacteriocina se lleva a cabo la formación de poros sobre la membrana celular del microorganismo blanco (Kuipers *et al.*, 2011).

Con respecto a las bacteriocinas de clase II, éstas pueden llegar a la membrana ya que su estructura es anfifílica, provocan un cambio en su polarización y ocasionan la muerte celular. En contraste, dentro de la misma clase existen bacteriocinas (lactococcina A) que se unen al receptor de manosa del sistema fosfotransferasa y forman poros (Man-PTS, por sus siglas en inglés) (Cotter *et al.*, 2013).

Por otra parte, el mecanismo de acción que siguen las bacteriocinas en contra de microorganismos Gram negativo difiere del descrito en contra de los Gram positivo. En la Figura 4, se muestra de manera esquemática el mecanismo que siguen las microcinas, bacteriocinas sintetizadas por miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

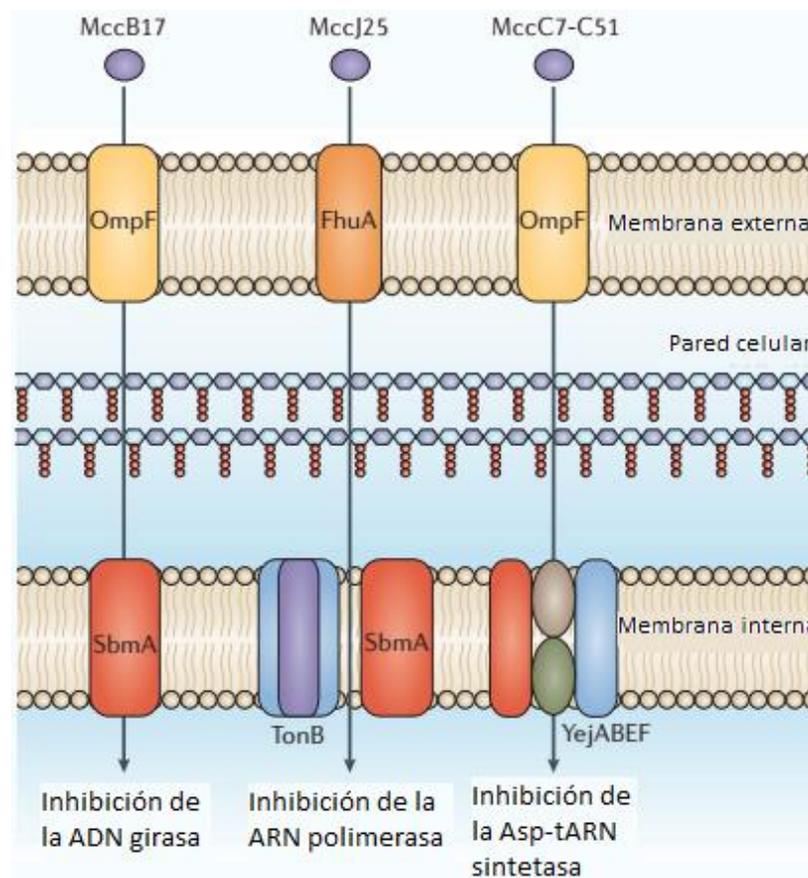


Figura 4. Mecanismo de acción de las microcinas. Tomada y modificada de Cotter *et al.*, (2013).

Estas bacteriocinas, necesitan de porinas que les ayudan a pasar a través de las membranas celulares externa e interna, una vez adentro de la célula, afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos y de proteínas.

La actividad bactericida de la bacteriocina MccB17 aún no ha sido dilucidada por completo, sin embargo, hay estudios que señalan que esta bacteriocina tiene la capacidad de estabilizar el complejo que se forma entre la girasa de ADN, encargada de liberar el superenrollamiento positivo durante la replicación de ADN, y el ADN de doble cadena a través de la interacción por puentes de hidrógeno entre residuos de la bacteriocina y residuos en la enzima (Parks *et al.*, 2007).

La microcina J25 obstruye el canal secundario de la ARN polimerasa, esto impide el proceso de transcripción y tiene como consecuencia la muerte celular del microorganismo blanco. Con respecto a MccC7-C51, una vez dentro de la célula, es modificada por una de las diferentes aminopeptidasas que se encuentran en el citoplasma de la célula para generar aspartil-adenilato modificado, compuesto que inhibe a la aspartil-ARNt sintetasa, lo que da lugar a la inhibición de la síntesis de ARNm (Vincent & Moreno, 2009) (Cotter *et al.*, 2013).

2.4. Inmunidad.

Las bacterias que producen bacteriocinas han desarrollado un sistema de protección en contra de su propia bacteriocina, a este proceso se le denomina inmunidad. De manera general, para cada bacteriocina hay una proteína de inmunidad específica; estas proteínas también son de tamaño pequeño (51 – 151 aminoácidos) y se expresan de manera concomitante con la bacteriocina (Nes *et al.*, 1996).

Además de la proteína de inmunidad, se ha demostrado que el sistema de transportador ABC, así como proteínas que pertenecen a la familia Abi forman parte del mecanismo de inmunidad desarrollado por los microorganismos productores de bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005; Kjos *et al.*, 2010). Para las bacteriocinas de clase I, el mecanismo de inmunidad está dado por un transportador ABC (LanFEG) y por la correspondiente proteína de inmunidad (LanI; LanH) para cada lantibiótico (Cotter *et al.*, 2005) (Tabla 2).

Tabla 2. Inmunidad asociada a diferentes lantibióticos.

Lantibiótico	Cepa productora	Clase de lantibiótico	Inmunidad
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	Clase I	NisFEG, NisI
Subtilina	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	Clase I	SpaFEG, SpaI
Ericina	<i>Bacillus subtilis</i> A1/3	Clase I	EriFEG, EriI
Epidermina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Clase I	EpiFEG, EpiH
Galidermina	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Clase I	GdmFEG, GdmH
Pep5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Clase I	PepI
Epicidina	<i>Staphylococcus epidermidis</i> BN280	Clase I	EciI
Epilancina	<i>Staphylococcus epidermidis</i> K7	Clase I	ElxI
Lacticina 481	<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ 481	Clase II	LctFEG
Mutacina II	<i>Streptococcus mutans</i> T8	Clase II	MutFEG
Nukacina ISK-1	<i>Staphylococcus warneri</i> ISK-1	Clase II	NukFEG, NukH
Lactocina S	<i>Lactobacillus sakei</i> LA5	Clase II	LasJ
Lacticina 3147	<i>Lactococcus lactis</i> DPC3147	Clase II	Ltn FEG, LtnI
Mersacidina	<i>Bacillus</i> spp. cepa HIL	Clase II	MrsEFG

Tabla tomada de Alkhatib *et al.*, (2012)

Los transportadores ABC se constituyen por 4 dominios, 2 dominios hidrofóbicos que se localizan en la membrana (LanEG) y son los que se encargan de llevar a cabo la exportación del correspondiente lantibiótico hacia el medio extracelular; y 2 dominios que se encuentran en la región citosólica (LanF) encargados de la hidrólisis de ATP necesario para realizar su función (Alkhatib *et al.*, 2012).

El mecanismo que realiza LanI para conferir inmunidad a la cepa productora de bacteriocinas no se conoce con exactitud, sin embargo, se reporta que esta proteína se localiza en la membrana celular y se propone que interacciona con la bacteriocina a través de su extremo carboxilo terminal y/o que ayuda a la exportación de la bacteriocina a través del sistema LanFEG. Es importante señalar que, a pesar de la existencia de cooperatividad entre LanFEG y LanI para proporcionar inmunidad (Figura 5), es LanI la proteína que contribuye en mayor medida en la inmunidad del productor (Alkhatib *et al.*, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

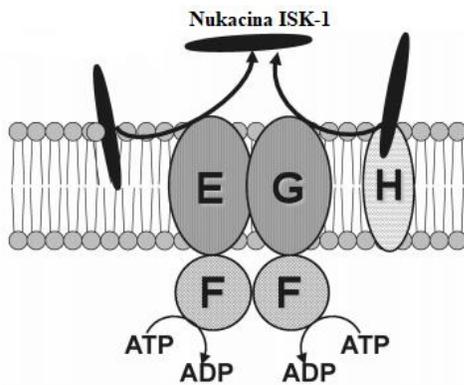


Figura 5. Esquema del mecanismo de inmunidad para la nukacina ISK-1. Tomada y modificada de Nishie *et al.*, (2012).

En el caso de las bacteriocinas de clase II (a y d), se ha demostrado que su blanco es el sistema de fosfotransferasa de manosa (Man-PTS). El sistema Man-PTS está compuesto por EI y HPr encargados de donar grupos fosfato. Sin embargo, el componente clave del Man-PTS es el complejo EII ya que proporciona la especificidad por carbohidratos.

EII a su vez, se constituye por 4 subunidades: IIA y IIB que se localizan hacia el citosol y que por lo general se encuentran como una sola proteína; mientras que IIC y IID son subunidades transmembranales que forman un canal de translocación específico de carbohidratos. Las subunidades IIC y IID son el receptor de la bacteriocina mientras que IIA y IIB son indispensables para un correcto funcionamiento del receptor (Figura 6) (Kjos *et al.*, 2011).

La lactococcina A es una bacteriocina clase IId cuya proteína de inmunidad asociada se denomina LciA. Una vez que la lactococcina A entra en contacto con las subunidades IIC y IID del Man-PTS, la proteína LciA interacciona con el complejo ya formado para bloquear la formación del poro y así evitar la muerte de la cepa productora (Kjos *et al.*, 2011); Nishie *et al.*, 2012).

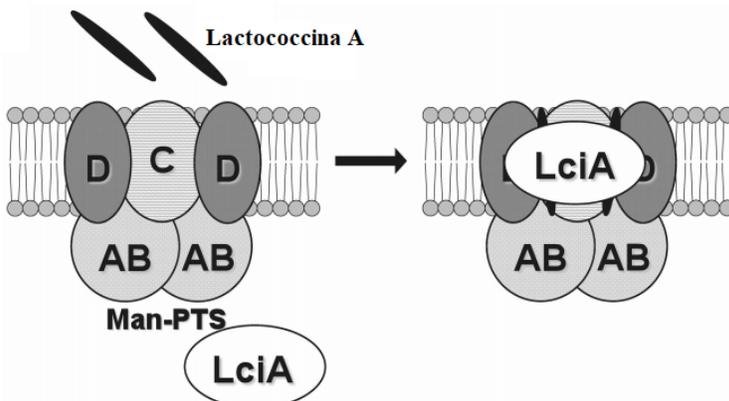


Figura 6. Mecanismo de inmunidad de la lactococcina A. Tomada y modificada de Nishie *et al.*, 2012.

Para bacteriocinas de clase IIB, se ha demostrado que proteínas de la familia de proteasas CAAX o familia de proteínas Abi tienen un papel importante en la inmunidad contra dichas bacteriocinas. Las proteasas CAAX tienen 3 dominios altamente conservados, que en eucariontes tienen actividad proteolítica, pero se desconoce cuál es su función en los procariontes. Se ha demostrado que dichos dominios son necesarios para conferir inmunidad en contra de las bacteriocinas; también, se ha observado que, al contrario de las proteínas de inmunidad asociada a una bacteriocina, las proteínas CAAX confieren inmunidad cruzada, es decir, confieren inmunidad no solo contra una bacteriocina específica (Kjos *et al.*, 2010; Kjos *et al.*, 2011).

2.5. Sistema de secreción.

La síntesis de bacteriocinas da como resultado la formación de pre-péptidos biológicamente inactivos que contienen una secuencia señal en su extremo amino terminal. Esta secuencia sirve como reconocimiento para que el sistema de secreción exporte a la bacteriocina; dicho sistema por lo general consiste en una proteína específica que pertenece a la superfamilia de los transportadores ABC que reconocen la secuencia característica del péptido señal de doble glicina (Nes *et al.*, 1996; Cotter *et al.*, 2005).

Por otro lado, y con menor frecuencia, existen bacteriocinas que no tienen un péptido señal de doble glicina, sino que tienen un péptido señal que es reconocido por la translocasa Sec que se encuentra en la membrana citoplasmática, lo que hace que su secreción sea dependiente de este sistema (Herranz & Driessen, 2005).

2.6. Producción y aplicaciones de las bacteriocinas.

Uno de los factores que limitan el uso de las bacteriocinas en aplicaciones comerciales es su alto costo de producción como consecuencia de los medios complejos necesarios para el crecimiento de las bacterias (por ejemplo, las ácido-lácticas) que las producen; a esto se suma la baja concentración que se obtiene de estos péptidos con los microorganismos productores nativos.

Por esto, la exploración de la producción de bacteriocinas se ha dirigido hacia la utilización de sistemas microbianos recombinantes. Sin embargo, la producción de bacteriocinas por

estos métodos depende de muchos factores y de manera fundamental lo son los vectores y cepas de clonación/expresión (Cintas *et al.*, 2011).

Entre los distintos sistemas de expresión que se pueden utilizar, los niveles de producción de proteína más altos se obtienen cuando se utiliza a *E. coli*, y a pesar de que se tienen diferentes desventajas al utilizar este microorganismo, ya se han producido bacteriocinas utilizando una cepa adecuada de dicha bacteria. No obstante, la alta producción de la bacteriocina no es el único parámetro que se debe considerar, también se debe considerar la obtención del péptido con una actividad similar o incluso más alta que cuando se produce por la cepa productora natural (Cintas *et al.*, 2011).

En la actualidad, las bacteriocinas tienen diferentes aplicaciones dentro de la tecnología de alimentos, farmacéutica, clínica y terapéutica. De las principales ventajas que tienen estos péptidos con actividad antimicrobiana, se encuentra el hecho de que son producidos por microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) y por su naturaleza proteínica, pueden ser degradadas por enzimas proteolíticas, lo que no permite que permanezcan por tiempo prolongado en el organismo que las ingiera (Perez *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014).

Dentro de la industria de alimentos, existen diferentes compañías que comercializan bacteriocinas (Benmechernene *et al.*, 2013) (Tabla 3).

Tabla 3. Bacteriocinas comerciales y sus aplicaciones.

Compañía	País	Bacteriocina	Bacteria blanco	Aplicaciones	Expresión (Vectores utilizados)
Danisco A/S	Dinamarca	Nisina A (<i>L. lactis</i>)	<i>Listeria</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. BAL	Productos lácteos Panificación Bebidas Delicatessen	No disponible
		Sakacina G (<i>L. sakei</i>)		Productos cárnicos frescos y cocidos	pGEM pZERO2 pBluescript SK+
Kerry Biosciences	Irlanda	Pediocina PA-1 (<i>P. acidilactici</i>)	<i>L. monocytogenes</i>	Productos cárnicos	No disponible
Chr. Hansen A/S	Dinamarca	Pediocina Sakacina A	<i>L. monocytogenes</i>	Cultivo iniciador en salchichas	No disponible
Handary	Holanda	Nisina Z Nisina A	<i>Listeria</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. <i>B. cereus</i>	Productos lácteos Panificación Bebidas Delicatessen Carne	No disponible
		Pediocina A Pediocina P		Nutracéuticos Panificación Bebidas Productos lácteos Carne	

Tomada y modificada de Benmechrene *et al.*, (2013).

También se ha hecho uso de bacteriocinas en el área clínica (Montalbán-López *et al.*, 2011) (Tabla 4).

Tabla 4. Aplicación de bacteriocinas en el área clínica.

Aplicación	Bacteriocina	Actividad
Microorganismos resistentes a antibióticos	Nisina	Inductor de lisis de <i>Enterococcus</i>
		Anti <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilicina (MRSA)
	Lacticina 3147	Anti MRSA y <i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina (VRE)
	Mutacina 1140	
Úlceras pépticas	Nisina	Anti <i>H. pylori</i>
	Mutacina B-Ny266	
Ginecología	Nisina	Anti <i>G. vaginalis</i>
	Subtilosina A	
Anticoncepción	Nisina	Espermicida
	Lacticina 3147	
Odontología	Nisina	Anti <i>S. mutans</i>
	Lacticina 3147	Tratamiento de gingivitis

Tabla 4. Aplicación de bacteriocinas en el área clínica. (Continuación)

Aplicación	Bacteriocina	Actividad
Piel y tejidos blandos	<i>Lactococcus</i> spp. HY499	Anti <i>P. acnes</i> , <i>S. aureus</i> y <i>Pseudomonas</i> spp.
	Enterocina ESL5	Anti <i>P. acnes</i>
	Enterocina AS-48	Prevención y tratamiento de la mastitis
	Nisina	
	Lacticina 3147	
Tuberculosis	Nisina	Anti <i>Mycobacterium</i>
	Lacticina 3147	
	BacST194BZ	
Antiviral	Enterocina CRL35	Antivirus del herpes simple
Antifúngico	Pentocina TV35b	Anti <i>Candida</i>
	BacTN635	
	Nisina	
Fibrosis quística	Duramicina	Restablecimiento de nivel de iones

Tomada y modificada de Montalbán-López *et al.*, (2011). En la referencia se pueden encontrar las diferentes publicaciones de donde se tomaron los ejemplos.

Todas las aplicaciones mencionadas, en diferentes campos, promueve la investigación acerca de estos compuestos. Así mismo, la generación de conocimiento e innovaciones ha dado origen a patentes en donde se utilizan bacteriocinas (Tabla 5).

Tabla 5. Patentes que involucran la aplicación de bacteriocinas.

Patente	Inventores	Fecha de publicación	Título
US20110053832A1	Antoniewski <i>et al.</i>	2011/03/03	Composición antimicrobiana natural
US7960505	O'Sullivan y Lee	2011/06/14	Lantibióticos y sus usos
US20110177218A1	Visser y Haan de Ben	2011/07/21	Soluciones líquidas de nisina
US20110257078A1	Young y Thomas	2011/10/20	Combinación de terapia antibacteriana para el tratamiento de infecciones bacterianas (Gram positivo)
US20110269671A1	Cotter, Hill y Field	2011/11/03	Derivados de nisina y sus usos
US20110236359A1	Lacroix y Millete	2011/09/29	Actividad antimicrobiana de bacterias ácido-lácticas productoras de bacteriocinas
EP2415858A1	Isawa y Kamijo	2012/02/08	Método para el cultivo de una bacteria ácido-láctica y método para la producción de leche fermentada
WO2011134998A8	Miller	2011/12/15	Método para reducir biopelículas

Tomada y modificada de Benmechrene *et al.*, (2013)

3. Antecedentes del grupo de trabajo.

En el grupo de trabajo se ha estudiado el queso Cotija como una fuente de investigación con mucho potencial biotecnológico. Esto se debe a que es un alimento lácteo madurado artesanal elaborado con leche no pasteurizada, con propiedades organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas particulares.

El desarrollo de la microbiota en cada etapa del proceso, pero principalmente en la maduración, repercute en la inocuidad microbiológica del alimento. Además, el metabolismo de la microbiota es responsable de la generación de una serie de metabolitos, enzimas, péptidos, etc. que no sólo se investigan para conocer el papel que desempeñan en la matriz alimentaria, sino que podrían poseer una potencial aplicación biotecnológica.

Como parte de la caracterización de las BAL presentes en el queso, se han encontrado los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Marinilactibacillus* (Bravo Mendoza, 2008; Cortés Díaz, 2009; Zuñiga Bustos, 2009) sin embargo, sólo se han podido aislar miembros del género *Enterococcus* y *Weisella* (Zuñiga Bustos, 2009; Castañeda Reyes, 2017).

Con respecto a las bacteriocinas, sólo en una ocasión se ha logrado identificar alguna. Tal caso fue el de Olvera-García (2013), trabajo que investigó el papel que desarrollan cepas de *Enterococcus* en el queso Cotija; se buscaron diferentes genes relacionados con factores de virulencia, peptidoglucanohidrolasas y bacteriocinas. El resultado que se obtuvo para los genes de las bacteriocinas fue positivo para el gen *entA* que codifica para la enterocina A. Mismo que demostró tener actividad en contra de *M. lysodeikticus* y *L. innocua*.

Como antecedente directo del presente trabajo, se encuentra el de Escobar-Zepeda (2016), cuyo análisis bioinformático del metagenoma bacteriano obtenido del queso Cotija, con tres meses de maduración, le permitió detectar, entre otras cosas, que los géneros dominantes fueron *Lactobacillus*, *Weisella* y *Leuconostoc*.

En relación con la información correspondiente a las bacteriocinas, se encontraron 43 contigs con al menos un gen con anotación para una bacteriocina y fueron 19 los que contaban tanto con el gen que codifica la bacteriocina, como con el gen que codifica para la proteína que le confiere inmunidad. Sin embargo, no se ha investigado si en efecto, los marcos de lectura

abiertos encontrados, codifican una proteína funcional activa puesto que solo se han anotado como bacteriocinas putativas.

4. Justificación.

Con el paso de los años, el auge de los estudios del metagenoma de diferentes nichos ecológicos ha ido aumentando, ya que estos proporcionan información invaluable acerca de la composición poblacional de los mismos sin la necesidad de buscar condiciones óptimas para su desarrollo en el laboratorio.

Así mismo, se puede investigar el potencial metabólico y de síntesis de proteínas específicas por el consorcio microbiano o por alguno de sus miembros.

Este grupo de trabajo es el primero en explorar la información del metagenoma del consorcio microbiano de un alimento fermentado tradicional mexicano, el queso Cotija. Esto nos da la pauta para buscar bacteriocinas a partir del metagenoma, determinar si ejercen actividad antagónica en contra de microorganismos patógenos de importancia en alimentos y analizar su función en la matriz alimentaria, así como una posible aplicación fuera de ésta.

5. Hipótesis.

Los marcos de lectura abiertos que codifican para bacteriocinas putativas encontrados en el metagenoma del queso Cotija, permitirán obtener bacteriocinas funcionales con actividad antagónica en contra de *Listeria monocytogenes*.

6. Objetivo(s).

6.1. General.

Obtener bacteriocinas funcionales a partir de la clonación y expresión de marcos de lectura abiertos con anotación de bacteriocinas, seleccionados a partir de la información metagenómica del queso Cotija.

6.2. Particulares.

- Analizar bioinformáticamente y seleccionar los marcos de lectura abiertos anotados como codificantes de bacteriocinas putativas.
- Clonar y expresar los marcos de lectura abiertos seleccionados.
- Identificar la actividad inhibitoria contra bacterias de interés en alimentos, así como la concentración mínima inhibitoria de los péptidos recombinantes en contra de *Listeria monocytogenes*.

7. Metodología.

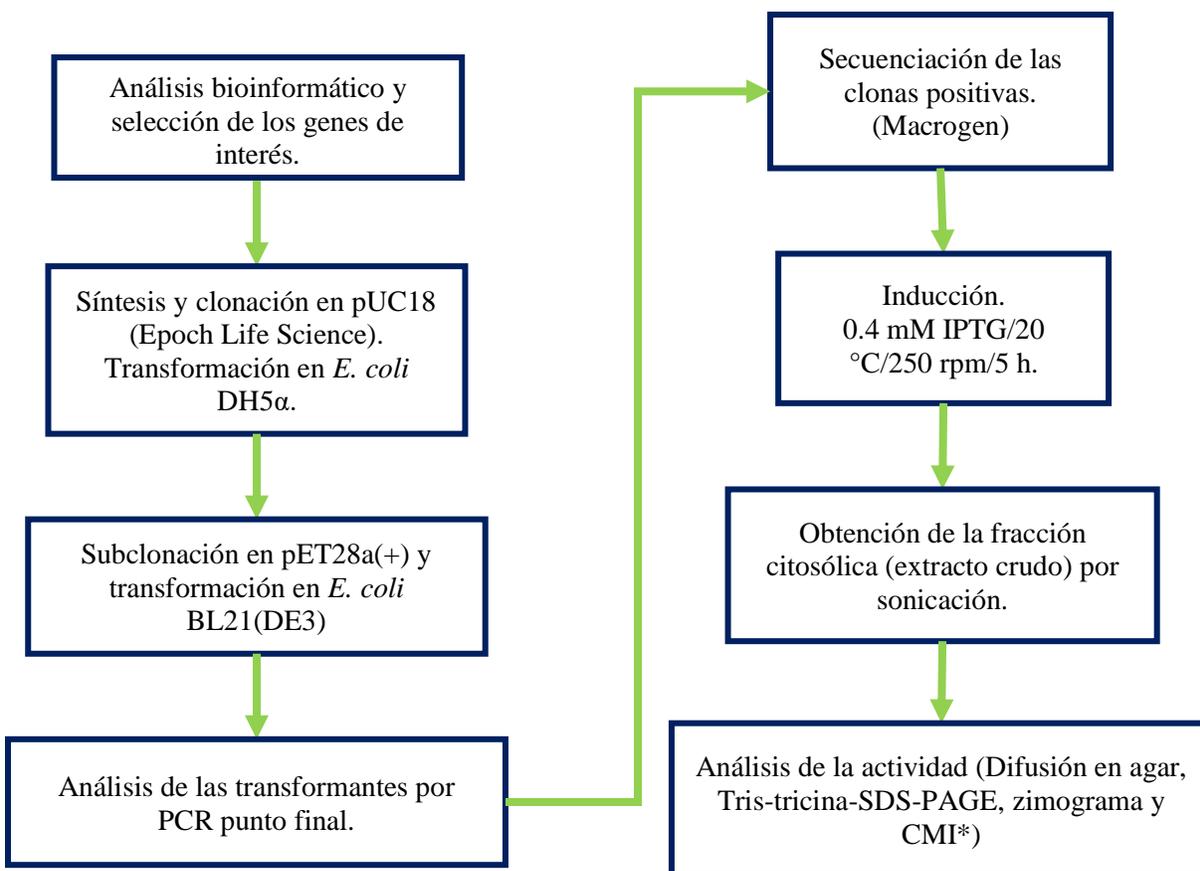


Figura 7. Diagrama general de trabajo.

*(Concentración Mínima Inhibitoria)

7.1. Obtención *in silico* de secuencias candidato codificantes para bacteriocinas (Escobar-Zepeda, 2016).

A partir del ADN metagenómico extraído de la mezcla de 25 muestras de quesos Cotija, se construyó una sola biblioteca tipo shotgun, misma que se secuenció en un equipo HiSeq2000 con configuración pareada de 100 ciclos por lado a partir de fragmentos de ~500 pares de bases (pb).

Se realizó la reconstrucción de fragmentos genómicos con el ensamblador de metagenomas IDBA_UD v1.1.1 (Peng *et al.*, 2012); sobre esta reconstrucción se llevó a cabo la predicción de secuencias codificantes usando MetaGeneMark v2.1.0 (Zhu *et al.*, 2010) y con las secuencias traducidas a aminoácidos se hizo la anotación por homología contra las bases de datos de Swiss-Prot mediante blastp v2.2.28+ (Camacho *et al.*, 2009) y Pfam-A usando

extrapolación de Modelos Ocultos de Markov con el programa HMMER v3.1b1 (Eddy, 2011).

La información resultado del análisis bioinformático anterior contiene los 43 contigs con genes anotados con diferente funcionalidad en los cuales se hizo un escrutinio para seleccionar los marcos de lectura abiertos de interés de acuerdo con los siguientes criterios: 1) la disposición de los genes con anotación de proteína de inmunidad y de bacteriocina; ambos genes deben encontrarse consecutivos, en un mismo contig y 2) no tener similitud, a nivel de secuencia, con alguna bacteriocina conocida y estudiada con anterioridad.

7.2. Síntesis de los genes.

Los genes seleccionados fueron sintetizados por Epoch life science, Inc. y clonados en el vector pUC18 (100 ng/ μ L). En el extremo 5' de cada una de las secuencias se encuentra el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI, por otro lado, en el extremo 3' se encuentra el sitio de reconocimiento de la enzima HindIII.

7.3. Células competentes y transformantes de *E. coli* DH5 α .

Las células competentes se obtuvieron de la siguiente manera:

Se realizó un pre-inóculo de la cepa de *E. coli* DH5 α en 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB) a 200 rpm a 37 °C durante toda la noche. Después, se tomaron 500 μ L del pre-inóculo y se colocaron en un matraz con 50 mL de caldo LB y fue incubado a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀= 0.1 – 0.25. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 10016 g, el sobrenadante fue desechado, y el paquete celular se resuspendió en 15 mL de CaCl₂ 100 mM frío para después ser incubado en hielo durante 30 minutos. Pasado el tiempo, el cultivo se centrifugó a 10016 g, el sobrenadante fue desechado, y el paquete celular se resuspendió con 2 mL de CaCl₂ 50 mM frío y se incubó en hielo durante al menos 2.5 h. Finalmente, para su conservación, se adicionó glicerol en una concentración final de 15 % (v/v) y se almacenaron a -70 °C.

La transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α con cada una de las construcciones se detalla a continuación:

En microtubos diferentes, fueron agregados 5 μ L de cada construcción y 50 μ L de células competentes, la mezcla se incubó en hielo durante 30 min, pasado el tiempo, los microtubos

fueron transferidos a un baño de agua a 42 °C por 2 minutos, después, la mezcla fue incubada en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, a la mezcla de transformación, se le adicionó 1 mL de caldo LB para recuperar las células y fue incubada a 37 °C a 200 rpm por 2 h. La mezcla se centrifugó a 5024 g, el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron con 200 µL de caldo LB para después plaquearlas en cajas de agar LB con ampicilina (100 µg/mL). Dichas cajas se incubaron a 37 °C toda la noche y se seleccionaron colonias al azar, éstas se inocularon en tubos con 10 mL de LB con ampicilina (100 µg/mL) y se dejaron a 37 °C a 200 rpm durante 14-16 h. Por último, se realizó la extracción de plásmido a las colonias seleccionadas con ayuda del kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific).

7.4. Reacción de digestión.

Con el propósito de verificar que las colonias seleccionadas tenían la construcción correspondiente, se realizó una digestión doble con las enzimas de restricción BamHI (Promega®) y HindIII (Thermo Fisher Scientific) con el Buffer R proporcionado con la enzima HindIII bajo las siguientes condiciones y cantidades:

En un tubo de 0.2 mL se adicionó 1 µg de plásmido, 1 µL de enzima BamHI, 2 µL de enzima HindIII, 2 µL de buffer R y se llevó a un volumen de 20 µL con agua libre de nucleasas. La mezcla de reacción se colocó a 37 °C por 2 h seguido de 20 min a 80 °C para desactivar las enzimas. Se elaboró un gel al 1 % (m/v) de agarosa para poder analizar la mezcla de la digestión y observar la presencia del plásmido y el inserto, que fue escindido del gel. Cada uno de los insertos fue purificado con ayuda del kit GeneJET Gel extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) para después, ser ligados al vector de expresión.

7.5. Reacción de ligación.

La reacción de ligación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor de la enzima T4 ADN Ligasa (Thermo Fisher Scientific) con una relación 3:1, en donde la concentración del vector pET28a(+) fue de 50 ng. Se agregaron en el tubo de reacción 50 ng de ADN, 1 U de la ligasa, 2 µL del buffer de ligasa 10X, el inserto 3:1 y se llevó a un volumen final de 10 µL con agua libre de nucleasas, la mezcla de reacción se incubó a 22 °C durante 30 min para la construcción pET28a(+)-contig-295 o por 5 h para la construcción pET28a(+)-contig-14178 y la inactivación de la enzima se realizó a 70 °C por 5 minutos.

El siguiente paso fue transformar a *E. coli* BL21(DE3) con el producto de ligación de acuerdo con el punto 7.2.

7.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para confirmar que las cepas transformantes tenían el inserto deseado en el plásmido de interés, se realizó la reacción de PCR con los cebadores T7 universales. En las tablas 6 y 7 se muestran los reactivos, cantidades y condiciones en las que se realizó el ensayo.

Tabla 6. Composición de reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad (μL)
Agua libre de nucleasas	18.75
Amortiguador Pfu•MgSO ₄ 10X	2.50
dNTP's	0.50
Cebador T7 promotor*	1.00
Cebador T7 terminador*	1.00
Pfu polimerasa	0.25
ADN molde	1.00
Volumen por reacción	25.00

*La secuencia de los cebadores utilizados está reportada en el manual pET system de Novagen y son las siguientes:

T7 promotor:

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

T7 terminador:

5'-CCGCTGAGCAATAACTAGC-3'

Tabla 7. Condiciones del termociclador para la PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
Desnaturalización inicial	95	5
Desnaturalización	95	0.5
Alineamiento	55	0.5
Extensión	72	4
Extensión final	72	10

Las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión se repiten por 35 ciclos.

A las clonas que mostraron tener el inserto de interés, se les realizó extracción de plásmido para ser secuenciados por Macrogen, Inc. (Seúl, Corea)

7.7. Inducción.

Una vez que se confirmó que cada una de las secuencias de las clonas seleccionadas no tuvo cambio alguno en su secuencia, se procedió a realizar inducciones de estas de acuerdo con el Manual pET System.

Se hizo un pre-inóculo de las clonas que contenían cada una de las construcciones, así como de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con y sin pET28a(+) en caldo LB con kanamicina (30 μg/mL; para las cepas que lo requieran) a 37 °C por 12 h a 250 rpm. Por otra parte, para

cada cepa se prepararon 50 mL de caldo LB más kanamicina (donde se requiera), y fueron inoculados con 500 μ L del pre-inóculo correspondiente e incubados a 37 °C a 250 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.5-1.0; alcanzada la DO adecuada, se adicionó isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en una concentración final de 0.4 mM y los matraces se incubaron a 20 °C a 250 rpm durante 5 h.

Pasado el tiempo de incubación, cada uno de los cultivos se centrifugó a 10016 g por 15 min (Biofuga PrimoR Heraeus), el sobrenadante fue desechado y el paquete celular se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 hasta llegar a una DO_{600} de 2 - 2.5. Dicha suspensión se sonicó (Sonic Dismembrator F550 Ultrasonic Homogenizer) con pulsos de 20 s y 20 s de reposo durante 7 min a 4 °C. Después de sonicar, se centrifugó a 34895 g (Beckman Coulter J2-MC) por 20 min a 4 °C y posteriormente, el sobrenadante se separó y fue filtrado con una membrana de 0.22 μ m; a esta fracción se le denominó fracción citosólica (extracto crudo).

7.8. Ensayo de difusión en agar.

Este ensayo se realizó para evaluar si la fracción citosólica tenía algún efecto antagonista en contra del crecimiento de *L. monocytogenes* y se realizó de la siguiente manera:

Primero, se preparó un pre-inóculo del microorganismo de prueba en 5 mL de caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón; BHI por sus siglas en inglés) y se incubó a 37 °C por 8 h. Por otra parte, se vertieron 20 mL de BHI con agar al 1.0 % (m/v) en cajas de Petri; posterior al tiempo de incubación del pre-inóculo, se hizo una dilución 1:100 del mismo en solución salina 0.85 % (m/v) estéril y de ésta se tomaron 800 μ L que se agregaron a 9.2 mL del medio BHI con agar 0.8 % (m/v).

Finalmente, los 10 mL se vertieron encima de la primera capa de agar. Una vez solidificado el medio, se realizaron pozos en el agar con la parte superior de una punta P1000 para después colocar 200 μ L de la fracción a evaluar e incubar las cajas a 37 °C por 12 h. Como control positivo se utilizó Nisaplin® y como controles negativos se utilizaron los extractos de *E. coli* BL21(DE3) con y sin vector de expresión (pET28a(+)). Este procedimiento se realizó con los extractos crudos y liofilizados.

Pasado el tiempo de incubación, se observa la presencia/ausencia de halos de inhibición alrededor de cada uno de los pozos.

7.9. Geles de Tris-Tricina-SDS-PAGE y zimogramas contra *L. monocytogenes*.

Por el peso esperado de los péptidos (< 15 kDa), se realizaron este tipo de geles, los cuales permiten una mejor resolución (Schägger & von Jagow, 1987). En la Tabla 8 se muestran los reactivos y cantidades en que fueron utilizados para realizar los geles.

Tabla 8. Composición de Tris-Tricina-SDS-PAGE.

Reactivo	Gel separador (16 % v/v) (mL)	Gel concentrador (4 % v/v) (mL)
Agua destilada	0.197	1.850
Glicerol 80 % (v/v)	0.895	-
Amortiguador del gel	2.830	0.744
Acrilamida	4.530	0.389
Persulfato de amonio (APS)	0.043	0.016
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	0.006	0.002
Volúmen final	8.500	3.000

Como marcador de peso molecular se utilizó el polipéptido de Bio-Rad. Se corrió el gel a 80 V a 4 °C por 7 h. El gel se tiñó con azul de Coomassie G250 y se destiñó con solución desteñidora (Metanol 40 % (v/v)/Ácido acético 10% (v/v)) hasta observar bandas.

Los zimogramas son geles de Tris-Tricina-SDS-PAGE, pero con células del microorganismo de interés embebidas en el gel. Para obtener las células de *L. monocytogenes*, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se preparó un pre-inóculo del microorganismo en 5 mL de caldo BHI y fue incubado a 37 °C por 8 h. Después de la incubación, los 5 mL de pre-inóculo se agregaron a un matraz que contenía 100 mL de caldo BHI, el matraz se incubó a 37 °C por 16 h. El cultivo se esterilizó para después ser centrifugado a 8872 g durante 15 min, el sobrenadante se desechó y el paquete celular fue lavado con solución salina isotónica (SSI) 2 veces.

El paquete celular se resuspendió con 8.5 mL (volúmen final del gel separador) de SSI y se midió la DO_{600nm}. Se consideró adecuada una DO entre 7 - 8. De nuevo, se centrifugo el cultivo a 8872 g por 15 min y el paquete celular se resuspendió con los reactivos del gel separador (Tabla 8).

El gel se corrió bajo las mismas condiciones que uno de Tris-Tricina-SDS-PAGE y al finalizar, el gel se colocó en una solución renaturalizante (Tris HCl 100 mM y tritón al 1 % (v/v), pH 8) a 37 °C por 18 h. El gel fue teñido con una solución de azul de metileno al 0.1 % (m/v) con KOH al 0.01 % (m/v) y se destiñó con agua destilada hasta observar bandas translúcidas que señalaron actividad lítica en contra del microorganismo indicador.

7.10. Western Blot

Con el vector de expresión utilizado se pudo colocar una etiqueta de histidinas en un extremo de los péptidos de interés, dicha etiqueta puede ser reconocida por un anticuerpo a través de un ensayo de western blot.

En primer lugar, se realizó un gel de Tris-Tricina-SDS-PAGE como se describe en el punto 7.9, al obtenerlo, se realizó la transferencia de proteínas hacia una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF; Bio•Rad) a 20 V/40 min. con un equipo Trans Blot SD Semi-dry Transfer cell (Bio•Rad) y se utilizó un amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol al 10 % (v/v)). Posterior a la transferencia, se cortó el carril del marcador de peso para teñirlo con rojo de Ponceau, el resto de la membrana se bloqueó con leche descremada al 3 % (m/v) (Skim Milk, Difco) en amortiguador TBE (Tris-Hcl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) con Tween-20 al 0.05 % (v/v) durante 1.5 h en agitación suave.

Finalizado el bloqueo, la membrana se lavó por 3 veces/1 min. con 20 mL de amortiguador TBE+Tween-20 y enseguida se le adicionó el anticuerpo anti-His-tag acoplado a fosfatasa alcalina (Abcam) diluido 1:2000 en 20 mL del mismo amortiguador y se dejó en agitación suave por 1 h. Concluido el tiempo, se repitieron los lavados a la membrana y se le adicionó solución reveladora NBT/BCIP (Thermo Scientific) diluida 1:2 en agua destilada hasta observar bandas moradas donde el anticuerpo reaccionó con la etiqueta de histidinas.

7.11. Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Una vez que los extractos de las diferentes construcciones mostraron actividad antagónica en contra de *L. monocytogenes* en las pruebas de difusión en agar, así como en los zimogramas, el siguiente paso fue determinar la CMI de los extractos. La CMI se define como la cantidad más baja de una sustancia que es capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de un periodo de 24 horas de incubación (Andrews, 2001).

Para llevar a cabo el procedimiento, se realizó un cultivo del microorganismo en 5 mL de caldo LB y se incubó a 37 °C por 16 h. Al cultivo se le realizó una dilución de 1×10^{-6} en caldo LB nuevo estéril. Por otra parte, se ajustó la concentración de proteína de los extractos liofilizados, tanto de las construcciones, controles negativos y control positivo a una concentración de 5 mg/mL; esta concentración fue la concentración más alta a partir de la cual se realizó una serie de diluciones dobles seriadas hasta llegar a una dilución de concentración 0.01 mg/mL. En total, para cada extracto, se obtuvo una serie de 10 tubos de 0.6 mL con 30 μ L de extracto a diferentes concentraciones cada uno. Finalmente, a cada tubo se le adicionaron 30 μ L de la dilución de *L. monocytogenes* previamente preparada, se homogenizó la mezcla y se incubaron por 24 h a 37 °C.

Después de la incubación, se volvió a homogenizar la mezcla de cada uno de los tubos para posteriormente tomar una alícuota de 10 μ L y colocarla en una caja de Petri con agar LB. Se espero a que cada una de las alícuotas se absorbiera en el agar y cada una de las cajas fue incubada a 37 °C durante 24 h. La CMI se determinó en el punto en el que no se viera la formación de una sola unidad formadora de colonia (UFC).

7.12. Purificación por cromatografía de afinidad.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad con ayuda de una resina de sílice con iones Ni^{2+} (Protino® Ni-TED). Se siguieron las indicaciones del proveedor para utilizar aproximadamente 1 g de resina. Se utilizaron los amortiguadores de Lisis-Equilibrio-Lavado (LEW, por sus siglas en inglés) para equilibrar la resina y un amortiguador de elución (LEW con imidazol a una concentración de 250 mM).

8. Resultados y discusión.

8.1. Selección de los genes de interés.

El número total de contigs que se obtuvo del análisis del metagenoma, con al menos un gen con anotación de bacteriocina o para una proteína de inmunidad, fue de 43 (Tabla 9).

Tabla 9. Información de los contigs con genes de bacteriocina y de inmunidad.

Bacteriocina	N (%)	Inmunidad	N (%)
Bacteriocina (Lactococcina_972)	3 (5.7)	Proteína de inmunidad [<i>E. faecalis</i>]	1 (4.8)
Bacteriocina [<i>L. garvieae</i>]	1 (1.9)	Protección contra bacteriocina	1 (4.8)
Bacteriocina clase II con péptido señal de doble glicina.	15 (28.3)	Proteasa CAAX de auto inmunidad	2 (9.5)
Bacteriocina clase IIc cíclica Gasicina A	2 (3.8)	Proteína de inmunidad de la Enterocina A	16 (76.2)
Bacteriocina Subtilosina A	2 (3.8)	Proteína de inmunidad relacionada con Carnobacteriocina BM1.	1 (4.8)
BAGEL* Acidocina_LF221B	2 (3.8)	Fragmentos anotados en total	21 (100)
BAGEL* variante de Bovicina 255	2 (3.8)		
BAGEL* Carnobacteriocina A	1 (1.9)		
BAGEL* Enterocina NKR-5-3D	1 (1.9)		
BAGEL* cadena beta Enterocina X	1 (1.9)	*Base de datos BAGEL.	
BAGEL* Plantaricina F	1 (1.9)	(Escobar-Zepeda, 2016)	
BAGEL* Bacteriocina putativa	1 (1.9)		
BAGEL* Sakacina T alfa	1 (1.9)		
Bacteriocina Clase II	12 (22.6)		
Galidermina	1 (1.9)		
Familia tipo Lactococcina	7 (13.2)		
Fragmentos anotados en total	53 (100)		

En la Tabla 9 se puede observar que, en cuanto a los genes con anotación de bacteriocina, se encuentra una mayor proporción de genes anotados como bacteriocinas de clase II.

En la Figura 8 se puede observar el arreglo o contexto genómico que, de manera general, presentaron los contigs analizados. Los contigs que tienen al menos un gen anotado como bacteriocina, también presentaron otros fragmentos con anotación distinta pero que tienen relación con el gen estructural a través de diferentes funciones: codificarían para una proteína de inmunidad o para proteínas involucradas en el procesamiento y secreción de la bacteriocina. Dentro de estos contigs también se encontraron fragmentos anotados con una función que no tiene relación alguna con bacteriocinas.

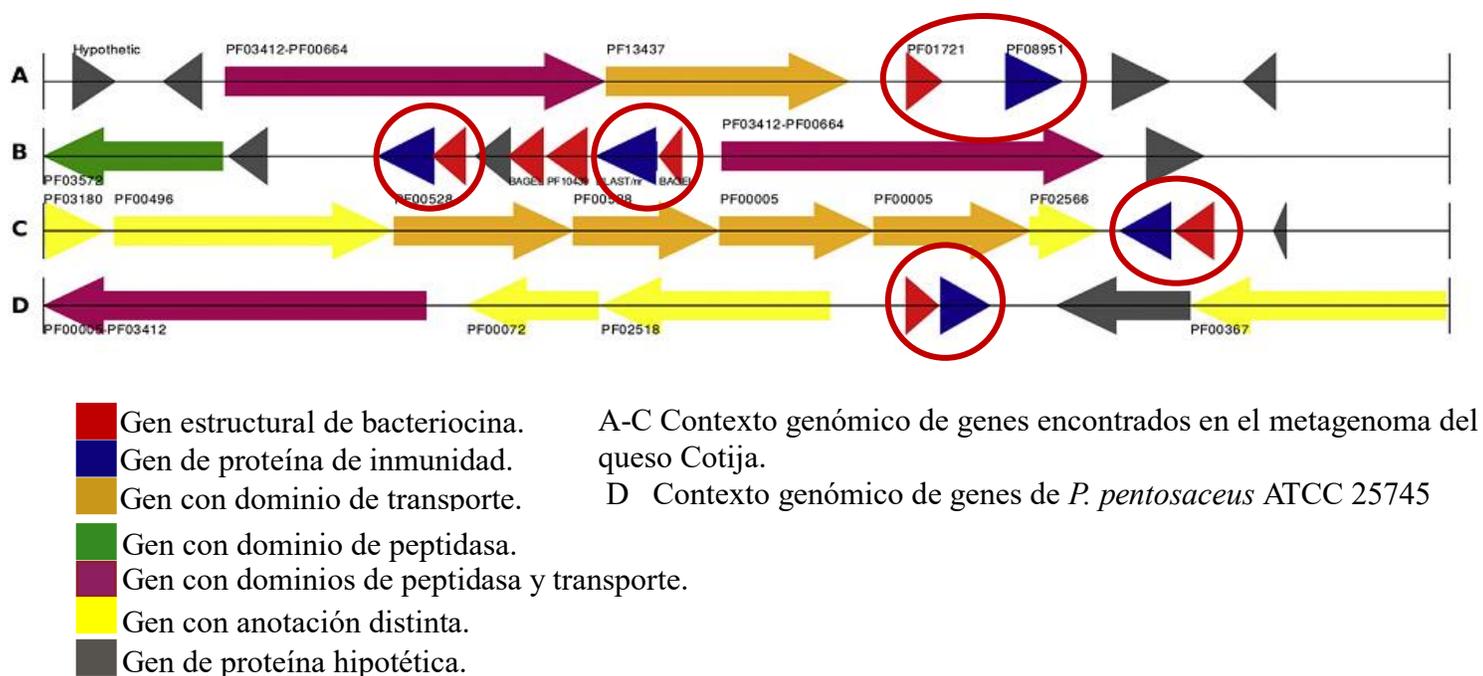


Figura 8. Contexto genómico de los genes relacionados con bacteriocinas. Tomado y modificado de Escobar-Zepeda *et al* (2016).

Una característica importante y que sirvió como criterio de selección de los genes de interés, es la disposición de los genes con anotación de proteína de inmunidad y de bacteriocina; ambos genes deben encontrarse en un mismo contig, ya que el gen de inmunidad protege al microorganismo productor de la autólisis y si ambos se encuentran cercanos y consecutivos, indicaría que ambos genes están estrechamente relacionados (Fimland *et al.*, 2002).

De acuerdo con la Tabla 10, son 19 contigs diferentes los que contienen ambos genes de interés. Se encuentran las etiquetas de los contigs y de los genes, así como la anotación referente al tipo de bacteriocina o proteína de inmunidad con la que se relaciona cada gen.

Un aspecto que vale la pena señalar es la cercanía que tienen los genes de interés, por ejemplo, en el caso del contig 13632, el gen de bacteriocina es el 77722 y el gen de inmunidad es el 77723, es decir, ambos genes se encuentran de manera contigua uno del otro, dicho ejemplo se repite para casi todos los contigs enlistados en la Tabla 10, por lo tanto, para diferentes contigs, el contexto genómico se confirma en cuanto al arreglo que tienen los genes con anotación de bacteriocina y un gen con anotación de proteína de inmunidad río arriba o río abajo del primero (Nes *et al.*, 1996).

Tabla 10. Contigs con gen que codifica para bacteriocina y gen que codifica para proteína de inmunidad.

Contig	Gen	Bacteriocina	Gen	Inmunidad
13632	77722	Familia tipo lactococcina	77723	Proteasa CAAX de auto inmunidad
5461	54516	BAGEL* Plantaricina F	54517	Proteasa CAAX de auto inmunidad
295	12489	Familia tipo lactococcina	12488	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
1196	27541	Bacteriocina [<i>L. garvieae</i>]	27534	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
10088	69312	Bacteriocina Clase II	69311	Proteína de inmunidad de Enterocina A
12297	74718	Bacteriocina Clase II	74719	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
12613	75448	Bacteriocina Clase II	75449	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
14178	78886	Familia tipo lactococcina	78887	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
16340	83151	Bacteriocina Clase II	83152	Proteína de inmunidad [<i>E. faecalis</i>]
21522	92266	Variante de bovicina 255	92265	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
21531	92286	Bacteriocina Clase II	92287	Proteína de inmunidad Carnobacteriocina BM1
21537	92297	Bacteriocina Clase II	92296	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
2358	38023	Bacteriocina Clase II	38022	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
2362	38053	Bacteriocina Clase II	38054	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
24049	96178	Bacteriocina Clase II	96177	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
2580	39587	Bacteriocina Clase II	39586	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
28624	102823	Bacteriocina Clase II	102822	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
7337	61292	Variante de bovicina 255	61293	Proteína de inmunidad de la Enterocina A
8776	65765	Familia tipo lactococcina	65766	Proteína de inmunidad de la Enterocina A

Una vez que se tuvieron identificados los contigs con ambos genes de interés, se procedió a realizar un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de los genes que codifican para posibles bacteriocinas con la información de las plataformas del NCBI y UniProt. Esto se realizó para dichos genes con el fin de obtener información acerca de las posibles bacteriocinas que codifican y saber si tienen relación con bacteriocinas ya estudiadas o son péptidos con dominios de bacteriocina pero que no tienen relación alguna con las bacteriocinas que se conocen hasta el momento. La información obtenida sirvió como segundo criterio de selección para los genes de interés.

En la Tabla 11, se encuentran los resultados del BLAST de los genes con anotación de bacteriocina. Se aprecia que para distintos genes no se encontró información en alguna de las plataformas utilizadas o en ninguna de las dos. Los genes que se encuentran en color verde son los seleccionados para el proyecto ya que, la información encontrada acerca de las secuencias con las que tienen similitud, corresponde a proteínas no caracterizadas o

hipotéticas, así como la presencia de un gen con anotación de proteína de inmunidad dentro del mismo contig. Lo anterior sugiere que los marcos de lectura abiertos seleccionados codifican para posibles bacteriocinas que no han sido estudiadas hasta el momento.

Tabla 11. BLAST para los genes con anotación de bacteriocinas.

Gen	Bacteriocina	UniProt*	Identidad (%)	NCBI**	Identidad (%)
77722	Familia tipo lactococcina	Secuencia señal tipo bacteriocina	92	Proteína hipotética N489_13665	97
54516	Plantaricina F	-	-	-	-
12489	Familia tipo lactococcina	Proteína no caracterizada	100	Proteína hipotética conservada.	100
27541	Bacteriocina [<i>L. garvieae</i>]	Proteína no caracterizada.	62	-	-
69312	Bacteriocina Clase II	Dominio de hiracina JM79	100	Proteína hipotética.	100
74718	Bacteriocina Clase II	-	-	-	-
75448	Bacteriocina Clase II	Hiracina JM79 putativa	100	Proteína hipotética.	100
78886	Familia tipo lactococcina	Proteína no caracterizada	100	Proteína hipotética.	100
83151	Bacteriocina Clase II	Enterocina P	83	Enterocina P	83
92266	Variante de bovicina 255	-	-	Proteína hipotética.	100
92286	Bacteriocina Clase II	Enterocina P	100	Enterocina P	100
92297	Bacteriocina Clase II	Coagulina A	96.1	Pediocina PA-1	100
38023	Bacteriocina Clase II	Hiracina JM79	100	Hiracin-JM79	92
38053	Bacteriocina Clase II	-	-	-	-
96178	Bacteriocina Clase II	Enterocina A	100	Enterocina A	98
39587	Bacteriocina Clase II	Enterocina NKR-5-3C	98.4	Enterocina NKR-5-3C	98
102823	Bacteriocina Clase II	Bacteriocina SRCAM 602	100	Bacteriocina	100
61292	Variante de bovicina 255	Bacteriocina	91.2	Bacteriocina	91
65765	Familia tipo lactococcina	-	-	-	-

*UniProt: <http://www.uniprot.org/blast/>

**NCBI: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Los demás genes que se descartaron ya tenían una anotación con una bacteriocina conocida desde un inicio. Se les relacionó con una bacteriocina conocida cuando se realizó el BLAST, o bien, no se encontró algún gen con anotación de proteína de inmunidad en el contig.

Los marcos de lectura abiertos seleccionados fueron los que se encuentran en el contig 295 que contiene el gen de inmunidad 12488 (303 pb), en adelante denominado como QC1-Inm, y el gen de bacteriocina 12489 (168 pb), que en adelante se referirá a él como bacteriocina QC1; y los que se encuentran en el contig 14178, cuyo gen de bacteriocina es el 78886 (351 pb) y que será referido como QC2 de ahora en adelante, así como el gen de inmunidad 78887 (324 pb), en adelante denominado como QC2-Inm.

8.2. Información de los genes con anotación de bacteriocina.

La información que se obtuvo del análisis BLAST dio como resultado que los posibles péptidos que codificarían los genes con anotación de bacteriocina tenían similitud con proteínas de *Lactococcus lactis*. Dicho microorganismo forma parte de la microbiota subdominante del queso Cotija (Escobar-Zepeda, 2016).

Las anotaciones funcionales encontradas por Escobar-Zepeda (2016), para cada uno de los genes seleccionados, corresponden a bacteriocinas de la familia tipo lactococcinas, cuya etiqueta o clave de identificación en la base de datos Pfam, es PF04369.8 (<http://pfam.xfam.org/family/PF04369.8>) (Finn *et al.*, 2016). La familia de tipo lactococcinas forma parte del clan de proteínas CL0400 que cuentan con un motivo conservado de doble glicina como reconocimiento para la escisión del péptido señal que contienen. En la plataforma del NCBI se encontró que la etiqueta de identificación de esta familia de proteínas es cl04488 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=113152>).

Los miembros que forman parte de esta familia son las lactococcinas A y B producidas por *Lactococcus lactis*, así como la mesentericina B105 producida por *Leuconostoc mesenteroides*. En otras bases de datos como la de InterPro, se refiere a estas bacteriocinas como parte de la subclase IId. Esta subclase puede dividirse en tres segmentos: 1) bacteriocinas dependientes del sistema de secreción *sec*; 2) bacteriocinas sin péptido señal; y 3) bacteriocinas no sub-agrupadas (Iwatani *et al.*, 2011).

En la Figura 9A se observa el dominio conservado de las bacteriocinas que conforman la familia de tipo lactococcinas en la región de su péptido señal (██████████nGG); después de los residuos GG, la secuencia se considera como parte del péptido maduro, en la cual, se logra observar un residuo de glutamina (Q) y de triptófano (W) conservados en las secuencias de las tres bacteriocinas integrantes de esta familia.

En la Figura 9B se observa el alineamiento de las secuencias de la Figura 9A más las secuencias seleccionadas para este trabajo. A pesar de que la secuencia del péptido señal de la bacteriocina QC2 es de mayor longitud en comparación con las demás secuencias, este permite observar el motivo conservado dentro del péptido señal que se observó cuando el alineamiento solo fue realizado con las tres bacteriocinas pertenecientes a la familia de lactococcinas.

Los residuos de glicina tienen un papel importante para la secreción de la bacteriocina hacia el medio extracelular porque son parte del sitio de reconocimiento del sistema de proteínas de transportadores ABC, así como para las proteasas necesarias para escindir el péptido señal y dar como resultado al péptido maduro en el medio extracelular (Nes *et al.*, 1996; Herranz & Driessen, 2005).

Se refiere a bacteriocinas de la subclase IId porque en esta se han colocado a las bacteriocinas que no cumplen con alguna de las características de las demás subclases, es así que para ser parte de este grupo una bacteriocina debe de ser lineal, no tener el dominio conservado de las bacteriocinas de tipo pediocina y ser de un solo péptido (Nishie *et al.*, 2012; Nes *et al.*, 2013). La lactococcina A cumple con las características anteriores y es la referencia de las bacteriocinas de la subclase IId en InterPro; en Pfam, es la representante de la familia de las lactococcinas.

A pesar de contar con un motivo conservado (██████████nGG) entre las bacteriocinas de la familia de tipo lactococcinas y las bacteriocinas de este trabajo, es importante señalar que no todas las bacteriocinas colocadas en esta subclase IId, cuentan con el mismo motivo conservado en el péptido señal. Los residuos de doble glicina conservados, así como los parámetros antes mencionados son los determinantes en la clasificación de estas bacteriocinas como parte de esta subclase.

8.3. Información de los genes con anotación de proteína de inmunidad.

La anotación de proteína de inmunidad de los genes seleccionados QC1-Inm y QC2-Inm, dio como resultado que pertenecen a la familia de proteínas de inmunidad de enterocina A con la etiqueta de identificación PF08951 (<http://pfam.xfam.org/family/PF08951#tabview=tab0>).

En contraste con las secuencias de aminoácidos de las bacteriocinas, donde pueden encontrarse motivos conservados que permiten clasificarlas, las proteínas de inmunidad no presentan algún motivo conservado que permita realizar clasificación alguna. A pesar de la diversidad en los aminoácidos que las conforman, estas proteínas de inmunidad son altamente específicas para conferir protección al microorganismo contra el efecto bactericida de la bacteriocina que produce. Es decir, una proteína de inmunidad confiere protección de manera casi exclusiva contra una bacteriocina específica (Fimland *et al.*, 2002).

La especificidad que presentan las proteínas de inmunidad está asociada con la secuencia de su extremo carboxilo ya que funciona como reconocimiento del mismo extremo en la bacteriocina con la que está relacionada, por lo tanto, la protección está dirigida hacia la acción de la bacteriocina con la que se co-expresa la proteína de inmunidad. En algunos casos, una misma proteína de inmunidad puede proteger al microorganismo productor de la acción de alguna otra bacteriocina, siempre y cuando esta comparta características estrechamente relacionadas con la bacteriocina a la cual está asociada la proteína de inmunidad en particular con la secuencia de su extremo carboxilo (Jhonsen *et al.*, 2005).

8.4. Síntesis de las construcciones y subclonación.

La obtención de las construcciones con las secuencias de los contigs seleccionados, se realizó a través de su síntesis y posterior clonación en un vector de clonación comercial (pUC18) por la compañía Epoch Life Science, Inc.

```

GGATCCATCGAGGGAAGAATG  TAAATATATTTTCCAAATTTAAAGATAACCAGAGATTATTCAATA
TATTTATCAATTTTATCTAGAGATAAACTTTCCATTGAAGAAGCAATGTTTTTGTAGCTAAAAAAA
TATFGAAAGTGGTCCAAATTTTGATCTCAAAATAGTGAATTCATTTCATTTTCAGATATCTTGTCTATTC
TCTGATGTCCAGTATTTTTTTTCAGAGCCACGAAAGCAATGTTGGTAAATCCAGGTACTGGTGGTTCTCTGI
ATGGATGGTCAAACCTTTGAAGCAA  TAAATATG
GGTCAAGCTT

```

Secuencia 1. Construcción contig-295 en el vector pUC18.

En la construcción pUC18-contig-295 se encuentran los genes 12488, que codifica la proteína de inmunidad QC1-Inm (color rosa) y 12489, que codifica la bacteriocina QC1 (color verde) (Secuencia 1) con un tamaño esperado de 494 pb.

```

GGATCCATCGAGGGAAGAGAT
TAAATG
CGAGTAAAAAATGATGAGAGAGAGGTTGAAATACCAATTCTATTGATAAACTTCCTTCATCAAGATGTTGA
ATTAACAATAGACGAAAAAGAATACTGTTAAATATATAAGAGCGGATTCAAATTCAAAAATATTGAATTT
GAAGTATTGATCTTAGAAAATGCTCTTCTCCATTTGTTATAAGTTTCGAAACTTTCGGAACTACATTAAATT
TCTATAAAAAAATACGAGCAGATAGAAAAATTAGATGGGGAGAAGGTAGCTCTCTAATTACTGGTATTCTGA
ATTTCTGTAAAAAAGA AAA CAAGCTT

```

Secuencia 2. Construcción contig-14178 en el vector pUC18.

En la construcción pUC18-contig-14178 se encuentran los genes 78886, que codifica la bacteriocina QC2 (color verde) y 78887 que codifica la proteína de inmunidad QC2-Inm (color rosa) (Secuencia 2). Tamaño esperado de 613 pb.

Para ambas secuencias, en el extremo 5' de cada una de las construcciones se encuentra el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI, y en el extremo 3' se encuentra el sitio de reconocimiento de la enzima HindIII (nucleótidos subrayados); en rojo se señala el término de cada uno de los genes y en color turquesa se indica el inicio de estos.

En la Figura 10 se observa cada uno de los fragmentos escindidos del vector pUC18, contig-295 y contig-14178. Estos fueron subclonados en el vector pET28a(+).

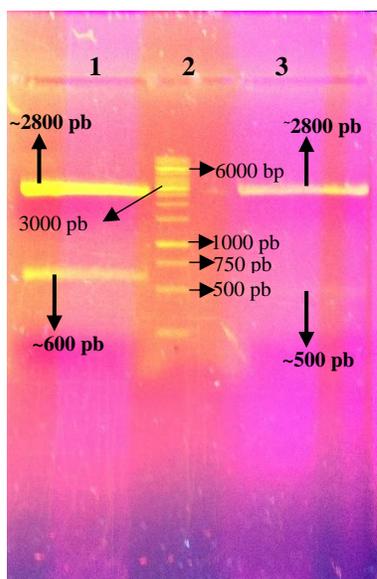


Figura 10. Digestión de las construcciones en el vector pUC18. Carril 1, pUC18-contig14178; Carril 2, Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb; Carril 3, pUC18-contig295.

Como resultado de la subclonación de cada uno de los fragmentos en el vector pET28a(+), y la posterior transformación de estas en *E. coli* BL21(DE3), se seleccionaron diferentes clonas para amplificar los fragmentos correspondientes, ahora con pesos aproximados de 781 pb para contig-295 y de 900 pb para contig-14178. El aumento en el peso de los fragmentos de interés, con respecto a los señalados en las secuencias 1 y 2, es resultado de utilizar los cebadores T7. Con dichos cebadores, se amplifica parte del vector de expresión que se encuentra río arriba y río abajo de los fragmentos de interés.

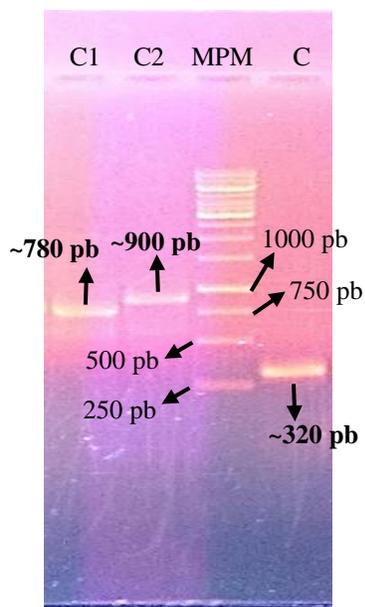


Figura 11. Amplicones de las clonas seleccionadas con las construcciones en el vector pET28a(+).

C1: clona pET28a(+)-contig295 ~781 pb

C2: clona pET28a(+)-contig 14178 ~900 pb

C: Control pET28a(+)-sin inserto ~318 pb

MPM: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb

Cada una de las clonas se enviaron a secuenciar para corroborar que la secuencia de los fragmentos de interés no tuviera cambio alguno. A continuación se describen las construcciones pET28a(+)-contig-295 y pET28a(+)-contig-14178, así como la secuencia y peso de los péptidos esperados en cada una.

En la Secuencia 3, el gen 12488 (QC1-Inm) comprende desde el nucleótido 115 hasta el nucleótido 417 y sus correspondientes aminoácidos (M39 – K138); la secuencia del gen 12489 (QC1) incluye desde el nucleótido 419 al nucleótido 583 y sus respectivos aminoácidos (M1 – G55). Como parte del diseño de esta primera construcción, también se observa la secuencia de reconocimiento de la proteasa del factor Xa de los nucleótidos 103 al 114 (aminoácidos I35 a R38, en verde); la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI (nucleótidos 97 al 102 y aminoácidos G33 y S34, en negro) y secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII (nucleótidos 585 al 590) más un

nucleótido (C, número 587) antes de dicha secuencia para que los fragmentos insertados entraran en fase con el marco de lectura del vector de expresión. Los nucleótidos 1 al 96 y 591 al 640 son parte del vector de ADN que se utilizó para expresar los fragmentos de interés. Al final se obtuvieron como productos dos proteínas: la proteína de inmunidad QC1-Inm (aminoácidos M1 – K138, color morado; con peso aproximado de 15.2 kDa) y la bacteriocina QC1 (aminoácidos M1 – C73, color rojo; con peso aproximado de 8 kDa).



Secuencia 3. Construcción pET28a(+)-contig-295.

En la Secuencia 4, el gen 78886 (QC2) comprende desde el nucleótido 115 hasta el nucleótido 381 y sus correspondientes aminoácidos (D39 – V126); la secuencia del gen 78887 (QC2-Inm) incluye desde el nucleótido 382 al nucleótido 702 y sus respectivos aminoácidos (M1 – K107).

Como parte del diseño de esta segunda construcción, también se observa la secuencia de reconocimiento de la proteasa del factor Xa de los nucleótidos 103 al 114 (aminoácidos I35 a R38, en verde); la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI (nucleótidos 97 al 102 y aminoácidos G33 y S34, en negro) y secuencia de reconocimiento

de la enzima de restricción HindIII (nucleótidos 704 al 709) más un nucleótido (C, número 703) antes de dicha secuencia para que los fragmentos insertados entraran en fase con el marco de lectura del vector de expresión.

Los nucleótidos 1 al 96 y 710 al 759 son parte del vector de ADN que se utilizó para expresar los fragmentos de interés. Al final, se obtuvieron como productos dos proteínas que son: la proteína de inmunidad QC2-Inm (aminoácidos M1 – C125, color morado; con peso aproximado de 13.8 kDa) y la bacteriocina QC2 (aminoácidos M1 – V126, color rojo; con peso aproximado de 13.9 kDa).



Secuencia 4. Construcción pET28a(+)-contig-14178.

8.5. Producción de las bacteriocinas y perfiles electroforéticos.

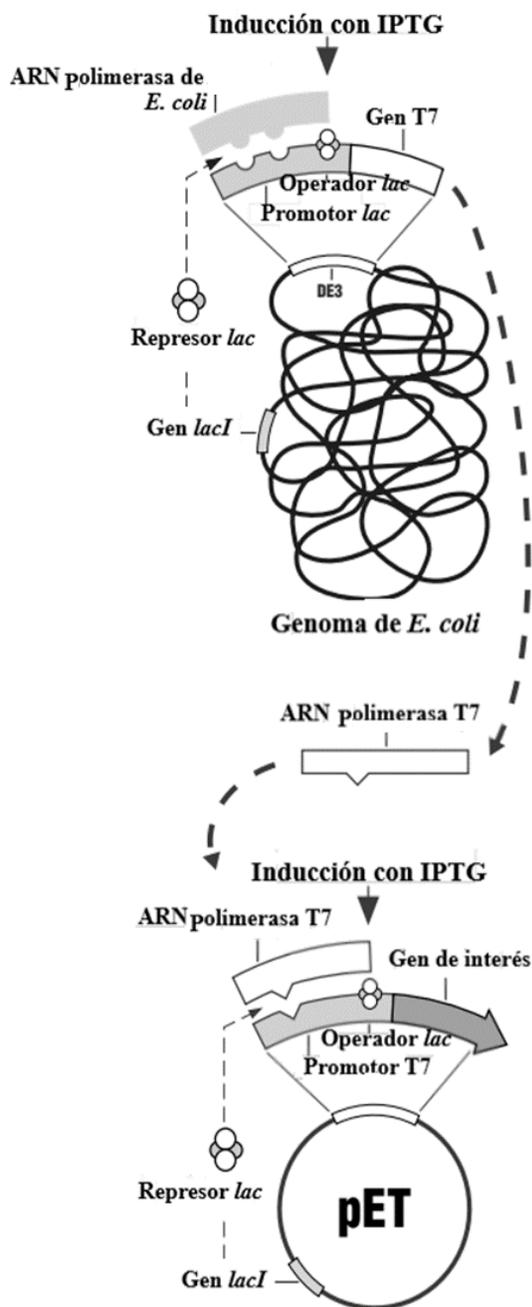


Figura 12. Sistema de expresión pET en *Escherichia coli*. Tomado y modificado de pET System Manual.

Para realizar la expresión de los genes de interés, se utilizó el plásmido pET28a(+) junto con una cepa de expresión de *E. coli* BL21(DE3).

La cepa cuenta con una copia del gen de la ARN polimerasa T7 que por unión al promotor T7 del plásmido lleva a cabo la transcripción del gen de interés insertado en el mismo vector.

La transcripción tanto del gen de interés en el vector como de la ARN polimerasa T7 en el cromosoma del hospedero se regulan negativamente por LacI. El inductor de la transcripción de los genes mencionados es el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

La presencia de LacI en el vector de expresión contribuye en una mayor regulación de la transcripción del gen de la ARN polimerasa T7 que se transcribe incluso en ausencia del inductor, lo que provocaría una expresión basal de la proteína de interés (Figura 12) (pET System Manual).

Es importante controlar la expresión basal de las bacteriocinas clonadas, ya que por su posible naturaleza antimicrobiana y que son ajenas a las proteínas nativas del hospedero, se evita que interfieran con el crecimiento óptimo de éste antes de ser inducido.

Después de realizar la inducción de las clonas seleccionadas y obtener el extracto crudo, se determinó la concentración de proteína contenida en estos. Posteriormente se realizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) tris-tricina para observar la expresión de las bacteriocinas, además de zimogramas (geles SDS-PAGE con células embebidas de *Listeria monocytogenes* CFQ-B103) para detectar la actividad bactericida en contra del microorganismo indicador, se colocaron 70 µg de proteína en todos los carriles de ambos geles (Figura 13). Este procedimiento se realizó también con la fracción insoluble (restos celulares), sin embargo, no se obtuvieron resultados de actividad lítica en esta fracción.

La técnica de zimografía en gel es utilizada para detectar la actividad de alguna(s) enzima(s) separada(s) por sus peso molecular a partir de una muestra en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) en el cual se encuentra el sustrato afín a la(s) enzima(s) y que, después de haberse realizado la separación de las muestras, el gel se coloca en una solución que contiene un detergente no iónico de concentración micelar crítica baja para poder llevar a cabo una renaturalización o plegamiento parcial de la(s) enzima(s) presente(s) en la muestra y que efectúe la reacción necesaria con el sustrato presente en el gel. La presencia de bandas translucidas o coloridas evidencian la actividad de la enzima(s) presente(s) en las muestras y estas se pueden contrastar con técnicas de tinción lo que permite una mejor visualización de las bandas con actividad (Vandooren *et al.*, 2013).

A pesar de que esta técnica se utiliza en mayor medida para detectar actividad hidrolítica de enzimas, se ha utilizado también para observar la actividad que tienen las bacteriocinas en contra de algún microorganismo. En el grupo de trabajo se ha utilizado esta metodología para detectar la actividad que tiene la enterocina A contra *Listeria innocua* (Olvera-García, 2013).

Se utilizó a *L. monocytogenes* como microorganismo indicador porque las bacteriocinas de la clase II, en general, presentan actividad antilisterial; también, este microorganismo es de importancia en la inocuidad de alimentos y representa un agente etiológico de importancia en salud pública.

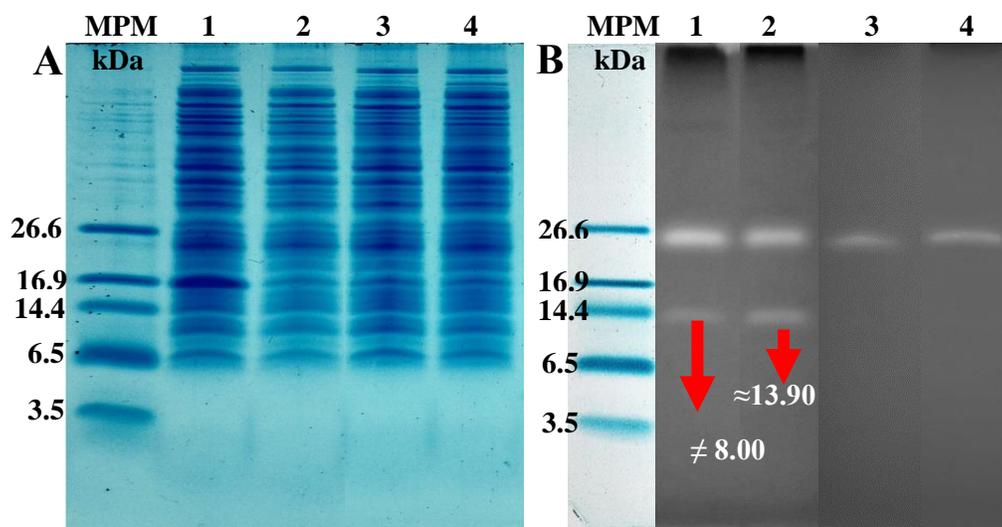


Figura 13. SDS-PAGE (A) y zimograma (B) de las clonas seleccionadas.

Para ambos geles: 1: pET28a(+)-contig-295 (Peso teórico QC1: 8.03 kDa); 2: pET28a(+)-contig-14178 (Peso teórico QC2: 13.86 kDa); 3: pET28a(+) vacío dentro de *E. coli* BL21(DE3); 4: *E. coli* BL21(DE3) sin vector de expresión; MPM: Marcador de peso molecular polipéptido Bio•Rad.

En el gel SDS-PAGE no se logró observar una diferenciación clara entre las proteínas nativas del hospedero y la sobre expresión de las proteínas de interés ya que, en el citosol, fracción celular utilizada como extracto crudo, se encuentra una gran cantidad de proteínas.

Por otra parte, el zimograma permitió detectar bandas translucidas que representan la actividad lítica de las bacteriocinas de interés, sin embargo, el peso molecular de la bacteriocina QC1 fue mayor (~14.4 kDa) con respecto al peso molecular esperado (~8.0 kDa); en el caso de la bacteriocina QC2, el peso molecular esperado (~13.9 kDa) corresponde con el peso molecular obtenido en el gel. Ambas bacteriocinas están presentes en las clonas seleccionadas correspondientes (carriles 1 y 2, 13B) y se encuentran ausentes en los extractos de la cepa de expresión con y sin pET28a(+) vacío (carriles 3 y 4; 13B). En el zimograma (Figura 13B) también se observa una banda translucida con un peso aproximado a los 26.6 kDa que pertenece a *Escherichia coli* BL21(DE3).

El plásmido de expresión permitió colocar 6 residuos de histidina en las proteínas de interés, de esta manera, a través de un ensayo de transferencia de proteínas, se corroboró la expresión de QC1 y QC2 en los pesos moleculares esperados (Figura 14).

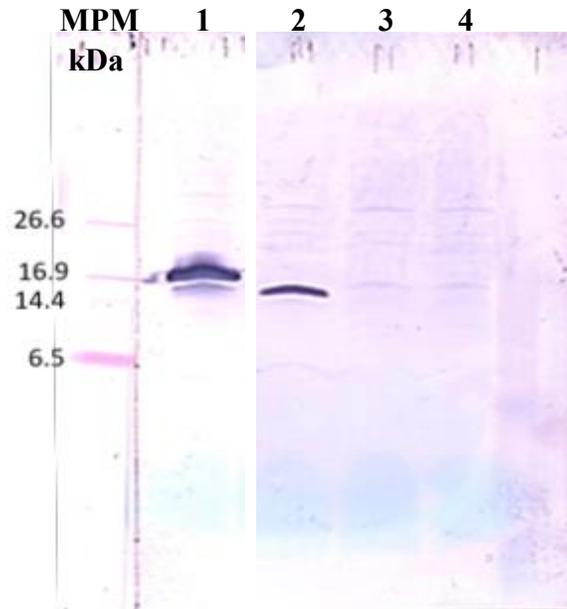


Figura 14. Transferencia de proteínas de las clonas seleccionadas.

1: pET28a(+)-contig-295 (Peso teórico QC1: 8.03 kDa); 2: pET28a(+)-contig-14178 (Peso teórico QC2: 13.86 kDa); 3: pET28a(+) vacío dentro de *E. coli* BL21(DE3); 4: *E. coli* BL21(DE3); MPM: Marcador de peso molecular polipéptido Bio•Rad.

La transferencia de proteínas de los extractos crudos de las clonas seleccionadas dieron como resultado una bacteriocina QC2 (carril 2) en el peso aproximado esperado sin la presencia de alguna otra proteína. La bacteriocina QC 1 no se logró observar ya que, debido al diseño de la construcción, la etiqueta de histidinas no se colocó en la bacteriocina sino en la proteína de inmunidad, por esta razón, en el carril uno (Figura 14), se observó una banda de aproximadamente 17 kDa, peso molecular mayor al esperado para la proteína QC1-Inm de 15.2 kDa, a pesar de esto, en el zimograma (Figura 13B) se observa actividad de una proteína en contra del microorganismo indicador que no es observada en los carriles de la cepa de expresión con y sin pET28a(+) vacío; en los carriles 3 y 4 no se observó proteína recombinante alguna con la etiqueta de histidinas (Figura 14).

8.6. Espectro inhibitorio de las bacteriocinas QC1 y QC2.

Los extractos crudos de las clonas seleccionadas mostraron tener las bacteriocinas recombinantes con actividad antilisterial por zimografía, técnica por la cual también se detectó una banda de actividad propia del microorganismo de expresión.

Por lo anterior, se determinó la actividad antibacteriana de los mismos extractos crudos por medio del ensayo de difusión en agar contra *L. monocytogenes* CFQ-B103, además, los extractos fueron liofilizados y se ajustó la cantidad de proteína para observar de mejor manera la actividad antagónica del crecimiento del microorganismo indicador.

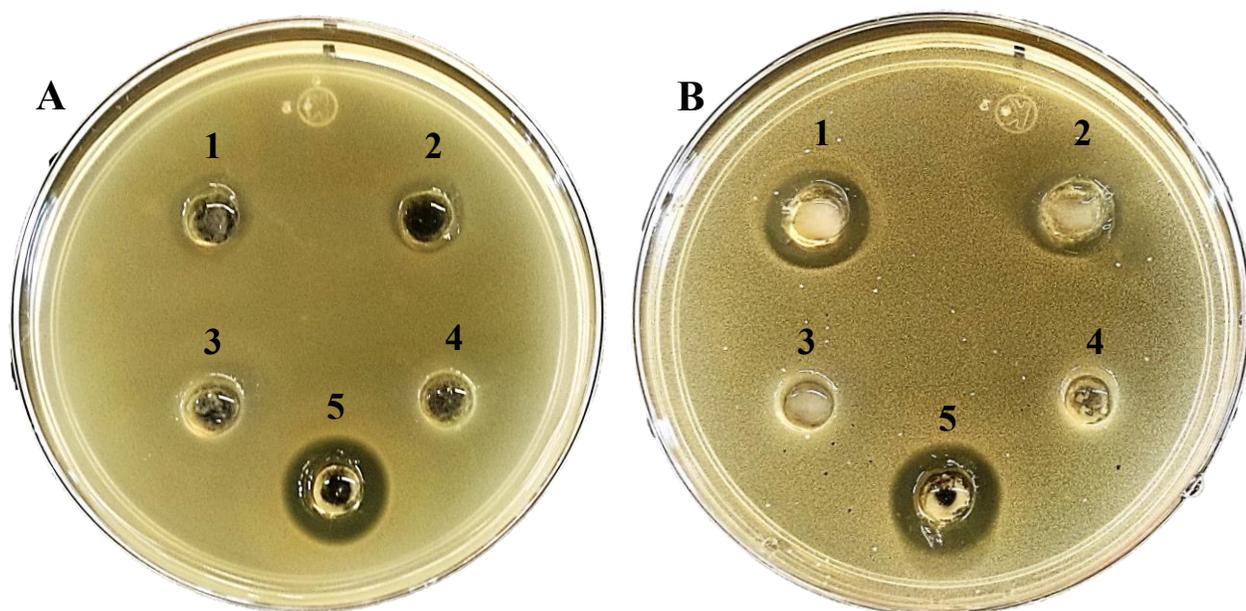


Figura 15. Difusión en agar contra *L. monocytogenes* CFQ-B-103.

Para ambas cajas: 1: QC1; 2: QC2; 3: pET28a(+) vacío dentro de *E. coli* BL21(DE3); 4: *E. coli* BL21(DE3); 5: Nisaplin® (Nisina) 10 mg/mL. A: Extractos crudos; 1A: 896 $\mu\text{g/mL}$; 2A: 443.2 $\mu\text{g/mL}$; 3A: 914.5 $\mu\text{g/mL}$ y 4A: 978.8 $\mu\text{g/mL}$; B: Extractos liofilizados; 1B-4B: 5 mg/mL.

En la Figura 15A se observa que los extractos que contienen a las dos bacteriocinas seleccionadas (pozos 1 y 2) presentaron actividad antagónica contra el crecimiento del microorganismo indicador (*L. monocytogenes*), tal actividad se observa de mejor manera en la Figura 15B ya que la concentración utilizada fue mayor que en el extracto crudo. Es importante señalar que en ambas cajas de difusión en agar no se observó actividad bactericida por parte de los extractos de *E. coli* BL21(DE3) con y sin vector de expresión vacío (pozos 3 y 4) a pesar de que en el zimograma (Figura 13B) se detectó una banda con actividad de un

peso aproximado a 26.6 kDa. Se utilizó a la bacteriocina nisina (Nisaplin®) como control positivo de la actividad bactericida contra el microorganismo indicador utilizado ya que se ha reportado que este lantibiótico posee capacidad antagónica del crecimiento de *L. monocytogenes*; de esta manera se tiene un control positivo de la actividad bactericida ejercida por este tipo de antimicrobianos.

El efecto inhibitorio de las bacteriocinas en estudio se confirmó en el ensayo de difusión en agar (Figura 15) y en los extractos de *E. coli* BL21(DE), con y sin vector de expresión, no se observó tal efecto a pesar de presentar una banda de actividad contra *L. monocytogenes* en la Figura 13B.

A continuación, se propone una posible explicación de la presencia de la banda con actividad lítica de *E. coli* BL21 en el zimograma realizado, pero que no se observa efecto inhibitorio del crecimiento contra el microorganismo de prueba en la Figura 14. Sin embargo, para confirmar esta propuesta sería necesario, en un trabajo posterior, secuenciar la banda de aproximadamente 26.6 kDa y así determinar la naturaleza de esta.

La información del genoma de *E. coli* BL21(DE3) (Número de acceso GenBank CP001509) cuenta con alrededor de 4700 genes, cuya anotación funcional da como resultado a aproximadamente 4339 proteínas (Jeong *et al.*, 2009). Dado el peso obtenido de la proteína (~26.6 kDa) se buscó en la información del genoma de este microorganismo una proteína que pudiera cumplir con un peso aproximado al obtenido experimentalmente, además de contar con una anotación funcional capaz de sustentar la actividad detectada en los resultados.

En la búsqueda realizada se encontró una proteína (Número de referencia NCBI WP_001301253.1) de 249 aminoácidos y peso aproximado a 28.7 kDa con anotación de endopeptidasa de peptidoglicano, esta categoría pertenece a un amplio grupo de enzimas implicadas en diferentes aspectos del metabolismo del peptidoglicano y de la fisiología celular bacteriana; además, se ha demostrado que tienen actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos de importancia en la inocuidad de alimentos como *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* entre otros (Serrano-Maldonado *et al.*, 2018). En *E. coli* se han descrito al menos 35 peptidoglicano hidrolasas (PGHs) clasificadas en 12

familias diferentes, esta clasificación depende de la región del peptidoglicano en donde realizan la hidrólisis (van Heijenoort, 2011).

Si bien la técnica de zimografía es ampliamente utilizada para evidenciar la actividad que presentan las PGHs, esta técnica suele dar resultados falsos positivos de acuerdo con las diferentes características fisicoquímicas de la proteína en estudio. Una vez que el zimograma se coloca en la solución renaturalizante, sigue un paso posterior de teñido con un colorante básico, azul de metileno, el cual tiene una carga neta positiva que le permite interactuar con los componentes celulares de carga negativa como el peptidoglicano (Prescott *et al.*, 2002; Escobar & Cross, 2018). Esta interacción de cargas es lo que permite tener un fondo oscuro donde las bandas de actividad lítica se ven translucidas porque ya no se encuentra el peptidoglicano para interactuar con el colorante.

De acuerdo con lo anterior, Escobar & Cross (2018) observaron que si la proteína en estudio tiene una carga mayoritariamente positiva (al menos +7), esta puede repeler electrostáticamente el colorante y así resultar una banda translucida que podría ser interpretada como positiva. Sin embargo, concluyeron que la carga neta de la proteína no es el único factor que puede interferir en la zimografía para dar como resultado un falso positivo.

Con respecto a la banda con posible actividad lítica de *E. coli* BL21(DE3) detectada en el zimograma de la Figura 13B y que pudiera tratarse de la peptidasa de peptidoglicano anotada en su genoma, se realizó un análisis *in silico* de los parámetros fisicoquímicos de tal proteína a través de la plataforma ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2005). Se obtuvo que tal proteína podría tener una carga neta de +7 [(Asp + Glu = -24)(Arg + Lys = +31)] lo que pudiera generar una banda translucida en el zimograma (posible falso positivo) y que al realizar el ensayo de difusión en agar no se observara el efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* CFQ-B103.

Con respecto a las bacteriocinas QC1 y QC2, se realizó un ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar cuál era la concentración mínima requerida de las bacteriocinas para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* CFQ-B-103, en donde también se incluyó como control positivo a la nisina, una bacteriocina ya comercializada que se utiliza en diferentes aplicaciones.

En total, para cada uno de los extractos, se obtuvo una serie de 10 tubos con las diferentes concentraciones de proteína que se indican en la Tabla 13. Cabe señalar que para el caso del Nisaplin®, los 5 mg utilizados como la concentración más alta es del polvo comercial, en el cual habrían 200 µg de proteína dentro de la cual se encontraría a la bacteriocina nisina.

Tabla 13. Concentraciones de los extractos utilizados.

Tubo	Concentración (mg/mL)	Tubo	Concentración (mg/mL)
1	5	6	0.156
2	2.5	7	0.078
3	1.25	8	0.039
4	0.625	9	0.019
5	0.313	10	0.01

La concentración mínima inhibitoria se determinó en el punto en el que no se observó el crecimiento de ni una sola unidad formadora de colonia (UFC).

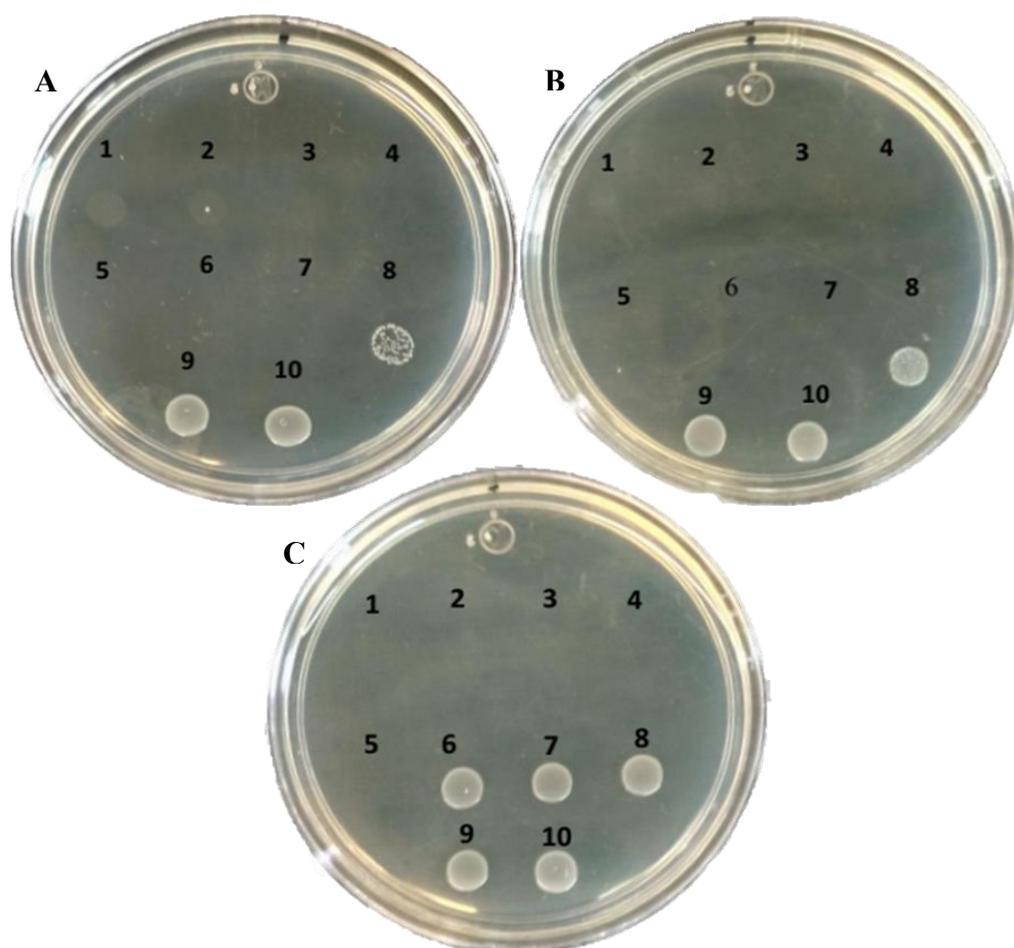


Figura 16. Concentración mínima inhibitoria de las bacteriocinas contra *L. monocytogenes* CFQ-B-103. A: Bacteriocina QC1; B: Bacteriocina QC2 y C: Nisina (Nisaplin®).

Para las dos bacteriocinas la concentración mínima inhibitoria fue de 78 µg/mL, punto 7 (Figura 16A y 16B); para el control positivo se determinó su concentración mínima inhibitoria en un valor de 12.5 µg/mL, punto 5 (Figura 16C). Los resultados obtenidos para ambas bacteriocinas (QC1 y QC2) nos permiten observar un comportamiento antagónico del crecimiento de *L. monocytogenes*, al igual que el presentado por el control positivo comercial. Es importante mencionar que, para las bacteriocinas en estudio se utilizaron, por el momento, los extractos crudos, es decir, sin algún paso de purificación previo al ensayo de CMI. Sin embargo, se les puede atribuir la actividad bactericida porque los controles utilizados como negativos no mostraron dicho comportamiento. Posteriormente, después de algún paso de purificación de QC1 y QC2, se podría realizar de nuevo el ensayo de MIC y así poder comparar su valor con el obtenido por la bacteriocina comercial.

En la Figura 17 se observa que los extractos de la cepa hospedera de *E. coli* sin vector y con vector sin inserto, no presentan efecto inhibitorio alguno sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* CFQ-B-103.

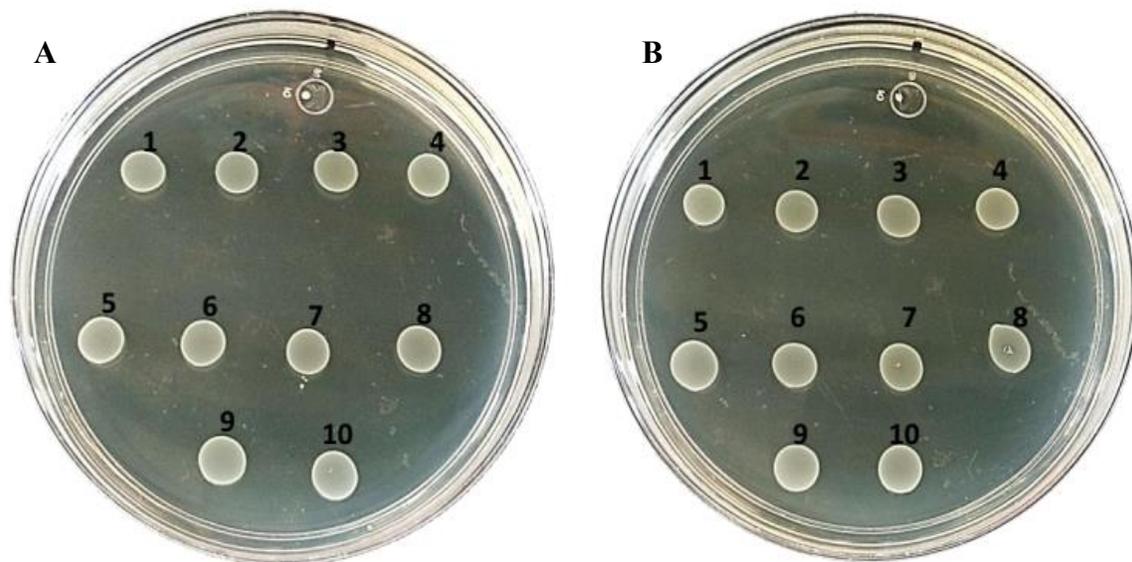


Figura 17. Concentración mínima inhibitoria de *E. coli* BL21(DE3) con y sin el vector de expresión vacío.

Existen bacteriocinas con la capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos, dentro de los que destacan las bacterias patógenas transmitidas por

alimentos e incluso aquellas bacterias que presentan resistencia a diferentes antibióticos (Cotter *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

Para determinar si las bacteriocinas QC1 y QC2 poseían actividad bactericida en contra de bacterias patógenas transmitidas por alimentos, además de *L. monocytogenes*, se realizó el ensayo de difusión en agar contra las siguientes bacterias: *Listeria innocua* CFQ-B-232, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* CFQ-B-230, *Streptococcus pyogenes* CFQ-B-218, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* CFQ-B231, además de *Escherichia coli* DH5 α y un aislado clínico de *Enterococcus faecalis* (YLV).

En las pruebas de difusión en agar contra los diferentes microorganismos de importancia en la inocuidad de alimentos los resultados fueron negativos, es decir, las bacteriocinas QC1 y QC2 no ejercieron actividad bactericida contra las diferentes bacterias. *Listeria monocytogenes* CFQ-B-103 fue la única bacteria contra la cual se observó tal actividad por parte de las bacteriocinas seleccionadas.

De acuerdo con la clasificación de las bacteriocinas, en general lantibióticos y no lantibióticos, se han desarrollado estudios para elucidar el mecanismo de acción bactericida que ejercen en contra de otros microorganismos relacionados con el género y/o especie del microorganismo que las produce.

Las bacteriocinas de la clase II, no lantibióticos, son capaces de formar poros en las membranas celulares de acuerdo con las diferentes características estructurales que tienen. La información acerca de la clasificación de las bacteriocinas QC1 y QC2 sugiere que estas pertenecen a la subclase II_d, cuyo miembro representante es la lactococcina A, por esta razón, se propone una explicación del posible mecanismo de acción bactericida que estas bacteriocinas ejercen de manera tan específica contra *L. monocytogenes* y que no se observó contra los otros microorganismos blanco utilizados en este trabajo.

Para estas bacteriocinas se ha descrito que tienen la capacidad de interactuar con un componente de la membrana celular encargado del transporte de monosacáridos denominado sistema de transporte de carbohidratos dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS, por sus siglas

en inglés), en específico, este mecanismo se ha descrito para las bacteriocinas de las subclases IIa y IId (Kjos *et al.*, 2011).

El sistema PTS está implicado en el importe y fosforilación de diferentes carbohidratos del medio extracelular o bien en la expresión de genes de transporte y catabolismo de otros azúcares. Los componentes de este sistema son la enzima I (EI), HPr y la enzima II (EII). EI y HPr son las proteínas generales del sistema que se encuentran en el citoplasma y comienzan con el proceso de transferencia de un grupo fosfato a partir de una molécula de fosfoenolpiruvato; la enzima EII está compuesta por diferentes dominios que son específicos para cada carbohidrato y se encuentran en la membrana celular, sin embargo, cabe señalar la existencia de microorganismos que no cuentan con EII (Postma *et al.*, 1993).

El sistema de transporte de manosa PTS (man-PTS) es el complejo proteínico específico que se ha reportado como el receptor de reconocimiento de las bacteriocinas IIa y IId, de esta manera, al formarse el complejo bacteriocina-man-PTS se genera un poro que lleva a la muerte celular. En este complejo, la EII está compuesta de diferentes subunidades, IIA y IIB que son los componentes localizados en la membrana y que a veces se encuentra como una sola cadena polipeptídica (IIAB), así como las subunidades transmembranales IIC y IID que son las encargadas de realizar el importe de la manosa (Tymoszevska *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que los componentes IIC y IID de EII son los involucrados en el reconocimiento de diferentes bacteriocinas como las lactococinas A y B (subclase IId), así como de bacteriocinas de tipo pediocina (subclase IIa) a pesar de que ambas subclases no comparten algún motivo conservado dentro de sus secuencias que pudiera relacionarlas (Diep *et al.*, 2007). A pesar de compartir este mecanismo de acción, las lactococinas solo ejercen un efecto bactericida específico contra *Lactococcus lactis*, en contraste con las bacteriocinas de tipo pediocina que tienen efecto antagónico contra otros microorganismos excepto contra el género *Lactococcus*.

En un estudio posterior se realizó un análisis bioinformático para encontrar la relación filogenética de 86 pares de proteínas IIC y IID del sistema man-PTS de diferentes microorganismos y así poder explicar la razón del por qué unas bacteriocinas pueden ejercer efecto bactericida contra los microorganismos de un género, pero no contra otro a pesar de que el sistema man-PTS se encuentra en la mayoría de las bacterias (Kjos *et al.*, 2009). Las

proteínas analizadas se distribuyeron en 3 grandes grupos (I – III), de los cuales seleccionaron 14 pares de proteínas para clonarlos y expresarlos en una cepa de *Lactococcus lactis* carente de este sistema para poder determinar si estas proteínas podrían conferirle sensibilidad frente a diferentes bacteriocinas de la clase II.

Los resultados de dicha investigación demostraron que los componentes de EII de diferentes microorganismos que se encontraban en el grupo I, expresados en una cepa de *L. lactis*, fueron capaces de reconocer a las bacteriocinas de la subclase IIa probadas, por lo tanto, la cepa fue inhibida. Por otro lado, las proteínas IIC y IID de *L. lactis*, también parte del grupo I, solo funcionaron como receptor para la lactococcina A como se había visto con anterioridad. En conclusión, Kjos y colaboradores encontraron regiones de aminoácidos conservados en las proteínas IIC del sistema man-PTS del grupo I de diferentes microorganismos que funcionan como biomoléculas de reconocimiento de bacteriocinas de la subclase IIa, pero tales motivos conservados no se encontraban en la proteína IIC del sistema man-PTS de *L. lactis* a pesar de ser parte del mismo grupo, lo que lo hace un receptor casi exclusivo para las bacteriocinas de subclase IId como las lactococcinas A y B.

En el presente trabajo se demuestra la actividad bactericida de dos bacteriocinas de la subclase IId en contra de *L. monocytogenes*, actividad que no presentan las lactococcinas A y B, las principales representantes de esta subclase. Cabe hacer notar que tanto QC1 y QC2 no presentaron actividad bactericida contra algún otro microorganismo Gram positivo o Gram negativo lo que sugiere que, como en el caso de las lactococcinas A y B contra *L. lactis*, exista una biomolécula o un receptor celular específico en *L. monocytogenes* (aún no reportado) con el que QC1 y QC2 interaccionen y puedan llevar a cabo su efecto bactericida. Al ser parte de la subclase IId, no se descarta la posibilidad de que el mecanismo de acción antibacteriano que utilizan QC1 y QC2 involucre al sistema man-PTS mediante sus componentes IIC y IID a través de la interacción con motivos o residuos conservados (aún no reportados) en estas biomoléculas distintos a los descritos en trabajos previos para otras bacteriocinas.

Como ejemplo de lo anterior, se ha demostrado que para la garvicina Q, una bacteriocina de la subclase IId sin estrecha similitud con las lactococcinas ni con las bacteriocinas de tipo pediocina, también ejerce su mecanismo bactericida a través del sistema man-PTS pero en

una región distinta de la proteína IIC y que es activa contra *Listeria monocytogenes*, *Lactococcus lactis* y otros microorganismos, es decir, es una bacteriocina de esta subclase con amplio espectro de inhibición (Tymoszevska *et al.*, 2017).

El enfoque del espectro antibacteriano que se utilizó en este trabajo fue contra microorganismos de importancia en salud pública y que pueden ser transmitidos por alimentos, sin embargo, queda pendiente revisar cual sería el posible efecto que ejercerían QC1 y QC2 contra bacterias ácido-lácticas ya que están más relacionadas con el posible microorganismo productor *L. lactis*.

Bajo condiciones de laboratorio se espera que la cantidad de bacteriocina producida por un microorganismo productor sea elevada, lo que conlleva a evaluar su efecto bactericida contra los microorganismos que se requiera probar además de poder estudiar cómo es que se lleva a cabo la regulación de la producción de estos compuestos. Sin embargo, al considerar un sistema nativo, en un nicho ecológico, sus niveles de expresión podrían ser tan bajos que el efecto no sería bactericida sino bacteriostático o sin efecto alguno y su papel estaría relacionado con la comunicación de célula a célula dependiente del proceso de *quorum sensing* (Snyder & Worobo, 2014).

Hasta el momento se ha detectado actividad antimicrobiana por parte de los extractos citosólicos crudos en donde se encuentran todos sus componentes y no exclusivamente la bacteriocina recombinante. Con ayuda de la cromatografía de afinidad se logró purificar la bacteriocina QC2 (Figura 18).

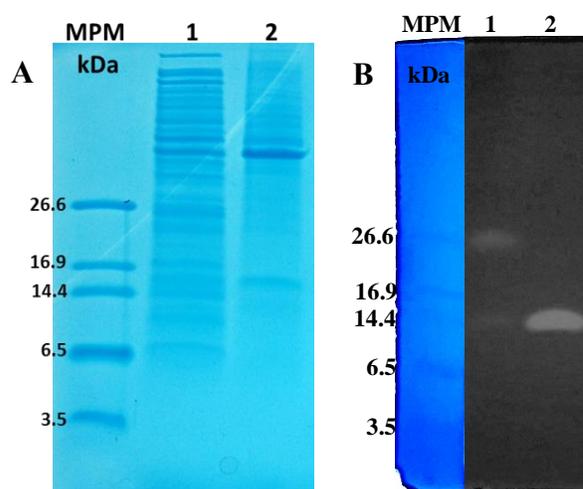


Figura 18. Perfil proteico y zimograma de la bacteriocina QC2 purificada.

MPM: Marcador de peso molecular polipéptido Bio•Rad.

1: Extracto crudo de QC2;

2: Extracto purificado de QC2.

La bacteriocina QC2 se logró purificar del extracto crudo (carril 2, Figura 18A) y se observó en el zimograma contra *L monocytogenes* CFQ-B-103 que hay una banda de actividad (carril 2, Figura 18B). A través de la purificación de la bacteriocina recombinante, se observó en el zimograma que la banda de actividad con un peso aproximado de 26.6 kDa de *E. coli* ya no se visualizó. A pesar de los resultados de la Figura 18B, es necesario optimizar el proceso de purificación de estas bacteriocinas, de modo que, se obtenga una mayor cantidad de éstas y poder realizar estudios posteriores referentes a su caracterización y posibles aplicaciones.

La investigación en el campo de las bacteriocinas se desarrolla de manera constante por el principal enfoque que se les ha atribuido, es decir, su capacidad de inhibir a otros microorganismos. Aunque es necesario realizar los estudios correspondientes con las bacteriocinas purificadas QC1 y QC2, en la actualidad se ha propuesto que algunos de estos péptidos puedan tener una aplicación viable en diferentes campos de los alimentos, farmacia, etc. e incluso en la lucha contra los microorganismos resistentes a los antibióticos convencionales (Yang *et al.*, 2014).

Dentro de las metodologías que han sido aplicadas para la búsqueda de nuevas bacteriocinas, existen enfoques utilizados para su búsqueda en metagenomas de diferentes nichos ecológicos (Velásquez & van der Donk, 2011; O'Sullivan *et al.*, 2015). Con estos enfoques se han identificado operones de bacteriocinas a través de la búsqueda de secuencias de genes codificantes de proteínas relacionadas con su procesamiento, que generalmente se encuentran adyacentes al gen codificante de la bacteriocina en el genoma, debido a que su procesamiento es necesario para que sean activas (Begley *et al.*, 2009; O'Sullivan *et al.*, 2011).

Sin embargo, tales estudios están dirigidos hacia el hallazgo en específico de cierto grupo de bacteriocinas y que utilizan una secuencia específica como molde de búsqueda en toda la información metagenómica. En este trabajo, se partió de la información recabada por Escobar-Zepeda (2016), en donde se realizó un escrutinio de genes con posible función de bacteriocinas de cualquier clase al realizar un análisis por homología contra bases de datos bien curadas (Swiss-Prot), así como la predicción de dominios conservados por modelos ocultos de Markov y extrapolándolos con bases de datos como Pfam. Estas nuevas metodologías permiten obtener compuestos funcionales no estudiados con anterioridad y que pueden ser objeto de aplicaciones en diferentes áreas.

9. Conclusión.

En el presente trabajo se utilizó la información metagenómica de un alimento artesanal madurado, el queso Cotija región de origen, cuyos datos permitieron seleccionar dos marcos de lectura abiertos no estudiados previamente, que al ser clonados y expresados en *E. coli* dieron como resultado a las bacteriocinas QC1 y QC2 con actividad bactericida exclusiva en contra de *Listeria monocytogenes* (CMI= 78 µg/mL).

10. Perspectivas.

- Optimizar el proceso de obtención y purificación para las bacteriocinas QC1 y QC2
- Evaluar el espectro antibacteriano de las bacteriocinas puras contra microorganismos de importancia en alimentos como bacterias ácido-lácticas y patógenos, además de investigar las posibles aplicaciones que estas pudieran presentar.
- Investigar el mecanismo de acción molecular que siguen las bacteriocinas QC1 y QC2, así como determinar el mecanismo de la capacidad protectora de las proteínas de inmunidad QC1-Inm y QC2- Inm en un sistema heterólogo adecuado.

11. Bibliografía.

- Alkhatib, Z., Abts, A., Mavaro, A., Schmitt, L., Smits, S.H.J. 2012. Lantibiotics: how do producers become self-protected? *Journal of Biotechnology*. 159(3): 145 - 154.
- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48(S1): 5 - 16.
- Begley, M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P. 2009. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(17): 5451–5460.
- Benmechernene, Z., Fernandez-No, I., Kihal, M., Böhme, K., Calo-Mata, P., Barros-Velazquez, J. 2013. Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*. 7: 66 - 73.
- Bravo Mendoza, A. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija. Tesis de Licenciatura: Facultad de Química, UNAM.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 10(421): 1-9.

- Castañeda Reyes, M. 2017. Aislamiento de bacterias ácido-lácticas dominantes en queso Cotija artesanal madurado. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Chikindas, M.L. & Montville, T.J. 2002. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. En: Juneja, V.K. y Sofos, J.N., editores. *Control of foodborne microorganisms*. New York: CRC Press, pp. 303-321.
- Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, E. 2011. Natural and heterologous production of bacteriocins. En: Drider, D. & Rebuffat, S., editores. *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. Springer, pp. 115-143.
- Cortés Díaz, L.A. 2009. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa en la búsqueda de bacterias ácido-lácticas en un queso artesanal mexicano. Tesis de Licenciatura: Facultad de Química, UNAM.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3(10): 777-788.
- Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. 2013. Bacteriocins. A viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*. 11: 1-11.
- Diep, D.B, Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., Nes, I.F. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(7): 2384-2389.
- Dischinger, J., Wiedemann, I., Bierbaum, G., Sahl, H.G. 2013. Lantibiotics. En: Kastin, A.J., editor. *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed. Elsevier Inc., pp. 119-128.
- Doyle, M.P., Busta, F., Cords, B.R., Davidson, P.M., Hawke, J., Hurd, H.S., Isaacson, R.E., Matthews, K., Maurer, J., Meng, J., Montville, T.J., Shryock, T.R., Sofos, J.N., Vidaver, A.K., Vogel, L. 2006. Antimicrobial resistance: Implications for the food system: An expert report, funded by the IFT Foundation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5(3): 71-137.
- Eddy, S.R. 2011. Accelerated profile HMM searches. *PLOS Computational Biology*. 7(10): e1002195.
- Escobar-Zepeda, G.A. 2016. Análisis taxonómico y del potencial metabólico del metagenoma del queso Cotija. Tesis de doctorado. Facultad de Química. UNAM.
- Escobar-Zepeda, A., Sánchez-Flores, A., Quirasco-Baruch, M. 2016. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*. 57: 116-127.
- Escobar, A. & Cross, T.A. 2018. False positives in using the zymogram assay for identification of peptidoglycan hydrolases. *Analytical Biochemistry*. 543(2018): 162-166.
- Fimland, G., Eijsink, V.G.H., Nissen-Meyer, J. 2002. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology*. 148(11): 3661-3670.

- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A. 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*. 44: D279-D285.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. En: Walker, J.M., editor. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press: pp. 571-607.
- Grace, D. 2015. Food safety in low and middle income countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12: 10490-10507.
- Gratia, J.P. 2000. André Gratia: A forerunner in microbial and viral genetics. *Genetics*. 156: 471-476.
- Herranz, C. & Driessen, A.J.M. 2005. Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(4): 1959–1963.
- Iwatani, S., Zendo, T., Sonomoto, K. 2011. Class IId or linear and non-pediocin-like bacteriocins. En: Drider, D. y Rebuffat, S., editores. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer, pp. 237-252.
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C.H., Vallenet, D., Yu, D.S., Choi, S.H., Couloux, A., Lee, S.W., Yoon, S.H., Cattolico, L., Hur, C.G., Park, H.S., Ségurens, B., Kim, S.C., Oh, T.K., Lenski, R.E., Studier, F.W., Daegelen, P., Kim, J.F. 2009. Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*. 394(4): 644-652.
- Jhonsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. 2005. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(10): 9243-9250.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B. 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive Bacteria. *Microbiology*. 157(Pt 12): 3256 - 3267.
- Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B. 2009. Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells. *Microbiology*. 155(9): 2949-2961.
- Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I.F., Diep, D.B. 2010. The Abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *Journal of Bacteriology*. 192(8): 2068–2076.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12(1-3): 39-86.
- Kotelnikova, E.A. & Gelfand, M.S. 2002. Bacteriocin production by Gram-positive bacteria and the mechanisms of transcriptional regulation. *Russian Journal of Genetics*. 38(6): 628 - 641.

- Kuipers, A., Rinck, R., Moll, G.N. 2011. Genetics, biosynthesis, structure, and mode of action of lantibiotics. En: Drider, D. y Rebuffat, S., editores. *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. Springer. pp. 147-169.
- Martin-Visscher, L.A. 2011. Class IIc or circular bacteriocins. En: Drider, D. y Rebuffat, S., editores. *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. Springer, pp. 213-236.
- Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. 2011. Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 12: 1205 - 1220.
- Nes, I.F., Brede, D.A., Diep, D.B. 2013. Class II non-lantibiotic bacteriocins. En: Kastin, A.J., editor. *Handbook of biologically active peptides*. Elsevier Inc., pp. 85-92.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 13-128.
- Nishie, M., Nagao, J.I., Sonomoto, K. 2012. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Science*. 17(1): 1 - 16.
- Olvera-García, M.E. 2013. Evaluación de la inocuidad de *Enterococcus* spp. aislados del queso Cotija. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Organización Mundial de la Salud. 2017. Inocuidad de los alimentos. Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva. [En línea] [Último acceso: 8 Febrero 2019]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>.
- O'Sullivan, O., Begley, M., Ross, P., Cotter, P.D, Hill, C. 2011. Further identification of novel antibiotic operons using LanM-based genome mining. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 3(1): 27-40.
- O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, P., Cotter, P.D. 2015. Bacteriocin mining in metagenomes. En: Nelson, K.E., editor. *Encyclopedia of metagenomics. Genes, genomes and metagenomes: basics, methods, databases and tools*. New York: Springer; pp. 54-60.
- Parks, W. M., Bottrill, A. R., Pierrat, O. A., Durrant, M. C., & Maxwell, A. 2007. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie*. 89: 500-507.
- Peng, Y., Leung, H.C.M., Yiu, S.M., Chin, F.Y.L. 2012. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*. 28(11): 1420-1428.
- Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K. 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*. 13(Suplemento 1): 1 - 13.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews*. 57(3): 543-594.
- Prescott, L.M., Harley, P., Klein, D.A. 2002. Microbiology. 5th ed. McGraw-Hill.

- Rea, M.C., Ross, R.P., Cotter, P.D., Hill, C. 2011. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. En: Drider, D. y Rebuffat, S, editores. *Prokaryotic antimicrobial peptides. from genes to application*. Springer, pp. 29-53.
- Schägger, H. & von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166: 368-379.
- Serrano-Maldonado, C.E., García-Cano, I., González-Canto, A., Ruiz-May, E., Elizalde-Contreras, J.M., Quirasco, M. 2018. Cloning and characterization of a novel N-acetylglucosaminidase (AtlD) from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 28(1): 14–27.
- Settanni, L. & Corsetti, A. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 121(2008): 123 – 138.
- Sofos, J.N. 2002. Microbial control in foods: Needs and Concerns. En: Sofos, J.N. y Juneja, V.K., editores. *Control of foodborne microorganisms*. NewYork: CRC Press. pp. 1-11.
- Snyder, A.B. & Worobo, R.W. 2014. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 94(1): 28 - 44.
- Tymoszevska, A., Diep, D.B., Wirtek, P., Aleksandrak-Piekarczy, T. 2017. The non-lantibiotic bacteriocin garvicin Q targets man-PTS in a broad spectrum of sensitive bacterial genera. *Scientific Reports*. 7(1): 1-14.
- Vandooren, J., Geurts, N., Martens, E., Van den Steen, P.E., Opendakker, G. 2013. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods*. 10(3): 211-220.
- van Heijenoort, J. 2011. Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 75(4): 636–663.
- Velásquez, J.E & van der Donk, W.A. 2011. Genome mining for ribosomally synthesized natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*. 15(1): 11-21.
- Vincent, P. A., & Moreno, R. D. 2009. The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25. *Current Medicinal Chemistry*. 16(5): 538-549.
- Wang, S., Weller, D., Falardeau, J., Strawn, L.K, Mardones, F.O., Adell, D.A., Moreno Switt, A.I. 2016. Food safety trends: from globalization of whole genome sequencing to application of new tools to prevent foodborne diseases. *Trends in Food Science and Technology*. 57: 188-198.
- Yang, S.C., Lin, C.H., Sung, C.T., Fang, J.Y. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: applications in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*. 5: 1 - 10.
- Zacahrof, M.P. & Lovitt, R.W. 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. A review article. *APCBEE Procedia*. 2: 50-56.
- Zhu, W., Lomsadze, A., Borodovsky, M. 2010. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. *Nucleic Acids Research*. 38(12): e132.

Zuñiga Bustos, B. 2009. Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.

12. Anexos.

- Alineamiento de la secuencia teórica (pET28a(+)-contig295) con los resultados de la secuenciación de la clona 1.

Las flechas verdes indican la secuencia de los genes de interés. La secuencia río arriba y río debajo de las flechas corresponde al vector de expresión.

- Electroferograma de la secuenciación de la clona 1 correspondiente a la construcción pET28a(+)-contig295.

- Alineamiento de la secuencia teórica (pET28a(+)-contig14178) con los resultados de la secuenciación de la clona 2.

Las flechas verdes indican la secuencia de los genes de interés. La secuencia río arriba y río debajo de las flechas corresponde al vector de expresión.

- Electroferograma de la secuenciación de la clona 2 correspondiente a la construcción pET28a(+)-contig14178.