



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* de origen alimentario

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q. A. Diana Ixchel Romero Sánchez

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Facultad de Química

Bertha González Pedrajo

Instituto de Fisiología Celular

Víctor Humberto Bustamante Santillán

Instituto de Biotecnología

Ciudad de México. Agosto, 2022 .



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

“Análisis de bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* de origen alimentario”

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. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología, UNAM.
Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán	Instituto de Biotecnología, UNAM.

Este proyecto fue financiado por el PAPIIT IN220921: “*Enterococcus* de origen alimentario como fuente de nuevas bacteriocinas con actividad antilisterial”, por el PAIP FQ con clave 5000-9102 y se agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El jurado asignado:

Presidente Dr. Agustín López Munguía Canales - Instituto de Biotecnología, UNAM.

Vocal Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete - Instituto de Biotecnología, UNAM.

Vocal Dr. Francisco Ruíz Terán - Facultad de Química, UNAM.

Vocal Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán - Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Secretario Dra. Rosa Laura Camarena Mejía - Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Índice General	Página
Índice de Tablas	iii
Índice de Figuras	v
Resumen	1
1. Introducción.....	3
1.1 Bacterias ácido lácticas.....	3
1.2 Generalidades de <i>Enterococcus spp</i>	3
1.2.1 Participación de <i>Enterococcus</i> en alimentos fermentados.....	4
1.3 Bacteriocinas: enterocinas	5
1.3.1 Clasificación de enterocinas	6
1.3.2 Contexto genómico	10
1.3.3 Biosíntesis y secreción	11
1.3.4 Sistema de inmunidad.....	14
1.3.5 Mecanismo de acción	16
1.3.6 Aplicaciones de las bacteriocinas	18
1.3.7 Expresión heteróloga de bacteriocinas.....	20
2. Antecedentes	22
3. Justificación	25
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	25
5.1 Objetivos particulares.....	25
6. Metodología	26
6.1 Verificación de pureza de la cepa de <i>E. faecium</i> QD-2	26
6.2 Extracción ADN.....	26
6.3 Búsqueda bioinformática de secuencias codificantes para bacteriocinas ...	27
6.4 Análisis bioinformático de las secuencias proteínicas de los genes seleccionados	28
6.5 Cepas y vectores	29
6.6 Amplificación de los genes de interés	30
6.7 Reacción de digestión	32
6.8 Reacción de ligación.....	33

6.9 Células competentes y transformación de <i>E. coli</i> cepas BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS.....	33
6.10 Análisis de transformantes.....	34
6.11 Producción de las bacteriocinas.....	35
6.12 Geles de Tris-Tricina-SDS-PAGE y zimogramas.....	36
6.13 Western Blot.....	37
6.14 Ensayo de difusión en agar.....	38
6.15 Determinación de proteína por el método de Bradford.....	38
7. Resultados y discusión	39
7.1 Extracción de ADN.....	39
7.2 Secuenciación e información del genoma	39
7.3 Búsqueda bioinformática de secuencias codificantes para bacteriocinas ...	41
7.4 Selección de secuencias de interés.....	42
7.5 Análisis <i>in silico</i> de secuencias de interés.....	54
7.6 Amplificación de los genes seleccionados.....	56
7.7 Clonación en pET28a(+) y transformación en <i>E. coli</i> cepas BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS.....	57
7.8 Producción de las bacteriocinas.....	62
7.9 Espectro inhibitorio de los péptidos 616c y 616i.....	68
8. Conclusiones	73
9. Perspectivas	73
10. Bibliografía.....	74

Índice de Tablas

Tabla 1. Enterocinas de clase II.	8
Tabla 2. Características moleculares de la cepa QD-2 de <i>E. faecium</i> .	23
Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos.	31
Tabla 4. Componentes de la reacción para la amplificación de los genes 615 y 616.	31
Tabla 5. Condiciones para la reacción de amplificación de los genes 615 y 616.	32
Tabla 6. Componentes de la reacción para la digestión de los productos de PCR purificados y de plásmido pET28a(+).	33
Tabla 7. Componentes de la reacción para la reacción de PCR utilizando oligos T7 universales.	35
Tabla 8. Condiciones para la reacción de PCR utilizando oligos T7 universales.	35
Tabla 9. Datos del genoma de <i>E. faecium</i> cepa QD-2 y la anotación de este	42
Tabla 10. Información de los contigs con genes de bacteriocina.	43
Tabla 11. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias proteínicas con anotación de bacteriocina y proteínas accesorias en Contig 2.	46
Tabla 12. Secuencia proteínica de Enterocina 29 β y ORF3.	48
Tabla 13. BLAST y búsqueda de dominios para la secuencia proteínica ORF3 y la secuencia reportada como Enterocina 29 β .	48
Tabla 14. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias proteínicas con anotación de bacteriocina y proteínas accesorias en Contig 3.	50
Tabla 15. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias proteínicas con anotación de bacteriocina y proteínas accesorias en Contig 20.	52
Tabla 16. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias proteínicas con anotación de bacteriocina y proteínas accesorias en Contig 96.	52
Tabla 17. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias con anotación de proteínas accesorias de bacteriocinas, pero que en la secuencia nucleotídica no presentan en su vecindad gen codificante de bacteriocina.	53
Tabla 18. Contexto genómico de las bacteriocinas presentes en el genoma de la cepa QD-2 de <i>E. faecium</i> .	54
Tabla 19. Secuencia de aminoácidos de bacteriocinas hipotéticas.	55
Tabla 20. Comparativo concentración de proteína vs diámetro halo de inhibición para cepa BL21(DE3)pLysS-pET28a(+), y construcciones pET28a(+)- 616c y pET28a(+)- 616i en BL21(DE3)pLysS.	70

Índice de Figuras

Figura 1. Operones involucrados en la formación de las bacteriocinas Nisina A y Pediocina PA1.	11
Figura 2. Biosíntesis y secreción de bacteriocinas para la clase I y clase II.	14
Figura 3. Mecanismos de acción de las diferentes clases de bacteriocinas.	16
Figura 4. Detección de la enterocina A en la cepa QD-2 de <i>E. faecium</i> .	23
Figura 5. Diagrama general de trabajo.	26
Figura 6. Células del cultivo de cepa QD-2 <i>E. faecium</i> a 48 h de crecimiento (A). Muestras de ADN purificado de <i>E. faecium</i> para secuenciación (B).	40
Figura 7. Reporte de calidad de secuenciación del genoma de <i>E. faecium</i> cepa QD-2.	41
Figura 8. Contexto genómico de los genes relacionados a bacteriocinas.	44
Figura 9. Contexto genómico del Contig 2.	46
Figura 10. Contexto genómico del Contig 3.	50
Figura 11. Contexto genómico del Contig 20.	51
Figura 12. Contexto genómico del Contig 66.	52
Figura 13. Modelamiento <i>in silico</i> de las secuencias proteínicas 615 y 616.	55
Figura 14. Hidrofobicidad y probabilidad de secuencia señal de bacteriocinas hipotéticas.	56
Figura 15. Amplicones de los genes 615 y 616 con los oligonucleótidos específicos.	57
Figura 16. Análisis de clonas seleccionadas.	59
Figura 17. Secuencia nucleotídica obtenida de los plásmidos (A) pET28a(+)-615c y (B) pET28a(+)-615i .	60
Figura 18. Secuencia nucleotídica obtenida de los plásmidos (A) pET28a(+)-616c y (B) pET28a(+)-616i.	61
Figura 19. Perfil proteínico y actividad hidrolítica de la fracción citosólica de la cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3) sin plásmido y con pET28a(+) sin inserto	63
Figura 20. Perfil proteínico y actividad hidrolítica de las fracciones citosólicas obtenidas de la cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS sin plasmidos y con pET28a(+) sin inserto.	64
Figura 21. Evaluación de la expresión y actividad de la bacteriocina recombinante 616c y 616i en la cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3)).	66
Figura 22. Evaluación de la expresión y actividad de la bacteriocina recombinante 616c y 616i en la cepa BL21(DE3)pLysS.	67
Figura 23. Difusión en agar contra <i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103.	69

Figura 24. Modelamiento *in silico* de las construcciones 616c y 616i en pET28a(+).

71

Resumen

Las bacterias del género *Enterococcus* pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas. Es un género que no es generalmente reconocido como seguro porque existen cepas patógenas oportunistas de origen nosocomial. Sin embargo, existe evidencia de que las cepas aisladas de alimentos no pertenecen al complejo clonal asociado a las que causan infecciones en pacientes hospitalizados.

En el grupo de trabajo se han aislado enterococos provenientes de quesos artesanales mexicanos, en específico, cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*. Estas cepas presentan regiones genómicas frecuentemente ausentes en los aislados nosocomiales. Entre las cuales se encuentran genes que codifican para bacteriocinas, un sistema de inmunidad bacteriano cuyo blanco de acción es la membrana citoplásmica, reconocen proteínas de transporte de carbohidratos y forman poros en la membrana celular, agotando el potencial transmembranal y/o el gradiente de pH, lo que resulta en la fuga de moléculas indispensables. Se ha reportado que las bacteriocinas tienen actividad contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Vibrio cholerae* y algunas otras bacterias patógenas de interés alimentario.

En un estudio previo se evaluó la presencia de marcadores genéticos para la diferenciación de cepas de *Enterococcus* de origen alimentario, con base en los resultados, se identificó que sólo una de las cepas analizadas, la QD-2, presenta el genotipo para producción de enterocina A y fue capaz de producir la cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Con base en dicha información, este trabajo tuvo como objetivo caracterizar la actividad antibacteriana de algunas de las bacteriocinas putativas codificadas en el genoma de la cepa QD-2 de *Enterococcus faecium*, de origen alimentario. Para ello se obtuvo la secuencia del genoma de la cepa y por métodos bioinformáticos se buscaron secuencias codificantes para bacteriocinas. Se encontraron ocho bacteriocinas putativas, de las cuales cinco ya están caracterizadas. A las tres restantes, mediante bioinformática, se les determinó sus propiedades fisicoquímicas y se encontró que únicamente los péptidos 615 y 616 tienen propiedades de posible

actividad de bacteriocina anteriormente no reportada. El gen que codifica para el péptido 616, se clonó y expresó en dos versiones, completo (616c) y sin posible señal de secreción, en dos cepas de *E. coli*, BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS. Por western blot no se pudo demostrar su expresión. No obstante, se realizó un análisis fenotípico contra *Listeria monocytogenes* mediante zimografía y difusión en agar. Los resultados sugieren que el péptido 616, sin delección de péptido señal, tiene actividad lítica contra *Listeria monocytogenes*, lo que la ubicaría en la clase II.2. Se propone que en su mecanismo de acción el extremo carboxilo terminal hidrofóbico, independientemente de la conformación estructural, estaría siendo suficiente para la inhibición del crecimiento del microorganismo blanco.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias benéficas, Gram-positivas, no formadoras de esporas, cocos o bacilos, cuyo mayor producto de la fermentación de carbohidratos es el ácido láctico. Son responsables de muchos procesos de fermentación de alimentos, aunque nativamente se encuentran en alimentos no fermentados. También están presentes en genitales, y en tracto respiratorio e intestinal de humanos y animales. En la industria de alimentos son ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores para obtener productos fermentados, donde la producción de diversos compuestos contribuye al sabor, olor, color y textura del alimento. Destaca su alto potencial antimicrobiano conferido por la producción de compuestos antagonistas a otros microorganismos, como ácidos orgánicos, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno o péptidos antimicrobianos, capaces de controlar bacterias patógenas o microorganismos descomponedores de alimentos tales como *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Salmonella* y *Bacillus* (Wang & Wang, 2014)

Las BAL se dividen en diversos géneros, de estos los más importantes en alimentos son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. De los anteriores, el género *Enterococcus* es de particular interés por encontrarse en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, donde viven como comensales y proveen de varios efectos benéficos (Khan *et al.*, 2010).

1.2. Generalidades de *Enterococcus spp*

Los enterococos son cocos Gram-positivos en pares o en cadenas cortas, no formadores de esporas, catalasa y oxidasa negativo, y anaerobios facultativos. El género *Enterococcus* pertenece a las bacterias ácido lácticas (BAL) y representan el tercer género más grande de BAL, después de *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Braïek & Smaoui, 2019). Su mayor producto de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico (Franz *et al.*, 2007). Son bacterias mesófilas capaces de crecer de 10°C a 45°C con la temperatura óptima de crecimiento entre 30°C y 35°C. También, son capaces de crecer en un amplio rango de pH, que va desde 4.4 hasta 9.6, y en medio hiper salado con 6.5% de NaCl (Braïek & Smaoui, 2019). Presentan DNA con contenido G+C <40%, (Franz *et al.*, 2007).

El género *Enterococcus* es un grupo diverso y ecológicamente significativo, los miembros de este género están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Constituyen parte de la microbiota comensal del tracto gastrointestinal de mamíferos (en primer lugar *E. faecalis*, seguido de *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae*) (Franz *et al.*, 2007) y son ubicuos en plantas y en alimentos fermentados (Liu *et al.*, 2019). *Enterococcus* tiene un papel en la maduración de quesos, debido a las propiedades lipolíticas y proteolíticas que permiten el desarrollo de aroma y sabor en el queso. Incluso, exhiben la propiedad benéfica de producción de bacteriocinas, presentando actividad contra patógenos potenciales como el grupo D de estreptococos y *Listeria* (Chattargi *et al.*, 2018).

1.2.1. Participación de *Enterococcus* en alimentos fermentados

Los enterococos están presentes en diversos alimentos (Braïek & Smaoui 2019), como son los descritos a continuación:

Productos lácteos. La predominancia de enterococos en la leche tradicionalmente ha sido considerada como contaminación fecal, sin embargo, diversos estudios han reportado que no siempre es así (Morandi *et al.*, 2013; Gaaloul *et al.*, 2014; Kadri *et al.*, 2015). De hecho, *Enterococcus spp.*, tiene la capacidad de adaptación a diversos sustratos y condiciones de crecimiento. En consecuencia, los enterococos pueden estar presentes tanto en leche cruda como pasteurizada proveniente de vaca, oveja, cabra o camello, así como en leche humana (Kadri *et al.*, 2015; El Hatmi *et al.*, 2018; Alzubaidy *et al.*, 2019).

Los enterococos también pueden estar presentes en quesos, tanto en los hechos con leche cruda como en los obtenidos a partir de leche pasteurizada, donde las especies más comúnmente presentes son *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. casseliflavus* y *E. lactis* (Gelsomino *et al.*, 2002; Giraffa *et al.*, 2003; Ghrairi *et al.*, 2004; Burdychova & Komprda, 2007). La presencia de las especies varía dependiendo del tipo de queso, de la leche utilizada en la elaboración, de la temporada de manufactura, y de las condiciones de producción y maduración. Es importante recalcar que *Enterococcus spp.* tiene un papel benéfico en la fermentación y maduración del queso, así como en el desarrollo de olores, texturas y sabores específicos, resultado de las actividades proteolítica y lipolítica, metabolismo de citrato y producción de diacetilo, entre otros compuestos volátiles

importantes (Favaro *et al.*, 2015; Portilla-Vázquez *et al.*, 2016; Yunita *et al.*, 2018; Vandera *et al.*, 2019).

Vegetales fermentados. Enterococos pueden estar presentes en vegetales fermentados debido a la reacción de fermentación con predominancia de *E. faecium* y *E. faecalis* en soya, sorgo y aceitunas fermentadas (Ben Omar *et al.*, 2004; Todorov & Holzappel, 2015; Perricone *et al.*, 2017; Kavitake *et al.*, 2018; Liptáková *et al.*, 2017).

Productos cárnicos. Dado que los enterococos son parte de la microbiota comensal del tracto intestinal de animales, durante la matanza pueden trasladarse a la carne. Las especies más comunes son *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. munditi*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gilvus* y *E. hirae* (Barakat *et al.*, 2000; Barbosa *et al.*, 2009; Panghal *et al.*, 2017). Los salamis y salchichas fermentados también pueden hospedar enterococos (ur Rahman *et al.*, 2017; Zgomba *et al.*, 2018).

Pescados y mariscos. Varias especies de enterococos han sido aisladas de vísceras y piel de pescado: *E. mundtii*, *E. faecium* y *E. durans* (Campos *et al.*, 2006; Sánchez-Valenzuela *et al.*, 2010; Migaw *et al.*, 2013; El-Jeni *et al.*, 2015; Braïek *et al.*, 2018; El-Jeni *et al.*, 2019). Respecto a los mariscos, la prevalencia de enterococos es más baja que en pescado crudo o fermentado (Nair *et al.*, 2005). Las cepas aisladas más comunes son *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* y *E. hirae* (Ben Said *et al.*, 2016).

1.3. Bacteriocinas: enterocinas

La presencia de enterococos en alimentos fermentados es relevante, por su capacidad de producción de antimicrobianos, como las bacteriocinas. Éstas se definen como péptidos o proteínas antimicrobianas sintetizadas ribosomalmente, producidos por una amplia variedad de bacterias, incluyendo bacterias ácido lácticas (BAL), que presentan efecto bacteriostático o bactericida en contra de cepas Gram-positivas cercanamente relacionadas a la cepa productora, aunque algunas muestran actividad de amplio espectro (capacidad antimicrobiana contra cepas no relacionadas). La gran mayoría son proteínas pequeñas, compuestas por 20 a 60 aminoácidos, catiónicas, hidrofóbicas, termoestables y presentan estabilidad en un amplio rango de pH. Por ser no tóxicas, por su eficacia y seguridad, las bacteriocinas de BAL se han utilizado ampliamente como

bioconservador de alimentos, en vegetales, carne y otros productos. Así mismo, se han establecido como alternativas viables a los antibióticos (Sushida *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019).

Se denominan enterocinas a las bacteriocinas producidas por el género *Enterococcus*, no obstante, en este trabajo se utilizan ambos términos indistintamente. Basándose en la similitud de las secuencias, en las diferentes modificaciones post-traduccionales y propiedades fisicoquímicas se ha propuesto un método de clasificación (Franz *et al.*, 2007) donde las enterocinas se dividen en cuatro clases: **la clase I o lantibióticos, la clase II o no lantibióticos, la clase III o enterocinas cíclicas y la clase IV o proteínas grandes.**

1.3.1. Clasificación de enterocinas

Clase I. Lantibióticos. Son péptidos de <5 kDa, de síntesis ribosomal y sufren extensas modificaciones post-traduccionales. Contienen residuos de lantionina y β -metil lantionina, 2,3-dehidroalanina (Dha) y el 2,3-dehidrobutirina (Dhb), resultado de la condensación de residuos de treonina y serina (Franz *et al.*, 2007; Snyder & Worobo, 2014).

La citolisina producida por *E. faecalis*, es el único lantibiótico conocido. Está constituida por dos péptidos de 3.4 y 2.0 kDa, cuyos genes están codificados en un plásmido. Las subunidades estructurales después de las modificaciones post-traduccionales contienen únicamente residuos de lantionina. Ésta bacteriocina es hemolítica, afectando a los eritrocitos. Tal fenotipo usualmente es asociado a los enterococos aislados de ambientes nosocomiales y contribuye a la virulencia bacteriana de *E. faecalis*. Además, su espectro antimicrobiano también incluye a *Enterococcus* y Gram-positivas (Brock & Davie, 1963; Gilmore *et al.*, 1994; Franz *et al.*, 2007).

Clase II. No Lantibióticos. Péptidos de tamaño entre 4-6 kDa, estables al calor, sintetizados ribosomalmente, cuya única modificación post-traducciona consiste en el corte del péptido líder durante el transporte hacia fuera de la célula. Algunos son sintetizadas como prepéptidos, conformado por un péptido líder de 14-30 aminoácidos, con un sitio conservado de procesamiento de 2 residuos de glicina en las posiciones -2 y -1 (Franz *et al.*, 2007).

La mayoría de las enterocinas pertenecen a la clase II. Poseen un amplio rango de actividad inhibitoria contra bacterias causantes de deterioro de alimentos, así como de patógenos presentes en éstos (Braïek & Smaoui, 2019).

Subclase II.1 Bacteriocinas tipo pediocinas. El grupo de las enterocinas tipo pediocinas es el más estudiado dentro de los péptidos antimicrobianos. Todos los integrantes contienen una región hidrofílica catiónica en el extremo N-terminal con la secuencia consenso KYYGNGLVXC o 'caja pediocina' que se organiza en una estructura de lámina β antiparalela en forma S, estabilizada por un puente disulfuro. En ausencia de este puente, la actividad antimicrobiana se reduce drásticamente (Nes *et al.*, 2013). Respecto al extremo C-terminal de las bacteriocinas tipo-pediocina, es menos conservado y presenta una estructura más hidrofóbica o una α -hélice anfifílica, la cual podría estar interactuando con el núcleo hidrofóbico de la membrana celular blanco y funciona como determinante en la especificidad de su célula blanco (Jhonsen *et al.*, 2004). Cabe destacar que no todas las bacteriocinas de este grupo tienen en su secuencia líder el sitio de doble-glicina, algunas como la enterocina P y la bacteriocina 31, contienen una secuencia líder tipo-sec la cual es removida en el proceso de secreción (Nes *et al.*, 2007).

De esta subclase, la mejor caracterizada es la enterocina A. Interesantemente, se conoce que la enterocina A es coproducida con otras bacteriocinas, usualmente en combinación con enterocina B y ocasionalmente con enterocina P, enterocinas L50 y enterocina Q. Resalta, la capacidad génica de los enterococos de producir más de una enterocina, como comúnmente se ha observado en múltiples bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas (Braïek & Smaoui, 2019).

Son generalmente activas en contra de especies de *Listeria*, como *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii* (Chen & Hoover, 2003). En la Tabla 1 se muestran ejemplos de enterocinas de esta clase, si su gen estructural está codificado en plásmido o cromosoma, el peso molecular y el espectro antimicrobiano.

Subclase II.2 Enterocinas sintetizadas sin péptido líder. Este grupo incluye las bacteriocinas que no tienen el motivo consenso KYYGNGLVXC, que son sintetizadas sin el péptido líder requerido para los sistemas de exporte. Las enterocinas de esta clase

consisten en uno o dos péptidos, y todas comparten la presencia de los residuos conservados Lys¹⁰ y Lys²¹. Se cree que su transporte podría estar mediado por transportadores ABC como sucede en la bacteriocina aureocina A70 de *S. aureus* (Franz *et al.*, 2007).

Ejemplos de estas bacteriocinas se presentan en la Tabla 1, la especie productora, si está codificada en plásmido o cromosoma, así como su espectro antimicrobiano (Cintas *et al.*, 1998; Franz *et al.*, 2007).

Subclase II.3 Otras enterocinas lineales no tipo pediocina. Este grupo incluye a las bacteriocinas lineales tipo no pediocina que son sintetizadas con péptido líder. En algunos casos, su actividad antimicrobiana está reforzada por la presencia de un segundo péptido (como en la enterocina 1071), aunque también se incluyen en la clasificación a bacteriocinas de un solo péptido (Franz *et al.*, 2007).

Ejemplos de estas bacteriocinas se presentan en la Tabla 1, la especie productora, si está codificada en plásmido o cromosoma, así como su espectro antimicrobiano (Casaus *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 2000).

Tabla 1. Enterocinas de clase II.

Enterocina	Microorganismo	Plásmido o cromosoma	Peso Molecular (kDa)	Espectro antimicrobiano
Subclase II.1 Bacteriocinas tipo pediocina				
Enterocina A	<i>E. faecium</i>	Cromosoma	4.8	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> spp, <i>Listeria</i> spp
Mundticina	<i>E. munditii</i>	Cromosoma	4.2	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> . <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> spp. <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. botulinum</i>
Enterocina CRL35	<i>E. munditii</i>	Cromosoma	4.3	Antilisterial y antiviral
Bacteriocina 31	<i>E. faecalis</i>	Plásmido	5.0	<i>Enterococcus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>
Bacteriocina T8	<i>E. faecium</i>	Plásmido	5.1	<i>E. faecalis</i> , <i>Lactobacillus</i> sp, <i>Enterococcus</i> sp., <i>Propionibacterium</i> sp.

Tabla 1 continuación. Enterocinas de clase II.

Enterocina	Microorganismo	Plásmido o cromosoma	Peso Molecular (kDa)	Espectro antimicrobiano
Bacteriocina RC714	<i>E. faecium</i>	Plásmido	3.0	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Listeria spp</i> , <i>Leuconostoc sp</i> , <i>P.pentosaceus</i> (Del Campo et al., 2001)
Bacteriocina 43	<i>E. faecalis</i>	Plásmido	5.5	<i>Enterococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Enterocina SE-K4	<i>E. faecium</i>	Cromosoma	5.3	<i>E.faecium</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C.beijerinckii</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Enterocina P	<i>E. faecium</i>	Cromosoma	4.9	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Peiodoccus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i>
Subclase II.2 Enterocinas sintetizadas sin péptido líder				
Enterocina L50	<i>E. faecium</i>	Plásmido	5.2	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i>
Enterocina L50A/L50B	<i>E. faecium</i>	Plásmido	5.2/5.2	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i>
Enterocina MR10A/ MR10B	<i>E. faecalis</i>	Cromosoma	5.2/5.2	<i>Enterococcus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>M. luteus</i> , <i>Bacillus</i> (Martín-Platero et al., 2006)
Enterocina RJ-11	<i>E. faecium</i>	Plásmido	5.2	<i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i> . (Yamamoto et al., 2003)
Enterocina Q	<i>E. faecalis</i>	Plásmido	3.9	<i>Enterococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>S. aureus</i> .
Enterocina EJ97	<i>E. faecalis</i>	Plásmido	5.3	<i>Enterococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria spp</i> , <i>S. aureus</i>
Subclase II.3 Otras enterocinas lineales no tipo pediocina				
Enterocina 1071 (A/B)	<i>E. faecalis</i>	Plásmido	4.3/3.9	<i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Listeria spp</i>
Enterocina B	<i>E. faecium</i>	Cromosoma	5.4	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. perfringens</i> .
Bacteriocina 32	<i>E. faecium</i>	Cromosoma	7.9	<i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. durans</i> .

Clase III. Péptidos antibacteriales cíclicos. Bacteriocinas que son sintetizadas ribosomalmente, sin modificación post-traducciona y ligados cabeza-cola. De estos péptidos la mejor caracterizada es la enterocina AS-48 de *E. faecalis*, cuyo gen está codificado en un plásmido. Es una molécula cíclica de 70 aminoácidos como resultado de la unión de la metionina N-terminal (Met¹) y el triptófano del extremo carboxilo (Trp⁷⁰) con peso molecular de 7.1 kDa (Franz *et al.*, 2007). Su espectro antimicrobiano incluye a *Enterococcus*, *Bacillus*, *S. aureus* y *Micococcus sp* (Gálvez *et al.*, 1989).

Clase IV. Enterolisinas. Son las enterocinas de alto peso molecular, termolábiles que efectúan degradación enzimática de la pared celular de la bacteria blanco (Franz *et al.*, 2007). La única conocida es la Enterolisina A, codificada en el cromosoma de *E. faecalis*, con peso molecular de 34.5 kDa. Presenta espectro antimicrobiano contra *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria* y *Staphylococcus*.

1.3.2. Contexto genómico

Los genes asociados con la expresión de las bacteriocinas usualmente presentan arreglos de tipo operón. Sin embargo, en algunos casos los genes están bajo regulación de múltiples promotores, por lo que su disposición está dada en forma de conjuntos de genes policistrónicos, aunque el término operón es utilizado (Snyder & Worobo, 2014).

Se han identificado operones funcionales de bacteriocinas en el cromosoma bacteriano. No obstante, su amplia distribución en la naturaleza, su función no esencial y el conferir ventajas a las especies que las producen las asocian con elementos transferibles como los plásmidos (o transposones conjugativos como en el caso de la nisina A).

En todos los casos, el operón de bacteriocina contiene al gen estructural que codifica para la bacteriocina o el prepéptido. Esta secuencia peptídica puede ser modificada enzimáticamente, procesada proteolíticamente durante la secreción, y adoptar la correspondiente estructura secundaria o terciaria. Estos procesos son necesarios para que la bacteriocina sea activa. Adicionalmente, entre los genes auxiliares se incluyen a los péptidos de inmunidad, enzimas modificadoras, maquinaria de secreción, y sustancias factor de inducción tipo bacteriocina (Snyder & Worobo, 2014; Sushida *et al.*, 2018).

A continuación, se describe a detalle los genes accesorios por clase de bacteriocina.

Clase I. Los operones para la biosíntesis generalmente contienen genes que codifican para pre-péptidos, enzimas responsables de reacciones de modificación, proteasas de procesamiento responsables de remover el péptido líder, proteínas de transporte del sistema ABC involucradas en la traslocación del péptido, proteínas regulatorias, y proteínas de inmunidad. El mejor caracterizado es el de la nisina A (Figura 1A).

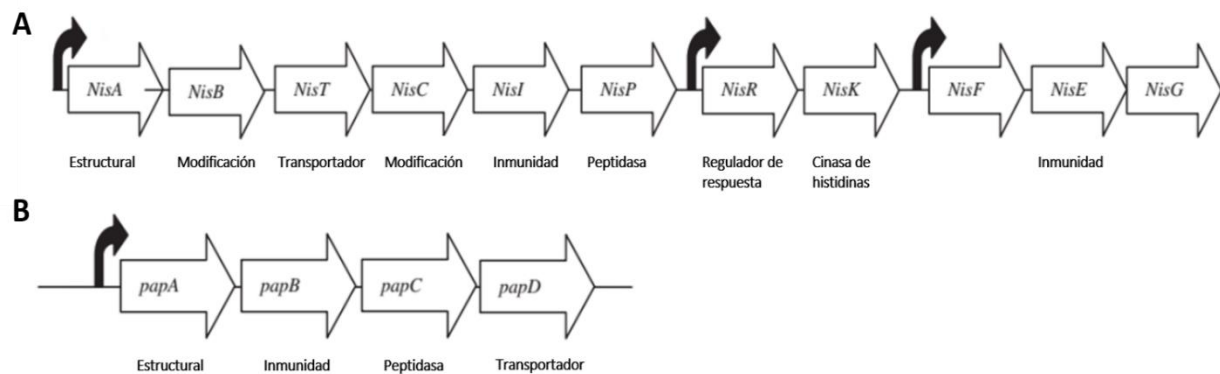


Figura 1. Operones involucrados en la formación de las bacteriocinas Nisina A y Pediocina PA1. Tomado y modificado de Snyder y Worobo (2014).

Clase II. En general el operón consiste en el gen estructural codificante para el precursor del péptido, inmediatamente seguido del gen de inmunidad, y los genes de transporte ABC. En algunos casos, están presentes genes regulatorios accesorios que son esenciales para el exporte de las bacteriocinas clase II. El más estudiado es el de la pediocina PA1 que tiene un gen estructural, de inmunidad, de peptidasa y de transporte (Figura 1B) (Chen & Hoover, 2003). Sin embargo, en el caso de las bacteriocinas no tipo pediocina, la presencia de los genes de inmunidad y de transporte es variable (Angelopoulou *et al.*, 2020).

1.3.3. Biosíntesis y secreción

El posicionamiento del gen estructural o de los genes de modificación bajo el control de un único promotor, asegura que la inducción de la expresión suceda únicamente cuando la secreción de la bacteriocina ofrezca una ventaja para la célula. Entonces, la expresión es solamente utilizable cuando se alcanza una cierta densidad de células vecinas o *quorum sensing*, lo cual se observa durante la fase lag tardía de crecimiento (Snyder &

Worobo, 2014). Además, usualmente la inducción de los péptidos sucede en condiciones de estrés, como la disminución de nutrientes (Chen & Hoover, 2003).

La biosíntesis de las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas usualmente es regulada a través de sistemas de transducción de señales, en específico por el sistema de dos componentes. Este sistema regulatorio consiste de 2 proteínas productoras de señal, una cinasa de histidina unida a membrana, y un regulador de respuesta (RR) (Chen & Hoover, 2003). La única diferencia entre las clases I y II es el péptido inductor.

Clase I. Bajo la regulación transcripcional del sistema regulatorio de dos componentes, indicativo de que las bacteriocinas se autorregulan y que los péptidos por sí mismos activan su expresión. La bacteriocina por si misma interactua con la proteína cinasa de histidina, la que transfiere el fosfato al segundo componente, el regulador de respuesta, localizado en el citoplasma. Esto causa un cambio en la estructura del regulador y se activa la transcripción (Snyder & Worobo, 2014) (Figura 2).

Clase II. De manera general la regulación está asociada a la inducción por péptidos de feromonas. Usualmente este factor de inducción procede de un gen único presente en el contexto genómico de la bacteriocina, que codifica para sustancias tipo bacteriocina (lo que puede dar falsos positivos cuando se buscan genes putativos para bacteriocinas). El factor de inducción es sintetizado como pre-péptido y sujeto a procesamiento proteolítico, es secretado a través del mismo transportador que la bacteriocina y su señal reconocida por los dominios extracelulares de las proteínas cinasa de histidina (Figura 2) (Snyder & Worobo, 2014). Como moléculas señalizadoras de bacterias Gram-positivas tienen actividad biológica en el rango de concentración nanomolar (Nilsen *et al.*, 1998; Franz *et al.*, 2000). En específico, el sistema mejor caracterizado es el de las bacteriocinas clase IIa. La síntesis de los péptidos tipo pediocina es regulada por un sistema regulador de tres componentes que es homólogo al sistema de traducción de señales en bacterias. Los componentes del sistema regulatorio consisten en un factor de inducción, una proteína cinasa de histidina y un regulador de respuesta (Franz *et al.*, 2000).

En ambas clases de bacteriocinas, una vez que sucede la expresión inicial, la síntesis de bacteriocina está sujeta a regulación por producto final. La terminación de la transcripción es independiente de Rho. Además, los operones son flanqueados por secuencias

regulatorias, como repetidos invertidos y palíndromes, que también funcionan como indicativo de recombinación o de eventos de transposición (Snyder & Worobo, 2014).

La mayoría de las bacteriocinas son sintetizadas como prepéptidos biológicamente inactivos que llevan un péptido líder en el extremo N-terminal unido al propéptido del C-terminal. Algunas funciones se han propuesto para el péptido líder. Puede servir como sitio de reconocimiento, para proteger a la cepa productora manteniendo al lantibiótico en estado inactivo mientras esté en el interior de la célula, interactuar con el dominio propéptido para asegurar la conformación adecuada y esencial para la interacción enzima-sustrato, además mediante su carga hidrofóbica es reconocido por el elemento citoplásmico de la maquinaria de secreción (Chen & Hoover, 2003; Sushida *et al.*, 2018).

Clase I. Para los lantibióticos, la serina, treonina y cisteína son los aminoácidos en el propéptido que sufren modificaciones post-traduccionales para formar la Lantionina/MeLan. La vía general de biosíntesis de lantibióticos sigue el siguiente esquema: formación de prepéptido, reacciones de modificaciones, corte proteolítico del péptido líder y la traslocación del prepéptido modificado o propéptido maduro a través de la membrana citoplásmica.

Clase II. Son sintetizadas como prepéptido que tienen el líder N-terminal conservado. El péptido líder del precursor de la bacteriocina es reconocido porque contiene un doble sitio de glicina para el corte por enzimas peptidasas. Este sitio está conservado a lo largo de la clase II de las enterocinas, excepto en la subclase II.3. Después de la formación del prepéptido, éste es procesado mediante la remoción del péptido líder y la subsecuente exportación a través del transportador ABC o su proteína accesoria. Algunos miembros tienen modificaciones como la formilación del residuo N-terminal o glicosilación.

El exporte de las bacteriocinas usualmente es mediado por proteínas de unión a ATP, transportadores ABC, y de una o más proteínas accesorias. Para los transportadores de las bacteriocinas de clase I y II se ha reportado un único gen codificante para la proteína. Ésta proteína contiene un dominio de unión a ATP, y un dominio de cruce de membrana. Además, cuando la bacteriocina es sintetizada como prepéptido, el transportador ABC llega a contener un dominio proteolítico N-terminal, perteneciente a la familia de las

proteasas de cisteína que es responsable de la remoción del péptido líder, aunque existen mínimas diferencias dependiendo de la clase de bacteriocina.

Clase I. El corte puede ser realizado por proteasas de serina.

Clase II. Se cree que las proteínas accesorias facilitan la translocación y/o remoción del péptido líder (Håvarstein *et al.*, 1995; Jack & Sahl, 1995; Cotter *et al.*, 2005).

Por otra parte, existe el caso particular del transportador ABC dedicado al exporte de la enterocina AS-48 de clase III. Este transportador es el resultado de la unión de dos genes, uno que codifica para el dominio C-terminal de un transportador ABC y otro que codifica para el dominio de cruce de membrana (Martínez-Bueno *et al.*, 1998).

Estos transportadores también contribuyen a la inmunidad al bombear hacia el exterior de las células a las moléculas de bacteriocina (Franz *et al.*, 2007).

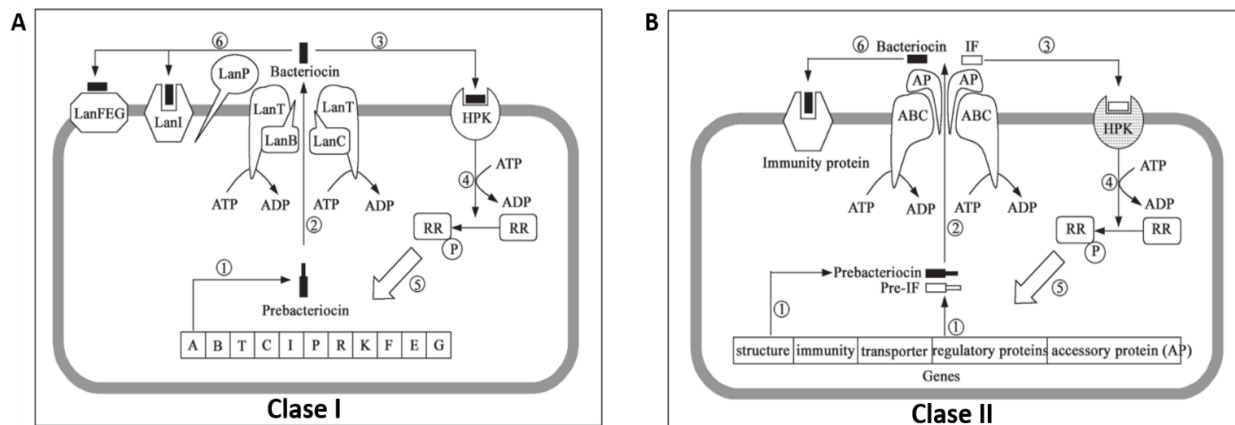


Figura 2. Biosíntesis y secreción de bacteriocinas para la clase I y clase II (Chen & Hoover, 2003). En A: (1) Formación de prebacteriocina; (2) La prebacteriocina es modificada por LanB y LanC, traslocada a través del transportador ABC específico LanT y procesado por LanP, resultando en la excreción de la bacteriocina madura; (3) La proteína cinasa de histidina (HPK) percibe la presencia de la bacteriocina y se autofosforila; (4) subsecuentemente se transfiere el grupo fosfato (P) al regulador de respuesta (RR); (5) el RR activa la transcripción de genes reguladores; y (6) la inmunidad de la bacteria productora es mediada por la proteína de inmunidad, LanI, y las proteínas específicas de transporte ABC, LanFEG. En B: (1) Formación de la prebacteriocina y del péptido factor de inducción (IF); (2) La prebacteriocina y el pre-IF son procesados y traslocados por el transportador ABC, resultando en la excreción de la bacteriocina madura y del IF; (3) la proteína HPK percibe la presencia del IF y se autofosforila; (4) subsecuentemente se transfiere el grupo fosfato (P) al regulador de respuesta (RR); (5) el RR activa la transcripción de genes reguladores; y (6) la inmunidad de la bacteria productora es mediada por la proteína de inmunidad.

1.3.4. Sistema de inmunidad

Las bacterias productoras de bacteriocinas presentan un sistema que las protege de sus propios péptidos. Si existe una proteína de inmunidad específica para la bacteriocina, ésta se localiza en la misma unidad de transcripción, al lado y corriente abajo del gen estructural de bacteriocina (Franz *et al.*, 2000).

Las proteínas de inmunidad son de tamaño pequeño, desde 51 hasta 254 aminoácidos, que se expresan de manera concomitante con la bacteriocina. Estas proteínas presentan una secuencia de grado variable de analogía, que va desde el 5% hasta 85%, incluso cuando sus bacteriocinas están cercanamente relacionadas o son idénticas. No obstante, en estructura se ha reportado similitud, como es la presencia de una alfa hélice.

Protegen a la célula productora bloqueando la formación de poro desde el lado citoplásmico, (Parente & Ricciardi, 1999; Franz *et al.*, 2000; Nes *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2017). La mitad C-terminal de las proteínas de inmunidad contiene un dominio que está involucrado en el reconocimiento específico de la bacteriocina innata o relacionada. En algunos casos la interacción directa o indirecta con la bacteriocina también involucra a la membrana celular, independientemente de la presencia de hélices transmembranales. Así mismo, se ha sugerido que la asociación a la membrana no es fuerte, y que posiblemente actúan como proteínas periféricas de membrana (Jhonsen *et al.*, 2004).

Generalmente las proteínas de inmunidad muestran un alto grado de especificidad respecto a las bacteriocinas que reconocen, sin embargo, se ha descrito que algunas proteínas pueden conferir inmunidad cruzada (Franz *et al.*, 2000; Jhonsen *et al.*, 2004). La efectividad y funcionalidad de la proteína de inmunidad es dependiente de la interacción con factores específicos producidos por la cepa. Para algunas bacteriocinas se ha reportado fenotipos de inmunidad parcial en los que se ha sugerido que se requiere de otros genes para la inmunidad total, como podrían ser los codificantes para proteínas transportadores ABC. Así mismo, también se ha descrito que la producción de la proteína de inmunidad es regulada por los reguladores de respuesta y/o las proteínas cinasas de histidina asociadas al sistema (Franz *et al.*, 2000).

Por otra parte, recientemente se ha reportado que las propias bacteriocinas están involucradas en su sistema de inmunidad. Tal es el caso de la bacteriocina EntDD14 de clase II.3, sin péptido señal y activa desde su expresión. Cuando no están presentes los genes estructurales de la EntDD14 la cepa productora es sensible a su propia bacteriocina (Ladjouzi *et al.*, 2020).

1.3.5. Mecanismo de acción

Las enterocinas, como la mayoría de las bacteriocinas, tienen como blanco primario ocasionar la permeabilización de la membrana citoplásmica. Forman poros en la membrana celular, ocasionando disminución del potencial transmembranal y/o el gradiente de pH, teniendo como resultado la fuga de moléculas indispensables intracelularmente. Particularmente, el modo de acción de la enterolisina A es un poco diferente al de otras enterocinas, porque ataca a bacterias susceptibles mediante la degradación de la pared celular, lo que eventualmente lleva a lisis de las células de cepas blanco.

La inicial interacción entre el péptido y la célula es mediada por atracciones de carga entre el péptido catiónico y la cubierta (lípidos) aniónica de la célula, lo que decrece la carga neta resultando en una pérdida de la actividad. Posteriormente sucede la unión a un receptor de superficie específico. No obstante, tal unión no es un mecanismo universal de acción de las bacteriocinas, algunas requieren únicamente la interacción electrostática entre el péptido y la superficie de la célula blanco para inducir su actividad (Snyder & Worobo, 2014).

Para la formación de poro, se requiere que el péptido presente cambios conformacionales mientras se mueve desde un ambiente hidrofílico hacia el hidrofóbico de la membrana. Esto es logrado mediante el cambio estructural de únicamente un péptido para adoptar una superficie más hidrofóbica o mediante la oligomerización de péptido, de tal forma que las regiones con aminoácidos hidrofóbicos queden en el interior del canal (Snyder & Worobo, 2014).

Clase I. Tienen un mecanismo dual que involucra, en ambos casos, la unión de estos péptidos con el lípido II, la cual es una molécula intermediario importante en la biosíntesis

del peptidoglicano. Por una parte, la unión bacteriocina-lípido II inhibe la síntesis de la pared celular y por otra, el aumento en la concentración de la bacteriocina provoca la formación de poros sobre la membrana celular del microorganismo blanco (Figura 3) (Kuipers *et al.*, 2011; Cotter *et al.*, 2013).

Clase II. En general éstas pueden llegar a la membrana, ya que su estructura es anfifílica, provocan un cambio en su polarización y ocasionan la muerte celular. Funcionan creando poros tipo barril o mecanismo carpeta, donde los péptidos se orientan paralelamente hacia la superficie de la membrana e interfieren con la estructura de la membrana. Específicamente, el mecanismo de las bacteriocinas de subclase II.1 se basa en la unión a un transportador del sistema de fosfotransferasa de manosa (Man-PTS).

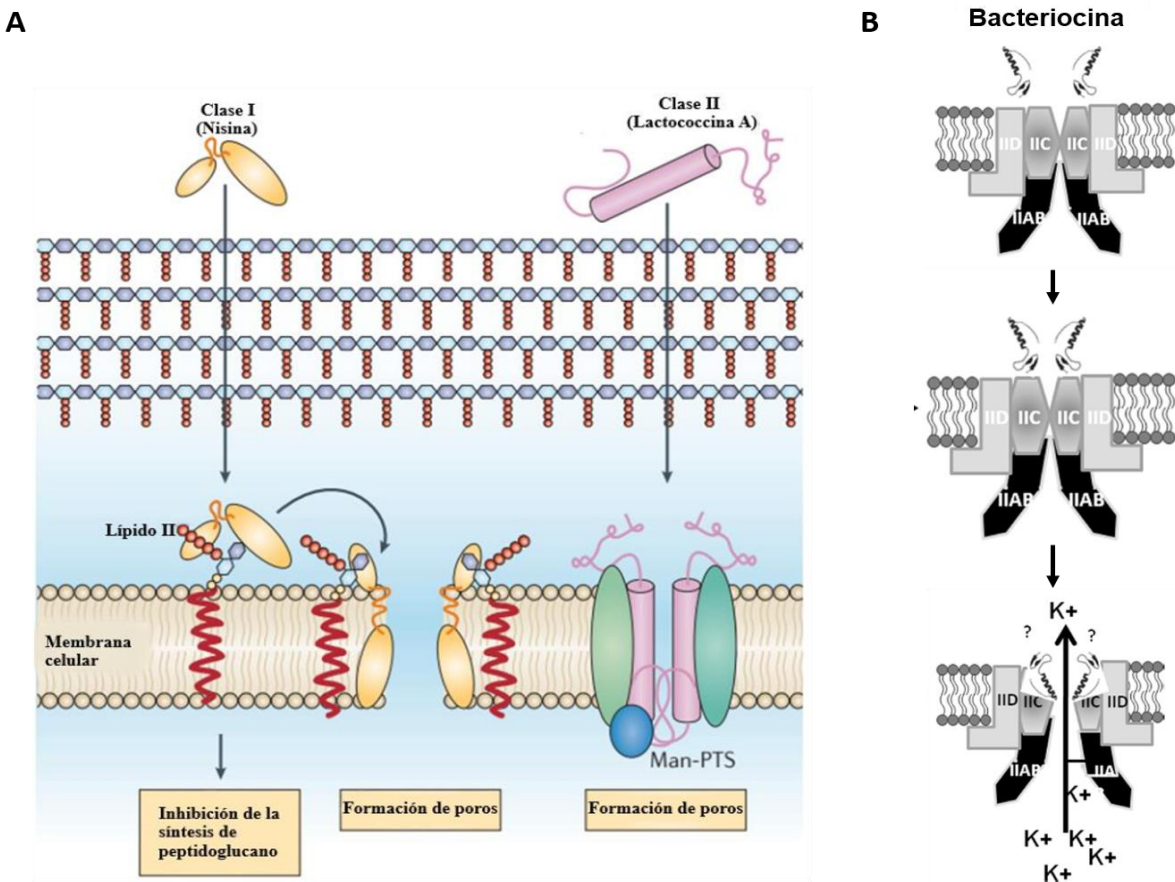


Figura 3. Mecanismos de acción de las diferentes clases de bacteriocinas. (A) Tomada y modificada de Cotter *et al.* (2013); (B) Tomada y modificada de Nes *et al.* (2013).

El sistema Man-PTS es la vía clave para la introducción de manosa, pero también puede aceptar como sustrato a glucosa, fructosa y glucosamina. El ingreso está acoplado a la

fosforilación de los carbohidratos entrantes mediante una serie de reacciones de fosforilación mediadas por enzima I (EI), Hpr y enzima II (subunidades IIAB, IIC y IID). La enzima II es una permeasa, cuyas subunidades IIC y IID forman un complejo localizado en la membrana, mientras que el complejo IIAB, se sitúa en el citoplasma, aunque también puede formar contactos reversibles con la parte localizada en membrana (Diep *et al.*, 2007, Tymoszevska *et al.*, 2018).

El acoplamiento de la bacteriocina sucede mediante el componente embebido ManCD (IIC y IID), se abre irreversiblemente el poro del transportador, se desestabiliza la membrana y ocurre la difusión de iones (Figura 3) (Nes *et al.*, 2013).

Es en el sistema de Man-PTS donde algunas cepas de la bacteria *L. monocytogenes* llegan a presentar resistencia a las bacteriocinas mediante mutaciones en las subunidades IIC y IID (Chen & Hoover, 2003). Tal mecanismo de resistencia también se ha reportado en cepas nosocomiales de *E. faecium* (Geldart & Kaznessis, 2017).

1.3.6. Aplicaciones de las bacteriocinas

La potencial aplicación biotecnológica de las bacteriocinas tiene como fundamento el origen natural de los péptidos, la no toxicidad a células eucarióticas, así como el modo y espectro de acción contra diversas bacterias patógenas. Las bacteriocinas también se han propuesto como alternativa viable a los antibióticos o en uso complementario, ya que sería mucho más difícil para una bacteria adquirir resistencia al mismo tiempo contra dos antimicrobianos con diferentes modos de acción (Diep *et al.*, 2007; Domínguez-Luna, 2019).

A continuación, se describe la aplicación de las bacteriocinas en diversas industrias:

a) Aplicaciones en la industria alimentaria.

Las bacteriocinas representan una estrategia prometedora para la preservación de alimentos, debido a su efecto antagonista hacia microorganismos que deterioran alimentos, y por su alta potencia y baja toxicidad. Adicionalmente se les puede hacer bioingeniería (Choyam *et al.*, 2019).

El mayor obstáculo para el uso de bacteriocinas en la industria alimentaria es el establecimiento de métodos de producción a gran escala y las aplicaciones a nivel industrial. Un método estándar de preparación es la purificación parcial del concentrado de bacteriocinas para ofrecerlos como polvo liofilizado. Por ejemplo, la nisina, producida por *L. lactis* en la fermentación de sustratos basados en leche, y la pediocina PA-1/AcH (Pediocina PA-1) de *Pediococcus acidilactiti*, comercializada como ALTA 2341 y utilizada como protector alimentario. Sin embargo, aunque la nisina es ampliamente utilizada en la industria de alimentos, posee algunas limitaciones, incluyendo baja estabilidad a altas temperaturas, susceptibilidad a enzimas fisiológicas (proteínasa K, tripsina y quimiotripsina), y actividad efectiva en un estrecho rango de pH (Chen & Hoover, 2003; Choyam *et al.*, 2019).

b) Aplicaciones biomédicas.

Las bacteriocinas son particularmente útiles en el tratamiento de una variedad de infecciones bacterianas, ya que además de los mecanismos de acción que presentan y su actividad en contra de patógenos resistentes a antibióticos convencionales, el desarrollo de resistencia a las bacteriocinas se da con menor frecuencia que el desarrollo de resistencia a los antibióticos, lo que las convierte en una opción atractiva como posibles agentes antimicrobianos (Cotter *et al.*, 2005).

Recientemente se ha estudiado el potencial de las bacteriocinas en aplicaciones de terapias biomédicas, su actividad dirigida hacia bacterias patógenas las hace de particular interés en el tratamiento de patógenos resistentes a antibióticos, y se ha demostrado que diversas bacteriocinas muestran actividad contra bacterias de importancia médica. Por ejemplo, la bacteriocina lacticina 3147 producida por *L. lactis* ha mostrado actividad *in vitro* en contra de *S. aureus* resistente a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina y contra diversas cepas de estreptococos (Cotter *et al.*, 2005).

c) Aplicaciones en medicina veterinaria.

Como resultado del uso indiscriminado de antibióticos en el tratamiento y prevención de enfermedades en animales, se ha investigado el uso de las bacteriocinas como una alternativa terapéutica. Tal es el caso de la bacteriocina lacticina 3147, la cual se ha

estudiado en la prevención de la mastitis bovina. Esta bacteriocina es eficaz en la inhibición de *S. aureus* ATCC25923 y *S. thermophilus* HA y ST112. Su uso como tratamiento de la mastitis también significa un beneficio para la industria de alimentos, ya que previene pérdidas económicas al evitar el desecho de leche y/o retención de carne (Cotter *et al.*, 2005).

a) Aplicaciones en la industria de cosméticos y productos de cuidado personal.

En el área de cuidado personal, se han utilizado las bacteriocinas como un ingrediente activo en los cosméticos, con el fin de controlar el crecimiento de bacterias patógenas y proporcionar protección contra la inflamación microbiana en la piel, ya que para ser dermatológicamente aprobado, el ingrediente activo debe ser no tóxico, hipoalergénico y no irritante, además se desea que sea biodegradable, y las bacteriocinas cumplen con todos estos requisitos.

En el área cosmética las composiciones que integran bacteriocinas presentan la ventaja de evitar el desarrollo de resistencias por patógenos que colonizan e infectan la piel. Por esta razón existen algunas publicaciones sobre la habilidad que presentan algunas bacteriocinas para inhibir a *Cutibacterium acnes*, reduciendo las lesiones inflamatorias causadas por esta bacteria. Tal es el caso de las producidas por *Lactococcus sp.* HY 449 y *E. faecalis* SL-5 (Mercedes *et al.*, 2012).

Varios autores combinan las bacteriocinas con la tecnología para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas en alimentos, como el uso de agentes quelantes (sodio trifosfato y EDTA), y métodos físicos (pH, temperatura, altas presiones hidrostáticas, y campo eléctrico de pulso) (Liu *et al.*, 2019).

Importante mencionar que el aumento del análisis de estos péptidos se ha correlacionado con el incremento en la demanda de compuestos naturales que sirvan como conservadores en alimentos, así como al incremento de la resistencia a los antibióticos por parte de los patógenos, ya que también las bacteriocinas pueden ser una alternativa viable para prevenir infecciones. De hecho, dos lantibióticos, nisina y lacticina 3147, han sido útiles para prevenir la mastitis (Nes *et al.*, 2007; Choyam *et al.*, 2019).

1.3.7. Expresión heteróloga de bacteriocinas

De manera habitual la identificación de las bacteriocinas es realizada mediante el aislamiento del compuesto proveniente del cultivo de las cepas productoras. No obstante, tal método es dependiente de las condiciones de crecimiento en las cuales el microorganismo produce la bacteriocina, por lo que se ha recurrido a la secuenciación de genomas, metagenómica y proteómica para la identificación de posibles compuestos con actividad tipo bacteriocina. Una vez obtenidas las secuencias se han analizado sus propiedades mediante ingeniería genética de microorganismos, como es *E. coli* y *L. lactis*. Entre estos microorganismos, *E. coli* es preferida porque se conoce ampliamente su sistema genético que ha sido explotado para la expresión de genes de interés. Varios huéspedes de expresión han sido estudiados e identificados, siendo las cepas BL21(DE3) y el plásmido pET los más utilizadas (Choyam *et al.*, 2019).

Para expresar bacteriocinas se requiere, de existir nativamente, la maquinaria básica de síntesis y secreción. En el desarrollo del plásmido de expresión es crucial que el grupo de genes codificante para la bacteriocina contenga el gen estructural y las proteínas accesorias. La selección del promotor depende de la cantidad de bacteriocina que queramos obtener, así como de las características de toxicidad del compuesto. Algunas bacteriocinas son tóxicas en la naturaleza, de tal forma que posteriormente a que comienza la expresión tienen efectos tóxicos sobre el hospedero, conduciendo a su muerte (Choyam *et al.*, 2019).

Para poder lograr el uso comercial económicamente viable de las bacteriocinas es necesario la optimización del rendimiento de la producción de la bacteriocina lo que suele conseguirse con la expresión en sistemas heterólogos (Chen & Hoover, 2003).

2. ANTECEDENTES

Enterococcus faecium es un organismo comensal del tracto digestivo de mamíferos, ubicuo en la naturaleza e importante para la fermentación de productos alimenticios, incluido el queso y salchichas. Recientes estudios en este grupo de trabajo han demostrado que existe una significativa distancia evolutiva entre las cepas de *E. faecium* asociadas a infecciones nosocomiales y las de otros nichos ecológicos. Las diferencias entre estas cepas incluyen el fenotipo, genes específicos, y distinciones entre el genoma y proteoma completo (Olvera-García *et al.*, 2017).

En el grupo de trabajo se ha estudiado la microbiota presente en el alimento artesanal fermentado, queso Cotija. El desarrollo de la microbiota durante la maduración, repercute en la inocuidad microbiológica del alimento. Además, el metabolismo de la microbiota es responsable de generar una serie de metabolitos, enzimas, péptidos, entre otros, que no sólo desempeñan una función en la matriz alimentaria, sino también poseen una posible aplicación biotecnológica. Del queso Cotija se han aislado cepas de *Enterococcus*, en particular de las especies *E. faecalis* y *E. faecium*. Ninguna contiene todos los genes necesarios para la biosíntesis de citolisina, (genes *cylA*, *cylL_L* y *cylL_S*) presente en cepas de enterococos nosocomiales y principal factor de virulencia que provoca la ruptura de la membrana celular de células eucariotas, de algunas bacterias y eritrocitos; por lo que no presentan el fenotipo asociado a las cepas de infecciones nosocomiales. Respecto a genes de enterocinas de clase II, se identificó que la gran mayoría posee el gen de la enterocina A, sin embargo, la detección de la actividad microbiana no fue concluyente.

En particular, la cepa QD-2 de *E. faecium* tiene características que la hacen interesante de analizar. La cepa fue aislada de queso Cotija elaborado en Quitupán, Jalisco. Fue identificada mediante el análisis del gen *ddl* que codifica para una ligasa D-Ala: D-Ala presente en *E. faecium*. Se sabe que presenta crecimiento a 37°C en medio MRS/NaCl 6.5%, y a 4°C y 45°C en medio MRS sin NaCl (Guzmán-Ovalle, 2015).

Mediante el análisis de siete genes conservados (tipificación por secuencias multilocus, MLST), se determinó que la secuencia tipo (ST) de la cepa QD-2 pertenece a la ST 135, mientras que la cepa nosocomial E1276, que produce bacteremia, pertenece a la ST17, lo que indica que la cepa QD-2 no está relacionada al grupo de cepas nosocomiales.

Dadas estas características es probable que la cepa QD-2 sea de origen humano y que haya sido inoculada en alguna de las múltiples etapas manuales durante la producción del queso Cotija (Guzmán-Ovalle, 2015). Es importante destacar que la cepa carece de plásmidos (Mendoza-Eslava, 2019). La búsqueda de genes codificantes para la citolisina, reveló que únicamente contiene el gen *cyiL_S* y dado que no desarrolló el fenotipo de hemólisis de eritrocitos se determinó que no es patógena. En cuanto a genes de enterocinas de clase II, se identificó que posee el gen de enterocina A, *entA*. La síntesis de enterocinas fue corroborada mediante el perfil proteínico y la evaluación de la actividad lítica contra *L. monocytogenes* (Figura 4) (Mendoza-Eslava, 2019). En la Tabla 2 se resumen las características moleculares de la cepa QD-2.

Tabla 2. Características moleculares de la cepa QD-2 de *E. faecium*.

Año	ST	Cepa fundadora	Distancia	Genes conservados analizados para MLST ¹							Isla de patogenicidad para citolisina ²			Fenotipo citolisina (hemolítico) ²	<i>entA</i> ²	Activ. vs. <i>Listeria monocytogenes</i> ²	Visualización en SDS-PAGE ²
				<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	<i>cyiA</i>	<i>cyiLL</i>	<i>cyiL_S</i>				
2015	135	17	3.94	27	3	1	2	1	1	1	-	-	+	-	+	+	Sí

¹Guzmán-Ovalle, 2015, ²Mendoza-Eslava, 2019.

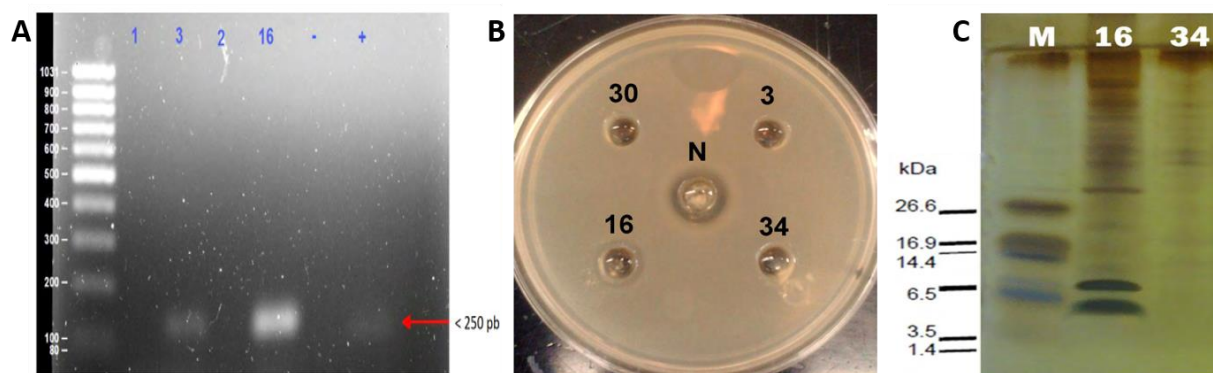


Figura 4. Detección de la enterocina A en la cepa QD-2 de *E. faecium*. (A) Evaluación de la presencia del gen *entA*; (B) Evaluación de la actividad lítica contra *L. monocytogenes*; (C) Perfil proteínico del extracto obtenido por adsorción-absorción. La muestra 16 es la correspondiente a la cepa QD-2 de *E. faecium*. Tomado y modificado de Mendoza-Eslava (2019).

Por otra parte, también en el grupo de trabajo, se ha utilizado la información metagenómica del queso Cotija (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016) para analizar la diversidad de la microbiota que los compone, elucidar su posible papel dentro del nicho ecológico, y encontrar y explotar biomoléculas no descritas con anterioridad. A partir de dicho análisis seleccionaron dos marcos de lectura con anotación de bacteriocina no descritas previamente, los cuales clonaron y expresaron en *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente determinaron las condiciones en las que se obtuvieran las bacteriocinas funcionales y evaluaron la actividad bactericida en contra de microorganismos de importancia en la inocuidad de los alimentos. Las bacteriocinas que caracterizaron tuvieron actividad bactericida exclusiva contra *L. monocytogenes* (Esquivel-López, 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

En el grupo de trabajo, se han aislado enterococos de un alimento artesanal fermentado, el queso Cotija. Estas cepas no son parte de complejos clonales nosocomiales y algunas tienen capacidad de producir péptidos antimicrobianos. Estos estudios sugieren que, mediante la síntesis de péptidos antimicrobianos algunas cepas contribuyen a la inocuidad del queso. Por lo que es de nuestro interés identificar la presencia de genes de bacteriocina en una cepa particular de *E. faecium*, y caracterizar si esas enterocinas confieren actividad inhibitoria a la cepa, existiendo la probabilidad de que presenten diferencias a las péptidos ya reportados.

4. HIPÓTESIS

La cepa QD2 de *E. faecium*, de origen alimentario, presentará diversos marcos de lectura abiertos que codifiquen para enterocinas de clase II no reportadas o no caracterizadas, las cuales tendrán actividad contra bacterias del género *Listeria*.

5. OBJETIVO

Caracterizar la actividad antibacteriana de algunas de las bacteriocinas putativas codificadas en el genoma de la cepa QD-2 de *Enterococcus faecium* de origen alimentario.

5.1. Objetivos particulares

1. Obtener la secuenciación del genoma de la cepa QD-2 de *Enterococcus faecium* a nivel de contigs
2. Buscar por métodos informáticos secuencias codificantes para bacteriocinas.
3. Clonar y expresar las secuencias de interés en *Escherichia coli*.
4. Evaluar la actividad de bacteriocina de las secuencias contra *Listeria monocytogenes*.

6. METODOLOGÍA

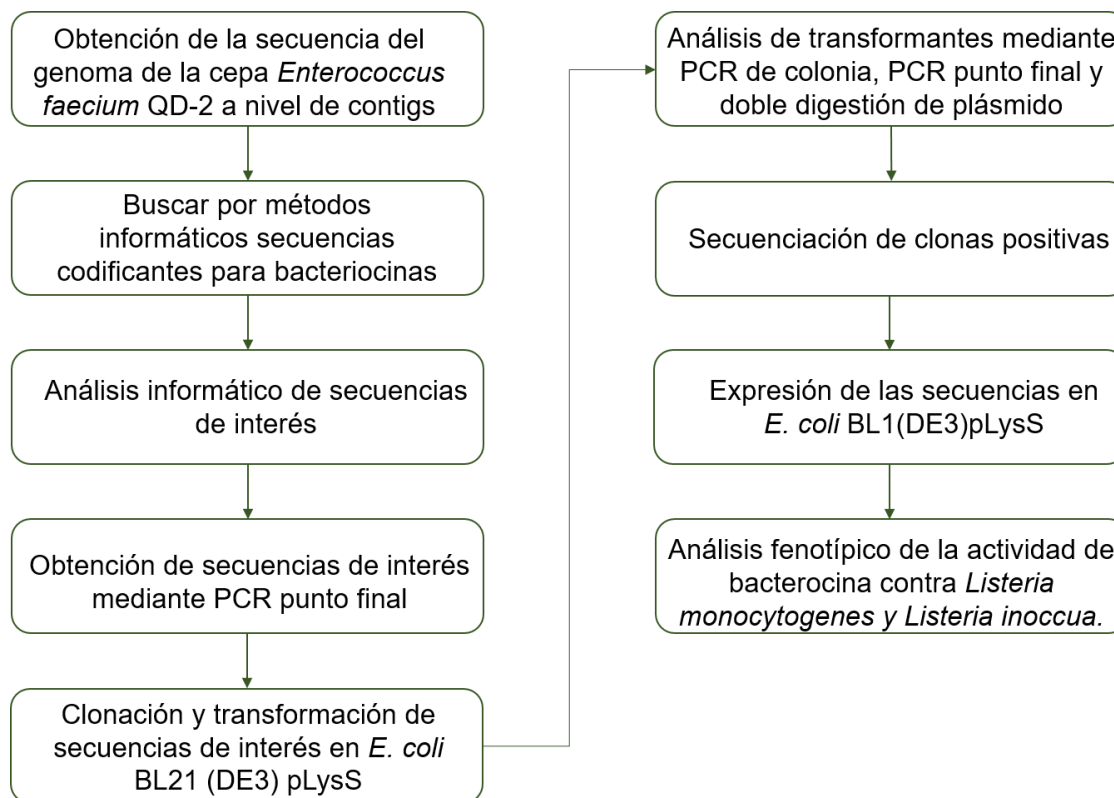


Figura 5. Diagrama general de trabajo.

6.1. Verificación de pureza de la cepa de *E. faecium* QD-2

La cepa QD-2 fue reactivada en 10 mL de medio MRS por 48 h a 37°C. A este cultivo se realizó tinción de Gram y se observó al microscopio para confirmar la pureza de la cepa.

6.2. Extracción ADN

Primero se realizó un cultivo de la cepa *E. faecium* QD-2, en 10 mL de medio MRS, y se incubó a 37 °C sin agitación por 48 h. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 10,016 X g y 4 °C. Este pellet se lavó 2 veces con solución salina isotónica 0.85% NaCl (SSI), centrifugando en las mismas condiciones.

El precipitado obtenido después de los lavados se resuspendió en 400 µL de buffer TE y se adicionaron 50 µL de una solución de lisozima de 10 mg/mL (en buffer Tris-HCl 100 Mm y EDTA 50 Mm, pH 8.0). Las muestras fueron agitadas en vórtex durante 1 min e incubadas durante 1 h a 37 °C en termomixer con agitación a 500 rpm. Se adicionaron

15 μ L de una solución de proteinasa K 10 mg/mL (en agua grado biología molecular), y se incubó durante 15 min a 65°C a 400 rpm. La mezcla se dejó enfriar hasta 37 °C y se agregaron 50 μ L de SDS al 10 % p/v, se incubó por 40 min. La solución resultante se dejó enfriar hasta temperatura ambiente para adicionar 200 μ L de una solución de NaCl 6 M y se mezcló mediante inversión. Posteriormente se agregaron 400 μ L de solución fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1 en la campana de extracción, se agitó mediante inversión hasta homogeneizar y se centrifugó a 18,200 X g durante 10 min a 4°C para recuperar la fase acuosa que contenía el ADN. Ésta se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL limpio y se repitió la centrifugación hasta que la interfase fue nula. Para precipitar al ADN se adicionó 1 mL de etanol al 100% v/v, se agitó por inversión 2-5 veces y se incubó a -20 °C durante mínimo 1 h. La mezcla se centrifugó a 18,200 X g durante 10 min a 4 °C y el pellet se lavó con 300 μ L de etanol al 70 % v/v centrifugando por 2 min con las condiciones anteriores.

Se desechó el etanol y se evaporó dejando a temperatura ambiente por 10 min y a 40 °C por el mismo tiempo. El precipitado seco se resuspendió en 100 μ L de agua grado biología molecular a 65°C durante 15 min para total hidratación. Para eliminar el ARN de la muestra, se procedió a añadir 2 μ L de RNasa e incubación por 20 min a 37 °C. Para la separación del ADN en solución se repitieron las condiciones utilizadas en la primera precipitación. El ADN ya precipitado y seco se resuspendió en 90 μ L de agua grado biología molecular a 65°C durante 15 min.

Se midió concentración y pureza del ADN total por el método espectrofotométrico (equipo Epoch, BioTek). Se considera puro si la $A_{260/280}$ está en el intervalo de 1.8-2.0 y la $A_{260/230}$ en el intervalo de 2.0-2.2. La integridad se observó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.5%. El ADN fue almacenado en congelación a -20 °C. El ADN total se envió a secuenciar a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la UNAM (UUSMB). Se solicitó una secuenciación pareada con profundidad de 5 millones de lecturas de longitud de 75 pb.

6.3. Búsqueda bioinformática de secuencias codificantes para bacteriocinas

Una vez obtenido la secuencia del genoma de la cepa QD-2 se realizaron diversos análisis para identificar secuencias con anotación de bacteriocina. Primero, a través de la base de datos de BAGEL4 (Bagel automated bacteriocin mining) (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) se identificaron ocho genes codificantes para bacteriocinas. La herramienta BAGEL4 es una base de datos para predecir péptidos antimicrobianos con modificación post-traducciona. Predice marcos de lectura abiertos (ORFs) tomando en cuenta la presencia de genes involucrados en la maquinaria de biosíntesis, transporte, regulación e inmunidad. Estas características hacen a BAGEL una herramienta única e invaluable en la búsqueda de genes putativos de bacteriocinas y de sus operones biosintéticos en los genomas bacterianos (Nes *et al.*, 2007). La búsqueda se complementó con la información de transcritos y secuencias peptídicas del genoma ensamblado. Se identificaron 8 genes que codificarían para bacteriocinas putativas: Bacteriocina Ilc (gen 615), Acidocina_LF221B (gen 616), Enterocina A (gen 621), Bacteriocina UviB (gen 718), Enterocina X cadena alfa (gen 901), Enterocina X cadena beta (gen 902), Enterolisina A (gen 2142), Enterocina B (gen 2596).

Una vez identificados los contigs que contuvieran genes con anotación de bacteriocina, se utilizó la información de los transcritos y secuencias peptídicas para comparar el producto de los genes adyacentes traducidos a proteínas contra las bases de datos UniProt y NCBI a través del algoritmo de BLAST. También se utilizó la base de datos Pfam de dominios conservados y familias de proteínas.

Así mismo se tomó en cuenta que en la búsqueda de ORFs para bacteriocinas se pueden obtener falsos positivos debido a la presencia de genes que codifican para los péptidos de feromonas (incluyendo péptidos de competencia). Estos péptidos comparten varias de las características de las bacteriocinas y están involucrados en los sistemas regulatorios de dos componentes (Nes *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta esta información se seleccionaron los genes 615 y 616 para análisis bioinformático de propiedades fisicoquímicas de bacteriocina.

6.4. Análisis bioinformático de las secuencias proteínicas de los genes seleccionados

Se determinaron mediante bioinformática las propiedades físicas y químicas de las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes 615 y 616 para verificar que cumplieran con las características principales de las bacteriocinas (revisar 1.3).

Para determinar hidrofobicidad se utilizaron las herramientas ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) y ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). La primera herramienta calcula y representa el perfil hidrofóbico de los aminoácidos de la proteína mediante la escala de Kyte-Doolittle que permite detectar regiones hidrofóbicas y es utilizada para identificar regiones de superficie expuestas, así como regiones transmembranales. El cálculo es dependiente del tamaño de ventana que se designe. La segunda herramienta estima diversos parámetros físicos y químicos de una proteína. La hidrofobicidad la determina a partir del promedio del índice de hidrofobicidad (GRAVY, grand average hydropathicity index) que es calculado con la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos y dividido entre el tamaño de la secuencia. En ambas herramientas un valor positivo indica hidrofobicidad y un valor negativo que es hidrofílico.

En el caso del punto isoeléctrico, se utilizó la herramienta ProtParam.

Las estructuras *in silico* se modelaron mediante la herramienta Quark (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>). Quark es un algoritmo computacional para la predicción *ab initio* de la estructura de proteínas y el plegado peptídico de proteínas. Su finalidad es construir el modelo tridimensional correcto de la proteína a partir de únicamente la secuencia de aminoácidos, por lo que es adecuado para proteínas que no tienen homólogos en la librería de PDB. La exactitud de la predicción está dada por la puntuación del modelado (TM-score), entre mayor sea este valor más precisa es la estructura secundaria.

Así mismo se predijo la presencia de péptido señal mediante la herramienta Signal P 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Signal P 5.0, predice los péptidos señal y la localización de los sitios de corte. Discrimina entre 3 tipos: Sec/SPI, péptidos señal de secreción transportados por el translocon de SEC y cortados por la peptidasa de señal I

(Lep), Sec/SPII, lipoproteínas péptido señal transportados por el translocon Sec y cortados por la peptidasa de señal II (Lsp), TaT/SPI, péptidos señal Tat transportados por el translocon de Tat y cortados por la péptidas de señal I (Lep).

6.5. Cepas y vectores

Es importante controlar la expresión basal de las bacteriocinas clonadas en un sistema heterólogo, ya que por su posible naturaleza antimicrobiana y por ser ajenas a las proteínas nativas del hospedero, podrían interferir con el crecimiento óptimo de la cepa. Dentro de la gran diversidad de cepas para expresión heteróloga, *E. coli* BL21(DE3) y sus derivadas son las cepas más frecuentemente utilizadas para la expresión de los péptidos. Así mismo, para facilitar la detección y la purificación de las bacteriocinas se ha optado por la incorporación de etiquetas afinidad como la etiqueta poli-His (Mesa-Pereira *et al.*, 2018).

Con el fin de comparar la producción, se seleccionaron las cepas *E. coli* BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS. Las dos cepas cuentan con una copia del gen de la T7 ARN polimerasa en el cromosoma, bajo control del promotor *lac*. El plásmido pET28a(+), en el cual el gen de interés será clonado (bacteriocina) lleva la secuencia promotora reconocida por esta ARN polimerasa y dirige la transcripción del mismo.

E. coli BL21(DE3)pLysS también contiene al plásmido pLysS, que produce la lisozima de T7, un inhibidor natural de la T7 ARN polimerasa. La transcripción tanto del gen de interés insertado en el vector como del gen de la T7 ARN polimerasa en el cromosoma del hospedero se regulan negativamente por LacI. La presencia de *lacI* en el vector de expresión contribuye en una mayor regulación de la transcripción del gen de la T7 ARN polimerasa que se transcribe incluso en ausencia del inductor, lo que provocaría una expresión basal de la proteína de interés.

El inductor de la transcripción de los genes mencionados es el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (pET System Manual, Esquivel-López, 2019).

Se seleccionó el vector pET28a(+). Este vector es de tamaño de 5,369 bp, tiene el promotor T7lacO, el gen de resistencia al antibiótico de kanamicina y el sitio múltiple de clonación que permite incorporar etiquetas de histidina en extremo amino o carboxilo. La

ventaja de este vector es la posibilidad de remover la etiqueta de histidina mediante el uso de la proteasa trombina. Sin embargo, no tiene una secuencia codificante para proteína que dirija la secreción y, por tanto, al realizarse la expresión de las proteínas de interés, éstas llegan a acumularse en cuerpos de inclusión.

6.6. Amplificación de los genes de interés

Para la amplificación del marco abierto de lectura de los genes 615 y 616, que codifican para bacteriocinas putativas, se diseñaron oligonucleótidos específicos para el vector pET28a(+) en el extremo 5' el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NdeI y en el extremo 3' el sitio de reconocimiento de la enzima XhoI (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos.

Gen	Oligo	Secuencia
615	Fw 1	AGAAGCC CATATG TTCAAGCATGCAAAATGTAAAGG
	Rv	TATTC CTCGAG TTGATTTTTTTCTTGATCCCAGC
	Fw 2	AAACTGTT CATATG GGCAATAATGCTTGGGG
616	Fw 1	TTTTTTAA CTCGAG ACGCACCGGTCCAC
	Rv	TTTTTTAA CTCGAG ACGCACCGGTCCAC
	Fw2	ATTCAAC CATATG AGTGCCGTGGGAGTTTTAG

Las secuencias en negrita corresponden al sitio de reconocimiento de las enzimas de restricción NdeI/XhoI.

Tabla 4. Componentes de la reacción para la amplificación de los genes 615 y 616.

Reactivo	Concentración
Amortiguador AccuPol + MgCl ₂	1x
dNTPs	0.2 mM
Cebador directo	0.2 μM
Cebador reverso	0.2 μM
AccuPol	1.5 U
ADN	20 ng/μL
Volumen por reacción	50 μL

La reacción de PCR para la amplificación se realizó utilizando la AccuPOL™ DNA Polimerasa (Ampliqon) siguiendo las concentraciones y condiciones mostradas en la Tabla 4 y 5. Los amplicones obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 5. Condiciones para la reacción de amplificación de los genes 615 y 616.

Paso		Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial		95	3 min	1
Desnaturalización		95	30 s	30
Alineamiento	61528Fw1/61528Rv	58	30 s	
	61528Fw2/61528Rv	65		
	61628Fw1/61628Rv	58		
	61628Fw2/61628Rv	65		
Extensión		72	1 min	
Extensión final		72	10 min	1

Los amplicones correspondientes al marco de lectura abierto se purificaron mediante el kit DNA clean and concentrator (Zymo Research), y los amplicones obtenidos con el primer interno se purificaron mediante el kit QIAEX II Gel Extraction (QIAGEN).

6.7. Reacción de digestión

Para preparar los productos de amplificación y el plásmido pET28a(+) para la reacción de ligación, se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción NdeI y XhoI (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó el Buffer O proporcionado con la enzima NdeI, empleando las condiciones de la Tabla 6. La mezcla de reacción se incubó 2 h a 37 °C seguido de 20 min a 80 °C, para desactivar las enzimas. Los insertos digeridos y el plásmido linealizado se purificaron mediante corte de banda a partir de un gel de agarosa al 1% con ayuda del kit QIAEX II Gel Extraction (QIAGEN).

Por último, el plásmido digerido y purificado, se desfosforiló con 0.05 U/mL de fosfatasa alcalina, se incubó por 30 min a 37°C y se purificó mediante el kit DNA clean and concentrator (Zymo Research).

Tabla 6. Componentes de la reacción para la digestión de los productos de PCR purificados y de plásmido pET28a(+).

Reactivo		Cantidad
Agua grado biología molecular		Para 20 µL
Buffer O		1X
ADN	Plásmido pET28a(+)	1.5 µg
	61528Fw1/61528Rv	1 µg
	61628Fw1/61628Rv	
	61528Fw2/61528Rv	500 ng
61628 Fw2/61528Rv		
XhoI		10 U
NdeI		5 U
Volumen por reacción		20 µL

6.8. Reacción de ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo empleando las condiciones que indica el proveedor de la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) para extremos cohesivos. Se utilizaron 50 ng del vector pET28a(+), una relación molar inserto:vector de 3:1, 2 µL del Buffer de ligasa 10X, 1U de ligasa, y se llevó a un volumen final de 10 µL con agua grado biología molecular. La mezcla de reacción se incubó a 22°C por 3 h para la construcción pET28a(+)-616c, y a temperatura ambiente por 48 h para las construcciones pET28a(+)-615c, pET28a(+)-615i y pET28a(+)-616i. En todas se inactivó la enzima a 70°C por 5 min.

6.9. Células competentes y transformación de *E. coli* cepas BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS

Para la obtención de células competentes de *E. coli* cepas BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS, primero se realizó un pre-inóculo de cada cepa en 5 mL de medio Luria- Bertani (LB) con cloranfenicol (34 µg/mL) a 37°C y 200 rpm durante toda la noche. Después, se tomaron 500 µL del cultivo y se colocaron en un matraz con 50 mL de medio LB que se incubó a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀= 0.4. Posteriormente, se repartió el cultivo en tubos falcon y se incubaron en hielo 20 min, a continuación, se centrifugaron a

10,016 X g por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 15 mL de CaCl₂ 100 mM frío y se incubaron los tubos en hielo por 30 min. Nuevamente se centrifugó a 10, 016 X g por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Luego, se resuspendió el paquete celular en 2 mL de CaCl₂ 50 mM con glicerol al 15% y se incubó en hielo por 2 horas y media. Por último, se hicieron alícuotas de 200 µL en tubos de microcentrifuga pre-enfriados. Las alícuotas se congelaron inmediatamente a -70°C.

La transformación de las células BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS se realizó de la siguiente manera: a 50 µL de células competentes se les agregó 10 µL de la reacción de ligación, la mezcla se incubó en hielo por 30 min. Después se transfirieron los tubos a un baño de agua a 42 °C por 45 segundos, siendo rápidamente trasladados a hielo donde se dejaron por 3 min. A continuación, se adicionó a cada tubo, 450 µL de medio SOC para recuperar las células, y se incubaron a 37 °C por 2 h a 225 rpm. Terminado el tiempo de incubación, se centrifugó el cultivo celular por 1 min a 18, 200 X g, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 100 µL de medio SOC. Posteriormente, se plaquearon 100 µL de la reacción de transformación en cajas de agar LB con kanamicina (30 µg/mL) para células BL21(DE3), y con cloranfenicol (34 µg/mL) y kanamicina (30 µg/mL) para BL21(DE3)pLysS , las cuales se incubaron a 37 °C toda la noche. De estas cajas se seleccionaron cinco colonias al azar, y se inocularon en tubos con 10 mL de LB con los antibióticos correspondientes, los cuales se incubaron a 37 °C a 250 rpm durante 16 h. Por último, se hizo la extracción de plásmido a las colonias seleccionadas por medio del kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific).

6.10. Análisis de transformantes

Para confirmar que las clonas transformantes tenían el inserto se realizaron 3 metodologías. Primero se realizó la reacción de PCR de colonia con los oligos universales T7 (condiciones en Tabla 7 y 8). A un tubo de 1.5 mL se añadieron 100 µL de agua estéril desionizada, después con un palillo o punta de pipeta se agregó una colonia al tubo y se disolvió. Posteriormente se agregaron 100 µL de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, seguido de una homogeneización en vórtex por menos de 15 segundos.

Después se centrifugó por 5 min a 4°C y 18, 200 X g. Por último, se tomaron 5-10 µL de la fase acuosa la cual se utiliza como ADN molde.

La segunda prueba consistió en la doble digestión del plásmido como se describe en el punto 6.6, seguida de la visualización de los fragmentos en gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 7. Componentes de la reacción para la reacción de PCR utilizando oligos T7 universales

Reactivo	Concentración
Amortiguador AccuPol + MgCl ₂	1x
dNTPs	100 µM
Cebador directo	50 pmol
Cebador reverso	50 pmol
AccuPol	2.5 U
ADN	5-10 µL
Volumen por reacción	50 µL

Tabla 8. Condiciones para la reacción de PCR utilizando oligos universales T7

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineamiento	55	30 s	
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	10 min	1

6.11. Producción de las bacteriocinas

Por las limitaciones de tiempo, de las cinco colonias transformantes analizadas, sólo dos se confirmaron mediante secuenciación. Una vez corroboradas se procedió a realizar inducciones 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 cepas *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* BL21(DE3)pLysS con y sin pET28a(+) en 5 mL de medio LB con kanamicina (30 µg/mL) para la primera cepa, y con cloranfenicol (34

$\mu\text{g/mL}$) y kanamicina ($30 \mu\text{g/mL}$) para la segunda cepa, a 37°C por 12 h a 250 rpm. Por otra parte, para cada cepa se prepararon 50 mL de medio LB en matraz Erlenmeyer de 250 mL, con los antibióticos respectivos, y fueron inoculados con 500 μL del pre-inóculo correspondiente e incubados a 37°C con agitación orbital a 250 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0.8-1.0; alcanzada la DO adecuada, se adicionó isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en una concentración final de 0.8 mM y los matraces se incubaron a 37°C a 250 rpm durante 3, 5 y 8 h.

Pasado el tiempo de incubación, cada uno de los cultivos se centrifugó a $10,016 \times g$ por 15 min. El sobrenadante fue desechado y el paquete celular se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 2-2.5. Dicha suspensión se sonicó con pulsos de 20 s y 20 s de reposo durante 7 min a 4°C . Después, se centrifugó a $34,895 \times g$ por 20 min a 4°C y posteriormente, el sobrenadante se separó y fue filtrado con una membrana de $0.22 \mu\text{m}$.

Para concentrar el sobrenadante filtrado, se utilizaron 4 volúmenes de acetona pre-enfriada y se incubó por 12 h a -20°C . Luego se centrifugó a $14,000 \times g$ por 12 min y el paquete proteínico se resuspendió con 700 μL de solución Tris-HCl 10mM pH 7.5, a esta fracción se le denominó fracción citosólica (FC).

6.12. Geles de Tris-Tricina-SDS-PAGE y zimogramas

Para confirmar la producción de los péptidos por las cepas transformantes, se evaluaron las fracciones citosólicas mediante electroforesis en geles Tris-Tricina-SDS al 16%. Este tipo de geles permiten una mejor resolución para proteínas de 5 a 20 kDa (Schägger y von Jagow, 1987).

Los geles se corrieron a 80 V, 4°C por 5 h en el equipo Mini Protean 3 System. Al finalizar se tiñeron con azul de Coomassie G-250 durante toda la noche y se destiñeron con solución desteñidora (metanol 40% (v/v), ácido acético 10 % (v/v)) hasta observar bandas. Para facilitar el proceso de renaturalización en el zimograma y poder comparar con el perfil proteínico, en ambos geles el buffer de carga fue sin β -mercaptoetanol y las muestras no se calentaron previo a la electroforesis. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador SDS-PAGE Broad Range (1610318, Bio-Rad).

Respecto a los zimogramas, estos son geles de Tris-Tricina-SDS-PAGE con el microorganismo de interés embebido en el gel. Para obtener las células de *L. monocytogenes* CFQ-B103 se inocularon 100 mL de medio BHI con 500 µL de un criovial y se dejó en incubación a 37° C durante 12 h sin agitación. Posteriormente el microorganismo se inactivó mediante esterilización en autoclave. La muestra se centrifugó a 10, 016 X g durante 15 min a 4° C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces con 35 mL de SSI 0.85% (m/v), pH 7, centrifugando con las condiciones iniciales. El tercer lavado se realizó con 8.5 mL de SSI (volumen final del gel separador) y se midió la DO_{600nm}, considerándose valores adecuados entre 8-10. Se repitió la centrifugación a las mismas condiciones y el paquete final se resuspendió con los reactivos del gel separador. Estos geles fueron corridos paralelamente con los geles de Tris-Tricina-SDS-PAGE. Al finalizar, el gel de zimograma, se incubó en solución renaturalizante (Tris-HCl 100 mM y Tritón 0.1% (v/v), pH 8) a 37° C, 50 rpm por mínimo 20 h. Finalmente, el gel fue teñido con solución de azul de metileno 0.1% (m/v) en KOH 0.01% (m/v) durante 20 min y se destiñó varias veces con agua destilada hasta observar la aparición de las bandas translúcidas que señalaron la actividad lítica en contra del microorganismo indicador.

Como controles positivos se utilizaron las fracciones citosólicas obtenidas de cepas que expresan la bacteriocina QC-2 (Esquivel-López, 2019), como controles negativos se utilizaron los extractos de *E. coli* cepas BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS con y sin vector de expresión (pET28a(+)).

6.13. Western Blot

El vector de expresión coloca una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal de los péptidos de interés, dicha etiqueta puede ser reconocida por un anticuerpo a través de un ensayo de western blot.

Primero se llevó a cabo electroforesis de gel de Tris-Tricina-SDS-PAGE como se describe en el punto 6.12. Al terminar la corrida se realizó la inmovilización de proteínas mediante transferencia a membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad), utilizando amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM y metanol al 20% (v/v) pH 8.3) con un equipo Trans Blot SD Semi-dry Transfers cell (Bio-Rad) a 20V por 1 h.

Concluida la transferencia, se cortó el carril del marcado de peso para teñirlo con rojo de Ponceau, el resto de la membrana se bloqueó con leche descremada al 4% (m/v) (Skim Milk Difco) en amortiguador TBE+Tween-20 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 con Tween-20 al 0.05% (v/v)) durante 1 h con agitación suave.

Finalizado el bloqueo, la membrana se lavó 3 veces por 1 min con 20 mL de amortiguador TBE+Tween-20. Después se adicionó el anticuerpo anti-His-tag acoplado a fostasa alcalina (Abcam) diluido 1:2000 en 20 mL del mismo amortiguador y se incubó por 1 h en agitación suave. Por último, se repitieron los lavados a la membrana y se agregó solución reveladora NBT/BCIP (Thermo Scientific) diluida 1:3 en agua destilada, y se agitó suavemente hasta observar bandas moradas donde el anticuerpo reaccionó con la etiqueta de histidinas. Para eliminar el exceso se lavó con agua destilada.

Como controles positivos se utilizaron las fracciones citosólicas obtenidas de cepas que expresan la bacteriocina QC-2 (Esquivel-López, 2019).

6.14. Ensayo de difusión en agar

El análisis del efecto antagonista se realizó mediante difusión en agar utilizando el microorganismo indicador *L. monocytogenes* CFQ-B103, proporcionado por el cepario de la Facultad de Química, UNAM. El protocolo utilizado fue el siguiente:

Primero, se preparó un pre-inóculo con 100 μ L del microorganismo de prueba en 10 mL de caldo BHI (infusión Cerebro Corazón; BHI por sus siglas en inglés) y se incubó a 37°C por 16 h. Después, se realizó un segundo cultivo con 200 μ L del pre-inóculo en 10 mL de caldo BHI y se incubó por 6 h o hasta alcanzar una DO_{600nm} de 1.2. Por otra parte, se vertieron 20 mL de BHI con agar al 1% (m/v) en cajas de Petri; posterior al tiempo de incubación del segundo cultivo, se hizo una dilución 1:100 del mismo en solución salina 0.85% (m/v) pH 7.0, y de ésta se tomaron 800 μ L que se agregaron a 9.2 mL del medio BHI con agar 0.8% (m/v).

Luego, 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 aproximadamente 90 μ g de proteína de la fracción citosólica en un volumen total de 200 μ L. Para las que no fue posible, se tomaron directamente los 200

μL de la fracción. Posteriormente, se incubaron las cajas a 37°C por 12 h. Como control positivo se utilizó Nisaplin® (Esquivel-López, 2019), como controles negativos se utilizaron los extractos de *E. coli* cepas BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS con y sin vector de expresión (pET28a(+)).

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

6.15. Determinación de proteína por el método de Bradford

En una microplaca de 96 pozos se colocaron $160 \mu\text{L}$ de cada una de las muestras a analizar diluidas 1/10, 1/100, o 1/500, dependiendo de la concentración. Se adicionaron $40 \mu\text{L}$ del reactivo de Bradford (Bio-Rad), se homogenizó la reacción y se dejó reposar por al menos 5 min antes de tomar la lectura. La concentración de proteína se determinó a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Epoch. Los valores obtenidos se interpolaron con una curva patrón de albúmina sérica bovina (0-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN de la cepa QD-2 de *E. faecium*, primero se confirmó la pureza de un cultivo de 48 h de la cepa mediante tinción de Gram y microscopía, donde únicamente se observaron cocos Gram-positivos (Figura 6A).

La extracción del ADN se realizó a partir del cultivo con incubación de 48 h. Esta extracción fue hecha por duplicado, y se obtuvo una concentración de 115 ng/μL con una pureza de $A_{260/230}$ de 2.04 y $A_{260/280}$ de 1.94. La integridad del ADN se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.5% (Figura 6B). Una vez comprobada la calidad de la extracción del ADN, se llevó a la UUSMB del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

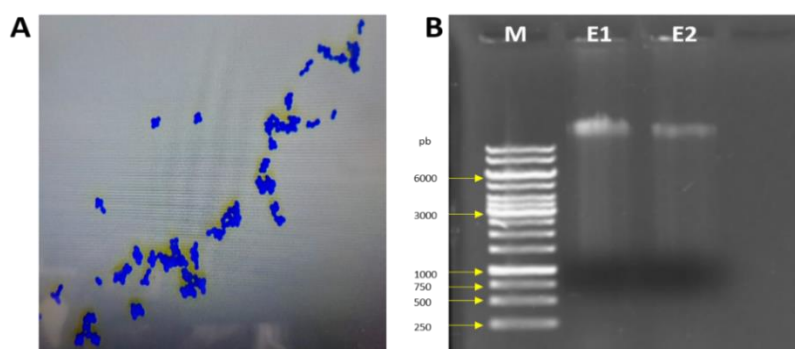


Figura 6. Células del cultivo de cepa QD-2 *E. faecium* a 48 h de crecimiento (A). Muestras de ADN purificado de *E. faecium* para secuenciación (B). M, marcador de peso molecular; E1 y E2, diferentes cultivos de la cepa QD-2 de *E. faecium*.

7.2. Secuenciación e información del genoma

En la Figura 7 se muestra el reporte de calidad de la secuenciación. Para el diagrama de calidades (Figura 7A y 7C) lo ideal es que todas las medias (línea azul) se mantengan por arriba del valor de 28, que corresponde a la zona verde en el fondo de la gráfica. Como se observa para ambas lecturas la calidad fue buena en todas las posiciones.

En la distribución del contenido de GC en la población total de las lecturas se observa un pico a un porcentaje menor de 40 (Figura 7B y 7D). *E. faecium* pertenece al *Phylum* de los *Firmicutes* que se caracterizan por tener un contenido de GC menor a 40.

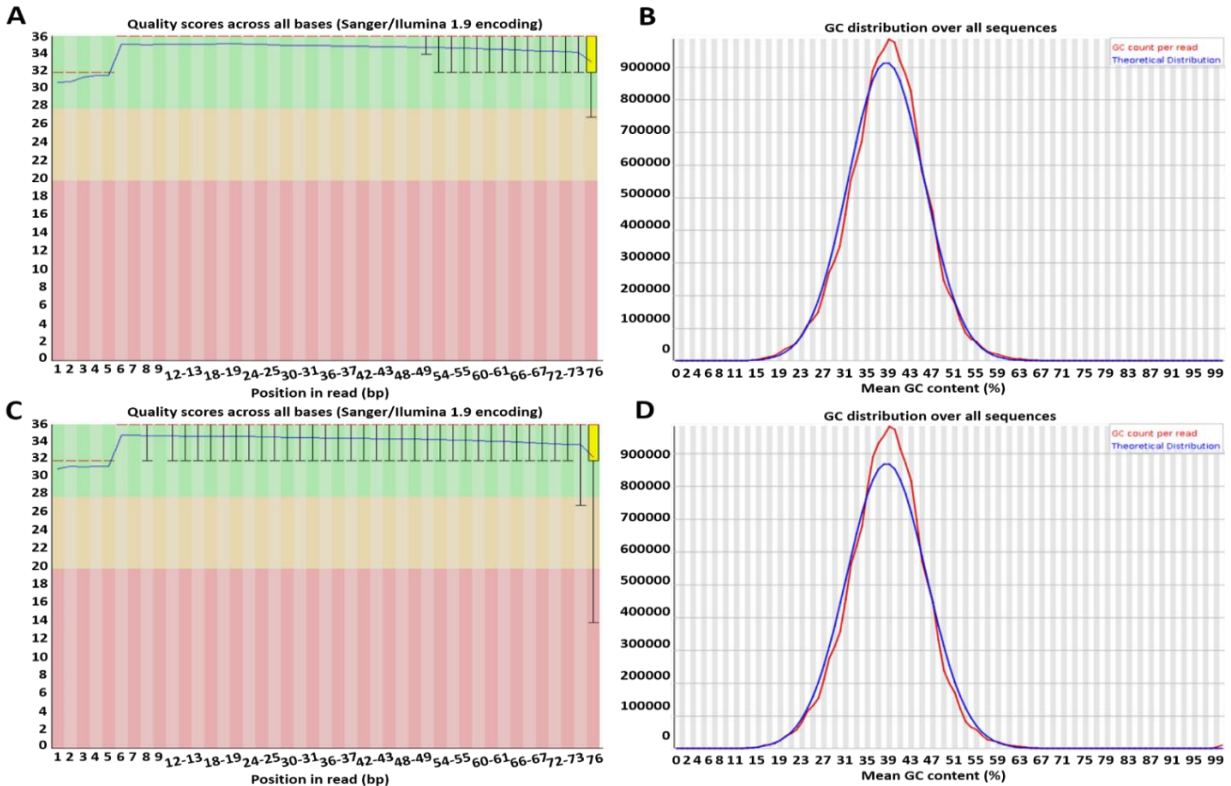


Figura 7. Reporte de calidad de secuenciación del genoma de *E. faecium* cepa QD-2. (A, C). Diagrama de las calidades obtenidas (B, D). Distribución de %GC. A-B sentido 5' y C-D en sentido 3'.

Al observar los resultados óptimos de la secuenciación se optó por solicitar el ensamblado *de novo* del genoma a la UUSMB. Se nos entregaron los siguientes archivos:

1. Genoma ensamblado en formato fasta realizado con el software Spades (v3.13.0).
2. Transcritos predichos en formato fasta utilizando el software PROKKA (v1.13.3).
3. Secuencias peptídicas traducidas a partir de las secuencias codificantes (CDs) de los transcritos.
4. Archivo en formato GFF3 de anotación.
5. Archivo en formato Genbank de anotación
6. Estadística relacionada al genoma y la anotación.
7. Archivo en formato tabular de la anotación funcional automática del genoma ensamblado utilizando pipeline para anotación de la USMB (v1).

La información de estadística relacionada al genoma y la anotación, confirmó la identidad de la cepa QD-2 como *Enterococcus faecium* (Tabla 9). Es una bacteria con tamaño de genoma de 2,676, 947 bp y porcentaje de GC menor al 40 %, con 2,565 secuencias codificantes (CDSs), 3 rRNAs, 46 tRNAs y 1 tmRNA. Resultados similares se han reportado de cepas de *E. faecium* aisladas de otros alimentos artesanales fermentados (Pashkova *et al.*, 2018; Duan *et al.*, 2019; Zommitti *et al.*, 2020).

Tabla 9. Datos del genoma de *E. faecium* cepa QD-2 y la anotación de este.

Organismo	<i>Enterococcus faecium</i>
No. de contigs	97
Tamaño del genoma (bp)	2,676,947
GC (%)	~ 39
No. de rRNAs	3
No. de CDSs	2565
No. de tRNAs	46
No. de tmRNAs	1

7.3. Búsqueda bioinformática de secuencias codificantes para bacteriocinas

Con los *contigs* del genoma ensamblado se realizó una primera búsqueda de genes codificantes con anotación de bacteriocinas utilizando la plataforma de BAGEL4. El análisis se complementó con la información de transcritos predichos y secuencias peptídicas traducidas. En la Tabla 10 se muestran las 8 bacteriocinas identificadas: bacteriocina Ilc (gen 615), Acidocina_LF221B (gen 616), Enterocina A (621), Bacteriocina UviB (gen 718), Enterocina X cadena alfa (gen 901), Enterocina X cadena beta (gen 902), Enterolisina A (gen 2142) y Enterocina B (gen 2596).

En otras cepas de *E. faecium* aisladas de alimentos fermentados se ha reportado la presencia de múltiples genes codificantes para bacteriocinas. Por ejemplo, Zommitti y colaboradores en el 2020, reportaron en 2 cepas la presencia de los genes codificantes para las bacteriocinas, enterocina A, enterocina B, enterocina P, uviB y enterolisina A. El hecho de que los enterococos aislados de estas matrices alimentarias tengan una amplia batería de bacteriocinas sugiere que los péptidos podrían estar ofreciendo una ventaja

para competir contra y/o inhibir el crecimiento de otras bacterias, las cuales podrían ser patógenas para el consumo humano. Esta hipótesis sería necesario corroborarla en estudios posteriores.

Tabla 10. Información de los contigs con genes de bacteriocina

Contig	Gen	Bacteriocina
2	615	Bacteriocina Ilc
	616	Acidocina_LF221B
	621	Enterocina A
3	718	Bacteriocina UviB
	901	Enterocina X cadena alfa
	902	Enterocina X cadena beta
20	2142	Enterolisina A
66	2596	Enterocina B*

*Identificado mediante la base de datos NCBI

En la Figura 8 se observa el arreglo o contexto genómico que presentan los genes que codifican para posibles bacteriocinas y que fueron identificados en los diferentes contigs analizados. De los contigs que presentan al menos un gen anotado como bacteriocina (en color verde claro), sólo el contig 2 tiene ORFs con anotación relacionada a genes estructurales, como son los genes codificantes para proteínas de inmunidad o para proteínas involucradas en el procesamiento y secreción de la bacteriocina. Dentro de los demás contigs, 3.1, 3.2 y 20, sólo están identificados los genes estructurales de bacteriocinas putativas. De manera general, en todos los contigs se encuentran fragmentos anotados con una función no conocida, que pudieran estar o no relacionados al cluster de bacteriocina.

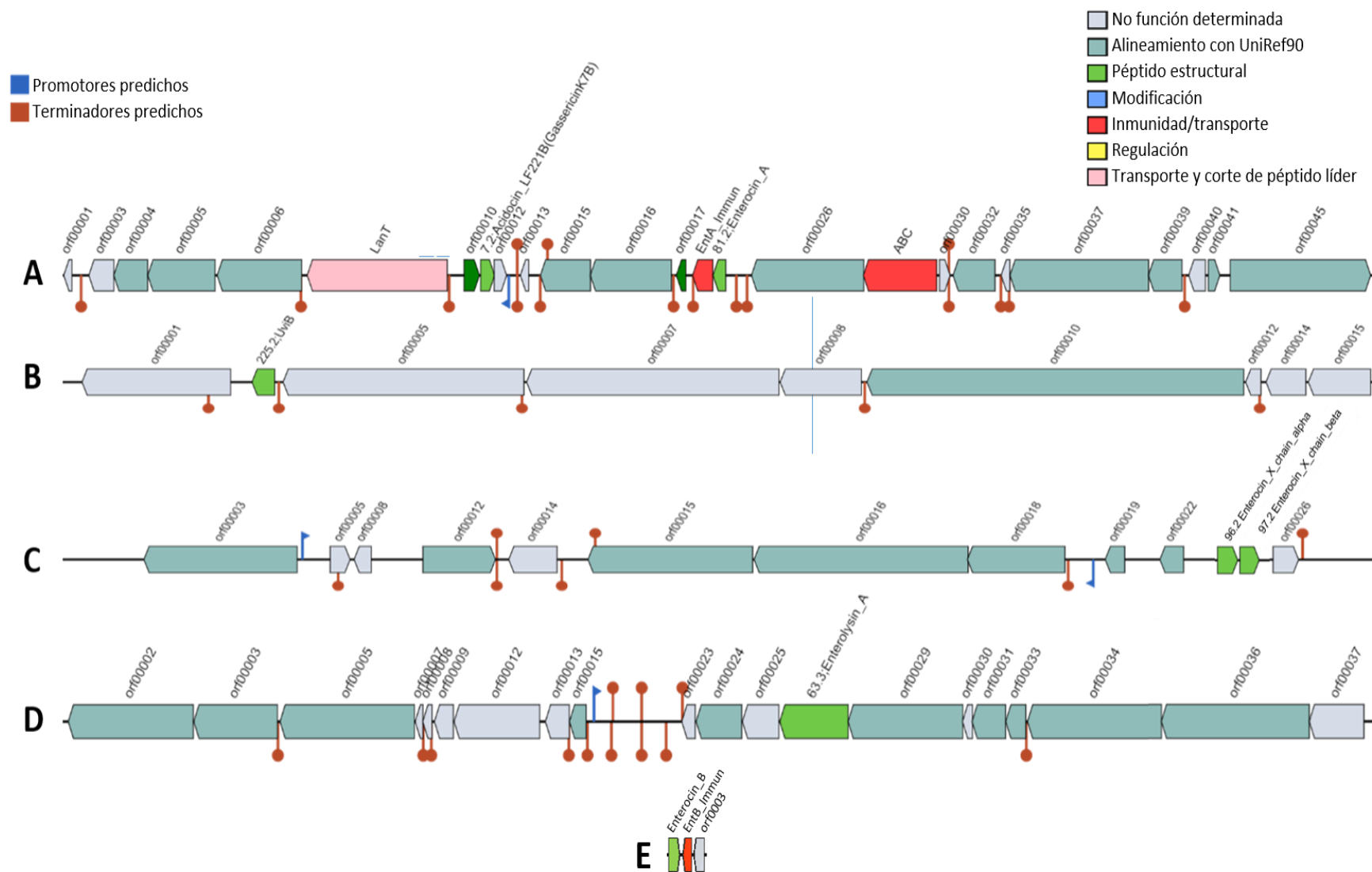


Figura 8. Contexto genómico de los genes relacionados a bacteriocinas. (A) Contig 2; (B) Contig 3.1; (C) Contig 3.2; (D) Contig 20; (E) Contig 66.

7.4. Selección de secuencias de interés

Posterior a la identificación de los contigs que presentaron genes de bacteriocina (Figura 8), se procedió a realizar un análisis de las secuencias traducidas adyacentes al gen de bacteriocina, por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en las bases de datos, NCBI, UniProt y Pfam (Tabla 11, 15, 16 y 17). Esto se realizó con el fin de obtener información acerca de las proteínas que codificarían, y en el caso de los genes de bacteriocina, saber si tienen relación con las ya estudiadas o son péptidos con dominios de bacteriocina pero que no tienen similitud alguna con las bacteriocinas que se conocen hasta el momento.

La información del análisis se comparó con el contexto genómico reportado en la literatura para la bacteriocina con la que la base de datos BAGEL4 encontró similitud (Tabla 10). Así mismo esta información sirvió como criterio de selección de genes de interés.

A continuación, se describe el análisis de las secuencias de cada contig.

Contig 2: Bacteriocina no caracterizada con similitud a la Acidocina _LF221B (Gasericina K7B) (Figura 19, gen 616). La Acidocina_LF221B es producida por las cepas probióticas *Lactobacillus gasseri* K7 y *Lactobacillus gasseri* LF221, está compuesta por dos péptidos, la cadena alfa y cadena beta, por lo que se clasifica como no lantibiótica de dos péptidos. Las cepas que la expresan presentan un amplio espectro de inhibición, incluyendo bacterias de deterioro de alimentos como: *B. cereus*, *C. tyrobutyricum*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *L. innocua*, *S. aureus* y *S. thermophilus*. El grupo de genes reportado presenta un gen codificante del transportador ABC, de una proteína accesoria, de una proteína hipotética, de un péptido complementario, del péptido activo, y de la proteína de inmunidad (Zorič *et al.*, 2010; Treven *et al.*, 2013).

En el caso del gen 616 codificante para la bacteriocina no caracterizada (verde claro), tiene río arriba el gen 615, identificado como codificante para bacteriocina (verde fuerte), que posiblemente tenga función de péptido complementario o de factor de inducción, y río abajo un gen cuyo producto sería una proteína hipotética (Figura 9, Tabla 11). Aunque el posible cluster, aparentemente no presenta gen de inmunidad, no se descarta que sea funcional ya que se ha propuesto que algunas bacteriocinas ocupan la maquinaria de

secreción y de inmunidad de otras bacteriocinas codificadas en el genoma (Franz *et al.*, 1999).

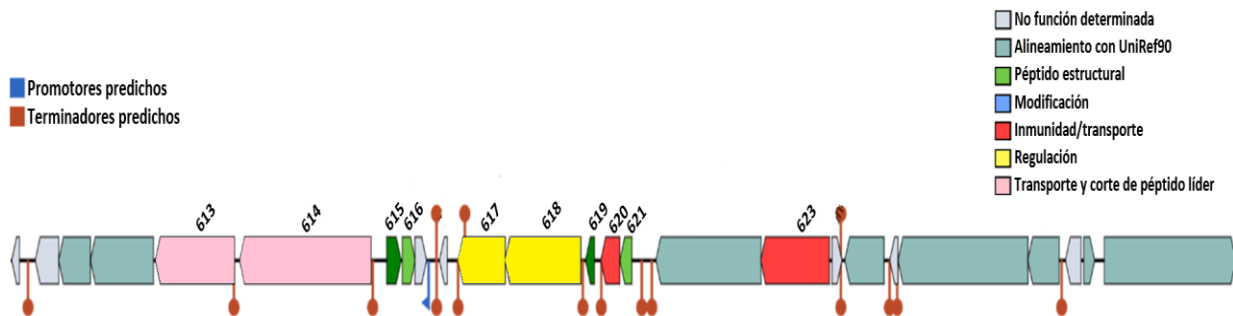


Figura 9. Contexto genómico del Contig 2.

Tabla 11. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias proteínicas con anotación de bacteriocina y proteínas accesorias en Contig 2.

Gen	NCBI	Id (%)	UniProt	Id (%)	Pfam	Bit score
613	Proteína accesoria de secreción de bacteriocina (ID:EOG05040.1)	100	Proteína accesoria de secreción de bacteriocina (E:A0A829FAV9)	100	Dominio proteína de secreción de la familia HlyD (PF13437)	48.7
614	Transportador ABC (ID:WP_016629566.1)	99	Transportador ABC de bacteriocina (E:A0A0M2B189)	100	Dominio familia de la Peptidasa C39 (PF03412)	152.4
					Dominio región transmembranal de transportador ABC (PF00664)	198.6
					Dominio Transportador ABC (PF00005)	109.2
615	Bacteriocina (ID:WP_100546289.1)	100	Bacteriocina (E:A0A3D5CTU4)/ Proteína no caracterizada (E:A0A829F1K4)	100	Dominio de Bacteriocina clase II (PF10439)	10.9
616	Bacteriocina (ID:WP_002294603.1)	99	Bacteriocina (E:A0A3D5CUF2)/Proteína no caracterizada (E:A0A829EWY9)	100	Dominio de Bacteriocina clase II (PF10439)	30.8
617	Factor transcripcional regulador de respuesta (ID:WP_002294602.1)	99	Factor transcripcional regulador de respuesta (E:U2NXE8)	100	Dominio regulador de respuesta (PF00072)	40.3
					Dominio de unión a DNA (PF04397)	53.9

E: Entrada (Entry); Id: similitud (Identities); ID: identificador (Sequence ID).

Tabla 11 continuación. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias proteínicas con anotación de bacteriocina y proteínas accesorias en Contig 2

Gen	NCBI	Id (%)	UniProt	Id (%)	Pfam	Bit score
618	Proteína con dominio GHKL (ID:WP_060812926.1)	99	Proteína cinasa de histidina (E:U2Q482)	99.8	Dominio GHKL (PF14501)	57.3
619	Factor de inducción de bacteriocina (ID:WP_002294600.1)	100	Secuencia señal tipo bacteriocina (E:A0A4Y3JRR7)	100	Dominio Familia lactococcina (PF04369)	16.2
620	Proteína de inmunidad de la enterocina A (ID:ELA64739.1)	98	Proteína de inmunidad de la enterocina A (E:I3U4Q3)	100	Dominio Familia inmunidad de la enterocina A (PF08951)	34.2
621	Enterocina A (ID:AAF44686.1)	98	Enterocina A (E:I34Q4)	100	Dominio Familia Bacteriocina clase II (PF01721)	74.4
623	Transportador ABC (ID:WP_002298507.1)	99	Transportador ABC (E:Q3Y0E0)	100	Dominio Transportador ABC (PF00005)	125.5

E: Entrada (Entry); Id: similitud (Identities); ID: identificador (Sequence ID).

Por otra parte, los genes 615 y 616 ya habían sido reportados por O’Keeffe y colaboradores en 1999. Ellos especularon que la posición de los genes en la hebra opuesta y entre genes codificantes para el operon de la enterocina A, sugería su presencia en la región intergénica como resultado de eventos de recombinación, y que por tanto no tenían relación alguna con la síntesis de la enterocina A. Sin embargo, gracias a la secuenciación de genomas, actualmente dichos genes se han hallado en diversas cepas de *E. faecium*, lo que descartaría dicha suposición. Además, en 2017, Escamilla-Martínez *et al.* reportaron mediante la técnica de secuenciación basada en el anclaje del cebador a la secuencia previa (*primer walking*), la identificación de los ORFs codificantes para la Enterocina 29 α (aquí nombrado como 616) y Enterocina 29 β presentes en la cepa MXVK29 de *E. faecium* aislada de salchichas fermentadas. Clasificaron a las probables bacteriocinas en la clase IIb (compuestas por dos péptidos de acuerdo con Cotter *et al.*, 2005).

Tabla 12. Secuencia proteínica de Enterocina 29β y ORF3.

Proteína	Identificado	Secuencia	pl	IH
Ent29β	Escamilla-Martínez <i>et al.</i> , 2017	MFFIFSKVWNGQNFLKLLVLFIIILNFYLLLKS DKNSLEM	10	0.548
ORF3	BAGEL4	VRKQLKNIKPDWV/SITNIG MFFIFSKVWNG QNFLKLLVLFIIILNFYLLLKSDKNSLEM	10	0.548

En negrita secuencia de la Enterocina 29β en el ORF3.

Tabla 13. BLAST y búsqueda de dominios para la secuencia proteínica ORF3 y la secuencia reportada como Enterocina 29β.

Proteína	Identificado	NCBI	Id (%)	UniProt	Id (%)	Pfam	Bit score
Ent29β	Escamilla-Martínez <i>et al.</i> (2017)	Proteína hipotética (ID: APV55190.1)	100	Proteína no caracterizada (E: S4DZ24)	100	ORF76 (PF05814)	14.2
ORF3	BAGEL4	Proteína hipotética (ID:APV55190.1)	98	Proteína no caracterizada (E:C9B7X3)	100	ORF76 (PF05814)	14.0

E: Entry; Id: similitud (Identities); ID: identificador (Sequence ID).

Por tanto, se complementó el análisis buscando la secuencia reportada en Escamilla-Martínez *et al.* (2017) en el genoma de la cepa QD-2. Primero, se alineó el contig 2 con la secuencia reportada en la base de datos NCBI con el ID: KT443908, dando como resultado un porcentaje de identidad de 99.89 %. Después, se revisaron los transcritos predichos para el genoma de la cepa QD-2, donde no se encontró la secuencia cuya traducción correspondería a la Enterocina 29β. En cambio, en el análisis con la herramienta BAGEL4, sí se predijo una proteína adyacente a las codificadas en los genes 615 y 616 (ORF3), aunque con una secuencia más larga a la reportada por Escamilla-Martínez *et al.* (2017) (Tabla 12). Posteriormente se analizó la secuencia proteínica reportada de Enterocina 29β y la encontrada mediante BAGEL4 en las bases de datos NCBI, UniProt y Pfam (Tabla 13). Ninguna secuencia dio resultado de alto porcentaje de identidad con otras bacteriocinas ya reportadas. Por lo que para los siguientes análisis se descartó la secuencia como probable bacteriocina.

Contig 2. Enterocina A (Figura 9, gen 621). La enterocina A, es la bacteriocina común en cepas de *E. faecium*. Se conoce que su actividad antimicrobiana requiere de una proteína de inmunidad, de un transportador ABC y de un factor de inducción (Aymerich *et al.*, 1996; O’Keeffe *et al.*, 1999). En el caso del genoma de la cepa QD-2, están presentes todas las proteínas con función en la biosíntesis de la enterocina A, el gen 613 codifica para la proteína de secreción de bacteriocina (rosa), el gen 614 para el transportador ABC (rosa), el gen 617 para el regulador de respuesta (amarillo), el gen 618 para la proteína cinasa de histidinas (amarillo), el gen 619 para el factor de inducción (verde fuerte), el gen 620 para la proteína de inmunidad (rojo) y el gen 621 para la enterocina (verde claro).

Contig 3. Bacteriocina no caracterizada con dominio de holina B y similitud a la bacteriocina UviB (Figura 10, gen 718). Las holinas son proteínas codificadas en fagos involucrados en la disrupción de la membrana bacteriana para facilitar la liberación de partículas de fago (Zhao & Kuipers, 2016). Bacteriocinas con este dominio han sido detectadas en *Bacillus*. Se conoce que el péptido tipo holina, BhIA tiene actividad antibacterial contra varias bacterias Gram-positivas, incluyendo a *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) y *Micrococcus luteus*, mediante la destrucción de la membrana celular (Aunpad & Panbangred, 2012).

Respecto al péptido denominado bacteriocina UviB, este se describió por primera vez en el plásmido bacteriocinogénico pIP404 proveniente de *Clostridium perfringens*. Este plásmido contiene tres genes inducidos por luz UV, el gen *uviA*, el gen *uviB* y el gen *bcn* codificante de la bacteriocina BCN5. Los dos primeros genes están organizados en un operon y están co-regulados con el gen *bcn*, por lo que se propuso que estos genes están relacionados funcionalmente y que las proteínas UviAB están involucradas en la secreción de la bacteriocina BCN5 y/o inmunidad hacia esta. Siendo la proteína UviA la más probable de ser de inmunidad y la UviB a una proteína que se incorpora en la membrana (Garnier & Cole, 1988; Garnier & Cole, 1988a).

En lo que corresponde al gen 718 de la cepa QD-2 (Figura 10, verde fuerte), este tuvo bajo porcentaje de identidad determinado por las diferentes plataformas de análisis. Además se analizaron los genes corriente abajo y corriente arriba, y en ambos casos se

identificaron proteínas relacionadas a fagos (Figura 10, Tabla 14). Por lo que se descartó su probable actividad tipo bacteriocina.

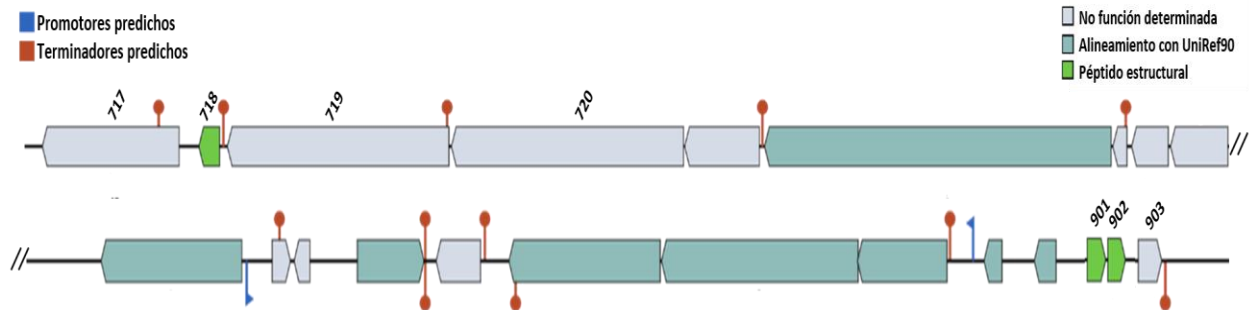


Figura 10. Contexto genómico del Contig 3.

Tabla 14. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias proteínicas con anotación de bacteriocina y proteínas accesorias en Contig 3.

Gen	NCBI	Id (%)	UniProt	Id (%)	Pfam	Bit score
717	Proteína hipotética (ID:MBK4853433.1)	99	Proteína no caracterizada (E:A0A8F5HBJ1)	100	Dominio de familia de función desconocida (PF19528)	395.4
718	Péptido tipo-holina (ID:WP_002334520.1) Proteína hipotética (ID:MBKK4853432.1)	99 97	Proteína no caracterizada (E:A0A511J083)	98	Dominio familia de las holinas (PF10960)	34.2
719	Proteína hipotética (ID:NTJ97620.1)	100	Proteína estructural menor de bacteriófago (E:A0A729AV99)	72.7	Dominio N-terminal sin función caracterizada (PF10651)	30.2
720	Proteína de cola de fago (ID:WP_10728464.1)	100	Proteína de cola de fago (E:A0A8E7H0U7)	98.7	Dominio cola de profago endopeptidasa (PF06605)	38.9
901	Precursor enterocina B (ID:WP_086319442.1)	97	Enterocina B (E:U2NJ00)	100	Dominio Lantibiótico tipo A (PF04604)	15.6
902	Bacteriocina clase II (ID:WP_194177760.1)	98	Bacteriocina clase II (E:A0A0M2B2R0)	100	Dominio Bacteriocina clase II (PF10439)	20.3
903	Proteína hipotética (ID:WP_136977700.1)	99	Proteína no caracterizada (E:U2QGY4)	100	Dominio Familia transportador FecCD (PF01032)	15.2

E: Entrada (Entry); Id: similitud (Identities); ID: identificador (Sequence ID).

Contig 3. Enterocina X cadena alfa (X α) (Figura 10, gen 901) y enterocina X cadena beta (X β) (Figura 10, gen 902). Estas bacteriocinas fueron identificadas por primera vez en la cepa de *E. faecium* KU-B5 aislada de manzanas dulces. Juntas forman una bacteriocina de dos péptidos con un espectro antimicrobiano mayor o menor, dependiente del microorganismo blanco, comparado con el de los péptidos individuales. La región codificante presenta 3 genes río arriba con funciones desconocidas y río abajo un gen que codifica para una posible proteína de inmunidad, hidrofóbica y catiónica con dos dominios transmembranales putativos (Hu *et al.*, 2010). La similitud de la secuencia de la región codificante de las enterocinas X con la región codificante de la enterocina B, así como la detección de las primeras y la segunda en cepas productoras de enterocina A sugiere que las enterocinas X α y X β utilizan el sistema de transporte de otras enterocinas, como del presente para la enterocina A (Franz *et al.*, 1999). En el caso de la región genómica en la cepa QD-2, los genes río arriba de los codificantes para la enterocinas, tienen función no relacionada a la síntesis (gris) y el gen (903) río abajo codifica para una proteína hidrofóbica, catiónica y con dos dominios transmembranales (Tabla 14).

Contig 20. Enterolisina A (Figura 11, gen 2142). Bacteriocina identificada por primera vez en *E. faecalis* que también se ha reportado en cepas de *E. faecium*. Su espectro de inhibición incluye enterococos, pedicocos, lactocos y lactobacilus (Nilsen *et al.*, 2003). No hay reportes de genes de inmunidad o de transporte asociados a la actividad de la bacteriocina.

Para el genoma de la QD-2 tampoco se identificaron genes relacionados con la función de la enterolisina A (verde fuerte), concordando con lo anteriormente reportado (Tabla 15).

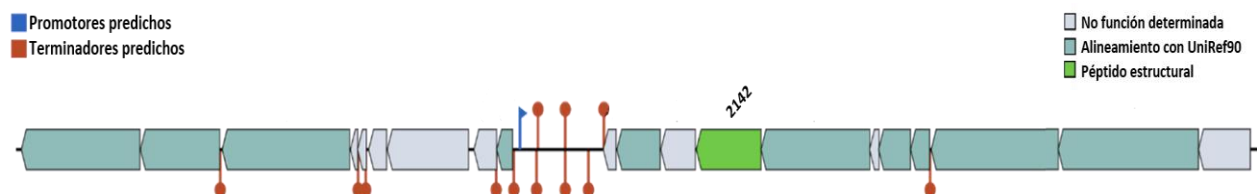


Figura 11. Contexto genómico del Contig 20.

Tabla 15. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias proteínicas con anotación de bacteriocina y proteínas accesorias en Contig 20.

Gen	NCBI	Id (%)	UniProt	Id (%)	Pfam	Bit score
2142	Proteína con dominio de glucosaminidasa (ID:WP_002330438.1)	99	Peptidasa (E:U2Q3L5)	100	Dominio de Glucosaminidasa (PF01832)	41.1
					Dominio de la familia de Peptidasa M23	39.4

E: Entrada (Entry); Id: similitud (Identities); ID: identificador (Sequence ID).

Contig 66. Enterocina B (Figura 12, Gen 2596). La enterocina B es comúnmente identificada en cepas de enterococos productoras de enterocina A y se ha reportado función sinérgica entre las bacteriocinas (Casaus *et al.*, 1997; Ankaiah *et al.*, 2018). La organización de la región donde se ubica este gen es atípica a la reportada para bacteriocinas de clase II. Únicamente se ha reportado la presencia del gen codificante para la proteína de inmunidad, localizado río abajo y con orientación opuesta al gen de la bacteriocina (Franz *et al.*, 1999). En el caso del contexto genómico para la enterocina B en el genoma de la cepa QD-2, se haya inmediatamente un gen codificante para una proteína putativa de inmunidad de enterocina, con orientación opuesta como ya ha sido reportado (Figura 12, Tabla 16).

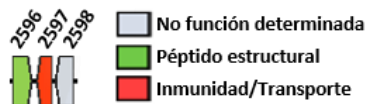


Figura 12. Contexto genómico del Contig 66.

Tabla 16. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias proteínicas con anotación de bacteriocina y proteínas accesorias en Contig 66.

Gen	NCBI	Id (%)	UniProt	Id (%)	Pfam	Bit score
2596	Enterocina B (ID:ABN45881.1)	10	Bacteriocina carnobacteriocina-A (E:S4DTV0)	100	Dominio Bacteriocina clase II (PF10439)	26.6
2597	Proteína de inmunidad de enterocina (ID:PQF30036.1)	98	Proteína no caracterizada (E:A0A0M2B2H8)/ proteína de inmunidad de enterocina B (E:O85791)	100	Dominio de familia de función desconocida (PF19144)	16.3

E: Entrada (Entry); Id: similitud (Identities); ID: identificador (Sequence ID).

Secuencias con anotación de proteínas accesorias de bacteriocinas, pero sin los péptidos estructurales.

En el genoma de la cepa Q.2 se identificaron genes con funciones asociadas a la expresión de bacteriocinas, pero sin gen estructural del péptido antimicrobiano (Tabla 17). Estas son, una proteína transportador ABC (gen 2335), una proteína integral de membrana asociada a bacteriocina (gen 2336) y una proteína de inmunidad de bacteriocina (gen 2485). La ocurrencia de este tipo de patrones ya se había reportado con anterioridad en cepas de enterococos aislados del queso Cotija (Escobar-Zepeda, 2016). Donde se planteó la hipótesis de que posiblemente las proteínas de inmunidad, y accesorias, son tan útiles o más que la propia bacteriocina, es decir, el hecho de poseer una batería de genes de accesorios a la síntesis de bacteriocina en el genoma, le otorga una ventaja real a la cepa que la posee aun cuando no sea productora de bacteriocinas.

Tabla 17. BLAST y búsqueda de dominios para las secuencias con anotación de proteínas accesorias de bacteriocinas, pero que en la secuencia nucleotídica no presentan en su vecindad gen codificante de bacteriocina.

Gen	NCBI	Id (%)	UniProt	Id (%)	Pfam	Bit score
2335	Transportador ABC (ID:WP_1741228440.1)	100	Transportador ABC (E:U2NHFO)	100	Dominio Transportador ABC (PF00005)	42
2336	Proteína integral de membrana asociada a bacteriocina (ID:EPI3064.1)	99	Proteína integral de membrana asociada a bacteriocina (E:A0A0M2B2H2)	99	Dominio de familia de función desconocida (PF07242)	31.0
2485	Proteína de inmunidad de bacteriocina (ID:WP_038809770.1)	97	Proteína de inmunidad de bacteriocina (E:A0A6B3QD15)	98	Dominio de inmunidad de la enterocina A (PF08951)	46.5

E: Entrada (Entry); Id: similitud (Identities); ID: identificador (Sequence ID).

De acuerdo al análisis comparativo anterior se propone el contexto genómico de la Tabla 18 para las bacteriocinas codificadas en el genoma de la cepa QD-2 de *E. faecium*.

En verde está el cluster de proteínas asociadas a la síntesis de la Enterocina A, en amarillo las bacteriocinas no caracterizadas 615 y 616, donde no se descarta la posibilidad de que la expresión de estas utilice las proteínas accesorias de la enterocina

A. En rosa el cluster de proteínas de síntesis de la Enterocina X, en morado, a la enterolisina A sin proteínas asociadas, y en gris a las proteínas de la enterocina B.

Tabla 18. Contexto genómico de las bacteriocinas presentes en el genoma de la cepa QD-2 de *E. faecium*. (Diferente color indica diferente cluster).

Gen	Proteína	Peso molecular (kDa)	pi
613	Proteína de secreción de bacteriocina	52.4	6.11
614	Transportador ABC	81.2	6.38
615	Bacteriocina	7.3/5.1	9.64/9.31
616	Bacteriocina no caracterizada	6.9/4.3	8.77/7.78
617	Regulador de respuesta	29.4	8.26
618	Proteína cinasa de histidinas	50.4	8.87
619	Factor de inducción de bacteriocina	5.3	9.41
620	Proteína de inmunidad de la enterocina A	13.2	8.69
621	Enterocina A	6.8/4.8	9.36/9.07
901	Enterocina X cadena alfa	6.4	9.10
902	Enterocina X cadena beta	6.1	9.82
903	Proteína hipotética con dominios transmembranales	8.6	9.84
2142	Enterolisina A	43.19	6.08
2596	Enterocina B	7.4	9.39
2597	Proteína de inmunidad de enterocina	6.7	10.02

7.5. Análisis *in silico* de secuencias de interés

Una característica importante que sirve como criterio de selección de los genes de interés, es la disposición de los genes con anotación de proteína de inmunidad y/o de transporte respecto a los de bacteriocina; los genes deben encontrarse en un mismo contig, ya que el de inmunidad y transporte protegen 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 los

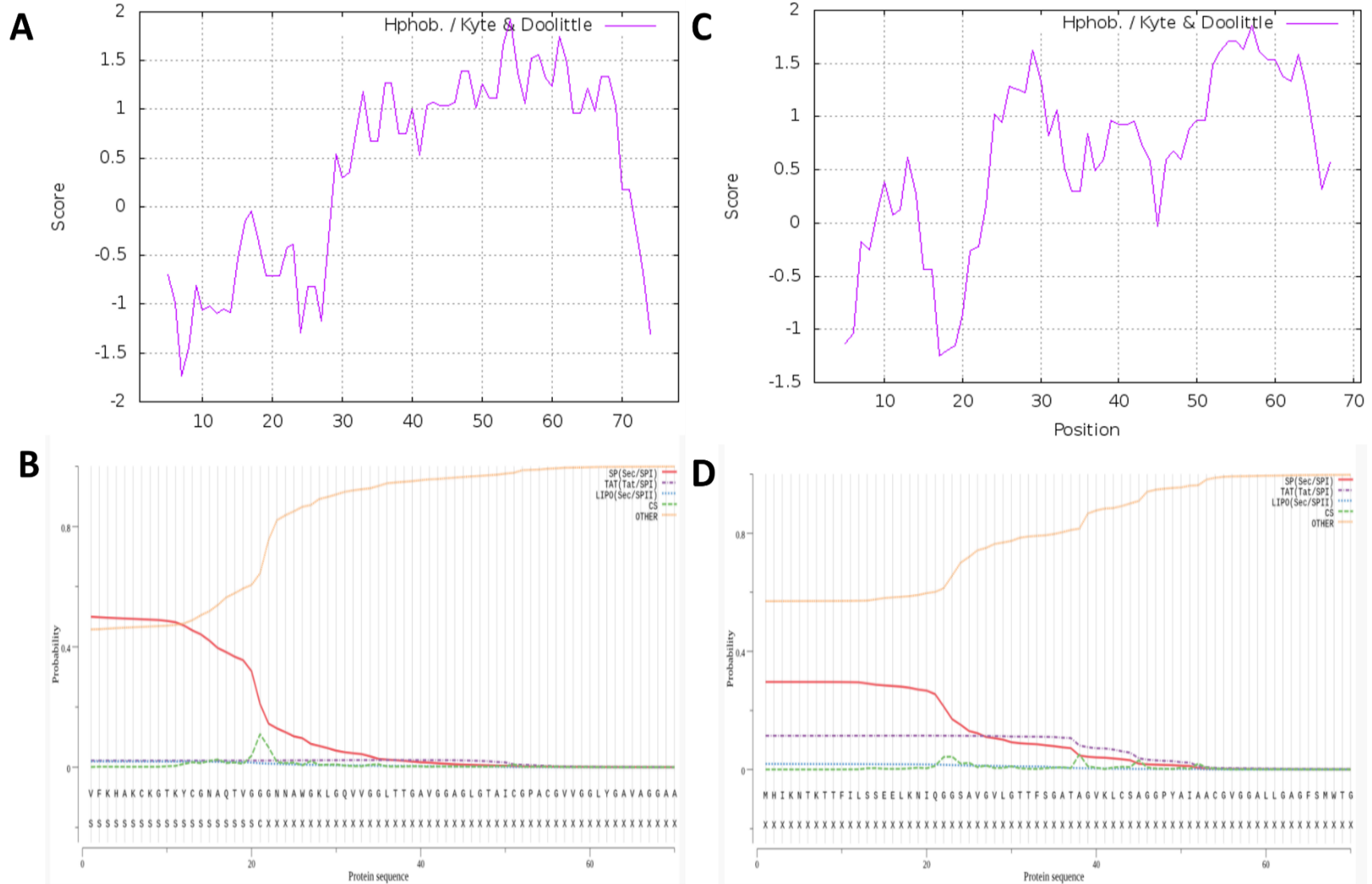


Figura 14. Hidrofobicidad y Probabilidad de secuencia señal de bacteriocinas hipotéticas (A_B) gen 615; (C-D), gen 616.

La confirmación teórica de las propiedades de bacteriocina de las secuencias 615 y 616, sirvió como criterio de selección para la caracterización de actividad antimicrobiana mediante la expresión en el sistema heterólogo *E. coli* cepas BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS.

7.6. Amplificación de los genes seleccionados

Para la clonación de los genes seleccionados se amplificaron las secuencias mediante oligonucleótidos específicos. Debido a la presencia de un probable sitio de procesamiento de doble glicina se diseñaron oligos internos para así obtener dos construcciones, una con el gen completo y otra sin la secuencia del probable péptido señal.

Primero, se realizó la extracción del ADN genómico (revisar 6.1) para su uso como molde en las reacciones de PCR de amplificación del gen completo (Figura 15A). Una vez comprobada la calidad del ADN se procedió a la amplificación de las secuencias.

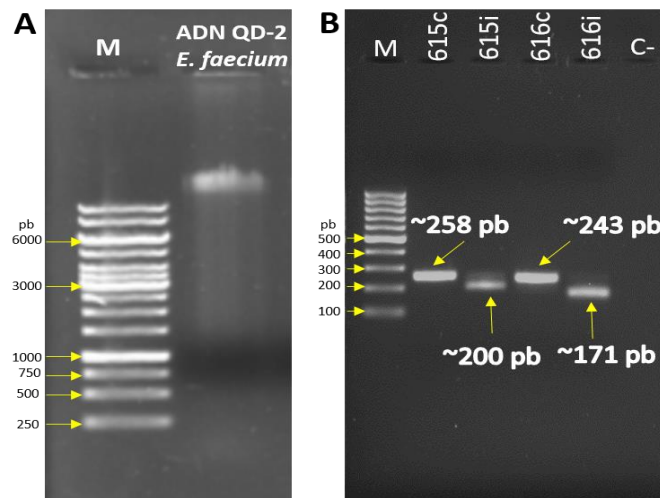


Figura 15. Amplicones de los genes 615 y 616 con los oligonucleótidos específicos. (A) ADN genómico de *E. faecium* utilizado como molde para la reacción de PCR visualizado en gel de agarosa al 0.5%; (B) amplificación de los genes 615c, 615i, 616c y 616i visualizados en gel de agarosa al 1.5%; C-, control negativo; M, marcador de peso molecular.

En la Figura 15B se muestra la amplificación de los genes completos 615 y 616 (615c y 616c), a un tamaño aproximado de 258 y 243 pb, respectivamente. Una vez obtenidos estos amplicones, se purificaron y se ocuparon como molde para la amplificación con el oligo interno donde se elimina la probable señal de secreción. También, en la Figura 15B,

se muestran los amplicones 615 y 616 obtenidos con oligo interno (615i y 616i). Se observan 2 bandas, la primera es la correspondiente al amplicón del gen completo (258 y 243 pb) y la segunda al amplicón obtenido cuando se elimina al gen la hipotética señal de secreción señal (200 y 170 pb), ésta se cortó y purificó para su uso en ligación.

7.7. Clonación en pET28a(+) y transformación en *E. coli* cepas BL21(DE3) y BL21(DE3) pLysS

Para la expresión de los genes de interés recombinantes se utilizó el plásmido pET28a(+) y las cepas *E. coli* BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS.

Para la clonación en el vector pET28a(+), los amplicones de los genes 615c, 615i, 616c, y 616i y el vector purificados se digirieron de acuerdo con el punto 6.6. Posteriormente se ligaron siguiendo el protocolo descrito en el punto 6.7 y se trasformaron por la metodología de choque térmico mencionada en el punto 6.8.

De la clonación de los insertos 615c, 615i, 616c, y 616i en el vector pET28a(+) y posterior transformación en las cepas de *E. coli*, se seleccionaron cinco clonas para comprobar la presencia de los insertos. En la Figura 16 se muestra una clona representativa de las analizadas. Primero se analizaron mediante la reacción de PCR de colonia utilizando los oligos universales T7, con lo cuales se amplifica parte del vector de expresión que se encuentra río arriba y río abajo del fragmento de interés. En la Figura 16A y 16B se muestran los amplicones obtenidos para los controles C1 y C2, cepa sin plásmido y cepa con pET28a(+) sin inserto, respectivamente, así como para las construcciones. Para C1, no hay amplicón y para C2, se observa una banda a un tamaño aproximado de 318 pb, que es la correspondiente al sitio múltiple de clonación sin inserto.

En el caso de las clonas de las construcciones pET28a(+)-615c y pET28a(+)-615i, las bandas de los amplicones se observan a tamaño aproximado de 480 pb y 420 pb, respectivamente. Para las clonas de las construcciones pET28a(+)-616c y pET28a(+)-616i, las bandas de los amplicones se muestran a tamaño aproximado de 456 pb y 390 pb. Los tamaños observados de todos los amplicones concuerdan con lo esperado.

Además, se llevó a cabo la doble digestión de los plásmidos con las enzimas NdeI y XhoI. En la Figura 16C y 16D, se observa para el control C1 que ninguna de las cepas contenía

plásmido que fuera digerido por las enzimas. Para el control C2, cepas con pET28a(+) sin inserto, únicamente se observa la linealización del plásmido, dado que el fragmento que se escinde del plásmido pET28a(+) cuando se digiere con NdeI y XhoI, es muy pequeño (78 pb) y en esta clase de gel y condiciones de corrida no es posible observarlo. Respecto a la digestión de las clonas recombinantes, se muestra para las construcciones 615c y 615i, fragmentos de aproximadamente 240 pb y 180 pb. Para las construcciones 616c y 616i, los fragmentos que se muestran son de aproximadamente 216 pb y 150 pb.

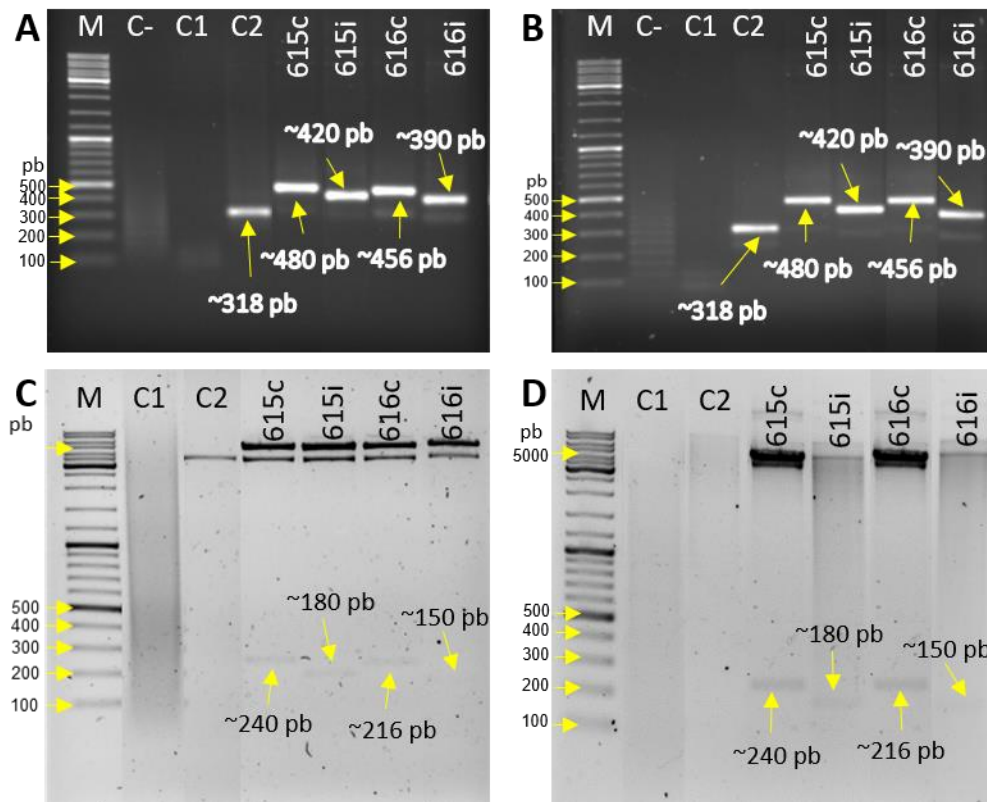


Figura 16. Análisis de clonas seleccionadas. (A) Amplicones obtenidos con los oligos T7 universales para las clonas en *E.coli* BL21(DE3); (B) Amplicones obtenidos con los oligos T7 universales para las clonas en *E.coli* BL21(DE3)pLysS; (C) Doble digestión NdeI-XhoI para las clonas indicadas en la figura provenientes de *E.coli* BL21(DE3); (D) Doble digestión NdeI-XhoI de los plásmidos indicados en la figura obtenidos de *E.coli* BL21(DE3)pLysS. M, marcador de peso molecular; C-, control negativo; C1, control cepas sin vector; C2, control cepa con plásmido ET28a(+) sin inserto.

Cada una de las clonas obtenidas para las construcciones se mandó a secuenciar para corroborar que estuvieran en marco de lectura apropiado con la etiqueta de histidinas y verificar que no hubiera cambio alguno en su secuencia.

En la Figura 17A se muestra la secuencia de la construcción del gen 615c obtenida a partir del plásmido pET28a(+)-615c, comprende del nucleótido 61 al 294 y sus correspondientes aminoácidos (M21-K98). Como parte del diseño de las construcciones se mantuvo la secuencia de reconocimiento de la proteasa Trombina aminoácidos L14 a S19 (nucleótidos 40 al 58); la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción NdeI (nucleótidos 58 al 63) y secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI (nucleótidos 299 al 304). Los nucleótidos 1 al 60 y 295 al 339 son parte del vector pET28a(+).

Con esta construcción la proteína 615c sería expresada como un polipéptido con un peso aproximado de 10.9 kDa.

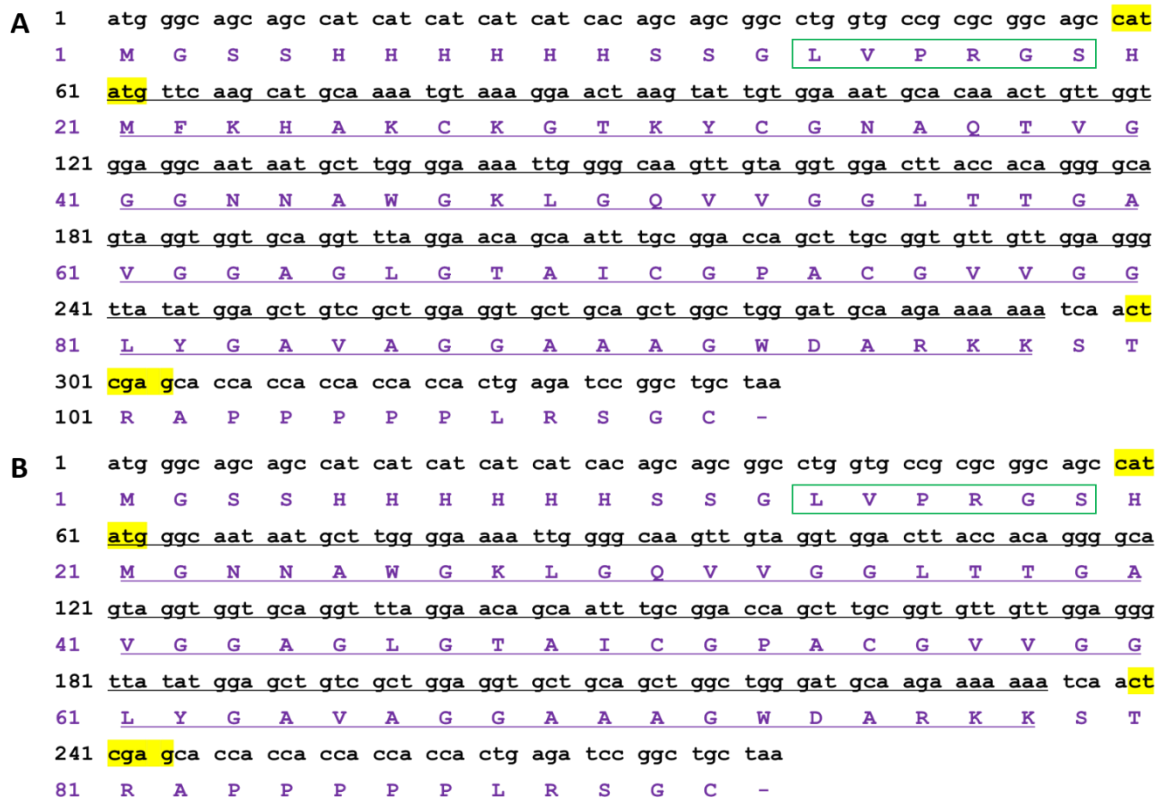


Figura 17. Secuencia nucleotídica obtenida de los plásmidos (A) pET28a(+)-615c y (B) pET28a(+)-615i. Para ambos casos, se muestra el producto de la traducción de ambas regiones. Un recuadro verde indica el sitio de reconocimiento a Trombina. En amarillo se resaltan los sitios de reconocimiento de las enzimas NdeI y XhoI.

Respecto a la secuencia del plásmido pET28a(+)-615i (Figura 17B), se observó que el gen 615i va del nucleótido 61 al 234 (aminoácidos M21-K78). Como parte del diseño de

las construcciones se mantuvo la secuencia de reconocimiento de la proteasa Trombina aminoácidos L14 a S19 (nucleótidos 40 al 58); la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción NdeI (nucleótidos 58 al 63) y la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI (nucleótidos 239 al 244). Los nucleótidos 1 al 60 y 235 al 279 son parte del vector pET28a(+).

Con esta construcción la proteína 615i sería expresada como un polipéptido con un peso aproximado de 8.8 kDa.

En la Figura 18A se muestra la secuencia de la construcción que lleva clonado el gen 616c. La secuencia del gen 616c comprende del nucleótido 61 al 273 y sus correspondientes aminoácidos (M21-K91). Como parte del diseño de las construcciones se mantuvo la secuencia de reconocimiento de la proteasa Trombina de los aminoácidos L14 a S19 (nucleótidos 40 al 58); la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción NdeI (nucleótidos 58 al 63) y la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI (nucleótidos 275 al 280). Los nucleótidos 1 al 60 y 274 al 318 son parte del vector pET28a(+) que se utilizó para expresar los fragmentos de interés.

Con esta construcción la proteína 616c sería expresada como un polipéptido con un peso aproximado de 10.4 kDa.

Respecto a la secuencia de la construcción que lleva clonado el gen 616i (Figura 18B), se determinó que éste va del nucleótido 61 al 207 y sus correspondientes aminoácidos (M21-K69). Como parte del diseño de las construcciones se mantuvo la secuencia de reconocimiento de la proteasa Trombina de los aminoácidos L14 a S19 (nucleótidos 40 al 58); la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción NdeI (nucleótidos 58 al 63) y la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI (nucleótidos 209 al 214). Los nucleótidos 1 al 60 y 208 al 247 son parte del vector pET28a(+) que se utilizó para expresar los fragmentos de interés.

Con esta construcción la proteína 616i sería expresada como un polipéptido con un peso aproximado de 7.9 kDa.

A

```

1 atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg cgc ggc agc cat
1 M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H
61 atg cat atc aag aac aca aaa aca aca ttt ata tta tct tca gaa gag ttg aaa aat att
21 M H I K N T K T T F I L S S E E L K N I
121 caa ggt ggg agt gcc gtg gga gtt tta ggc act act ttt tct ggg gca aca gca gga gta
41 Q G G S A V G V L G T T F S G A T A G V
181 aaa ctt tgt tca gcc gga gga cct tat gca ata gct gct tgt ggt gta ggt gga gct tta
61 K L C S A G G P Y A I A A C G V G G A L
241 tta ggt gct gga ttc agc atg tgg acc ggt gcg tct cga gca cca cca cca cca cca ctg
81 L G A G F S M W T G A S R A P P P P P P
301 ctg aga tcc ggc tgc taa
101 L R S G C -

```

B

```

1 atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg cgc ggc agc cat
1 M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H
61 atg agt gcc gtg gga gtt tta ggc act act ttt tct ggg gca aca gca gga gta aaa ctt
21 M S A V G V L G T T F S G A T A G V K L
121 tgt tca gcc gga gga cct tat gca ata gct gct tgt ggt gta ggt gga gct tta tta ggt
41 C S A G G P Y A I A A C G V G G A L L G
181 gct gga ttc agc atg tgg acc ggt gcg tct cga gca cca cca cca cca cca ctg aga tcc
61 A G F S M W T G A S R A P P P P P L R S
241 ggc tgc taa
81 G C -

```

Figura 18. Secuencia nucleotídica obtenida de los plásmidos (A) pET28a(+)-616c y (B) pET28a(+)-616i. Para ambos casos, se muestra el producto de la traducción de ambas regiones. Un recuadro verde indica el sitio de reconocimiento a Trombina. En amarillo se resaltan los sitios de reconocimiento de las enzimas NdeI y XhoI.

7.8. Producción de las bacteriocinas

Dadas las condiciones limitadas de trabajo en el laboratorio y reportes previos, se decidió únicamente realizar la comprobación de la actividad antimicrobiana del péptido codificado por el gen 616, versión completa, 616c, y sin péptido señal hipotético, 616i.

Una vez realizadas las inducciones de los cultivos que llevan los plásmidos de interés y la obtención de la fracción citosólica (FC), con la metodología descrita en el punto 6.10, se determinó la concentración de proteína contenida en estas. Después, se realizaron geles desnaturizantes de Tris-Tricina-SDS-PAGE para observar la expresión de los péptidos.

En los zimogramas de los controles, cepas sin vector y cepas con vector sin inserto (Figura 19 y 20), se observa una banda lítica con un peso aproximado de 27 kDa que

produce *E. coli* BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS, y la cual también ha sido reportada en inducciones de la primera cepa (Anzengruber *et al.*, 2014; Esquivel-López, 2019). Esquivel-López, reportó la probabilidad de que la lisis sea producida por una endopeptidasa de peptidoglicano, que consiste en 249 aminoácidos y peso aproximado a 28.7 kDa, perteneciente a la familia de las peptidasas C40 (Número de referencia NCBI WP_001301253.1). En esta familia se encuentran 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 *S. aureus*, entre otros (Serrano-Maldonado, 2019). En *E. coli* se han descrito al menos 35 peptidoglicano hidrolasas (PGHs) (van Heijenoort, 2011).

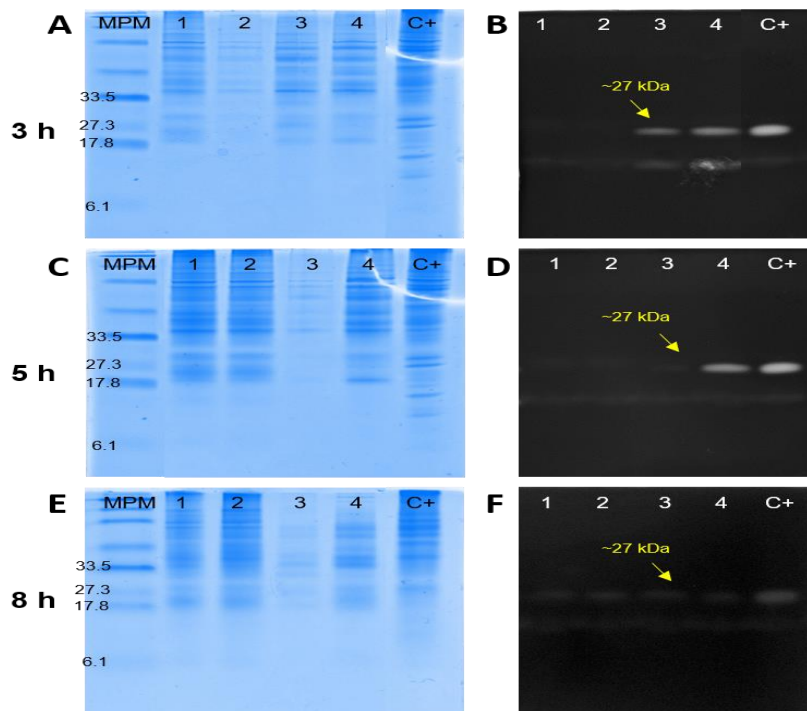


Figura 19. Perfil proteínico y actividad hidrolítica de la fracción citosólica de la cepa *E. coli* BL21(DE3) sin plásmido y con pET28a(+) sin inserto. (A, C, E) Perfil proteínico a 3 h, 5 h y 8 h de inducción; (B, D, F) Zimograma a 3 h, 5 h y 8 h de inducción. Para ambos geles: 1, BL21(DE3) sin inductor; 2, BL21(DE3) con inductor; 3, BL21(DE3)-pET28a(+) sin inductor; 4, BL21(DE3)-pET28a(+) con inductor; C+, bacteriocina QC2; MPM, marcador de peso molecular.

Por otra parte, aunque la técnica de zimografía ha sido ampliamente utilizada como el principal ensayo para determinar la funcionalidad de las enzimas peptidoglicano hidrolasas, es susceptible a resultados falsos positivos.

La técnica depende de la formación del complejo entre el azul de metileno y el peptidoglicano, interacción que parece ser electrostática, dado que el primero es una molécula orgánica de carga neta positiva y el segundo es un polímero cargado negativamente. Esta interacción de cargas es lo que permite observar en un fondo oscuro bandas translúcidas, porque ya no existe sustrato con el cual interactúa el colorante. Así mismo, si la proteína cuenta con una alta carga neta positiva (al menos +7), podría estar repeliendo el colorante por simple repulsión electrostática, resultando en una banda translúcida que podría ser interpretada como positiva. No obstante, la carga neta no es el único factor que afecta el resultado final del ensayo, este también depende de la combinación de la distribución de cargas y de la cantidad de proteína a utilizar (Escobar & Cross, 2018).

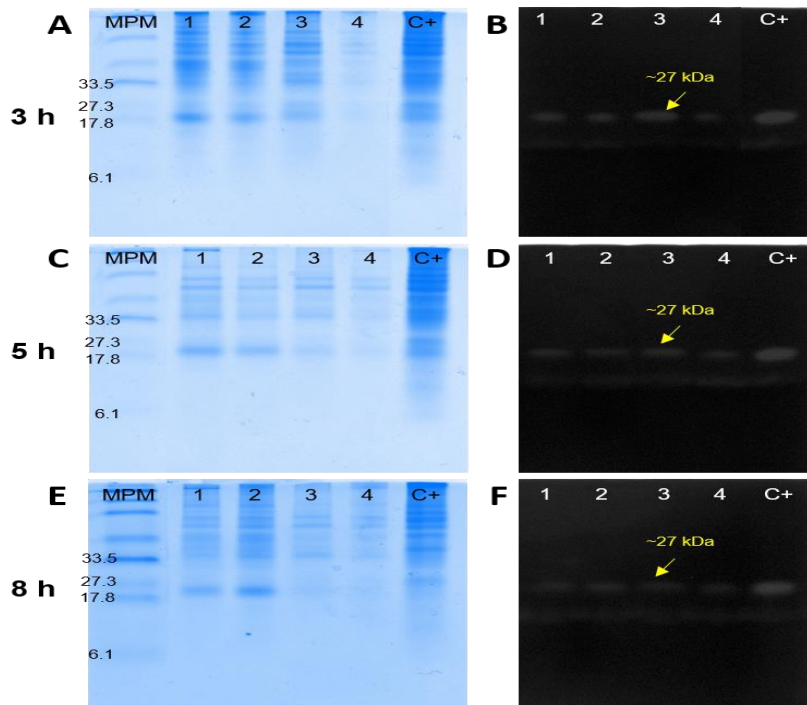


Figura 20. Perfil proteínico y actividad hidrolítica de las fracciones citosólicas obtenidas de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS sin plasmidos y con pET28a(+) sin inserto. (A, C, E) Perfil proteínico a 3, 5 y 8 h de inducción; (B, D, F) Zimograma a 3, 5 y 8 h de inducción. Para ambos geles: 1, BL21(DE3)pLysS sin inductor; 2, BL21(DE3)pLysS con inductor; 3, BL21(DE3)pLysS-pET28a(+) sin inductor; 4, BL21(DE3)pLysS-pET28a(+) con inductor. C+, bacteriocina QC2; MPM, marcador de peso molecular.

De acuerdo a lo anterior, Esquivel-López reportó la carga neta de la peptidoglicano hidrolasa encontrada en *E. coli* BL21(DE3), siendo esta de +7, por tanto, repulsión del

colorante. Sugirió la posibilidad de que pudiera ser la causante de la banda translúcida en el zimograma.

Para confirmar tales hipótesis sería necesario, en un trabajo posterior, secuenciar la banda de aproximadamente 27 kDa, y así determinar su identidad. También sería necesario realizar zimogramas control, sin proceso de renaturalización, en donde las proteínas con actividad lítica real no producen bandas translúcidas (Escobar & Cross, 2018).

Posteriormente, se analizó la expresión de las construcciones pET28a(+)-616c y pET28a(+)-616i en la cepa *E. coli* BL21(DE3) mediante la metodología descrita en el punto 6.11. Con los extractos de las fracciones citosólicas obtenidas se corrieron geles Tris-tricina SDS-PAGE. En la Figura 21 se muestran los geles de perfil proteínico, zimograma y western blot realizados para las muestras obtenidas a 3, 5 y 8 h de inducción.

Para el control positivo, bacteriocina QC2, se observa en el zimograma (Figura 21 B, E, H) una sola banda con actividad lítica con un peso mayor de 17.8 kDa. Mientras que el teórico para esta bacteriocina es de 13.8 kDa. Respecto al western blot, el anticuerpo anti-His reconoce dos proteínas, la primera es de igual tamaño que la identificada en el zimograma, mayor a 17.8 kDa, y la segunda a tamaño de 13.8 kDa. El hecho de que con las dos metodologías se identifique una banda mayor a 17.8 kDa, sugiere que la no adición de agente reductor de puentes disulfuro, así como el no sometimiento a calor, mantiene a la bacteriocina en una estructura terciaria de mayor actividad.

Respecto a las construcciones, pET28a(+)-616c y pET28a(+)-616i, en ninguno de los tiempos se observa por zimografía una banda lítica. Resultado que se repitió en el western blot, donde el anticuerpo no reconoció proteína alguna sobreexpresada con etiqueta de histidinas.

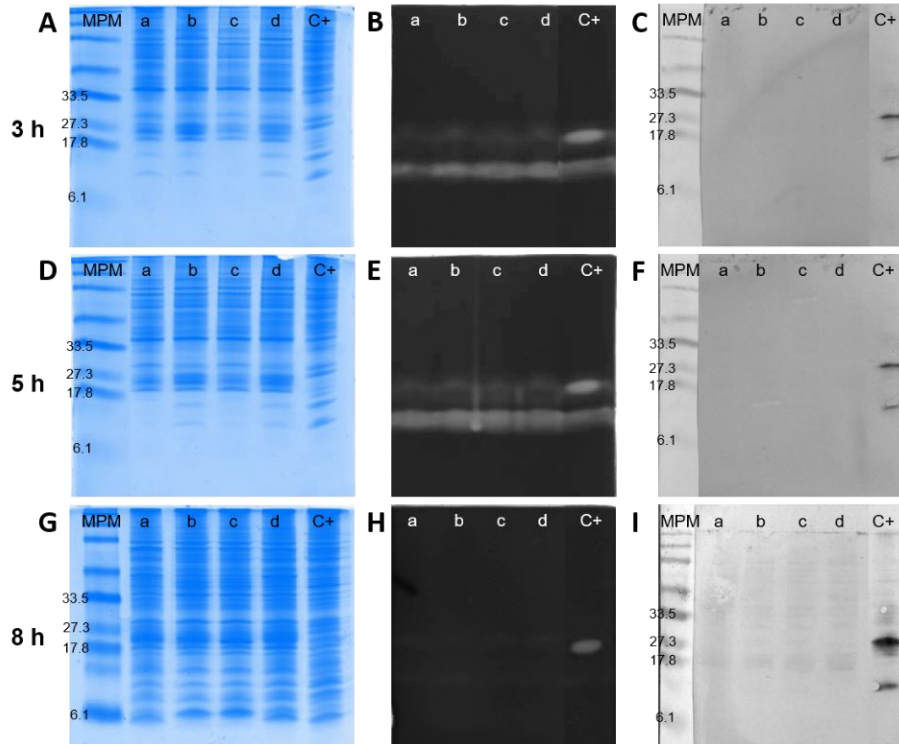


Figura 21. Evaluación de la expresión y actividad de la bacteriocina recombinante 616c y 616i en la cepa *E. coli* BL21(DE3). (A, D, G) Perfil proteínico a 3, 5 y 8 h de inducción; (B, E, H) Zimogramas a 3, 5 y 8 h de inducción; (C, F, I) Western-blot a 3, 5 y 8 h de inducción. Para las tres metodologías: a, pET28a(+)-616c sin inductor; b, pET28a(+)-616c con inductor; c, pET28a(+)-616i sin inductor; d, pET28a(+)-616i con inductor. C+, bacteriocina QC2; MPM, marcador de peso molecular.

Por otra parte, con la finalidad de comparar entre cepas de *E. coli*, se analizó la expresión de las construcciones pET28a(+)-616c y pET28a(+)-616i en la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS, en donde la síntesis de proteína recombinante está más regulada por la presencia de la lizosima de T7. Con los extractos de fracción citosólica obtenidos se corrieron geles Tris-tricina SDS-PAGE. En la Figura 22 se muestran los geles de perfil proteínico, zimograma y western blot realizados para 3, 5 y 8 h de inducción.

El resultado para el control positivo, bacteriocina QC2, fue similar al obtenido con la cepa BL21(DE3). Se observa en los zimogramas (Figura 22 B, E, H) una sola banda con actividad lítica a peso mayor de 17.8 kDa. Respecto al western blot, el anticuerpo anti-His reconoce dos proteínas, la primera es de igual tamaño que la identificada en el zimograma, mayor a 17.8 kDa, y la segunda a tamaño de 13.8 kDa.

En relación a las construcciones, pET28a(+)-616c y pET28a(+)-616i, sólo para la primera, a 5 h de inducción, se observa una banda lítica que mostró un peso diferente del teórico esperado, 10.4 kDa (Figura 22 E). Sin embargo, en el western blot no se observa ninguna proteína al tamaño de la banda lítica presente en el zimograma (Figura 22 F). Para el péptido 616i, no se observan bandas líticas a ningún tiempo de inducción (Figura 22 B, E, H) y tampoco en western blot se reconoció proteína alguna.

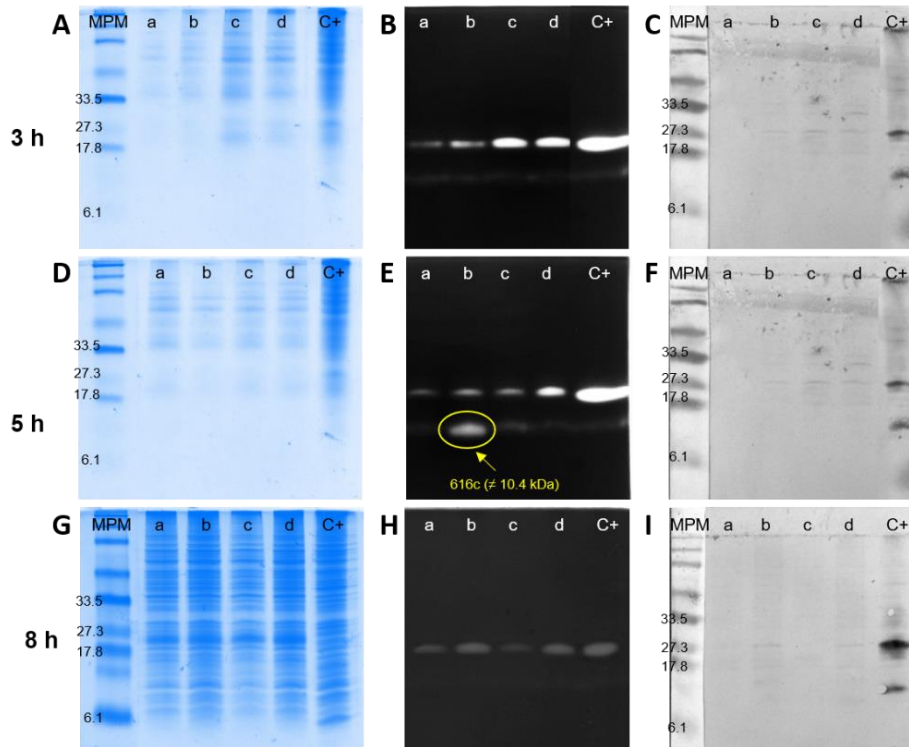


Figura 22. Evaluación de la expresión y actividad de la bacteriocina recombinante 616c y 616i en la cepa BL21(DE3)pLysS. (A, D, G) Perfil proteínico a 3, 5 y 8 h de inducción. (B, E, H) Zimograma a 3, 5 y 8 h de inducción. (C, F, I) Western-blot a 3, 5 y 8 h de inducción. Para las tres metodologías: a, pET28a(+)-616c sin inductor; b, pET28a(+)-616c con inductor; c, pET28a(+)-616i sin inductor; d, pET28a(+)-616i con inductor. C+, bacteriocina QC2; MPM, marcador de peso molecular.

Existe la posibilidad de que los péptidos se estén agregando en cuerpos de inclusión, dado que estas conformaciones se ven favorecidas por alta hidrofobicidad y son dependientes de la temperatura de inducción/expresión (Yup Lee, 2009). Sin embargo, se realizaron estudios previos de inducción a 20°C y tampoco se observó reconocimiento de la proteína (datos no reportados).

Aunque no se logró identificar la expresión de los péptidos se optó por realizar el ensayo de difusión en agar, que se ha reportado como una de las mejores técnicas para identificar actividad tipo bacteriocina.

7.9. Espectro inhibitorio de los péptidos 616c y 616i

Para corroborar la actividad tipo bacteriocina observada en el zimograma para la expresión del péptido 616c a 5 h de inducción se realizó el ensayo de difusión en agar con células de *L. monocytogenes*.

La técnica de difusión en agar es el método más utilizado para determinar la actividad de bacteriocina en donde la zona de inhibición es resultado de la supresión del crecimiento bacteriano a la concentración mínima inhibitoria o por encima de esta. El diámetro del halo de inhibición está en función del espesor del agar, la temperatura de incubación, el tamaño del pozo, el volumen inoculado, así como de la capacidad de difusión del antimicrobiano a través del agar, la susceptibilidad del microorganismo indicador y la velocidad de crecimiento de este (Lalpuria *et al.*, 2012; Oliveira de Souza *et al.*, 2018)

En la Figura 23 A, B y C, se presentan los resultados para los controles negativos de inducción en *E. coli* BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS sin y con plásmido sin inserto. Respecto a BL21(DE3), cepa sin vector y BL21(DE3)-pET28a(+) vector vacío, no presentan halos de inhibición (Figura 23 A,B y C, muestras 1, 2, 3 y 4) contrario a lo detectado por zimografía (Figura 19 B, D y F). Este resultado apoya la posibilidad de que la banda lítica observada sea producida por una péptidoglicano hidrolasa y que al realizar el ensayo de difusión en agar no se observe efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* CFQ-B103.

Sin embargo, con BL21(DE3)pLysS-pET28a(+) vector vacío, se advierten halos de inhibición a 5 y 8 h de inducción con y sin inducción de IPTG (Figura 23 B y C, muestras 7 y 8).

En las pruebas de difusión en agar para los péptidos expresados 616c y 616i en la cepa BL21(DE3), no se observan halos de inhibición (Figura 23D-F). Caso contrario se muestra para 616c y 616i en cepa BL21(DE3)pLysS, para estas se visualizan halos de inhibición a 5 y 8 h de inducción para 616c (Figura 23H, 23I), y a 8 h para 616i (Figura 23I). En

ambos péptidos, la inhibición es procedente de las fracciones citosólicas de las expresiones sin y con inducción por IPTG.

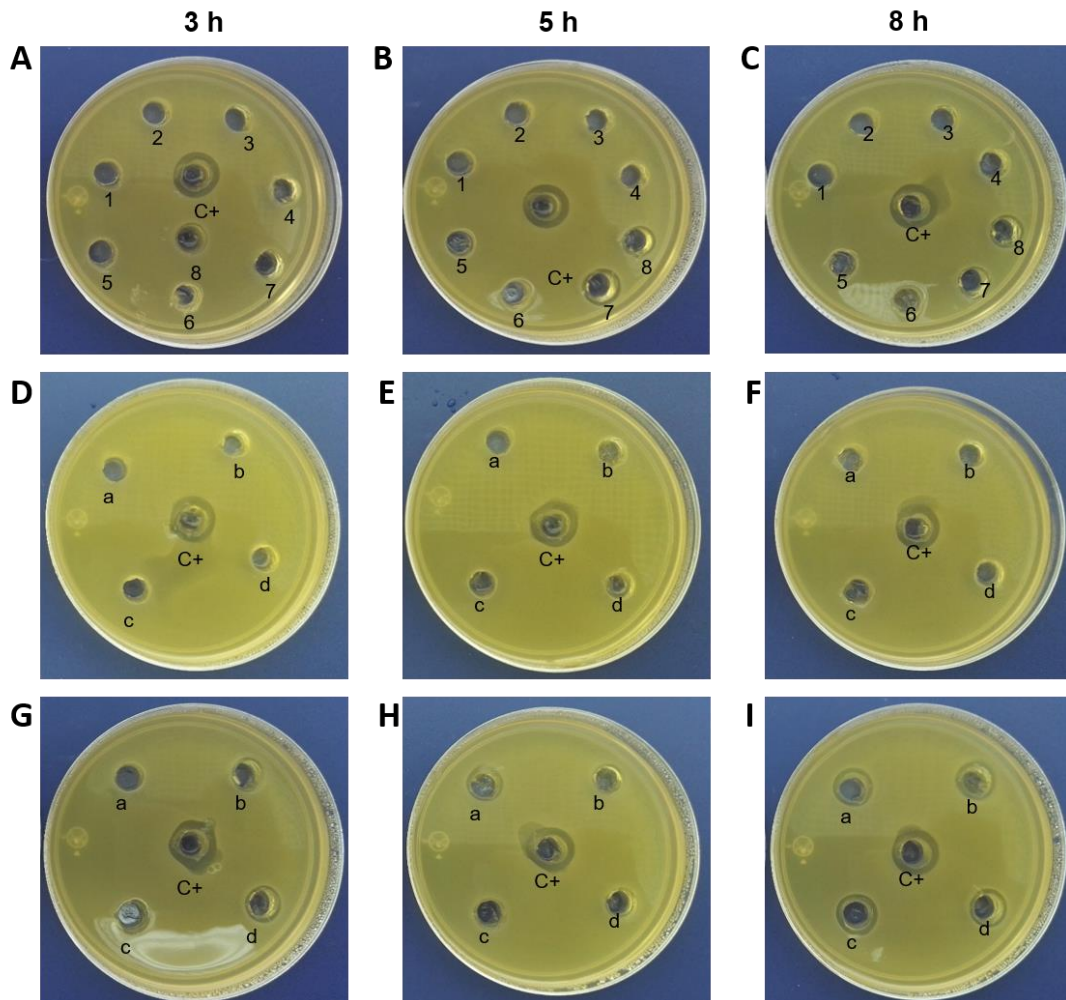


Figura 23. Difusión en agar contra *L. monocytogenes* CFQ-B-103. (A-C), controles cepas *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* BL21(DE3)pLysS; (D-I) Expresión de construcciones. 1, BL21(DE3) sin inductor; 2, BL21(DE3) con inductor; 3, BL21(DE3)-pET28a(+) sin inductor; 4, BL21(DE3)-pET28a(+) con inductor; 5, BL21(DE3)pLysS sin inductor; 6, BL21(DE3)pLysS con inductor; 7, BL21(DE3)pLysS-pET28a(+) sin inductor; 8, BL21(DE3)pLysS-pET28a(+) con inductor; a, pET28a(+)-616c sin inductor; b, pET28a(+)-616c con inductor; c, pET28a(+)-616i sin inductor; d, pET28a(+)-616i con inductor. C+, Nisaplin® (Nisina) 10 mg/mL.

Comparando la cantidad de proteína en las fracciones citosólicas del control BL21(DE3)pLysS +pET28a(+) y la de las construcciones BL21(DE3)pLysS-pET28a(+)-616c y BL21(DE3)pLysS-pET28a(+)-616i, en el control se puso mayor cantidad de proteína (Tabla 20). Para poder discernir si esto afecta los resultados sería necesario

hacer el análisis de concentración mínima inhibitoria (CMI), donde se esperaría que fuera menor para los péptidos 616c y 616i.

Tabla 20. Comparativo concentración de proteína vs diámetro halo de inhibición para cepa BL21(DE3)pLysS-pET28a(+),y construcciones pET28a(+)- 616c y pET28a(+)- 616i en BL21(DE3)pLysS

Muestra			Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Diámetro halo de inhibición (cm)
BL21(DE3)pLysS -pET28a(+)	5 h	s/IPTG	0.18	0.7
		c/IPTG	1.24	0.6
	8 h	s/IPTG	0.16	0.57
		c/IPTG	0.88	0.6
BL21(DE3)pLysS- pET28a(+)- 616c	5 h	s/IPTG	0.08	0.65
		c/IPTG	0.04	0.55
	8 h	s/IPTG	0.10	0.72
		c/IPTG	0.03	0.72
BL21(DE3)pLysS- pET28a(+)- 616i	8 h	s/IPTG	0.10	0.74
		c/IPTG	0.10	0.67

El hecho de observar halos de inhibición sin y con IPTG, estaría indicando una expresión basal de los péptidos a una cantidad mínima, pero suficiente para tener efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes*. Aunque la actividad no se observa por zimografía, ni por western-blot, esto podría deberse a la formación de cuerpos de inclusión propensos a conformarse por las propiedades hidrofóbicas de los péptidos.

Para explicar el posible mecanismo de inhibición observado en las pruebas de difusión en agar se realizó un análisis *in silico* de las estructuras de los péptidos.

En la Figura 24 se observa que el péptido 616c presenta al menos una alfa hélice próxima al extremo carboxilo (Figura 24A, C; TM-score: 0.343 ± 0.141), mientras que el péptido 616i tiene regiones en hoja beta y giros en toda su estructura (Figura 24B, D; TM-score: 0.269 ± 0.084). A pesar del arreglo molecular diferente, ambos péptidos se predicen como catiónicos e hidrofóbicos.

péptidos. Algunas de ellas son: secuenciar el péptido correspondiente a la banda lítica observada para 616c, subclonar los péptidos en algún vector con secreción a periplasma con la intención de disminuir la probabilidad de formación de agregados y/o proteólisis, así como modificar las condiciones de inducción (disminuir temperatura y concentración de inductor). Así mismo se sugiere evaluar si el péptido es tóxico para la célula, esto podría llevarse a cabo mediante la determinación de la densidad óptica, la viabilidad celular y estudios de microscopía electrónica de transmisión (Aunpad y Panbangred, 2012).

De igual modo, se propone una modificación al ensayo de difusión en agar. El uso de pre-difusión, que ha sido reportada en determinaciones de la actividad de la nisina. En este procedimiento se guardan las placas de agar a 3° C y 4° C antes de ser incubadas a temperatura óptima del microorganismo blanco, lo que incrementa la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo dando como resultado una mayor zona de inhibición y menor variabilidad (Lalpuria *et al.*, 2012). Además de la temperatura de pre-difusión, también se ha reportado que dejar más tiempo el procedimiento (aproximadamente 48 h) favorece la sensibilidad y mejora la distinción de las zonas de inhibición (Lalpuria *et al.*, 2012).

La pre-difusión tiene como fundamento el no crecimiento microbiano, mientras la molécula antimicrobiana se difunde por el agar. Como consecuencia, los microorganismos sensibles encuentran mayor concentración del antimicrobiano por célula bacteriana. Cuando no hay tiempo de pre-difusión, los microorganismos se encuentran con menores concentraciones relativas del antimicrobiano por célula bacteriana. Un mayor tiempo de pre-difusión permite que un gran volumen de antimicrobiano pueda difundir en el agar antes de que ocurra el crecimiento microbiano, cambiando la MIC de la zona de inhibición más allá del centro del pozo y dando zonas de inhibición más grandes para la misma concentración de nisina. Por tanto, aumentar el tiempo de pre-difusión resulta en ensayos con mayor sensibilidad.

8. CONCLUSIONES

- La cepa QD-2 de *E. faecium* presenta 8 genes codificantes de enterocinas, de los cuales, el 615, 616 y 718 corresponden a bacteriocinas no caracterizadas.
- De los posibles agrupamientos genómicos, sólo el de la enterocina A tiene asociados genes involucrados en la síntesis de las proteínas accesorias de inmunidad y transporte. Los demás genes se encuentran rodeados de secuencias codificantes para proteínas hipotéticas, con dominios transmembranales, siendo posible que sean proteínas de inmunidad o transporte no caracterizadas.
- Las proteínas codificadas por los genes 615 y 616 tienen propiedades fisicoquímicas características de bacteriocinas.
- La proteína 616 tiene actividad de bacteriocina contra *Listeria monocytogenes*, sin delección de péptido señal, lo que la clasificaría en la clase II.2.

9. PERSPECTIVAS

Analizar las condiciones bajo las cuales se favorece la transcripción de las bacteriocinas codificadas en el genoma de la cepa QD-2.

- Determinar si el péptido 615 muestra actividad antimicrobiana, y si tiene relación con el péptido 616.
- Evaluar diferentes condiciones de cultivo e inducción para favorecer la expresión de las bacteriocinas putativas 615 y 616 a partir de los plásmidos pET28a(+)-615 y 616.
- Secuenciar el péptido que se observó con actividad lítica.
- Una vez comprobada la actividad tipo bacteriocina de los péptidos estudiados en el presente trabajo, analizar diversos parámetros necesarios para aplicación biotecnológica como: concentración mínima inhibitoria, espectro de inhibición contra bacterias Gram positivas y negativas, pruebas de toxicidad, alergenicidad, etc.

10. BIBLIOGRAFÍA

Alzubaidy, ZM, Khthir, KO, Kamal, R (2019). Determination of some antibiotic resistance genes by polymerase chain reaction of lactic acid bacteria isolates from local dairy products. *Int J of Medical Sci.* 2(1):12-28.

Angelopoulou, A, Warda, AK, O'Connor, PM, Stockdale, SR, Shkoporov, AN, Field, D, Draper, LA, Stanton, C, Hill, C, Ross, RP (2020). Diverse bacteriocins produced by strains from the human milk microbiota. *Front Microbiol.* 11:788.

Ankaiah, D, Palanichamy, E, Antonyraj, CB, Ayyanna, R, Perumal, V, Ahamed, AIB, Arul, V (2018). Cloning, overexpression, purification of bacteriocin enterocin-B and structural analysis, interaction determination of enterocin-A, B against pathogenic bacteria and human cancer cells. *Int J Biological Macromolecules.* 116: 502-12.

Anzengruber, J, Courtin, P, Claes, I, Debreczeny, M, Hofbauer, S, Obinger, C, Capot-Chartier, MP, Vanderleyden, J, Messner, P, Schäffer, C (2014). Biochemical characterization of the major N-acetylamuramidase from *Lactobacillus buchneri*. *Microbiol.* 160:1807-1819.

Aunpad, R, Panbangred, W (2012). Evidence of two putative holin-like peptides encoding genes of *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr Microbiol* 64:343-48.

Aymerich, T, Holo, H, Håvarstein, LS, Hugas, M, Garriga, M, Nes, I (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.* 62(5): 1676-82.

Barakat, RK, Griffiths, MW, Harris, LJ (2000). Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. From cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International J Food Microbiol.* 62: 83-94.

Barbosa, J, Ferreira, V, Teixeira, P (2009). Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiol.* 26: 527-532.

Bennik, MHJ, Verheul, A, Abee, T, Naaktgeboren-Stoffels, G, Gorris, LGM, Smid, EJ (1997). Interactions of Nisin and Pediocin PA-1 with closely related Lactic Acid Bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity. *Appl Environ Microbiol.* 63:3628-3636.

Ben Omar, N, Castro, A, Lucas, R, Abrouel, H, Yousif, NMK, Franz, CMA, Holzappel, WH, Pérez-Pulido, R, Martínez-Cañero, M, Gálvez, A (2004). Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiol* 27:118-130.

Ben Said, L, Klibi, N, Dziri, R, Borgo, F, Boudabous, A, Ben Slama, K, Torres, C (2016). Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages of *Enterococcus* spp. From

vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia. *J Sci Food Agric.* 96:1627-1633.

Braïek, OB, Cremonesi, P, Morandi, S, Smaoui, S, Hani, K, Ghrairi (2018). Safety characterization and inhibition of fungi and bacteria by a novel multiple enterocin-producing *Enterococcus lactis* 4CP3 strain. *Microbial Pathogenesis.* 118:32-38.

Braïek, OB, Smaoui, S (2019). Enterococci: Between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Res Int.* 2019:1-13.

Brock, T, Davie, JM (1963). Probable identity of a group D hemolysin with a bacteriocine. *J. Bacteriol.* 708-712.

Burdychova, R Komprda, T (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol letters.* 276(2):149-155.

Campos, CA, Rodríguez, O, Calo-Mata, P, Prado, M, Barros-Velázquez, J (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food research International.* 39:356-364.

Casaus, P, Nilsen, T, Cintas, LM, Nes, IF, Hernández, PE, Holo, H (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* t136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiol.* 143:2287-94.

Chattargi, VC, Gaikwad, MA, Meti, BS, Nimonkar, YS, Dixit, K, Prakash O, Shouche, YS, Pawar, SP, Dhotre DP (2018). Comparative genome analysis reveals key genetic factors associated with probiotic property in *Enterococcus faecium* strains. *BMC Genomics.* 19:652-665.

Cintas, LM, Casaus, P, Holo, H, Hernández, PE, Nes, IF, Håvarstein, LV (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180:1988-1994.

Chen, H, Hoover, DG (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Rev in Food Science and Food Safety.* 2:82-100.

Choyam, S, Srivastava, AK, Shin, J, Kammara, R (2019). Ocins for food safety. *Front Microbiol.* 10:1-13.

Cotter, PD, Hill, C, Ross, RP (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 11:1-11.

Cotter, PD, Hill, C, Ross, RP (2005). Bacterial Lantibiotics: Strategies to improve therapeutic potential. *Curr Protein Pept. Sci.* 6:61-75.

Cotter, PD, Ross, RP, Hill, C (2013). Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 11:95-105.

Del Campo, R, Tenorio, C, Jiménez-Díaz, R, Rubio, C, Gómez-Lus, R, Baquero, F, Torres, C (2001). Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(3):905-912.

Diep, D, Skaugen, M, Salehian, A, Holoa, H, Nes, I (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci.* 104(7):2384-2389.

Domínguez-Luna, J (2019). Bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas, Usos y aplicaciones industriales potenciales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Duan, X, Yang, H, Tian, Y, Wang, R, Lui, C, Zhou, H (2019). Complete genome sequence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* HY07. *Microbiol Resour Announc.* 8(38):1-2.

El Hatmi, H, Jrad, Z, Oussaief, O, Nasri, W, Sbissi, I, Khorchani, T, Canabady-Rochelle, LLS (2018). Fermentation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) milk by *Enterococcus faecium*, *Streptococcus macedonicus* as a potential alternative of fermented cow milk. *Food Science and Technology.* 90: 373-380.

El-Jeni, R, El Bour, M, Calo-Mata, P, Böhme, K, Fernández-No, IC, Barros-Velázquez, J, Bouhaouala-Zahar, B (2015). In-vitro probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Canadian J Microbiol.* 62:60-71.

El-Jeni, R, Böhme, K, El Bour, M, Calo-Mata, P, Kefi, R, Barros-Velázquez, J, Bouhaouala-Zahar, B (2019). Rapid genus identification of selected lactic acid bacteria isolated from *Mugil cephalis* and *Oreochromis niloticus* organs using MALDI-TOF. *Annals of Microbiol.* 69:1-15.

Escamilla-Martínez, EE, Álvarez, YM, Fernández, FJ, Quirasco-Baruch, M, P-Alquicira, E (2017). Identification of structural and immunity genes of a class IIb bacteriocin encoded in the enterocin A operon of *Enterococcus faecium* strain MXVK29. *J Food Protection.* 80(11):1851-1856.

Escobar, C, Cross, T (2018). False positives in using the zymogram assay for identification of peptidoglycan hydrolases. *Anal Biochem.* 543:162-166.

Escobar-Zepeda, GA (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 Microbiol.* 57:116-127.

Esquivel-López, A (2019). Obtención de bacteriocinas a partir del metagenoma bacteriano del queso Cotija. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.

Favaro, L, Barreto, PAL, Todorov, S (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses- Application in preservation? *Trends in Food Science & Technology*, 41(1):37-48.

Fields, FR, Freed, SD, Carothers, KE, Hamid, MN, Hammers, DE, Ross, JN, Kalwajtys, VR, Gonzalez, AJ, Hildreth, AD, Friedberg, I, Lee, S (2019). Novel antimicrobial Discovery using machine learning and biophysical selection of minimal bacteriocin domains. *Drug Dev Res.* 81:43-51.

Fimland, G, Eijsink, VGH, Nissen-Meyer, J (2002). Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology.* 148(11):3661-3670.

Franz, CM, Worobo, RW, Quadri, LE, Schillinger, U, Holzappel, WH, Vederas, JC, Stiles, ME (1999). Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl Environ Microbiol.* 65(5): 2170-78.

Franz, CM, van Belkum MJ, Worobo, RW, Vederas, JC, Stiles, ME (2000). Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology* 146):621-631.

Franz, CM, van Belkum MJ, Holzappel WH, Abriouel H & Gálvez A (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev.* 31(3):293-310.

Gaaloul, N, Braïek O, Berjeaud, JM (2014). Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of enterococcus italicus GGN10 strain isolated from Tunisian bovine raw milk. *J. Food Safety.* 34(4):300-311.

Gálvez, A, Maqueda, M, Martínez-Bueno, Valdivia, E (1989). Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms. *Res Microbiol.* 140:57-68

Garnier, T, Cole, S (1988). Complete nucleotide sequence and genetic organization of the bacteriocinogenic plasmid, piP404, from *Clostridium perfringens*. *Plasmid.* 134-150.

Garnier, T, Cole, S (1988a). Studies of UV-inducible promoters from *Clostridium perfringens* in vivo and in vitro. *Mol Microbiol.* 2(5):607-614.

Geldart, K, Kaznessis Y (2017). Characterization of class IIa bacteriocin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 6(4):1-17.

Gelsomino, R, Vancanneyt, M, Cogan, TM, Condon, S, Swings, J (2002). Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiol.* 68(7):3560-3565.

Gilmore, M, Segarra, RA, Booth, MC, Bogie, CP, Hall, LR, Clewell, DB (1994). Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol.* 176(23):7335-7344.

Giraffa, G (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol.* 88(2): 215-222.

Ghrai, T, Manai, M, Berjeaud, JM, Frère, J (2004). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. *J of Applied Microbiol.* 97(3):621-628.

Guzmán-Ovalle, AU (2015). Estudio genético poblacional de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del queso Cotija artesanal madurado. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Håvarstein, LS, Diep, DB, Nes, IF (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substances concomitant with export. *Mol Microbiol.* 16(2):229-240.

Hu, C, Malaphan, W, Zendo, T, Nakayama, J, Sonomoto, K (2010). Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl Environ Microbiol.* 76(13): 4524-45.

Jack, RW, Sahl, HG (1995). Unique peptide modifications involved in the biosynthesis of lantibiotics. *Elsevier science.* 13:269-278.

Jhonsen, L, Fimland, G, Mantzilas, D, Nissen-Meyer, J (2004). Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.* 70(5): 2647-2652.

Johnson, EM, Jung, Y, Jin, Y, Jayabalan R, Yang, S, Suh, J (2017). Bacteriocins as food preservatives: challenges and emerging horizons. *Critical reviews in food science and nutrition.* 1-25.

Kadri, Spitaels F, Cnockaert, M (2015). *Enterococcus bulliens* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from camel milk. *J of Microbiol.* 10885:1257-1265.

- Kavitake, D, Kandasamy, S, Devi, PB, Shetty, PH (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods- A review. *Food science*. 21:34-44
- Khan, H, Flint, S, Yu, PL (2010). Enterocins in food preservation. *Int J Food Microbiol*. 141:1-10.
- Kuipers, A, Rinck, R, Moll, GN (2011). Genetics, biosynthesis, structure, and mode of action of lantibiotics. *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. Springer. 147-169.
- Ladjouzi, R, Lucau-Danila, A, Benachour, A, Drider, D (2020). A leaderless two-peptide bacteriocin, enterocin DD14, is involved in its own self-immunity: evidence and insights. *Front Bioeng Biotechnol*. 8:1-15.
- Lalpuria, M, Karwa, V, Anantheswaran, RC, Floros, JD (2012). Modified agar diffusion for better quantification of Nisaplin®. *J Appl Microbiol*. 114:663-671.
- Liptáková, D, Matejčková, Z, Valík, L (2017). Lactic acid bacteria and fermentation of cereals and pseudocereals. *Fermentation Process*. 223-254. InTech.
- Liu, G, Wang, Y, Li, X, Hao, X, Xu, D, Zhou, Y, Mehmood, A, Wang, C (2019). Genetic and Biochemical evidence that *Enterococcus faecalis* Gr17 produces a novel and sec-dependent bacteriocin, enterocin Gr17. *Front Microbiol*. 10:1-12.
- Mendoza-Eslava, C (2019). Evaluación de marcadores genéticos para la diferenciación de cepas de *Enterococcus* de origen alimentario. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Martín-Platero, AM, Valdivia, E, Ruíz-Rodríguez, M, Soler, JJ, Martín-Vivaldi, M, Maqueda, M, Martínez-Bueno, M (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl Environ Microbiol*. 7(6):4245-4249.
- Martinez-Bueno, M, Valdivia, E, Gálvez, A, Coyotte, J, Maqueda, M (1998). Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol*. 27(2):347.-358.
- Mercedes, MA, Manuel, MB, Eva, VM, Samir, AJ, Rubén, CC (2012). Composición para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel y mucosas. Universidad de Granada. Patente, No. 201231060.
- Mesa-Pereira, B, Rea, C, Cotter, PD, Hill, C, Ross, RP (2018). Heterologous expression of biopreservatives bacteriocins with a view to low cost production. *Front Microbiol*. 9:1-15.

- Migaw, S, Ghrairi, T, Belguesmia, Y, Choiset, Y, Berjeaud, JM, Chobert, JM, Hani, K, Haertlé, T (2013). Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Mediterranean fish viscera. *J Microbiol Biotechnol.* 30(4):1207-1217.
- Morandi, S, Silvetti, T, Brasca, M (2013) Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. *J Microbiol.* 9(3):239-249.
- Nair, PS, Surendran, PK (2005). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. *J Culture Collections.* 4:48-52.
- Nes, IF, Diep DB, Holo H (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol.* 189(4):1189-1198.
- Nes, IF, Brede, DA, Diep, DB (2013). Class II non-lantibiotic bacteriocins. En: Kasti, A.J., editor. *Handbook of biologically active peptides.* Elsevier Inc. 85-92.
- Nilsen, T, Nes, IF, Holo, H (1998). An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J Bacteriol.* 180:1848-1854
- Nilsen, T, Nes, IF, Holo, H (2003). Enterolysin A, a cell Wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol.* 69(5):2975-84
- O'keeffe, T, Hill, C, Ross, PR (1999). Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl Environ Microbiol.* 65(4): 1506-15.
- Oliveira de Souza, P, Molinari, F, Oliveira, RP (2018). Importance of the agar media in the evaluation of bacteriocin activity against the same test-microorganisms. *Braz J Pharm Sci.* 54(1):1-6.
- Olvera-García, M, Sánchez-Flores, A, Quirasco-Baruch, M (2017). Genomic and functional characterisation of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Appl Microbiol and Biotechnol.*
- Panghal, A, Janghu, S, Virkar, K, Gat, Y, Kumar, V, Chhikara, N (2017). Potential non-dairy probiotic products-a healthy approach. *Food Bioscience.* 21: 80-89.
- Parente, E, Ricciardi, A (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52:628-638.
- Pashkova, TM, Vasilchenko, AS, Khlopko, YA, Kochkina, EE, Kartashova OL, Sycheva, M (2018). Genome sequence of *Enterococcus faecium* strain ICIS 96 demonstrating intermicrobial antagonism associated with bacteriocin production. *Genome Announc.* 6(10):1-2.

Perricone, M, Arace, E, Calò, G, Sinigaglia, M (2017). Ethnic fermented foods. *Starter Cultures in Food Production*. 384-406. Wiley Blackwell.

Portilla-Vázquez, S, Rodríguez, A, Ramírez-Lepe, Mendoza-García, PG, Martínez, B (2016). Biodiversity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from regional cheeses and their contribution to milk fermentation. *Food Biotechnology*. 3839:155-72.

Serrano-Maldonado, CE (2019). Expresión de la enterocina A en una cepa de *Enterococcus faecalis* para mejorar su capacidad antibacteriana. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM.

Schägger, H, von Jagow, G (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166:368-379.

Snyder, AB & Worobo, RW (2014). Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J Sci Food Agric*. 94(1):28-44.

Sushida, H, Ishibashi, N, Zendo, T, Wilaipun, P, Leelawatcharamas, V, Nakayama, J, Sonomoto, K (2018). Evaluation of leader peptides that affect the secretory ability of a multiple bacteriocin transporter, EnkT. *J Biosci Bioeng*. 126 (1):23-23.

Todorov, SD & Holzapfel, WH (2015). Traditional cereal fermented foods as sources of functional microorganisms. *Advances in Fermented Foods and Beverages*. 123-152. Woodhead Publishing.

Treven, P, Turkova, K, Trměmié, A, Obermajer, T, Rogelj, I, Matijašić, BB (2013). Detection and quantification of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in faecal samples by targeting bacteriocin genes. *Folia Microbiol*. 58:623-30.

Tymoszevska A, Diep, D, Aleksandrak-Piekarczyk, T (2018). The subcellular loop of Man-PTS subunit IID is responsible for the sensitivity of *Lactococcus garvieae* to garvicins A, B and C. *Sci Rep*. 8:15790.

Ur Rahman, U, Khan, MI, Sohaib, M, Sahar, A, Ishaq, A (2016). Exploiting microorganisms to develop improved functional meat sausages: a review. *Foods Rev Int*. 33(2): 195-215.

Sánchez-Valenzuela, A, Benomar, N, Abriouel, H, Martínez, M, Gálvez, A (2010). Isolations and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol*. 27:955-961.

Vandera, E, Kakouri, A, Koukkou, A, Samelis, J (2019) Major ecological shifts within the dominant nonstarter lactic acid bacteria in mature Greek Graviera cheese as affected by the starter culture type. *Int J Food Microbiol*. 290: 15-26.

- Van Heijenoort, J (2011). Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75(4):636-663.
- Wang, W & Wang, H (2014). The effect of Lactic Acid Bacteria in food and feed and their impact on food safety. *Int J Food Engineering.* 10(2):203-21.
- Yamamoto, Y, Togawa, Y, Shimosaka, M, Okazaki, M (2003). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl Environ Microbiol.* 69(10):5746-5753.
- Yunita, D, Dodd, CER (2018). Microbial community dynamics of a blue-veined raw milk cheese from the United Kingdom. *J Dairy Sci.* 101(6):4923-4935.
- Yup Lee, Sang (2009). Systems Biology and Biotechnology of *Escherichia coli*. *Springer.*
- Zgomba, A, Zunabovic-Pichler, M, Kos, I, Mayrhofer S, Hulak, N, Domig, KJ, Mrkonjic, M (2018). Microbiological hazards and potential of spontaneously fermented game meat sausages: a focus on lactic acid bacteria diversity. *LWT-Food Science and Technology.* 89: 418-426.
- Zhao, X, Kuipers, OP (2016). Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of *Bacillales* species. *BMC Genomics.* 17:882
- Zommitti, M, Ferbichi, M, Sebei, K, Feuilloley MGJ, Connil, N, Boukerb AM (2020). Draft genome sequences of five potentially probiotic *Enterococcus faecium* strains isolated from an artisanal tunisian meat (dried ossban). *Microbiol Resour Announc.* 9(3):1-3
- Zorič, M, Čanžek, A, Holo, H, Nes, I, Salehian, Z, Berlec, A, Rogelj, I (2010). Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2:233-240.