



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
CEPAS DE *Enterococcus* spp. AISLADAS DE QUESO COTIJA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

CLAUDIA ALBERTO RIOS

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch



Ciudad Universitaria, Cd. Mx, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Aurora Irma Ortegón Ávila

VOCAL: Maricarmen Quirasco Baruch

SECRETARIO: Norma Angélica Camacho de la Rosa

1er. SUPLENTE: Beatriz Ruiz Villafan

2º SUPLENTE: Carolina Peña Montes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 312. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Edificio “E”. Facultad de Química. Circuito de la investigación científica. Ciudad Universitaria.

Se reconoce el apoyo recibido por el proyecto DGAPA PAPIIT IN222115: “Análisis funcional de metagenoma bacteriano e inocuidad y potencial biotecnológico del género *Enterococcus* del queso Cotija”, junto con el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ) con clave 5000-9102.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Carolina Peña Montes

SUSTENTANTE:

Claudia Alberto Rios

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico.....	3
3.1. Bacterias ácido lácticas	3
3.1.1. Principales grupos	4
3.2. Cultivos iniciadores para la industria láctea.....	5
3.3. Quesos	5
3.3.1. Microbiología de los quesos.....	6
3.4 Generalidades de los <i>Enterococcus</i> spp.	8
3.5 Importancia del género <i>Enterococcus</i> en alimentos y salud	9
3.6 Características proteolíticas y lipolíticas del género <i>Enterococcus</i>	11
3.7 Queso Cotija.....	12
3.7.1 Materias primas para la elaboración del Queso Cotija.....	14
3.7.2. Proceso de elaboración.....	14
3.7.3. Composición proximal	15
3.8 Actividades metabólicas importantes para la maduración del Queso	16
3.8.1 Lípidos y lipólisis	17
3.8.2 Proteínas de la leche y proteólisis	18
4. Antecedentes del grupo de trabajo	22
4.1 <i>Enterococcus</i> spp. aislados del queso Cotija.....	22
4.2 Contenido de grasa del Queso Cotija	23
4.3 Contenido proteínico en el Queso Cotija	24
5. Justificación.....	25
6. Hipótesis.....	25
7. Objetivos	25
General	25
Particulares.....	25
8. Metodología	26
8.1 Diseño experimental.....	26
8.2 Bacterias en estudio.....	27
8.3 Reactivación de cepas	28
8.4 Determinación de curvas de crecimiento	28

8.5 Siembra de cepas en AT y ALD.....	28
8.6 Crecimiento de cepas (cultivo).....	28
8.7 Concentración de sobrenadante por ultrafiltración	29
8.8 Determinación de la concentración de proteína (Método de Bradford)	29
8.9 Difusión en AT y ALD.....	30
8.10 Determinación de actividad cualitativa con α -NA	31
8.11 Preparación de geles de poliacrilamida y zimogramas	32
8.12 Determinación de actividad cuantitativa con ésteres de <i>p</i> -nitrofenilo.....	33
8.13 Perfil electroforético de hidrólisis de caseína.....	34
8.14 Determinación de actividad cuantitativa con azocaseína	34
9. Resultados y discusión	36
9.1. Determinación de curvas de crecimiento	36
9.2. Determinación de actividad esterasa	40
9.2.1 Estría radial en placas de medio AT.....	40
9.2.2 Difusión AT.....	42
9.2.3 Prueba con α -naftil acetato.....	44
9.2.4 Perfil electroforético e identificación de bandas con actividad.....	44
9.2.5 Prueba cuantitativa con ésteres de <i>p</i> -nitrofenilo.....	46
9.3 Determinación de actividad proteolítica.....	52
9.3.1 Estría radial en placas de medio ALD.....	52
9.3.2 Difusión en ALD.....	53
9.3.3 Hidrólisis de caseína y perfil electroforético.....	55
9.3.4 Prueba cuantitativa de hidrólisis de Azocaseína	57
10. Conclusiones	58
11. Perspectivas.....	59
Anexos.....	60
Bibliografía	95

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Aw	Actividad de agua
AT	Agar Tributirina
ALD	Agar Leche Descremada
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BSA	Albumina Sérica Bovina
MRS	Man Rogosa Sharpe
PAGE	Gel de Electroforesis de poliacrilamida
pH	Potencial de Hidrógeno
<i>p</i>-NA	Acetato de <i>p</i> - nitrofenilo
<i>p</i>-NB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo
<i>p</i>-NDe	Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo
<i>p</i>-NDo	Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo
<i>p</i>-NP	Palmitato de <i>p</i> -nitrofenilo
α-NA	Acetato de α -naftilo

1. Resumen

A partir de siete cepas de *Enterococcus* spp. previamente aisladas de queso Cotija artesanal madurado se evaluaron dos diferentes tipos de actividades enzimáticas: esterasa y proteasa.

Para la evaluación de actividad esterasa de ácidos carboxílicos se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas, para las cualitativas se llevó a cabo la reacción en microplaca con alfa naftil acetato como sustrato, difusión en agar usando como sustrato tributirina y zimografía revelando con alfa naftil acetato. Mientras que para la evaluación cuantitativa se realizaron reacciones de especificidad de sustrato con ésteres de *p*-nitrofenilo de diferentes longitudes de cadena.

Para la evaluación de actividad proteolítica cualitativas se realizaron pruebas de difusión en agar usando como sustrato leche descremada y un perfil electroforético de hidrólisis de caseína. Y para la evaluación cuantitativa se realizó una reacción de hidrólisis usando como sustrato azocaseína.

Las cepas analizadas presentaron actividad de esterasa de ácidos carboxílicos preferentemente a los de cadena corta, de igual forma presentaron actividad proteolítica al hidrolizar la caseína.

2. Introducción

El queso Cotija artesanal es un queso mexicano genuino, con una tradición de más de 400 años, elaborado con leche cruda de vaca y producido estacionalmente en la región geográfica que abarca la zona montañosa entre los estados de Jalisco y Michoacán (sierra de Jalmich). Los productores artesanales se unieron para ofrecer un producto de buena calidad y es así como lograron que actualmente el queso Cotija artesanal cuente con una marca colectiva sustentada en una indicación geográfica denominada “Cotija región de origen”. Es de gran importancia ya que ha ganado fama debido a que es reconocido internacionalmente por su sabor y calidad (queso Cotija región de origen, ganador del premio internacional como mejor queso extranjero en el certamen celebrado en Cremona, Italia, en el año 2006 (López y Ramos, 1992). Se entiende por queso genuino aquél que se elabora a partir de leche fluida con el empleo mínimo de aditivos, que no incluye grasa vegetal, ni derivados proteínicos, ni almidones o extensores (Cervantes, *et al.* 2008). Su particularidad es que al ser un producto elaborado a partir de leche cruda de vaca, su maduración ocurre mediante la interacción de la microbiota natural del producto que cambia libremente en un tiempo mínimo de tres meses, en el que se ven modificados factores fisicoquímicos como pH, acidez (por el crecimiento de bacterias ácido lácticas) y la actividad acuosa (la cual disminuye por la pérdida de humedad) (Casillas, 2013).

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de las actividades enzimáticas de esterasa y proteasa de cepas de *Enterococcus spp* aisladas del queso Cotija artesanal madurado con la finalidad de evaluar su potencial biotecnológico.

Se sabe que los enterococos forman una parte importante dentro de la microbiota intestinal endógena de los seres humano y animales y se cree que tienen un papel clave en el equilibrio de la misma. Por otro lado las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) participan en la fermentación natural de diversos alimentos como queso, salchichas y aceitunas.

Dichos resultados podrían indicar la participación de dichas cepas en la maduración del queso Cotija artesanal a través de la formación de compuestos que confieren sabor y aroma al producto final (Izquierdo *et al.*, 2008; Franz *et al.*, 2003).

3. Marco Teórico

3.1. Bacterias ácido lácticas

Las BAL se definen como cocos o bacilos Gram (+), no esporulados, catalasa negativos, anaerobios facultativos que producen ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos vía Embden-Meyer –glucólisis- (homofermentación, ver figura 1) y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6-fosfogluconico (heterofermentación, ver figura 2) (Lyhs, 2002; Larpent, 1995). En términos generales estas bacterias tienen necesidades complejas de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones del porque abundan en un medio tan rico nutricionalmente como la leche. A nivel de laboratorio se deben emplear medios selectivos que posean estas características para su aislamiento (por ej., el MRS, Man Rogosa Sharpe). Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia al pH ácido, pH 5, incluso a veces menores (pudiendo inhibir levaduras, mohos y algunas bacterias).

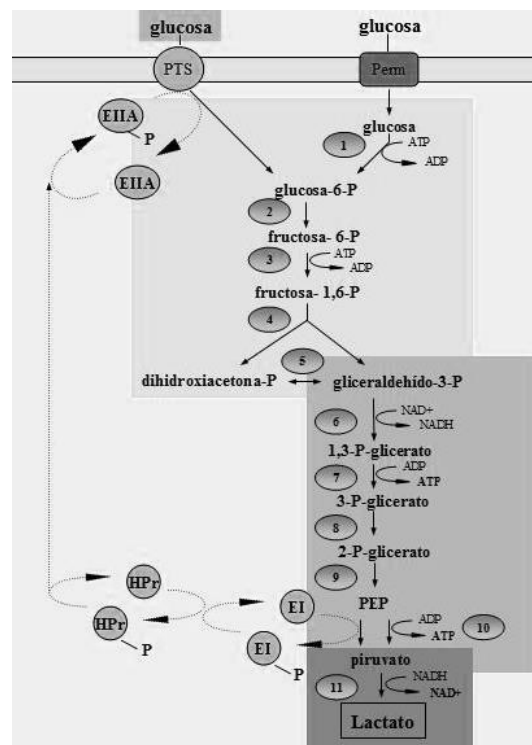


Figura 1. Fermentación láctica homofermentativa (Adaptada de Brock & Madigan, 1991; Nelson & Cox, 2001).

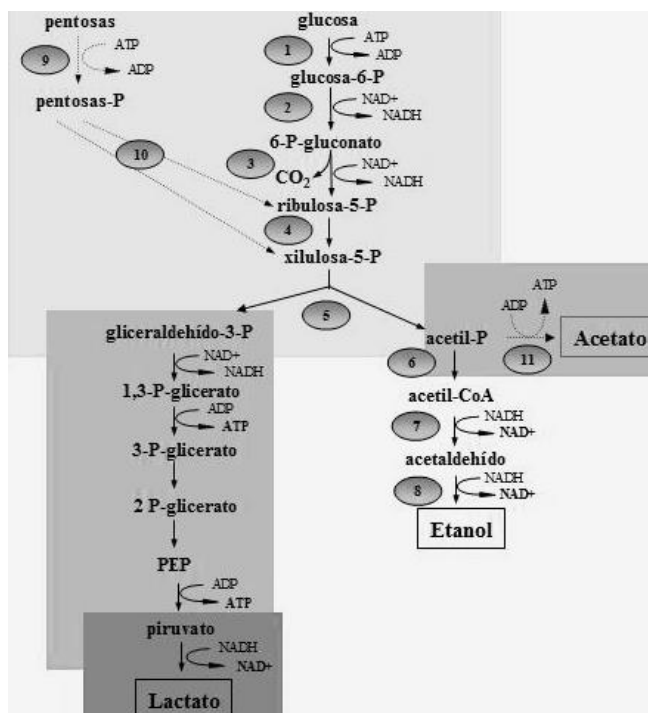


Figura 2. Fermentación láctica heterofermentativa (Adaptada de Brock & Madigan, 1991; Nelson & Cox, 2001).

3.1.1. Principales grupos

Las BAL de importancia en la industria de alimentos pertenecen a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* (Lyhs, 2002; Leisner *et al*, 2000; Stiles y Holzapfel, 1997).

Dentro del grupo de las bacterias ácido-lácticas homofermentativas encontramos algunas especies de *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, y de las heterofermentativas algunas especies de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* y *Leuconostoc cremoris* (Larpent, 1995).

3.2. Cultivos iniciadores para la industria láctea

La industria láctea durante siglos ha aprovechado la utilidad de distintos grupos de microorganismos (bacterias, mohos, levaduras) para la obtención de diversos subproductos fermentados, como prueba de ello encontramos entre otros a los quesos, yogures y mezclas de leches y granos fermentados.

Los microorganismos que normalmente aparecen en los quesos se han dividido en dos grandes grupos: cultivos iniciadores y cultivos no iniciadores (Beresfort *et al.*, 2001). Los cultivos iniciadores intervienen fundamentalmente en la producción de ácido láctico durante la primera etapa de fabricación, la coagulación de la leche y pudiendo formar parte en la maduración del mismo en forma secundaria. Estos pueden presentarse de manera natural o ser añadidos de manera intencional. Los cultivos no iniciadores son microorganismos que no van a intervenir en la acidificación (al menos de forma directa), pero van a desempeñar un papel muy importante durante la maduración del queso (Martín, 2008).

La principal aplicación de las BAL como cultivos iniciadores en la industria láctea ha sido para la obtención de yogurt y diversos quesos madurados.

3.3. Quesos

Para la obtención de quesos debe lograrse la coagulación de la caseína, para tal fin se emplea de forma normal la adición de cuajo natural (renina) o de otras proteasas fúngicas (enzimas), obteniendo de esta forma una cuajada húmeda, gelatinosa, muy impermeable, que se desuera ya sea por calentamiento (queso de pasta cocida), por prensado (quesos de pasta prensada) o cortándola. En algunas ocasiones suele usarse a las BAL como cultivos iniciadores o el ácido láctico producido por éstas, lo que da lugar a una cuajada frágil, compacta, muy friable, permeable y de la que se separa fácilmente el suero. Dentro de las muchas formas de clasificación de los quesos como: frescos, curados, semi-curados, de pasta blanda, pasta prensada no cocida o semi-cocida, pasta azul, entre otros. Varias BAL pueden intervenir en su elaboración.

Las BAL son de gran importancia en la manufacturación, maduración y propiedades organolépticas de los quesos:

- La fermentación de los azúcares lleva a un descenso de pH, importante en el fenómeno de la coagulación y en la reducción o prevención del crecimiento de microbiota acompañante.
- Participan en la hidrólisis de las proteínas, contribuyendo a la textura y sabor final de diferentes productos fermentados.
- Sintetizan compuestos que dan sabor y aroma, como ácidos orgánicos, acetaldehído, diacetilo, acetoína, entre otros.
- Pueden sintetizar agentes texturizantes como: polisacáridos los cuales aportan consistencia al producto.
- Producen componentes inhibitorios de otros microorganismos (Salminen *et al*, 2004).

3.3.1. Microbiología de los quesos

Entre los microorganismos que con más frecuencia se aíslan de derivados lácteos, destacan los lactobacilos y los lactococos. Ambos tienen una gran capacidad acidificante y muchas especies son proteolíticas. Además, en los quesos elaborados en la cuenca europea Mediterránea, también es frecuente aislar enterococos, sobre todo en aquellos que han sido elaborados con leche cruda. A continuación se describirán las características diferenciales de algunos géneros de BAL que participan en la elaboración de productos lácteos.

Lactobacillus spp

Dentro de las bacterias lácticas, el grupo *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo, incluyendo especies con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes. Son bacilos o cocobacilos no esporulados, aerotolerantes o anaeróbicos, acidúricos o acidófilos, con requerimientos nutricionales complejos. Incluyen especies homofermentativas obligadas. Ocasionalmente forman pigmentos; amarillo, rosa o rojo ladrillo. Los límites de temperatura donde se desarrollan van de 2-53 °C con óptima de 30-40 °C. Están presentes en productos lácteos, cárnicos, de pescadería, agua, frutas y verduras.

En los quesos algunas especies de lactobacilos como *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii* forman parte de algunos cultivos iniciadores industriales contribuyendo a la acidificación y a la proteólisis (Feria, 2007; Castellano *et al.*, 2008).

Lactococcus spp

Este género está formado por varias especies, de las cuales las más importantes en alimentos son: *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subesp. *hordniae*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus plantarum* y *Lactococcus raffinolactis* (Prescott, 1999). Son típicamente esféricas u ovoides y se agrupan en pares o en cadenas cortas. No forman esporas y no son móviles. Tienen la capacidad de crecer a 10-45°C, en pH óptimo de 6.0-6.5, que son las características más importantes usadas para su identificación. A temperaturas entre 20 y 30°C, los lactococos se toman de 10 a 20 horas para fermentar la leche cruda. Los lactococos son los microorganismos mesofílicos homofermentativos más usados para la producción de ácido en las fermentaciones lácteas, ya que son capaces de convertir rápidamente la lactosa en ácido láctico.

Entre las especies de lactococos, se encuentra, *Lactococcus lactis*, que es utilizado en la fermentación de productos lácteos, destacándose, como las más importantes, las subespecies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* es una bacteria con propiedades bioconservadoras, ya que algunas cepas son capaces de producir nisina, una bacteriocina ampliamente usada en la industria y generalmente reconocida como segura por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) (Martin, 2008; Parra, 2010).

Numerosos estudios han sido publicados reportando la eficacia de la nisina para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, entre ellas *Listeria monocytogenes* y *Clostridium spp*; sin embargo, son escasos los que demuestran la efectividad sobre *Staphylococcus aureus* (Rodríguez *et al.*, 2005; Valbuena *et al.*, 2005; Felis *et al.*, 2009).

Streptococcus sp

El género *Streptococcus* es un grupo heterogéneo de bacterias gram positivos con gran significado para la medicina y la industria, son esenciales en procesos de productos lácteos y como indicadores de contaminación de origen fecal (Harrington *et al.*, 2002).

La mayoría de las especies de *Streptococcus* son anaerobios facultativos y algunos crecen únicamente en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono. Sus exigencias nutricionales son complejas, y su aislamiento requiere el uso de medios enriquecidos con sangre o suero. Son capaces de fermentar carbohidratos produciendo ácido láctico y también son catalasa negativo (Patrick *et al.*, 2009).

Son cocos esféricos u ovoides, típicamente dispuestos en cadenas hasta con más de 50 células o en pares. La especie *Streptococcus thermophilus* es termófilo con cepas específicas que se utilizan en la fermentación de productos lácteos, sobretodo en combinación simbiótica con otras BAL. *Lb delbruecki sp.* estimula al estreptococo liberando aminoácidos mientras que éste forma compuestos relacionados con el ácido fórmico, que promueve el desarrollo del lactobacilo (Ryan y Ray, 2004; Hardie y Whiley, 2006; Martin, 2008).

Streptococcus thermophilus es una bacteria homofermentativa termorresistente, presenta la habilidad de fermentar un pequeño número de carbohidratos, crece a un pH óptimo de 6.5 soporta una concentración máxima de NaCl 2.5%, posee actividad proteolítica limitada, produce ácido láctico como principal producto de la fermentación, tiene menor poder de acidificación que el género *Lactobacillus* y ha sido usado tradicionalmente para la fabricación de yogurt y de varios quesos, como, por ejemplo el queso Emmental, Gruyere, Grana, Mozzarella y Cheddar (Hassan *et al.*, 2001).

3.4 Generalidades de los *Enterococcus spp.*

Son cocos Gram positivo, anaerobios facultativos, quimiorganototrofos, no esporulados, generalmente no móviles, no formadores de pigmentos, catalasa, reductasa y oxidasa negativo, no son capaces de reducir los nitratos y tienen la capacidad de producir ácido láctico por fermentación de azúcares como glucosa (Giraffa, 2003).

Se pueden distinguir de otros cocos Gram positivo, catalasa negativo, homofermentativos, como los estreptococos y lactococos por su capacidad de crecer a 10° y 45° C, con 6.5 % de NaCl, en presencia de 40 % de bilis, en un rango de pH entre 4 y 9.6, capacidad de hidrolizar esculina y crecer en presencia de azida de sodio (Giraffa, 2003; Franz *et al.*, 2003).

Tienen un metabolismo biosintético limitado por lo que requieren medios de cultivo ricos en aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. En la clasificación de BAL por su capacidad de fermentación de azúcares, los enterococos son clasificados dentro del grupo III, junto con pediococos, estreptococos, tetragenococos, algunos lactobacilos y vagococos. Estos microorganismos se caracterizan por ser estrictamente homofermentativos ya que poseen la enzima fructosa-1,6-difosfatoaldosa, mediante la cual hacen uso de la glicólisis para la fermentación de hexosas. Los enterococos son homofermentativos con respecto a las hexosas y heterofermentativos para las pentosas y algunos otros sustratos y, por tanto son llamados heterofermentativos facultativos (Salminen *et al.*, 2004).

3.5 Importancia del género *Enterococcus* en alimentos y salud

En la actualidad no existe un consenso sobre la cantidad de enterococos permitido en los alimentos y la posible patogenicidad de las diferentes especies del género sigue en estudio. El género de *Enterococcus* incluye más de 20 especies, con *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus durans* como las especies más frecuentemente encontradas en alimentos (Giraffa, 2003).

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios en los que se concluye que los enterococos tienen un papel importante en la maduración de quesos tradicionales elaborados a partir de leche de oveja, vaca y cabra, y una contribución al desarrollo del sabor y aroma característicos de dichos quesos (www.enpresa.ehu.es). Se atribuye a su gran capacidad para sobrevivir y resistir ambientes desfavorables, así como a las fuentes de contaminación ambientales que hacen posible la colonización de alimentos crudos, tal es el caso de la leche y carne y su multiplicación en esos productos durante la fermentación.

Mientras otros estudios demuestran que su resistencia térmica (62.8 ° C por 30 min) explica su presencia en alimentos lácteos producidos a partir de leche pasteurizada (Giraffa, 2003). La presencia de enterococos en quesos tradicionales puede ser deseable ya que en algunos estudios indican que cepas de este género pueden tener un efecto positivo en la producción y maduración de algunos quesos como: Manchego, Armada, Cebreiro, Picante, Majoero, Feta, Teleme, Mozzarella, Monte Veronese, Fontina, Caprino, Serra, Venaco y Cómte ya que contribuyen a la maduración y desarrollo de características organolépticas deseables, tales como el aroma y sabor, debido a la producción de ácido láctico y de metabolitos obtenidos de la actividad proteolítica y lipolítica como aminoácidos libres, acetaldehído, diacetilo y acetoína. Además de su contribución en el desarrollo de características organolépticas, los enterococos pueden desempeñar un papel antagonista en contra de bacterias patógenas. Se ha reportado que *E. faecalis* y *E. faecium* son capaces de producir una variedad de bacteriocinas, llamadas enterocinas, éstas tienen como blanco de acción principal la membrana citoplasmática 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 (Cleveland *et al.*, 2001). Se ha reportado que las enterocinas tienen actividad contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Vibrio cholerae* (Giraffa, 1995; Franz *et al.*, 1996; Maisnier-Patinet *et al.*, 1996; Nunez *et al.*, 1997; Simonetta *et al.*, 1997; Ennahar *et al.*, 1998; Laukova y Czikkova, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2002).

En algunos países de Europa los enterococos son utilizados como probióticos (Franz *et al.*, 1999; 2003). La mayoría de los cultivos probióticos son de origen intestinal y pertenecen al grupo de las BAL y *Bifidobacterium*; por ejemplo cepas de *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. thermophilus*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *P. acidilactici* se han utilizado como probióticos (Fuller, 1989; O'Sullivan *et al.*, 1992; Holzapfel *et al.*, 1998).

Otro uso de cepas de enterococos como probiótico, es el cultivo Causido® que está integrado por cepas de *S. thermophilus* y *E. faecium*, se le atribuye un efecto hipocolesterolémico a corto plazo (Agerholm-Larsen *et al.*, 2000). Así mismo, se utilizó la cepa *E. faecium* PR88 probiótica, como un cultivo adjunto en el queso Cheddar. En comparación con el control, el queso que contenía la cepa PR88, aumentó la proteólisis y se percibieron mayores niveles

de compuestos volátiles. La cepa mantuvo la viabilidad en queso Cheddar durante 9-15 meses de maduración a 8 °C (Gardiner *et al.*, 1999).

Contrario a otras bacterias ácido lácticas, no se consideran GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) ya que se asocian con condiciones antihigiénicas en la producción de alimentos y son utilizados como un indicador microbiológico de contaminación en alimentos y agua.

Por otro lado, los enterococos se han convertido en agentes principales de las infecciones adquiridas en los hospitales, por tal motivo se está examinando la biología de los enterococos con el objetivo de tener nuevas estrategias terapéuticas (Shankar *et al.*, 2004).

Por formar parte de la microbiota intestinal, los enterococos son capaces de producir infecciones en pacientes hospitalizados, y se pensaba que la mayoría de las infecciones causadas por estos agentes eran endógenas; sin embargo la mayoría de estas ocurren en pacientes bajo tratamiento con diálisis peritoneal o hemodiálisis, en los cuales el agente es exógeno, ya que las cepas se encuentran en el ambiente o en manos de personal. Los enterococos poseen una variedad de mecanismos de resistencia adquiridos, la mayoría de los cuales están mediados por genes codificados en plásmidos o transposones (Brogden, 2000).

3.6 Características proteolíticas y lipolíticas del género *Enterococcus*

Algunos autores reportaron actividad proteolítica relevante dentro de *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. durans* de cepas aisladas de diferentes quesos, sin embargo sus actividades fueron generalmente bajas (Giraffa, 2003).

En un estudio donde se evaluó la actividad proteolítica y la capacidad para hidrolizar proteínas de la leche de *E. faecalis* FT132 y *L. paracasei* FT700, ambas cepas aisladas de productos lácteos brasileños, mediante la inoculación de *E. faecalis* FT132 y *L. paracasei* FT700 en leche descremada analizadas mediante SDS-PAGE, tal como se presenta en la figura 3, *E. faecalis* FT132 presentó una mayor actividad proteolítica en comparación con *L. paracasei* FT700, especialmente en α -caseína, β -caseína y β -lactoglobulina (Tulini *et al.* 2015).

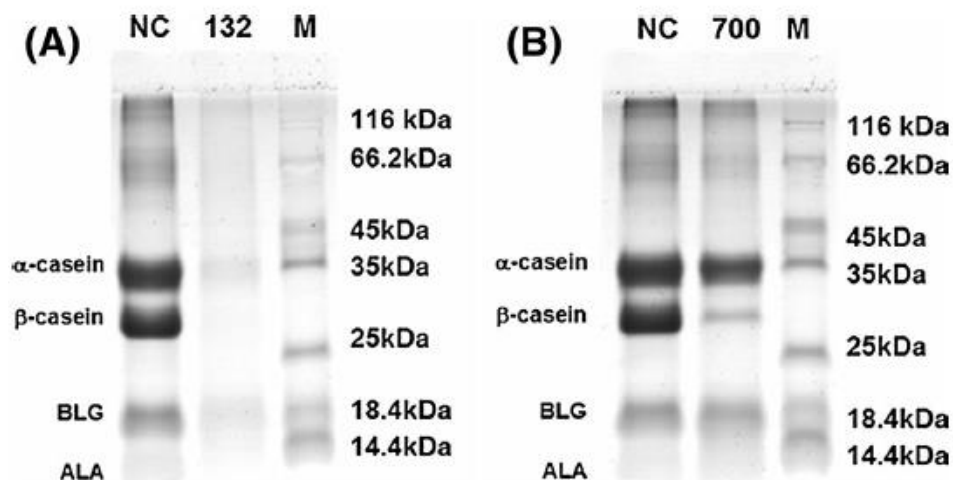


Figura 3. Gel SDS-PAGE para detección de actividades proteolíticas de *E. faecales* FT132 (A) y *L. paracasei* FT700 (B) en la leche descremada. Control negativo (NC): leche descremada, Marcador de peso molecular (M), BLG β -lactoglobulina, ALA α -lactalbúmina (Tulini *et al.* 2015).

En cuanto a su actividad lipolítica fue reportado *E. faecalis* en menor medida, *E. faecium*, y *E. durans* siendo el que presente mayor actividad. (Giraffa, 2003).

3.7 Queso Cotija

El queso Cotija es un derivado lácteo que se elabora artesanalmente en México, a partir de leche bronca de vaca, cuajo y sal como materias primas. El queso Cotija (figura 4) se clasifica como un queso madurado que posee una pasta friable (desmoronable), ácida y con un porcentaje alto de sal; cuando está maduro, presenta un color amarillento agradable y un sabor-aroma bastante pronunciado (Villegas, 2004) es de gran formato, con un peso que oscila de los 20-30 kg y dimensiones de 40 cm de diámetro por 18 cm de altura, en promedio (Álvarez *et al.*, 2005), (NMX-F-735-COFOCALEC-2011).



Figura 4. Pieza de queso Cotija artesanal madurado Región de origen.

Es originario de la región aledaña a Cotija de la Paz en el estado de Michoacán y actualmente el producto autentico sólo es elaborado por un grupo de habitantes de las sierras de los estados de Jalisco y Michoacán, la sierra de Jalmich (ARPQC, 2005).

El queso Cotija artesanal es el único queso mexicano que cuenta con una marca colectiva sustentada en una indicación geográfica, denominada “Cotija Región de Origen”. A lo largo del tiempo el producto ha adquirido un prestigio, y por ello es necesario diferenciarlo de otros similares.

La leche que se utiliza para la elaboración de este queso proviene de ganado de doble propósito, producida en la zona geográfica, durante la temporada de lluvias (julio a octubre) y obtenida del día en un solo ordeño. El ganado se alimenta en sistema de libre pastoreo, únicamente con la vegetación natural de la región. Las vacas utilizadas, principalmente cruza con raza cebú, producen leche con un mínimo de 3.7% de grasa y 3% de proteína. La leche no debe contener residuos de antibióticos, hormonas, desparasitantes, neutralizantes, entre otros. Los únicos ingredientes permitidos para la elaboración del queso son la leche, el cuajo (que debe ser de origen animal) y sal de grano artesanal proveniente de Colima (Álvarez *et al.*, 2005). El producto se madura en la misma zona de producción por un tiempo mínimo de tres meses.

3.7.1 Materias primas para la elaboración del Queso Cotija

Leche

La principal materia prima para la elaboración del queso es la leche, esta debe ser producida por ganado sano, la calidad de la leche debe tener un mínimo de 3.7 % (p/p) de sólidos grasos y 3.0 % (p/p) de proteína.

Toda la leche utilizada para la elaboración debe ser fresca (recién ordeñada del día) y provenir de las vacas ordeñadas durante los meses de lluvia (junio a noviembre).

Cuajo

El cuajo utilizado puede ser natural. Elaborado higiénicamente por los mismos productores de queso, a partir de cuajo de rumiantes jóvenes, o bien puede utilizarse cuajo comercial cuya composición corresponda a la mezcla enzimática proveniente del extracto enzimático del estómago de rumiantes.

Sal

La sal empleada debe ser sal de grano artesanal proveniente de Colima libre de materia extraña y compuestos químicos, obtenida mediante proceso artesanal, esto con el fin de que tenga la consistencia necesaria para su incorporación durante el salado (Álvarez *et al.*, 2005).

3.7.2. Proceso de elaboración

El proceso de manufactura del queso se resume a continuación: la leche se filtra a través de un lienzo limpio y se deja reposar en un recipiente, en el cual se adiciona el cuajo, se mezcla y se deja quieta hasta obtener la cuajada. Ésta se corta en un tamaño aprox. de 1cm y se espera hasta que el suero se separe. La cuajada libre de suero se pasa a una mesa de trabajo de acero inoxidable y se mezcla manualmente con la sal. Esta operación y otros factores, como el prensado, son fundamentales para determinar la textura final del producto. La cuajada salada y amasada se vacía al molde (forado en su interior con dos mantas de ixtle o algodón) y se envuelve para darle la forma cilíndrica e imprimir la marca o dibujo característico de la

corteza. La pasta fajada se prensa de 18 a 24 h. A partir de este momento comienza la maduración de cada pieza de queso. La pieza se mantiene fajada para que no pierda la forma durante al menos 15 días, en los que diariamente se voltea y limpia su superficie, hasta que esté firme y pueda ser manipulada. Entonces se desfaja y se continúa volteándolo durante al menos tres meses. Este proceso de maduración debe realizarse en la misma zona geográfica, en un lugar limpio destinado para tal efecto. Las condiciones higiénicas deben mantenerse en todo momento, además de una temperatura $< 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de 80 a 95 %. Durante la maduración el queso debe estar protegido del sol y de cualquier agente contaminante o materia extraña se debe limpiar su superficie manualmente con un lienzo limpio, volteando la pieza para favorecer la pérdida de humedad de manera uniforme y la adecuada formación de la corteza. Estas operaciones se realizan al menos cada tercer día. La corteza es característica del producto y se retira previo al consumo (Álvarez *et al*, 2005), (NMX-F-735-COFOCALEC-2011).

3.7.3. Composición proximal

En la tabla 1 con base a las reglas de uso del queso Cotija Región de Origen se muestran los parámetros establecidos respecto a la composición proximal.

Tabla 1. Composición proximal del queso Cotija (Álvarez et al, 2005).

Humedad máxima	36%
Grasa mínima	23%
Proteína mínima	25%

Características fisicoquímicas

Previamente en el grupo de trabajo se ha estudiado la composición y características fisicoquímicas del queso Cotija (Hernández Briones, 2007), en la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de dicho estudio respecto a las características fisicoquímicas.

Tabla 2. Características fisicoquímicas del queso Cotija.

Aw	Máximo 0.90
Ácido láctico	4.8 - 5.2
pH	0.20 - 0.32 %
Cloruros	4.7 – 7.2 %

3.8 Actividades metabólicas importantes para la maduración del Queso

Las características únicas de cada queso se desarrollan durante la maduración del mismo y son resultado diferentes reacciones bioquímicas. Los cambios que ocurren durante la maduración son: aroma, sabor y textura del queso madurado están determinados por el proceso de manufactura, es decir, por la composición o especialmente por la humedad, contenido de NaCl y pH, por la actividad residual del cuajo, por el tipo de microorganismos iniciadores, por las enzimas presentes en la leche (principalmente proteasas y lipasas) y en otros casos por la microbiota secundaria (Fox *et al.*, 2004).

La maduración de los quesos comprende una serie de cambios químicos que a continuación serán descritos de forma breve:

Glucólisis: mediante la cual se produce la transformación de la lactosa en ácido láctico, cantidades pequeñas de acético y propiónico, así como diacetilo y CO₂. Ésta comienza durante la coagulación y se prolonga hasta la desaparición total de la lactosa. El ácido láctico también sufre transformaciones, según el tipo de queso.

Proteólisis: mediante la cual se degradan las proteínas en péptidos y aminoácidos libres, es uno de los procesos más importantes, ya que además de intervenir en las características olfato-gustativas, interviene fundamentalmente en la textura y el aspecto.

Lipólisis: mediante la cual se produce la hidrólisis de la grasa, generalmente en pequeñas cantidades, cuyos derivados: ácidos grasos y productos de su transformación como diacetilo y acetoína, influyen decisivamente en las características olfato-gustativas del queso.

3.8.1 Lípidos y lipólisis

Lípidos: contribuyen al sabor del queso en tres maneras:

I. Son una fuente de ácidos grasos, especialmente de ácidos grasos de cadena corta, los cuales presentan sabor y aromas característicos a productos lácteos.

II. Los ácidos grasos, sobre todo los poliinsaturados son sometidos a la oxidación, lo que conlleva a la formación de varios aldehídos insaturados que son fuertemente aromáticos y causan defectos de sabor y aroma conocido como rancidez oxidativa.

III. Los lípidos además toman el papel de disolventes para compuestos de sabor y aroma producidos no sólo por lípidos, también por proteínas y lactosa (Fox et al., 2004).

Lipasas: son enzimas que hidrolizan ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga (>10 átomos de carbono), pertenecen al grupo 3.1.1 de la clasificación del “Enzyme Collection” de acuerdo a las reacciones químicas que catalizan. Normalmente las lipasas actúan en la interfase aceite-agua de ésteres emulsificados.

En la figura 5 se muestra una imagen de la reacción de lipólisis.

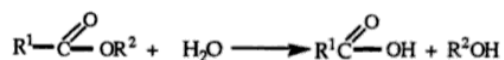


Figura 5. Reacción de lipólisis

Especificidad de las lipasas:

- Algunas lipasas muestran especificidad por enlaces externos tipo éster de tri o diglicéridos (posiciones sn1 y sn3). Por lo tanto los triglicéridos son hidrolizados inicialmente a 1,2 – y 2,3- diglicéridos.
- Usualmente las lipasas muestran especificidad por cierto largo de cadena en ácidos grasos.

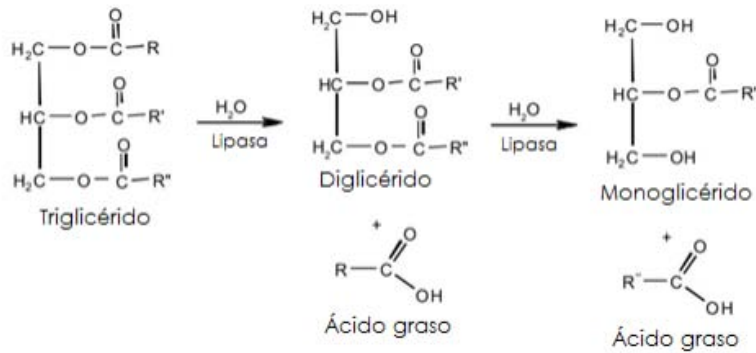


Figura 6. Hidrólisis de un triglicérido por una lipasa (Fox *et al.*, 2004).

Esterasas: son enzimas que hidrolizan ésteres de ácidos carboxílicos de cadena corta (<10 átomos de carbono), y otros ésteres simples.

Especificidad de las esterasas (Arpigny y Jaeger, 1999):

- Actúan sobre sustratos más solubles y con un grado de hidrofobicidad menor en comparación con las lipasas.
- Muestran un menor número de aminoácidos no polares localizados en las zonas expuestas al solvente y en la región del centro activo.
- El rango de sustratos no es muy amplio.
- Menor regioselectividad y estereoespecificidad, comparado con las lipasas.

3.8.2 Proteínas de la leche y proteólisis

La leche contiene varios tipos de proteínas, algunas de ellas en cantidades muy pequeñas. Las proteínas pueden ser clasificadas de acuerdo a sus propiedades físicas o químicas y sus funciones biológicas. Tradicionalmente las proteínas de leche fueron clasificadas en caseínas, proteínas de suero y proteínas menores.

Los tres grupos principales de proteínas en leche están distribuidos por sus diferentes comportamientos y formas existentes. Las caseínas son fácilmente precipitables principalmente por coagulación enzimática o por disminución de pH, mientras que las proteínas de suero usualmente quedan en solución. Las proteínas globulares de suero se

desnaturalizan bajo un calentamiento moderado mientras que las caseínas permanecen estables (Marcos A, *et al.*, 1977).

Caseína

Caseína es el nombre de un grupo de proteínas constituyente de las proteínas en leche. Las caseínas están presentes en toda leche animal, incluyendo leche humana. En leche de vaca casi el 80 % de las proteínas son caseínas.

Las caseínas fácilmente forman varios polímeros con el mismo o diferente tipo de caseínas. Debido a la abundancia de grupos fosfatos y sitios hidrofóbicos en la molécula de caseína, las moléculas de polímeros formados por la caseína son muy especiales y estables. Los polímeros son construídos por cientos y miles de moléculas individuales y forman una solución coloidal que da el color blanco de la leche. Estas moléculas complejas son conocidas como miscelas de caseínas. Las miscelas de caseína consisten de un complejo de sub-miscelas de un diámetro de 10 a 15 nm.

El fosfato de calcio y las interacciones hidrofóbicas entre las sub-miscelas son responsables de la estabilidad de las miscelas de caseína. Las partes hidrofílicas de k-caseína contienen grupos de carbohidratos que se proyectan desde el exterior del complejo de miscelas, lo más importante es que estabilizan las miscelas impidiendo la agregación (Marcos A, *et al.*, 1977).

Proteínas de suero

Las proteínas de suero forman aproximadamente el 20 % de la fracción de proteínas en leche. Las proteínas de suero son muy solubles y pueden ser separadas en los siguientes sub-grupos:

- α -Lactoalbumina
- β -Lactoglobulina
- Albúmina de suero de sangre
- Immunoglobulinas
- Proteínas miscelaneas y polipéptidos

α -Lactoalbumina

Esta proteína puede ser considerada por ser la típica proteína de suero. Está presente en la leche de todos los mamíferos.

β -Lactoglobulina

Esta proteína es encontrada sólo en mamíferos y es el mayor componente de proteínas de suero en leche de vacas. Si la leche es calentada sobre 60 °C, se inicia la desnaturalización donde la reactividad del aminoácido de azufre de la β -lactoglobulina juega un rol importante. A altas temperaturas los componentes sulfurados son gradualmente liberados. Estos componentes sulfurados son en parte responsables de los sabores a cocido de la leche tratada con calor.

Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas juegan un rol importante en la protección del animal recién nacido (también en humanos) contra bacterias y enfermedades.

Lactoferrina

Es una glicoproteína que pertenece al transportador de hierro o la familia transferrina, esto fue originalmente aislado de leche bovina, pero está también presente en la leche de otros animales. Además se encuentra en las secreciones exocrinas de mamíferos.

Proteínas Menores

Las proteínas de la membrana forman una capa protectora alrededor de los glóbulos de grasa, para estabilizar la emulsión de gotitas de grasa de la leche. Algunas de las proteínas contienen residuos de lípidos y son llamados lipoproteínas. Las proteínas globulinas de la membrana son la fracción más pequeña de las proteínas en la leche, aproximadamente 1.5 % de la fracción total de proteínas. Los lípidos y los aminoácidos hidrofóbicos de dichas proteínas hacen que las moléculas dirijan sus sitios hidrofóbicos hacia la superficie de grasa, mientras que las partes menos hidrófobas son orientadas hacia el agua. Enzimas fosfolipídicas y lipolíticas, en particular, se absorben dentro la estructura de la membrana (Marcos A, *et al.*, 1977).

La proteólisis es un proceso esencial en la maduración de los quesos, estrechamente relacionado con la calidad organoléptica del producto.

La hidrólisis de las paracaseínas de la cuajada es de naturaleza enzimática y en ella participan las enzimas del coagulante de la leche, la proteasa alcalina natural de la leche, de los cultivos lácticos añadidos y de los microorganismos que entran en el producto durante su manufactura.

En la degradación de las caseínas a productos solubles por la acción microbiana intervienen las proteasas extracelulares de los microorganismos vivos y las proteasas intracelulares liberadas por la autólisis de las células microbianas.

La presencia de la actividad proteolítica de los microorganismos presentes en los diversos tipos de queso y de la acción específica de las proteasas microbianas sobre las diferentes paracaseínas, es de indudable interés tecnológico para la selección de los cultivos a emplear en quesería.

La extensión de la proteólisis en los quesos depende de la variedad, los productos pueden ser desde polipéptidos ligeramente más pequeños que las caseínas intactas pasando por medianos y pequeños péptidos hasta aminoácidos libres (Marcos A, *et al.*, 1977), además la actividad proteolítica de LAB en proteínas de la leche puede liberar péptidos bioactivos con diferentes actividades tales como antihipertensivo, antioxidante y antimicrobiano.

4. Antecedentes del grupo de trabajo

4.1 *Enterococcus* spp. aislados del queso Cotija

Bravo en el 2008 encontró que la microbiota presente en el queso Cotija cambia después de 3 meses de maduración, no se detectan levaduras, los coliformes fecales disminuyen por debajo del límite máximo (50 NMP/g) indicado en la NOM 121 “Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias”. También llevó a cabo el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del género *Enterococcus* y *Lactobacillus*. Detectó que durante el proceso de maduración ocurren cambios fisicoquímicos como el aumento de acidez, la disminución de la A_w y el pH, lo que limitó el desarrollo de ciertos microorganismos. Zuñiga en el 2009 estudio a la comunidad bacteriana del queso Cotija mediante métodos moleculares (PCR-DGGE y posterior secuenciación de la región V3 del gen ADNr 16 S), identificando así especies de *Enterococcus*, las cuales no son la población dominante dentro de todo el consorcio encontrado en el queso Cotija pero están presentes y se mantienen durante el proceso de maduración. Serrano en 2010 demostró que la actividad antibacteriana extracelular producida por BAL aisladas del queso Cotija son de carácter proteínico y encontró una banda de 87 kDa por *Enterococcus faecalis*, correspondiente a una proteína con una región NplC/P60, de esta proteína solo pudo identificarse actividad en contra de bacterias Gram positivas. Olvera en 2010 encontró que las cepas de *Enterococcus* spp. aisladas del queso Cotija presentan actividad antibacteriana, al cultivarse en medio de cultivo MRS, contra: *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Yersinia enterocolitica*.

Así mismo Olvera en el 2013 llevó a cabo la evaluación del potencial de virulencia y efectos antibacterianos en 12 grupos de *Enterococcus* spp. aislados de muestras de queso Cotija “Región de Origen” y de cepas aisladas y caracterizadas por el grupo de trabajo, mediante la detección y evaluación de la expresión de genes que codifican para factores de virulencia (citolisina, proteína de superficie y sustancias de agregación), enterocinas (enterocina A y AS-48) y peptidoglucano hidrolasas (AtlA).

Resultados de nuestro grupo de investigación indican que las cepas de *Enterococcus faecalis* y *faecium* presentes en el queso Cotija pertenecen a complejos clonales diferentes de las cepas de origen nosocomial (Olvera en proceso; Guzmán, 2015).

4.2 Contenido de grasa del Queso Cotija

El contenido mínimo de grasa en el queso Cotija debe ser de 23 %, el perfil de ácidos grasos de este contenido de materia grasa fue estudiado por Escobar (2012) y se muestra a continuación en la figura 7, donde se observa con diferentes colores las zonas del queso Cotija de donde se tomó la muestra, numerada del 1 al 5 desde el centro hasta la corteza del queso. Sobresale el alto contenido en ácidos de cadena larga como el ácido palmítico, esteárico y oleico. También se puede observar la presencia de ácidos de cadena corta de los cuales el que se encuentra en una mayor proporción es el ácido butírico.

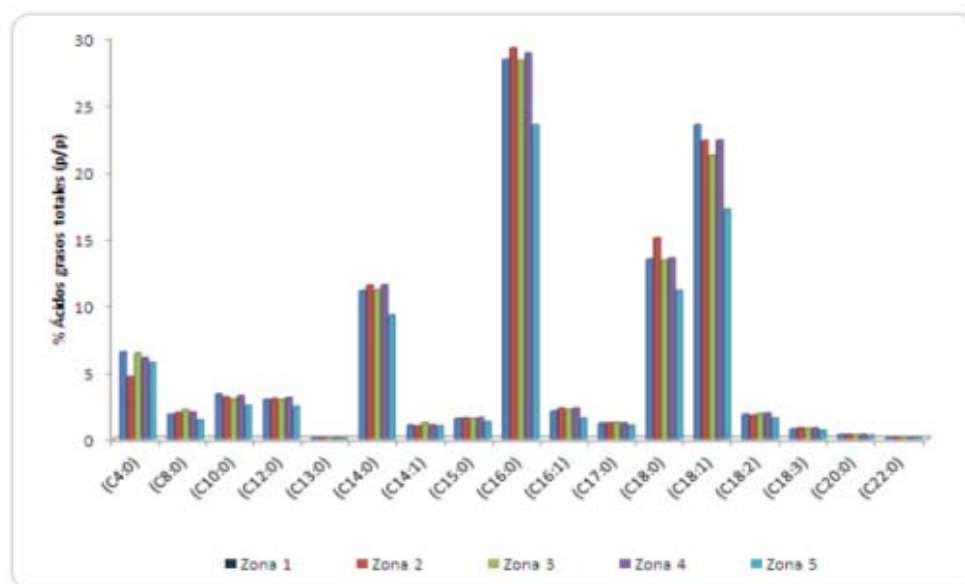


Figura 7. Perfil de ácidos grasos del queso Cotija. La pieza fue dividida en 4 zonas comenzando por el centro y se tomó la corteza como la zona 5 (Escobar, 2012).

4.3 Contenido proteínico en el Queso Cotija

Las fuentes de proteasas provenientes en el queso, pueden provenir del cuajo (quimosina, con especificidad por residuos de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos), de la leche (plasmina, catepsina D) y de microorganismos ya que como se mencionó antes, dentro de la elaboración del queso Cotija no hay un paso de esterilización de la leche ni adición de cultivo iniciador.

Es sabido que las BAL tienen un sistema proteolítico no muy extenso, sin embargo lo poseen y presentan diferentes peptidasas (Escobar, 2012).

En la figura 8. se muestra el perfil electroforético de proteínas correspondientes al queso Cotija tomado de las cinco zonas diferentes marcados desde Z1 –Z5, donde se logran observar diferentes bandas de proteína desde los 14.4 kDa hasta 116 kDa. No hay diferencia en el perfil de proteínas entre zonas y tampoco se observa una proteólisis evidente. Como lo indican las flechas en la figura por debajo de los 25 kDa se observaron cuatro bandas bien definidas las cuales podrían corresponder a caseinomacropéptido no glucosilado (6.5 kDa), k-paracaseína libre (13.5 kDa), k-caseína residual (19 kDa) y caseinomacropéptido glucosilado (alrededor de 20 kDa).

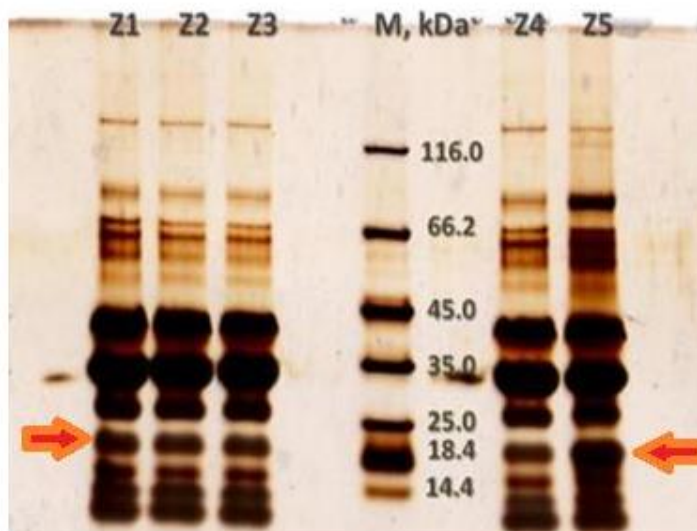


Figura 8. Perfil electroforético de proteínas del Queso Cotija 4 zonas comenzando por el centro y se tomó la corteza como la zona 5 (Escobar, 2012).

5. Justificación

Existen reportes de que los enterococos juegan un papel importante en las características finales de varios quesos madurados, donde contribuyen al desarrollo de aromas y sabores por su actividad lipolítica y proteolítica.

En el grupo de trabajo se han aislado varias cepas de *Enterococcus* spp. a partir del queso Cotija, sin embargo no se ha evaluado su capacidad proteolítica ni lipolítica.

6. Hipótesis

Las cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de queso Cotija serán capaces de producir proteasas y esterases que presenten actividad a una temperatura similar a la que se madura dicho producto.

7. Objetivos

General

Evaluar las actividades enzimáticas esterasa de ácidos carboxílicos y proteasa, para cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de queso Cotija artesanal madurado.

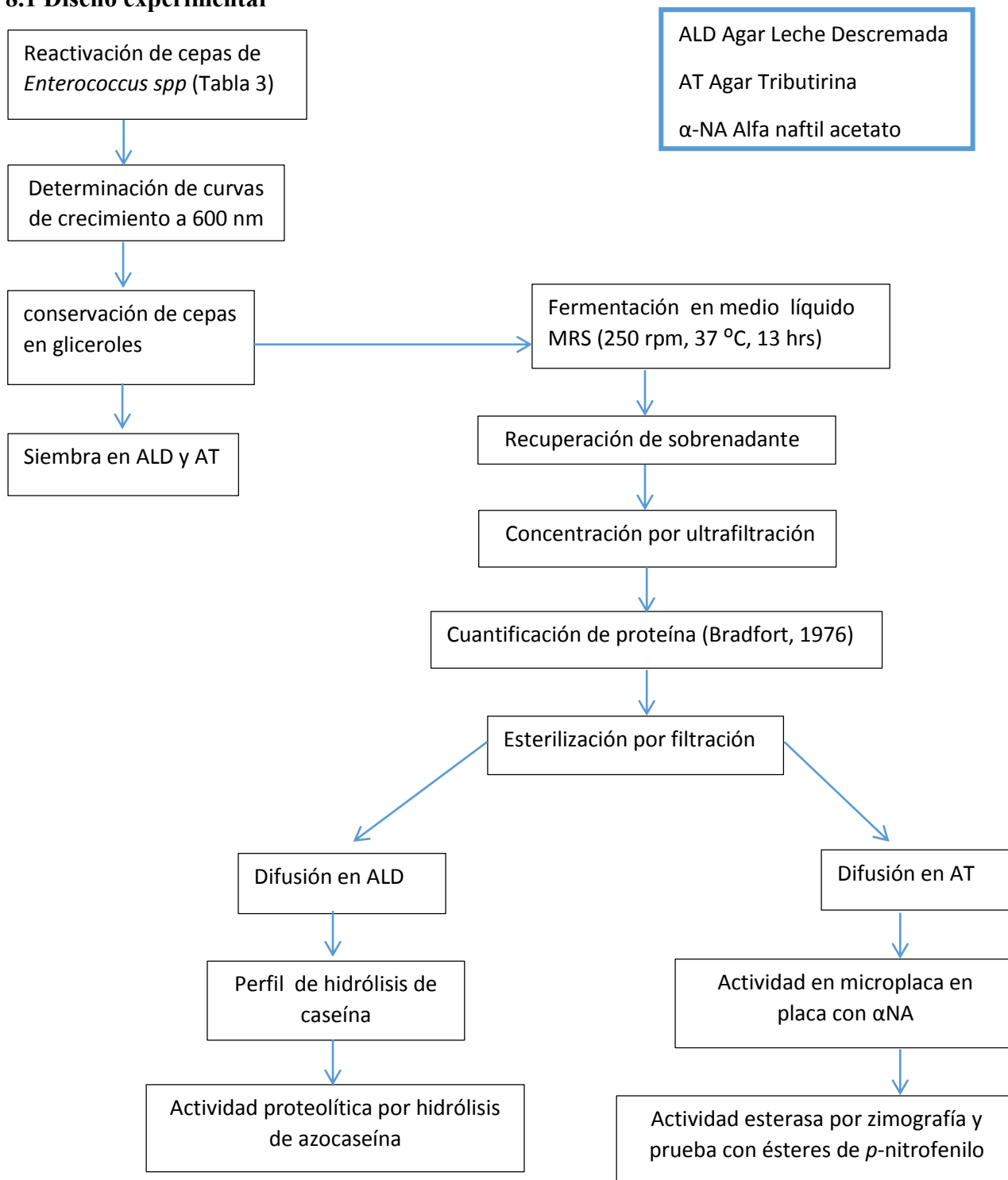
Particulares

A partir de los extractos enzimáticos concentrados, evaluar la actividad esterasa de *Enterococcus* spp., mediante pruebas cualitativas: hidrólisis de α -naftil acetato, por difusión en agar y zimografía; y cuantitativamente contra ésteres de *p*-nitrofenilo de diferente longitud de cadena.

Así mismo evaluar la actividad proteasa de *Enterococcus* spp., cualitativamente mediante difusión en agar e hidrólisis de caseína y cuantitativamente por hidrólisis de azocaseína.

8. Metodología

8.1 Diseño experimental



8.2 Bacterias en estudio

Para la realización del presente trabajo se utilizaron siete cepas de *Enterococcus* sp. aisladas previamente del queso Cotija por el grupo de trabajo.

La lista de las siete cepas totales y la información que se sabía de ellas se muestra a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de queso Cotija.

Todas las cepas se encontraban crioconservadas a -70 °C.

Cepa	Gram	Morfología	Identificada como	Técnica empleada de identificación (Robles, Tania, 2014)
A	(+)	Cocos	<i>Enterococcus faecalis</i>	Amplificación del gen ribosomal 16S
B	(+)	Cocos	<i>Enterococcus faecium</i>	Amplificación del gen ribosomal 16S
C	(+)	Cocos	<i>Enterococcus faecium</i>	Amplificación del gen ribosomal 16S
D	(+)	Cocos	<i>Enterococcus faecium</i>	Amplificación del gen ribosomal 16S
E	(+)	Cocos	<i>Enterococcus faecalis</i>	Amplificación del gen ribosomal 16S
G	(+)	Cocos	<i>Enterococcus faecium</i>	Amplificación del gen ribosomal 16S
I	(+)	Cocos	<i>Enterococcus faecalis</i>	Amplificación del gen ribosomal 16S

8.3 Reactivación de cepas

A tubos de ensayo con capacidad de 15 mL, se les agregaron 5 mL de medio líquido MRS los cuales se inocularon mediante la adición de 50 μ L de los gliceroles previamente criopreservados y se incubaron a una temperatura de 37 °C y aireación 250 rpm durante 8 horas.

8.4 Determinación de curvas de crecimiento

Posterior a la reactivación de las siete cepas de *Enterococcus spp.* se inocularon 500 μ L en matraces de 50 mL con caldo MRS y se incubaron a una temperatura de 37 °C y aireación de 250 rpm durante 20 horas. Las lecturas de absorbancia a 600 nm fueron tomadas por duplicado cada dos horas hasta las 16 horas, tomando en cuenta el tiempo cero de la fermentación y el blanco con caldo MRS estéril sometido a las mismas condiciones de las demás muestras.

Posterior a las curvas de crecimiento, las cepas utilizadas fueron conservadas (Anexo 1) hasta el momento en que se utilizaran para la realización de todos los experimentos restantes.

8.5 Siembra de cepas en AT y ALD

Para la observación de halos de lipólisis y proteólisis cada cepa fue inoculada mediante estría radial a partir de los gliceroles en placas de AT y ALD (Anexo 3), las cuales fueron incubadas 72 horas a 37 °C. La observación de la producción de halos en ALD fue realizada a las 48 horas y en AT fue hasta las 72 horas.

8.6 Fermentación en medio líquido MRS

Se prepararon pre inóculos en tubos de ensayo con 5 mL de caldo MRS más 50 μ L de cepa y se incubaron en condiciones de crecimiento a 37 °C, 250 rpm durante 8 horas.

Posteriormente a partir del pre inóculo se realizó un pase de 1 mL en 100 mL de caldo MRS contenidos en un matraz de 500 mL y se incubó en condiciones de crecimiento a 37 °C, 250 rpm durante 13 horas. Para cada cepa se obtuvieron 200 mL como volumen final de fermentación en el caldo MRS.

8.7 Concentración de sobrenadante por ultrafiltración

El sobrenadante obtenido de la fermentación de 13 horas se colocó en un tubo falcon con capacidad de 50 mL y se centrifugó a 8,500 rpm durante 15 minutos, posteriormente al sobrenadante se le ajustó el pH a 7 con NaOH 1N (se guardó una alícuota de 5 mL del extracto crudo). Para concentrar los extractos primero se realizó una filtración en el equipo millipore con una membrana de 0.22 μm y posteriormente se colocó en el equipo AMICON con capacidad de 500 mL para ultrafiltrarlo con una membrana de 10 kDa. Con un volumen inicial de 200 mL de extracto se ultrafiltra hasta un volumen de 50 mL y se realizaron dos lavados con 100 mL de buffer de fosfatos de potasio 100 mM pH 7.5 hasta llegar a un volumen de 10 mL. Por último, los 10 mL de extracto se colocaron en el equipo AMICON con capacidad de 10 mL y se ultrafiltraron hasta llegar a un volumen final de 2 mL, concentrando así la muestra 200 veces.

8.8 Determinación de la concentración de proteína (Método de Bradford)

Se determinó la concentración de proteína mediante el Método de Bradford, el fundamento de la técnica es: el azul brillante de Coomasie G-250 al unirse a la proteína, principalmente a los aminoácidos básicos y aromáticos, provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm, pasando de un color rojo a azul. Este ensayo es muy reproducible y rápido, ya que el proceso de unión al colorante se da en aproximadamente 2 minutos y continúa estable durante una hora aproximadamente. Se mide la absorbancia a 595 nm (Bradford, 1976).

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor del reactivo de Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, No. de catálogo 500-0006, Bio-Rad Laboratories).

Las muestras concentradas mediante la ultrafiltración se diluyeron para que la cantidad de proteína estuviera dentro de la curva patrón elaborada con albúmina bovina sérica (de 0 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) la elaboración de la curva patrón se encuentra descrita en el Anexo 2.

Se adicionaron en cada pozo de una microplaca 160 μL de la muestra diluida y 40 μL del reactivo de Bradford. Se mezcló, evitando la formación de burbujas de aire. Se colocó un blanco con agua destilada en lugar de la muestra y se dejó reposar por 5 minutos para que se estabilizara el color generado, al cual se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (Espectrofotómetro Biomate 3, Thermo Scientific).

8.9 Difusión en AT y ALD

Para poder observar la actividad enzimática lipolítica y proteolítica de las diferentes cepas se colocó sobrenadante concentrado con la misma cantidad de proteína en pozos hechos dentro de placas con AT (1%) y ALD (1.5%). Las cuales se incubaron a 29 °C durante 24 horas. Previamente las muestras se esterilizaron dentro de la campana de flujo laminar con una membrana desechable Millipore de 0.22 μm .

La composición de cada medio está descrita en el Anexo 3 (García, 2006; Hernández Briones, 2007).

AT

La observación de actividad lipolítica se basa en la actividad que tiene las lipasas, que puede ser determinada a través de la utilización del sustrato de la lipasa, en este caso la tributirina. La actividad lipolítica es indicada por una formación de halos alrededor de las colonias del triglicérido opaco. El área o la zona de aclaramiento es proporcional a la actividad lipolítica. Para obtener un medio adecuado es importante que haya una buena emulsificación de la materia grasa añadida (García, 2006).

ALD

Con la finalidad de determinar la actividad proteolítica se seleccionó el ALD considerando que la leche es materia prima del queso y por tanto los sustratos de las proteasas tanto en el medio sólido como en el alimento son los mismos (caseínas).

En ALD, las colonias de bacterias proteolíticas se encuentran rodeadas de una zona clara como resultado de la conversión de la caseína en compuestos nitrogenados solubles. La zona clara en el agar refleja solamente el desdoblamiento completo de la caseína, por lo que etapas tempranas de proteólisis, no pueden ser detectadas por el cambio en la opacidad del medio (Pouch, 2001).

8.10 Determinación de actividad cualitativa con α -NA

Se preparó en stock de α -NA (Sigma), pesando 2 mg del reactivo y disolviéndolo en 0.5 mL de acetona. Se llevaron a un volumen de 2 mL con Buffer de Fosfatos 100 mM pH 7.5.

También se preparó un stock de fast red (Sigma), pesando 2 mg del reactivo y se disolvió en 0.5 mL de buffer de fosfatos 100 mM pH 7.5 con 20 μ L de tritón 100-X para solubilizar y se llevó a 2 mL con el mismo buffer de fosfatos.

Se colocaron en una microplaca 75 μ L de la muestra ultrafiltrada (o regulador en el caso del blanco), y se añadieron 75 μ L del stock de α -naftil acetato (Sigma). Se incubó a una temperatura de 29 °C durante 15 minutos y después se añadieron 75 μ L del stock de fast red (Sigma) para observar la intensidad de la coloración rojiza obtenida.

El fundamento de esta reacción consiste en que las enzimas con actividad de esterasa hidrolizan acetato de α -naftilo liberando α -naftol, el cual reacciona con el fast red, que es una sal de diazolio para formar un cromógeno de color rojo:



8.11 Preparación de geles de poliacrilamida y zimogramas

Geles de bandas de proteína

Para la determinación de actividad lipolítica se realizaron geles nativos de poliacrilamida según el método de Ornstein-Davis con un gel concentrador al 4 % y un separador al 12 % de poliacrilamida. Todos los reactivos que se utilizaron para su preparación se realizaron de acuerdo al manual Mini-Protean Tetra Cell Bio-Rad con números de catálogo 165-8000/165-8001 (Anexo 4 y 5).

Los sobrenadantes concentrados fueron tomados de sobrenadantes frescos (al término de la fermentación) se ajustaron a 70 μ g de proteína aproximadamente, se les añadió Buffer de Carga 4x (3:1) y se cargaron en el gel. La electroforesis se corrió en una cámara Mini-Protean de Bio-Rad a temperatura ambiente durante 15 minutos a 80 volts posteriormente se llevó a una temperatura de 4 °C y 120 volts durante 2 horas aproximadamente.

Al término de la electroforesis el gel se lavó con un poco de agua destilada y se tiñó con una solución de azul de comassie (10 % ácido acético, 45 % metanol, 45 % agua destilada y 0.25 % azul de comassie) durante 30 minutos y posteriormente se dejó destiñiendo con una solución destiñidora (10 % ácido acético, 45 % metanol y 45 % agua destilada). Se realizaron cambios de esta solución cuando se saturó por el colorante, así hasta la aparición de las bandas azules en fondo claro.

Para los zimogramas, al término de la electroforesis el gel se lavó con un poco de agua destilada y posteriormente se colocó con buffer de fosfatos 100 mM pH 7.5 y se dejó en agitación durante 30 minutos. Al término de ese tiempo se desechó el buffer y se le agregó una solución de α -NA (Sigma) (tabla 4), se dejó a una temperatura de 29 °C durante 15 minutos, pasado este tiempo se le agregó el mismo volumen de una solución de fast-red (Sigma) hasta ver las bandas de color rojo.

Tabla 4. Solución para revelar zimograma de actividad lipolítica.

Reactivos	Solución α -naftil acetato	Solución Fast-Red
α -naftil acetato	20 mg	----
Fast-Red	----	20 mg
Acetona	5 mL	----
Tritón 100-X	----	20 μ L
Buffer de Fosfatos 100 mM pH7.5	15 mL	20 mL

8.12 Determinación de actividad cuantitativa con ésteres de *p*-nitrofenilo

Se emplearon como sustrato los ésteres acetato de *p*-nitrofenilo (*p*-NA), butirato de *p*-nitrofenilo (*p*-NB), decanoato de *p*-nitrofenilo (*p*-NDe), dodecanoato de *p*-nitrofenilo (*p*-NDo) y palmitato de *p*-nitrofenilo (*p*-NP), los cuales se prepararon a una concentración 0.1 mM en alcohol absoluto.

En una micro placa se colocaron 20 μ L de buffer de fosfatos 0.5 M, pH 7.5, 90 μ L de agua destilada, 20 μ L de sustrato y por último 70 μ L del sobrenadante concentrado. Finalmente se registró cada 3 minutos el incremento en las lecturas de absorbancia a 420 nm (Espectrofotómetro Biomate 3, Thermo Scientific) como consecuencia de la actividad lipolítica sobre los diferentes sustratos, durante 30 minutos. Para esta prueba también se realizó un blanco para cada sustrato, con todos los reactivos menos el sobrenadante concentrado.

Para obtener los valores de U/ mg proteína se utilizó una curva patrón pH 7 con *p*-nitrofenol 1 mM Anexo 6.

$$U/mL = \left[\left(\frac{abs\ 440\ nm}{min} \right) \left(\frac{V_f}{V_i} \right) \left(\frac{1}{\frac{abs}{\mu L}} \right) \right] = \left[\left(\frac{m\ cinética}{m\ curva\ patrón} \right) \left(\frac{V_f}{V_i} \right) \right]$$

$$U/ mg\ proteína = \frac{\left[\frac{U}{\frac{mg\ proteína}{mL}} \right]}{Vol.\ total\ de\ reacción}$$

8.13 Perfil electroforético de hidrólisis de caseína

Se colocó 1 mL de leche descremada estéril en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL y se les añadió el volumen correspondiente a 200 µg de proteína de cada una de las preparaciones enzimáticas concentradas tomadas de sobrenadantes frescos (al término de la fermentación) y se incubaron a 29 ° C durante 24 y 48 horas.

Para la determinación de actividad proteolítica se realizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida según el método de Laemmli (Laemmli, 1970) con un gel concentrador al 4 % y un separador al 12 % de poliacrilamida.

Todos los reactivos que se utilizaron para su preparación se realizaron de acuerdo al manual Mini-Protean Tetra Cell con números de catálogo 165-8000/165-8001 (Anexo 5).

Después de las 24 horas de incubación de la reacción de proteólisis se tomaron 30 µL de las muestras y se detuvo la reacción sustrato-enzima cuando se les añadió buffer de carga 4x (3:1) y se calentaron a ebullición en baño maría durante 5 minutos antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se corrió en una cámara Mini-Protean de Bio-Rad a temperatura ambiente durante 15 minutos a 80 volts, posteriormente se llevó a una temperatura de 4 ° C a 120 volts aproximadamente una hora y media. Lo mismo se realizó con las muestras de 48 horas de incubación.

Al término de la electroforesis el gel se lavó con un poco de agua destilada y se tiñó con una solución de azul de comassie (10 % ácido acético, 45 % metanol, 45 % agua destilada y 0.25 % azul de comassie) durante 30 minutos y posteriormente se dejó destiñiendo con una solución destiñidora (10 % ácido acético, 45 % metanol y 45 % agua destilada), realizando cambios de esta solución cuando sea saturada por el colorante, así hasta la aparición de las bandas azules.

8.14 Determinación de actividad cuantitativa con azocaseína

El método requiere de la preparación de un blanco el cual no contiene muestra enzimática, tratada bajo las mismas condiciones que las reacciones con preparaciones enzimáticas. Si la

muestra posee color que pueda interferir con la lectura adecuada de los resultados, se prepara también un control del extracto. Ese control se somete a las mismas condiciones que las muestras, pero se le agrega el TCA al 20 % antes de adicionar la azocaseína evitando que se lleve a cabo la reacción entre la proteasa y la azocaseína. La lectura registrada será entonces la ocasionada por el color per se de la preparación enzimática en estudio (García Carreño y Haard, 1993).

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en tubos eppendorf de 1.5 mL con agitación y temperatura controlada (Thermomixer, Eppendorf, 800 rpm y 37 ° C), la reacción se realizó como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Reacción enzimática

Reactivo (mL) en orden de adición	Reacción con muestra	Control de extracto	Blanco
Azocaseína	0.5	----	0.5
Buffer pH= 7.5	----	----	0.1
Enzima (muestra concentrada)	0.1	0.1	----
TCA (20%)	----	0.6	----

Después se incubó a las condiciones anteriormente mencionadas durante 60 minutos, pasado ese tiempo se procede a la adición de reactivos de acuerdo a la Tabla 6. Se incubó a 29 °C durante 30 minutos más, sin agitación.

Tabla 6. Continuación de la reacción enzimática

Reactivo (mL) en orden de adición	Reacción con muestra	Control de extracto	Blanco
TCA (20%)	0.6	----	0.6
Azocaseína	----	0.5	----

Al término del tiempo se centrifugó a 8,200 rpm durante 20 minutos (Biofuga Primor Heraeus) para separar el sustrato que no reaccionó, se tomó una alícuota del sobrenadante (1 mL) y finalmente se registró el incremento en las lecturas de absorbancia a 440 nm como consecuencia de la actividad proteolítica sobre azocaseína (derivado colorido de caseína que sirve como sustrato para proteasas). Si existe la presencia de una proteasa en la muestra se lleva a cabo una reacción con la azocaseína liberándose un color naranja (Adaptado de Ballesteros, 2006 y García Carreño y Haard, 1996). Una unidad de actividad enzimática se define como el incremento de absorbancia/hora*mg proteína (Hazen, *et. al*, 1965).

$$U/mg \text{ proteína} = \left[\frac{(\text{Abs } 440 \text{ muestra} - \text{Abs } 440 \text{ control extracto}) - (\text{Blanco})}{(\text{mg de proteína})(60 \text{ min})} \right] \left[\frac{V_f}{V_i} \right]$$

9. Resultados y discusión

9.1. Determinación de curvas de crecimiento

Se llevó a cabo la reactivación de las siete cepas de *Enterococcus spp.* y a continuación se presenta en las figuras 9-15 las curvas de crecimiento en caldo MRS (27 °C, 250 rpm durante 20 horas) , observándose que las cepas A,B,C,D y G a las 8 horas de crecimiento terminan la fase exponencial y comienzan una fase estacionaria mientras que las cepas E e I hasta las 10 horas de crecimiento alcanzan el comienzo de la fase estacionaria.

Se realizaron las pruebas en microplaca con el sustrato α -NA a las 8 horas (término de la fase exponencial) de la fermentación y a las 13 horas (fase estacionaria), con la finalidad de observar en cuál de esas dos fases de crecimiento se observaba actividad enzimática. Como se muestra en la figura 16, las cepas A, B,C y D tuvieron actividad desde las 8 horas, mientras que las siete cepas presentaron actividad de tipo esterasa a las 13 horas de fermentación, es decir en una fase estacionaria. Considerando lo anterior, se decidió llevar a cabo la fermentación durante 13 horas, cuando todas las cepas se encontraran en una fase estacionaria para la obtención de las proteínas deseadas.

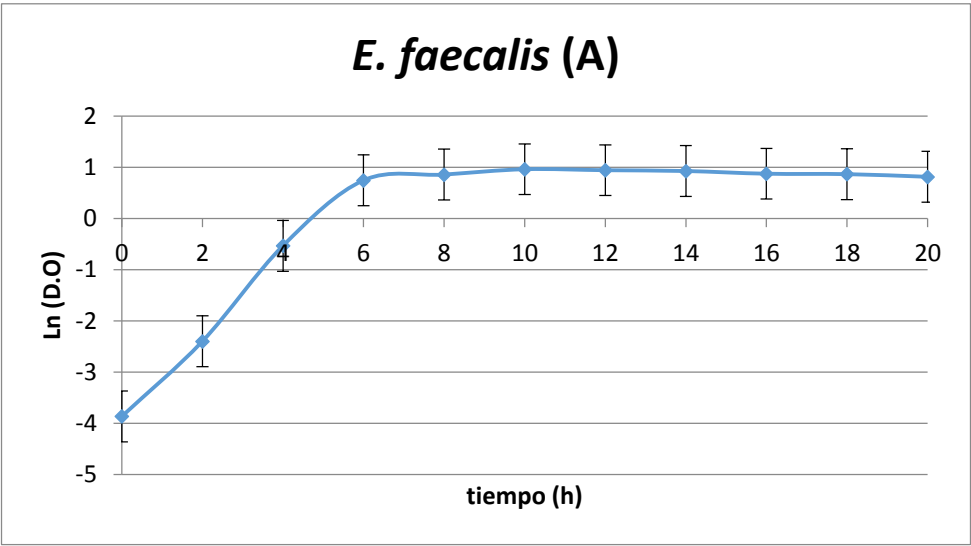


Figura 9. Curva de crecimiento cepa A

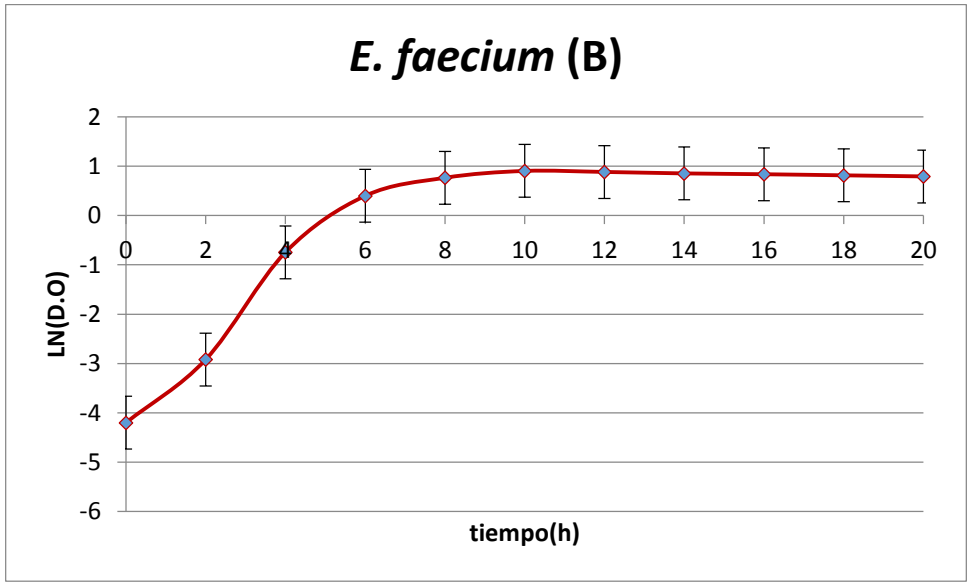


Figura 10. Curva de crecimiento cepa B

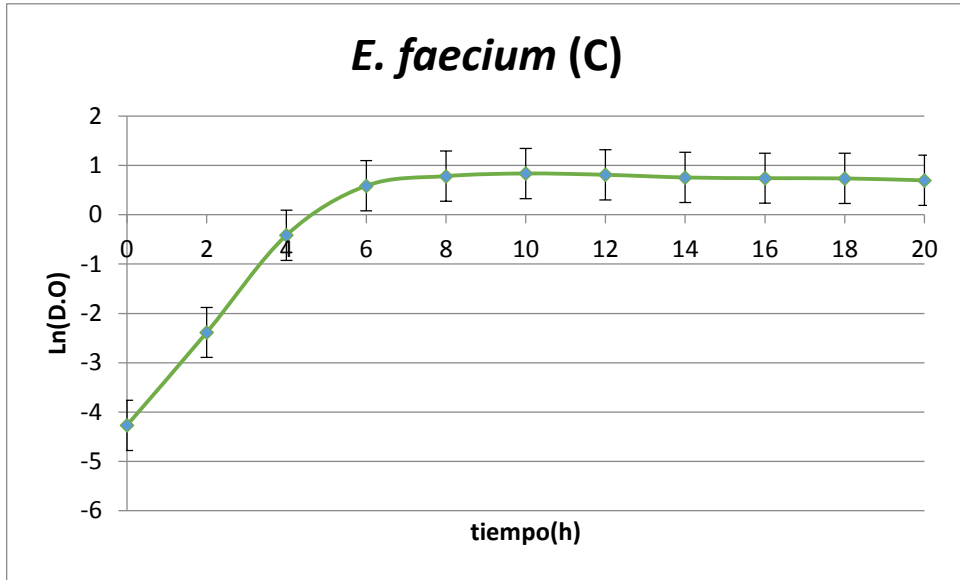


Figura 11. Curva de crecimiento cepa C

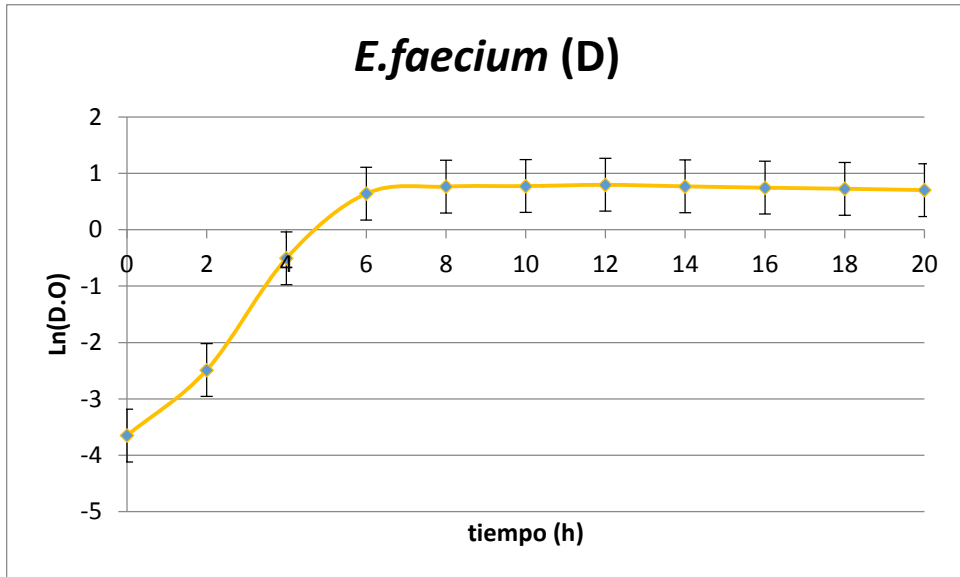


Figura 12. Curva de crecimiento cepa D

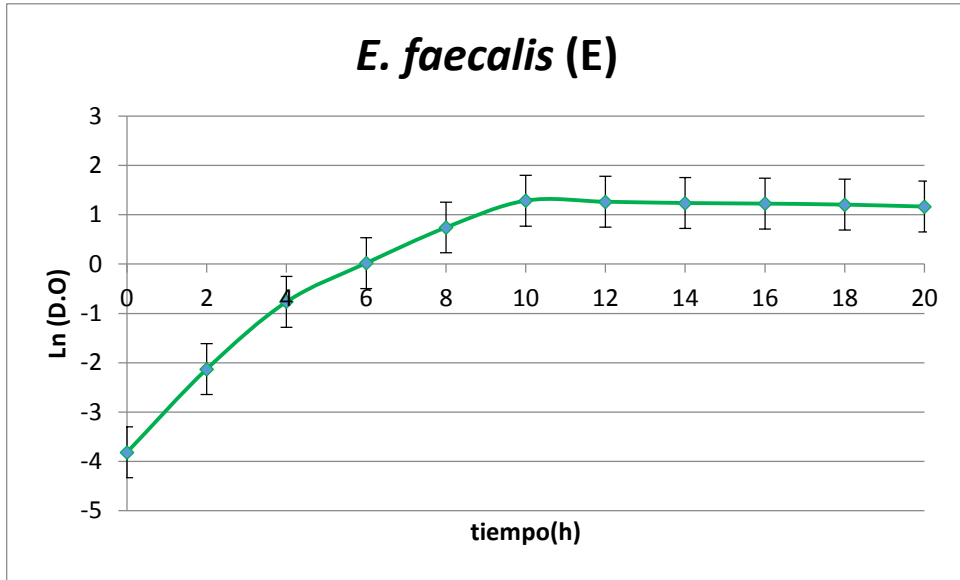


Figura 13. Curva de crecimiento cepa E

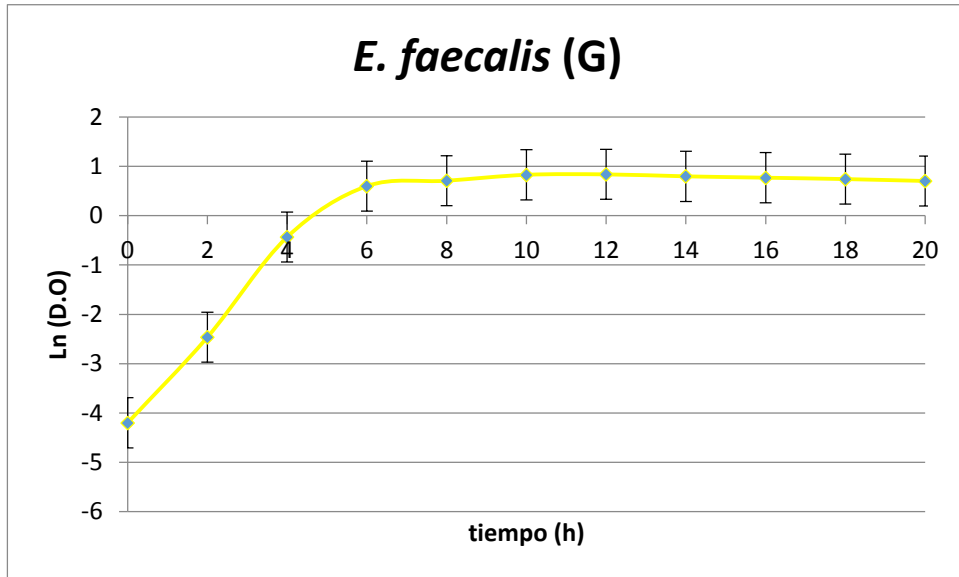


Figura 14. Curva de crecimiento cepa G

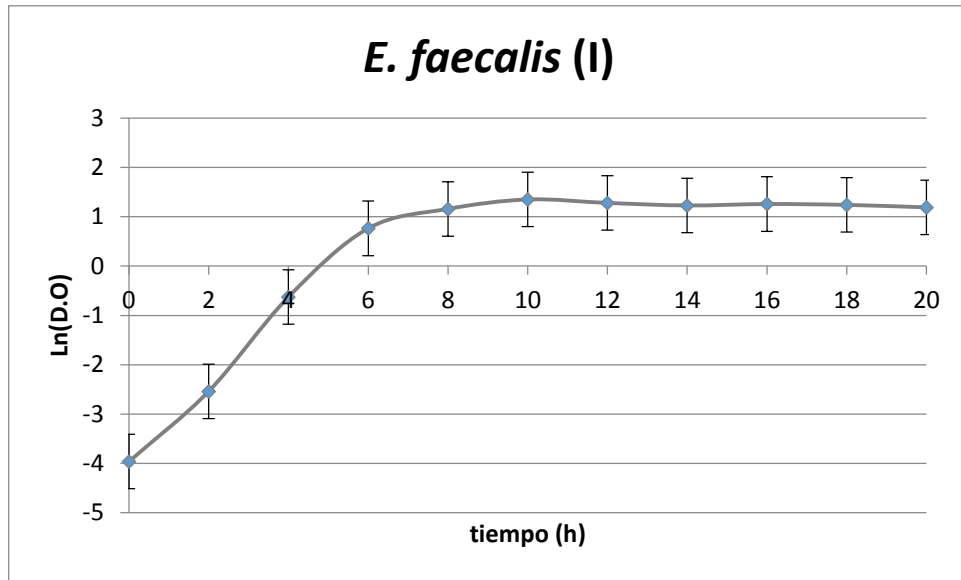


Figura 15. Curva de crecimiento cepa I

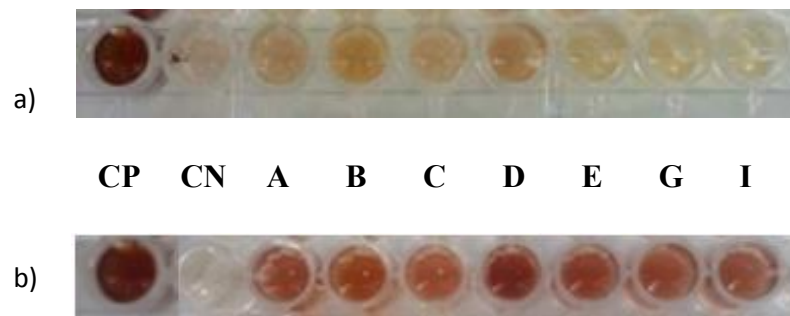


Figura 16. Prueba cualitativa con α -NA a las 8 horas (a) y a las 13 horas (b) de fermentación, después de incubar 15 minutos a 29° C. Control positivo: esterasa de cerdo (Sigma) CP; Control negativo: Buffer de Fosfatos CN.

9.2. Determinación de actividad esterasa

9.2.1 Estría radial en placas de medio AT

Directamente de los gliceroles de las cepas se realizó una estría radial sobre placas con AT las cuales fueron incubadas a 37 ° C durante 48 horas, esto con la finalidad de tener una prueba presuntiva en cuanto a la capacidad de actividad esterasa que se esperaba de las cepas.

Las siete cepas Figuras 17-23 presentaron halos alrededor de las colonias, lo que significa la hidrólisis de la tributirina, sin embargo en las figuras 17, 18, 19 y 21 se observó una mayor claridad de los halos.

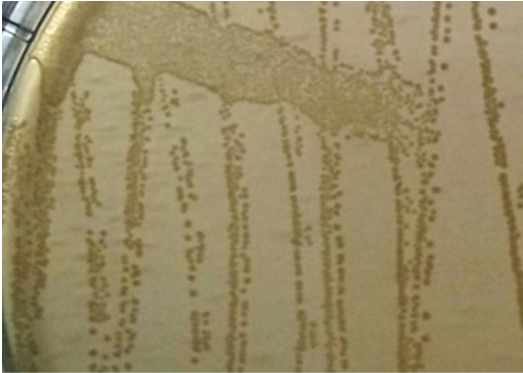


Figura 17. Hidrólisis de tributirina: cepa A



Figura 18. Hidrólisis de tributirina: cepa B

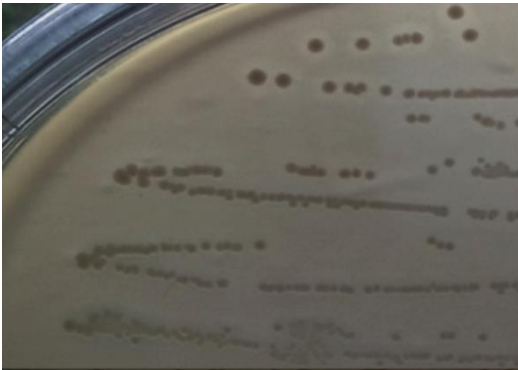


Figura 19. Hidrólisis de tributirina: cepa C

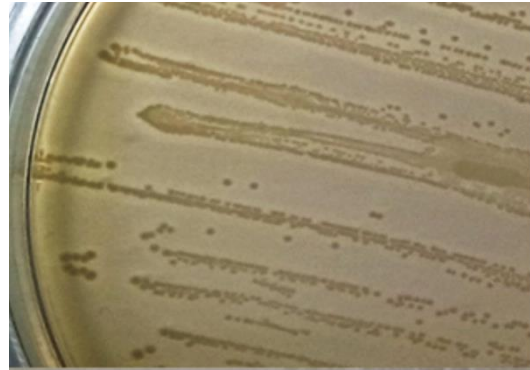


Figura 20. Hidrólisis de tributirina: cepa D



Figura 21. Hidrólisis de tributirina: cepa E

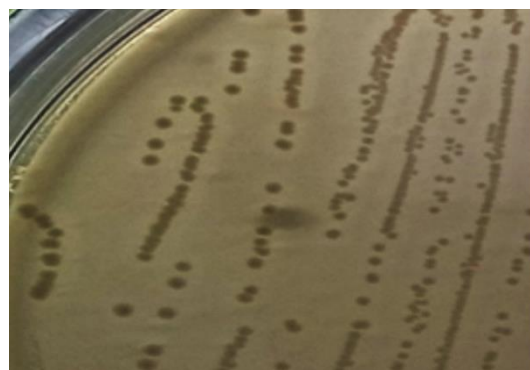


Figura 22. Hidrólisis de tributirina: cepa G

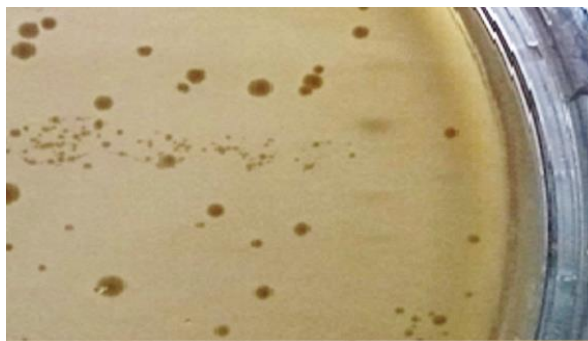


Figura 23. Hidrólisis de tributirina: cepa I

9.2.2 Difusión AT

En la figura 24 y 25 se presenta la prueba en difusión en AT incubadas a 29° C durante 24 horas con los sobrenadantes crudos de la fermentación de las diferentes cepas y un control positivo (Esterasa de Cerdo, Sigma), donde no se observaron halos de hidrólisis de la tributirina, mientras que en la figura 26 y 27 se muestra la misma prueba pero con los sobrenadantes concentrados donde se logran observar halos de hidrólisis de las cepas A, B, D y G.

Los halos fueron pequeños, lo que coincide con que generalmente se considera que las BAL son débiles en su actividad lipolítica si se compara frente a otros grupos de microorganismos (Foulquié *et al.*, 2006), y dentro de las BAL los enterococos presentan la mayor actividad lipolítica que por ejemplo *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Tsakalidou *et al.*, 1994, Hemati *et al.*, 1998; Tavaría y Malcata, 1998).

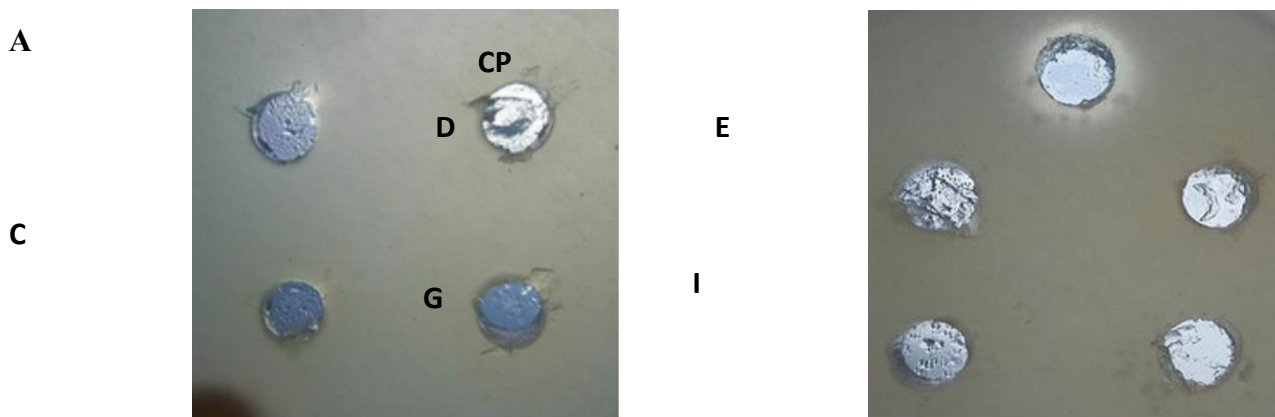


Figura 24 y 25. Difusión en AT con sobrenadante crudo de las siete cepas de *Enterococcus faecales* y *faecium* y control positivo: CP esterasa de cerdo (Sigma).

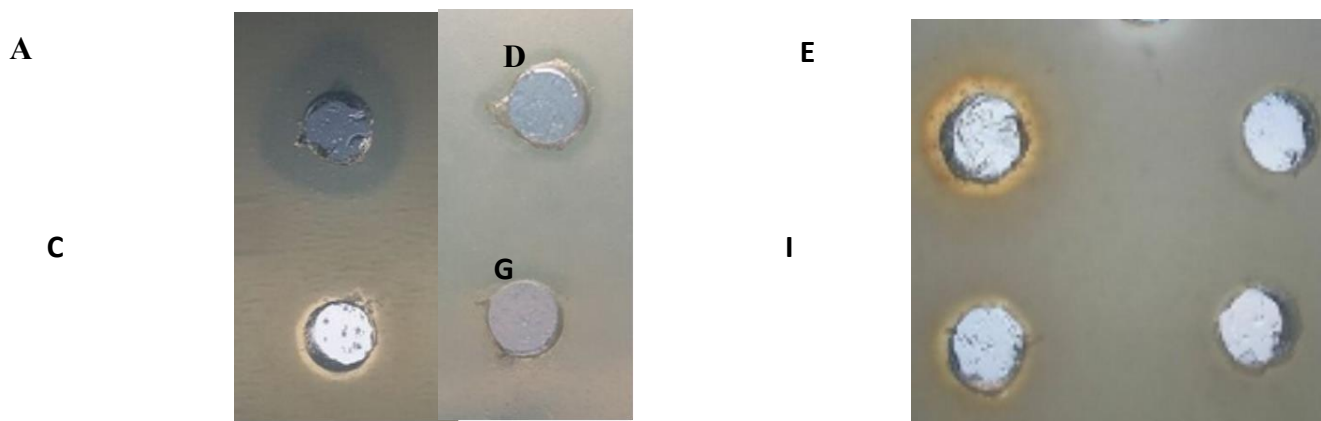


Figura 26 y 27. Difusión en AT con sobrenadante concentrado de las siete cepas de *Enterococcus faecalis* y *faecium* y control positivo: CP esterasa de cerdo (Sigma).

En la tabla 7 se muestran los valores de actividad esterasa específica producidas por los sobrenadantes concentradas de cada una de las siete cepas de *Enterococcus* spp. en el medio AT, con la finalidad de tener una idea de la capacidad productora enzimática de las cepas y su pureza. Se calculó la actividad específica relacionando el tamaño de halo con la cantidad de proteína colocada en cada pozo. Cabe mencionar que en cada pozo se colocó la misma cantidad de proteína.

Se puede observar que la cepa con mayor actividad es la cepa D, seguida de la cepa A, luego B y G, y con menor actividad la cepa C, E, e I.

Tabla 7. Actividad específica de las cepas de *Enterococcus* sp.

Cepa	Tamaño de halo (mm)	Proteína (mg)	Actividad específica (mm/mg)
A	3	0.196	15.30
B	2	0.197	10.15
C	--	0.196	0.0
D	4	0.198	20.20
E	1	0.202	4.95
G	2	0.197	10.15
I	1	0.196	5.10

9.2.3 Prueba con α -naftil acetato

A partir de los sobrenadantes concentrados correspondientes a las 13 horas de fermentación, se observó en la figura 28 que las siete cepas dieron positivo en la prueba cualitativa en placa, es decir que se hidrolizó el enlace éster liberando α -naftol formando un complejo con la sal de Fast Red dando la coloración roja. En cada uno de los pozos se colocó la misma cantidad de proteína y a pesar de que esta prueba sólo es cualitativa, se logró observar que la cepa D presentó una coloración más acentuada en comparación a las demás muestras, lo que coincide con la prueba de difusión en agar, sin embargo sí se pudo observar actividad en la cepa C. Estos resultados podrían indicar que la prueba de hidrólisis de α -NA en placa es más sensible que la de difusión en agar.

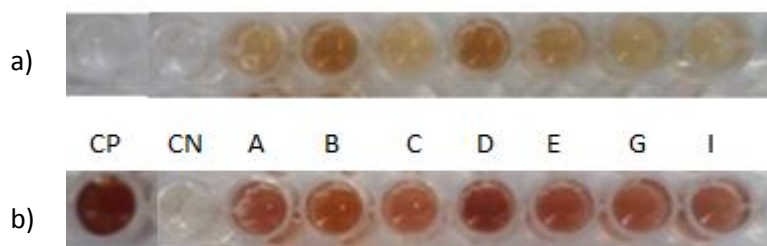


Figura 28. Prueba cualitativa con α -NA revelada con Fast Red. a) placa antes de incubar; b) placa después de incubar 15 minutos a 29° C. Control positivo: esterasa de cerdo (Sigma) CP; Control negativo: buffer de fosfatos CN.

9.2.4 Perfil electroforético e identificación de bandas con actividad

Todas las muestras concentradas se sometieron a una electroforesis con el fin de separar las proteínas, identificar sus pesos moleculares aproximados e identificar mediante zimogramas, cuales eran las que presentaban actividad lipolítica.

Se colocaron alrededor de 70 μ g de proteína total de las muestras en cada pozo del gel para la electroforesis. Primeramente se realizó una electroforesis desnaturizante pero no se logró ver ninguna banda con actividad, por lo que se prosiguió con una electroforesis nativa Figura 29 y 30 en donde se señalan las bandas de actividad que presentaron las cepas, la cepa A

presento una banda ancha, mientras que todas las demás también presentaron una banda de actividad. No se pudo obtener un peso aproximado de las bandas debido a la falta de un marcador de peso molecular nativo.

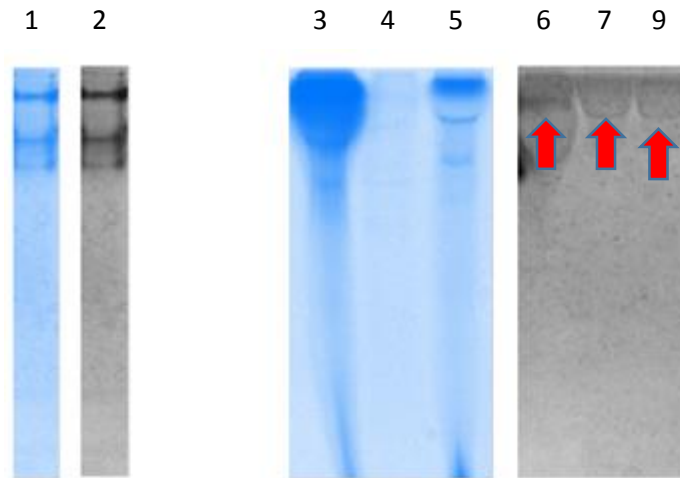


Figura 29. Perfil electroforético en gel nativo teñido con azul de coomassie y zimograma revelado con α -NA y Fast Blue. Control positivo: esterasa de cerdo Sigma (1), actividad control positivo (2), cepa A (3) y banda de actividad (6), cepa B (4) y banda de actividad (7), cepa C (5) y banda de actividad (8).

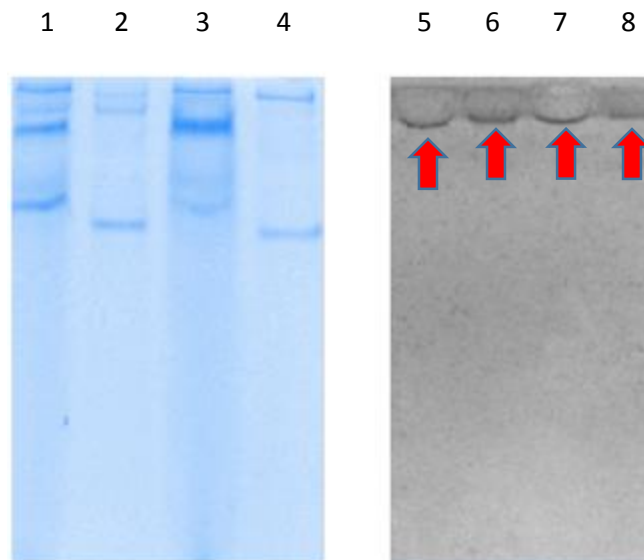


Figura 30. Perfil electroforético en gel nativo teñido con azul de coomassie y zimograma revelado con α -NA y Fast Blue. Cepa D (1) y banda de actividad (5), cepa E (2) y banda de actividad (6), cepa G (3) y banda de actividad (7), cepa I (4) y banda de actividad (8).

9.2.5 Prueba cuantitativa con ésteres de *p*-nitrofenilo

Los estudios acerca de la actividad lipolítica de los enterococos, al igual que ocurre con la actividad proteolítica es limitado y a menudo los datos existentes en la literatura son contradictorios. Sin embargo de acuerdo a los resultados anteriores donde todas las cepas en estudio presentan actividad esterasa, se decidió probar sustratos con diferente longitud de cadena y que presentaran un enlace éster, el que al romperse libera un compuesto colorido, en este caso algunos derivados del *p*-nitrofenol. Por tanto, se determinaron las actividades de los extractos enzimáticos concentrados obtenidos de cada cepa frente a cinco sustratos: *p*-NA (C:2), *p*-NB (C:4), *p*-NDe (C:10), *p*-NDo (C:12) y *p*-NP (C:16).

Se determinó la absorbancia a 440 nm de cada reacción y se realizaron las gráficas correspondientes con respecto al tiempo (Anexo 7). Con el valor de la pendiente (m experimental) se calculó la actividad volumétrica y con los mg de proteína colocada en cada una de las reacciones se determinó el valor de actividad específica “U”/mg (Anexo 8). Así mismo se realizaron los análisis de varianza por el método de ANOVA con un 95 % de confianza y el método empleado para discriminar entre las medias, diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Anexo 9).

En la figura 31 se muestran los resultados expresados como porcentaje de actividad específica, donde se asignó el 100 % al sustrato con mayor actividad, haciéndose lo mismo con la desviación estándar, para *Enterococcus faecalis* (Cepa A) se observó una especificidad bastante sobresaliente hacia el sustrato de cadena corta (C: 2) *p*-NA. Lo que concuerda con la actividad mostrada en microplaca, donde se obtuvo una coloración roja más acentuada con respecto a las demás cepas y también en el zimograma donde se usó α -naftil acetato como sustrato, la banda fue mucho más intensa con respecto a las demás. Estadísticamente existe diferencia significativa, donde la especificidad por el sustrato C:2 es diferente de todas las demás, mientras que las restantes presentan semejanza entre ellas.

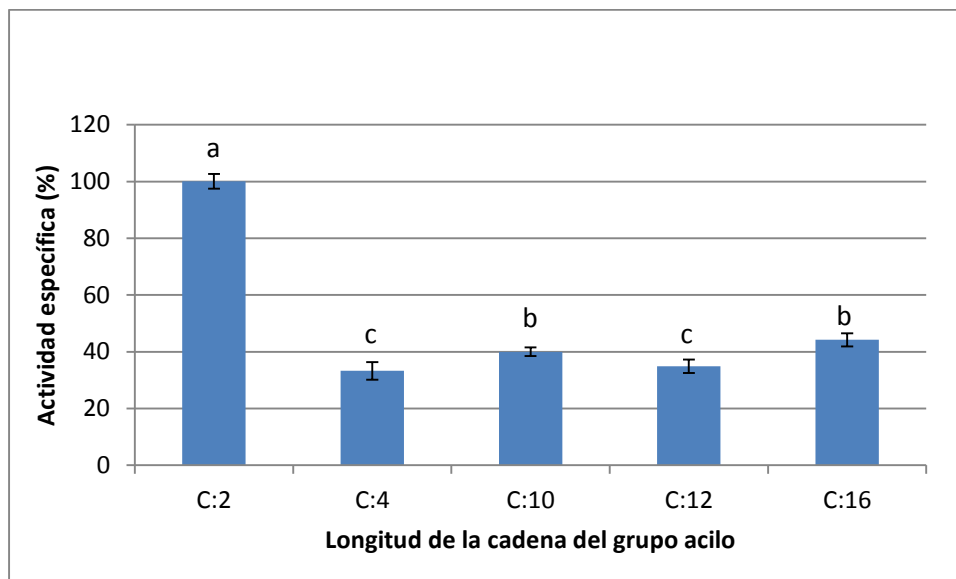


Figura 31. Especificidad de sustrato de *Enterococcus faecalis* (Cepa A) en extracto concentrado, hacia ésteres de *p*-nitrofenilo de diferente longitud de cadena.

En la figura 32 se puede observar que *Enterococcus faecium* (Cepa B) presentó mayor especificidad hacia el sustrato de cadena corta (C: 2) *p*-NA de igual forma estos datos concuerdan con la prueba en microplaca para actividad esterasa y la actividad detectada en el zimograma. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes sustratos mostrando semejanza entre ellas.

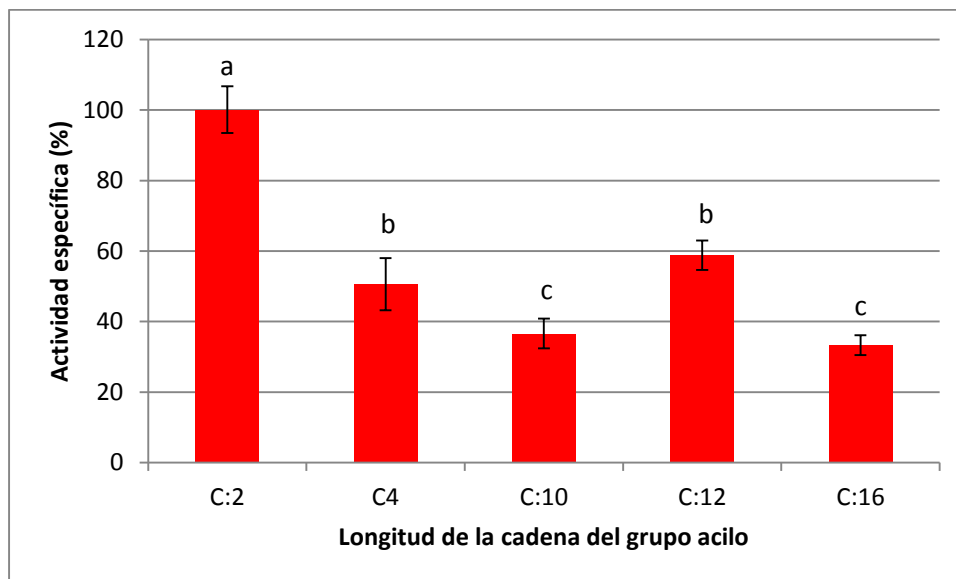


Figura 32. Especificidad de sustrato de *Enterococcus faecium* (Cepa B) en extracto concentrado, hacia ésteres de *p*-nitrofenilo de diferente longitud de cadena.

Mientras que en la figura 33, *Enterococcus faecium* (Cepa C) presentó especificidad hacia los ésteres de cadena corta (C: 4) *p*-NB y cadena media (C:10) *p*-NDe. Sin embargo, no dejó de presentar cierta actividad hacia el acetato de *p*-nitrofenilo como se mostró en la prueba de actividad esterasa en microplaca. Además estadísticamente se presentó una diferencia significativa entre los diferentes sustratos y su especificidad.

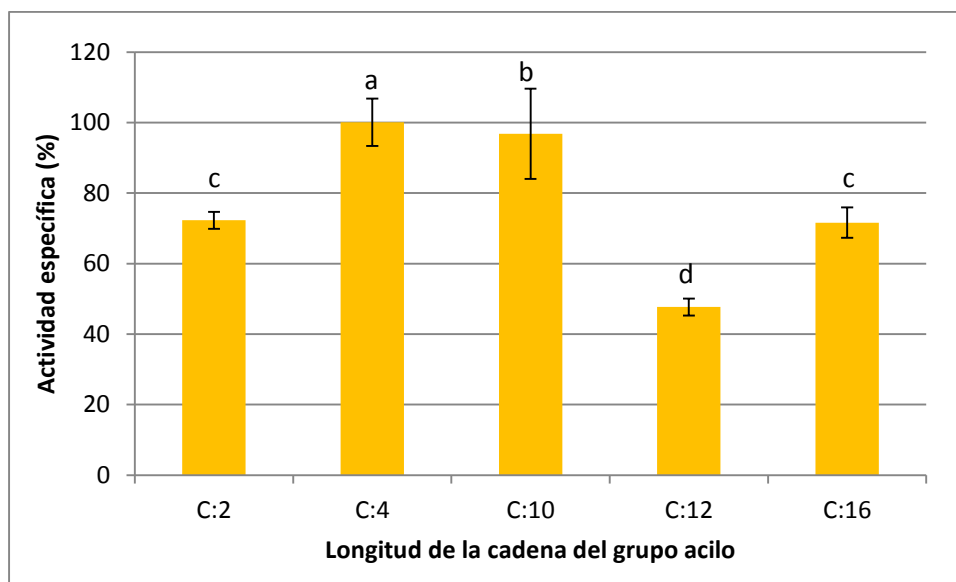


Figura 33. Especificidad de sustrato de *Enterococcus faecium* (Cepa C) en extracto concentrado, hacia ésteres de *p*-nitrofenilo de diferente longitud de cadena.

Los resultados de las Cepas A, B y C indican que las enzimas presentan actividad esterasa, puesto que no responde al comportamiento típico de las lipasas, que prefieren las cadenas largas (Macedo y Malcata, 1997). Mientras que en la figura 34 se observa que *Enterococcus faecium* (Cepa D) presentó mayor actividad hacia el sustrato de cadena corta (C:2) *p*-NA y (C: 4) *p*-NB. Estadísticamente se presentó diferencia entre los diferentes sustratos y su especificidad.

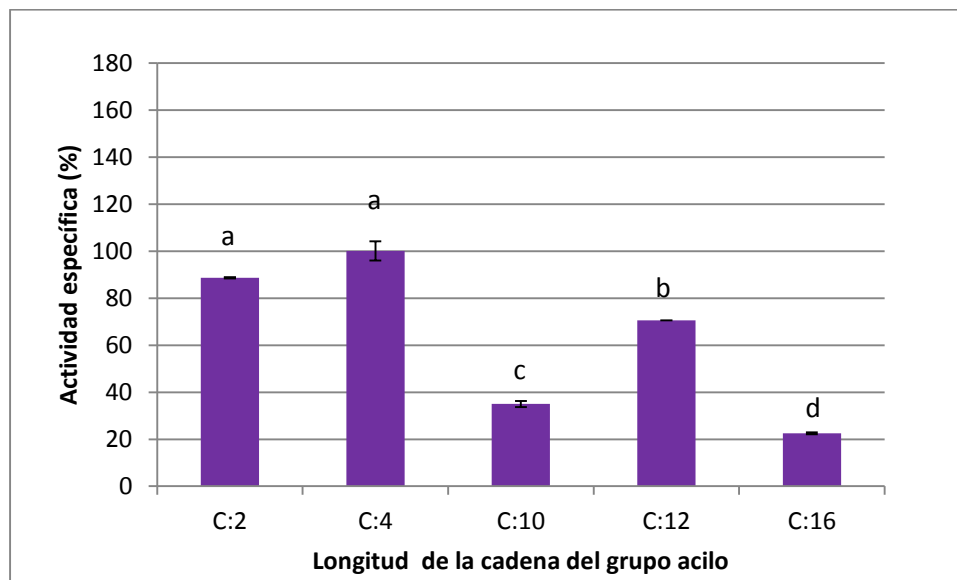


Figura 34. Especificidad de sustrato de *Enterococcus faecium* (Cepa D) en extracto concentrado, hacia ésteres de *p*-nitrofenilo de diferente longitud de cadena.

En la figura 35 se observa que *Enterococcus faecalis* (Cepa E) presentó una mayor actividad contra el sustrato de cadena media (C: 10) *p*-NDe, estadísticamente la actividad resultó diferente entre los sustratos, sin embargo se presentó semejanza entre ellas a excepción de C:10.

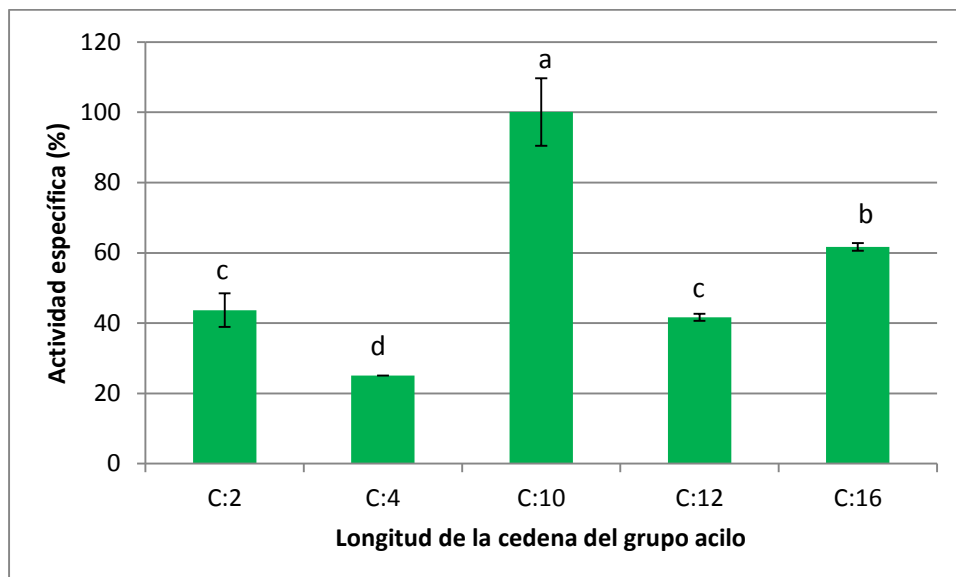


Figura 35. Especificidad de sustrato de *Enterococcus faecalis* (Cepa E) en extracto concentrado, hacia ésteres de *p*-nitrofenilo de diferente longitud de cadena.

En la figura 36 se observa que *Enterococcus faecalis* (Cepa G) presentó mayor actividad por el sustrato de cadena corta C:2 sin embargo estadísticamente presentó semejanza con el sustrato C:2 y C:12, mientras que para la actividad contra el sustrato de cadena media C:10 presentó menor especificidad.

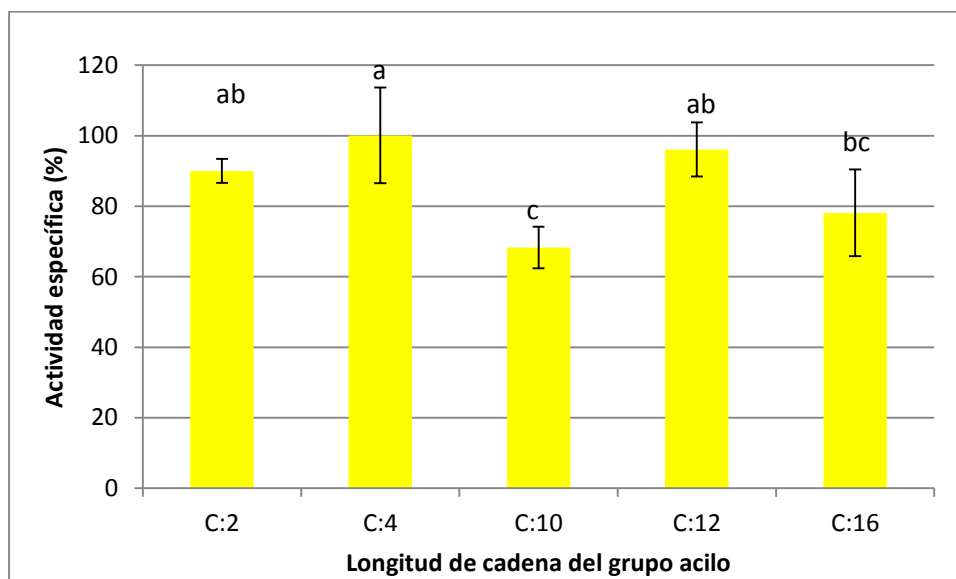


Figura 36. Especificidad de sustrato de *Enterococcus faecalis* (Cepa G) en extracto concentrado, hacia ésteres de *p*-nitrofenilo de diferente longitud de cadena.

En la figura 37 se observa que *Enterococcus faecalis* (Cepa I) presentó mayor actividad contra el sustrato de cadena corta (C: 2) *p*-NA, mientras que las demás presentaron semejanzas entre ellas.

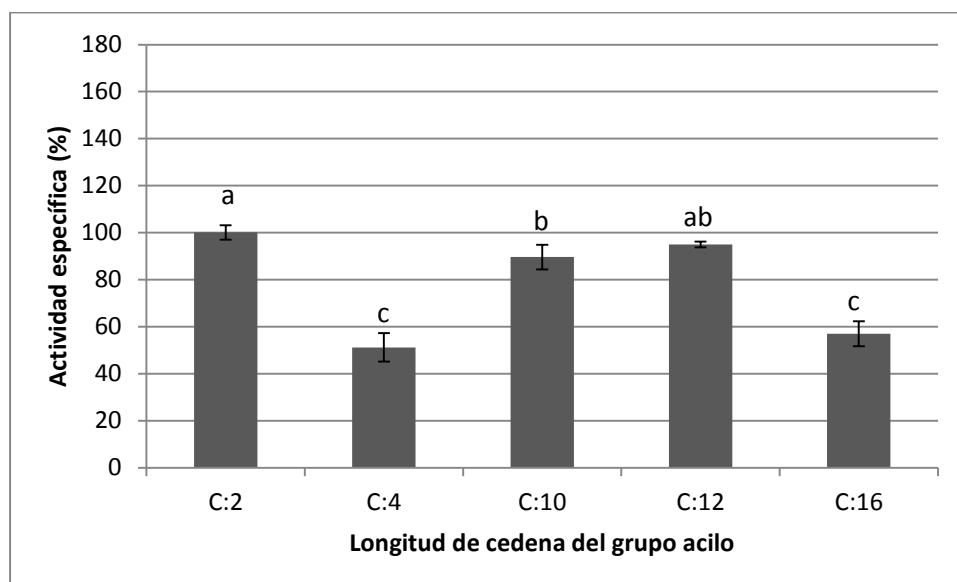


Figura 37. Especificidad de sustrato de *Enterococcus faecalis* (Cepa I) en extracto concentrado, hacia ésteres de *p*-nitrofenilo de diferente longitud de cadena.

En general las cepas presentaron diferencia por una mayor actividad hacia los sustratos de cadena corta, en un estudio realizado por Dovat *et al.*, (1970), Chander *et al.*, (1979) demostraron que la actividad lipolítica de los enterococos se reduce en presencia de compuestos de mayor tamaño molecular (por ejemplo, los ácidos grasos C: 3, C: 4, C: 6 y C: 10 estimularon la producción de lipasas, y que ácidos grasos de C: 12, C: 14, C: 16, C: 18 y C: 18:2 inhibieron esta producción de lipasas).

9.3 Determinación de actividad proteolítica

9.3.1 Estría radial en placas de medio ALD

Directamente de los gliceroles de las cepas se realizó una estría radial sobre placas con ALD las cuales fueron incubadas a 37 ° C durante 48 horas, esto con la finalidad de tener una prueba presuntiva en cuanto a la capacidad de actividad proteolítica que se esperaba de las cepas. Las siete cepas Figuras 38-44 presentaron halos traslúcidos alrededor de las colonias, lo que significa la hidrólisis de la caseína, sin embargo en las figuras 39, 41 y 42 se observó una mayor claridad las colonias y de los halos. Las imágenes fueron tomadas con un efecto negativo para mejorar la visibilidad de los halos.



Figura 38. Hidrólisis de caseína por la cepa: A



Figura 39. Hidrólisis de caseína por la cepa: B



Figura 40. Hidrólisis de caseína por la cepa: C



Figura 41. Hidrólisis de caseína por la cepa: D



Figura 42. Hidrólisis de caseína por la cepa: E



Figura 43. Hidrólisis de caseína por la cepa: G

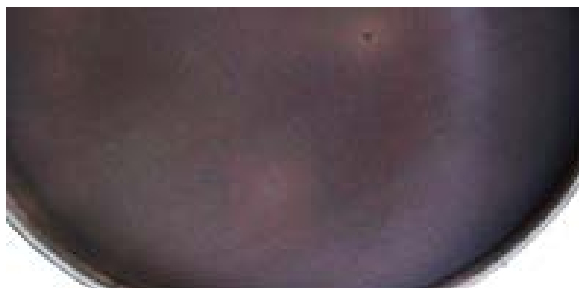


Figura 44. Hidrólisis de caseína por la cepa: I

9.3.2 Difusión en ALD

En la figura 45 y 46 se presenta la prueba en difusión en ALD incubadas a 29° C durante 24 horas con los sobrenadantes crudos de las diferentes cepas y un control positivo (Pronasa, Sigma), donde no se observaron halos de hidrólisis de la caseína, mientras que en la figura 47 y 48 se muestra la misma prueba pero con los sobrenadantes concentrados donde se logran observar halos de hidrólisis claros de todas las cepas. Sin embargo, sólo se encuentran pocos datos en la literatura con respecto al sistema proteolítico de los enterococos comparado con otras especies de BAL (Foulquié *et al.*, 2006).

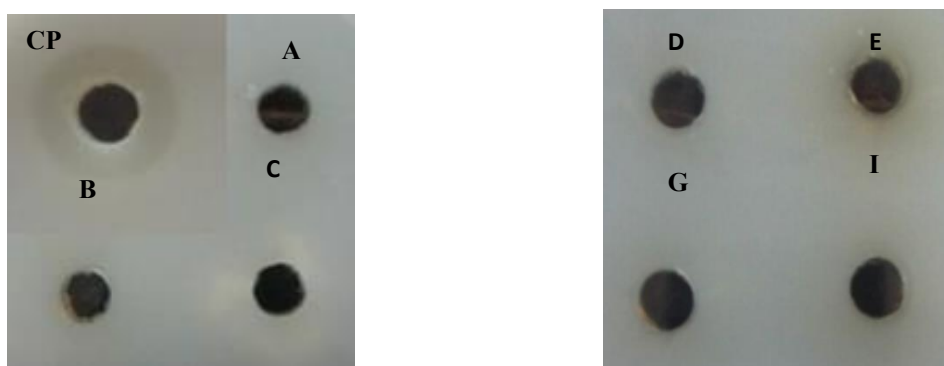


Figura 45 y 46. Difusión en ALD con los sobrenadantes crudos de las siete cepas de *Enterococcus faecium* y *faecalis*. y control positivo: CP Pronasa (SIGMA).

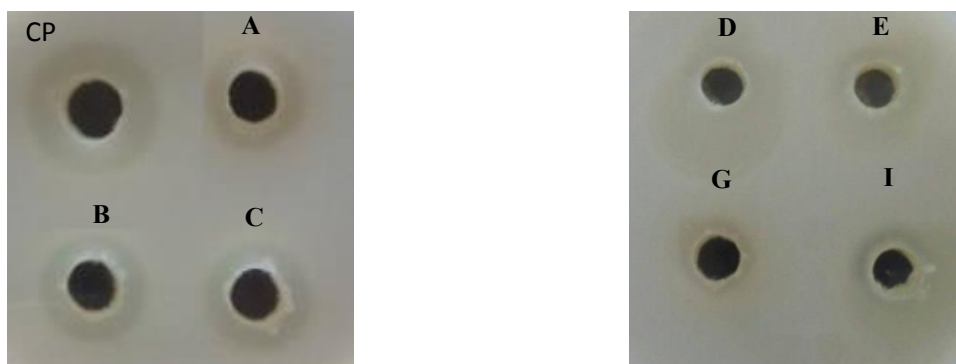


Figura 47 y 48. Difusión en ALD con los sobrenadantes concentrados de las siete cepas de *Enterococcus faecium* y *faecalis* y control positivo: CP Pronasa (SIGMA).

En la tabla 8 que se presenta a continuación se muestran los valores de actividad proteolítica específica producida por los sobrenadantes concentrados de cada una de las siete cepas de *Enterococcus* spp. en el medio ALD. Con la finalidad de tener una idea de la capacidad productora enzimática de las cepas y su pureza, se calculó la actividad específica relacionando el tamaño de halo con la cantidad de proteína colocada en cada pozo. Cabe mencionar que se colocó la misma cantidad de proteína.

Se puede observar que la muestra con mayor actividad es la cepa D, seguida de la cepa E y con menor actividad la cepa G.

Tabla 8. Actividad específica de las cepas de *Enterococcus* sp.

Cepa	Tamaño de halo (mm)	Proteína (mg)	Actividad específica (mm/mg)
A	5	0.329	15.19
B	5	0.305	16.39
C	5	0.314	15.92
D	10	0.372	26.88
E	7	0.339	20.64
G	4	0.329	12.15
I	6	0.355	16.90

9.3.3 Hidrólisis de caseína y perfil electroforético

La degradación de la caseína juega el principal papel en el desarrollo de la textura del queso. Además, algunos péptidos contribuyen a la formación de un buen sabor, sin embargo, algunos péptidos pueden aportar un sabor amargo indeseable en el producto final. También, se considera que la degradación secundaria de los aminoácidos tiene un gran impacto en el desarrollo del sabor del queso. Sin embargo, sólo se encuentran pocos datos en la literatura con respecto al sistema proteolítico de los enterococos comparado con otras especies de BAL (Foulquié *et al.*, 2006). Estas actividades son bajas en especies del género *Enterococcus*, con excepción de cepas de *Enterococcus faecalis* (Arizcun *et al.*, 1997; Macedo *et al.*, 1997; Suzzi *et al.*, 2000; Andrighetto *et al.*, 2001).

Para evaluar la capacidad proteolítica de las cepas de estudio, se realizó la siguiente prueba donde se colocó 1 mL de leche descremada estéril en tubos eppendorf de 1.5 mL y se inocularon con el volumen correspondiente a 200 µg de proteína del sobrenadante concentrado con la finalidad de observar un perfil de proteínas que serían hidrolizadas por las enzimas del sobrenadante de cada cepa de *Enterococcus spp.* monitoreado a las 24 y 48 horas. Comparando el control negativo: CN (perfil de proteínas de la leche descremada) con el perfil de las muestras inoculadas. También se colocó un control positivo: CP (Pronasa Sigma). Como se muestra en la figura 49 todas las cepas presentaron hidrólisis de caseína, siendo las de mayor hidrólisis de caseína las cepas A, D y G para ambos casos, es decir a 24 y 48 horas y las de menor hidrólisis de caseína las cepas E, B, I y C. cabe resaltar que la hidrólisis se vio mucho mayor a las 48 horas de incubación. En el perfil electroforético (figura 50) resalta a la vista dos bandas intensas en todos los carriles del gel por arriba de los 30 kDa que podrían corresponder a asociaciones de α_1 y α_2 , las cuales presentarían pesos moleculares de 37.1 y 38.7 respectivamente (Eck, 1990). Corroborando la figura 46, donde a las 24 horas se observó poca diferencia entre el control negativo y las muestras, mientras que en el perfil electroforético a las 48 horas la diferencia entre el control negativo y las muestras es mucho más notoria la degradación de bandas que van de 14 a 31 kDa, sin embargo se siguen observan bandas por debajo de los 20 kDa que probablemente sean segmentos de la hidrólisis de las caseínas.

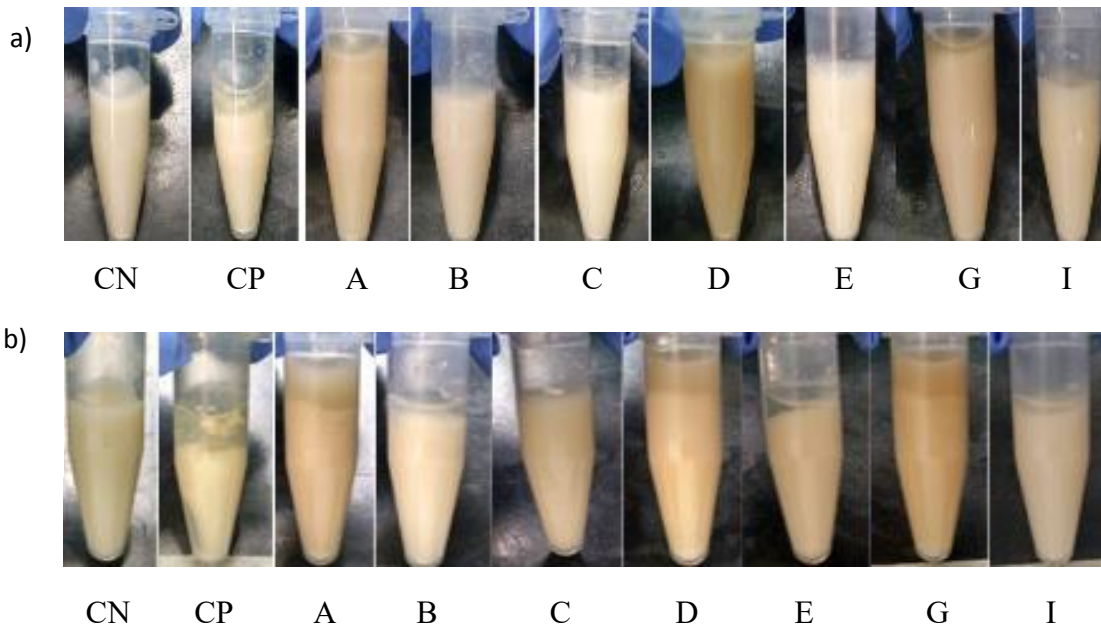


Figura 49. Prueba de hidrólisis de caseína en tubos eppendorf. a) Incubados a 29 °C durante 24 horas, b) incubados a 29 °C durante 48 horas.

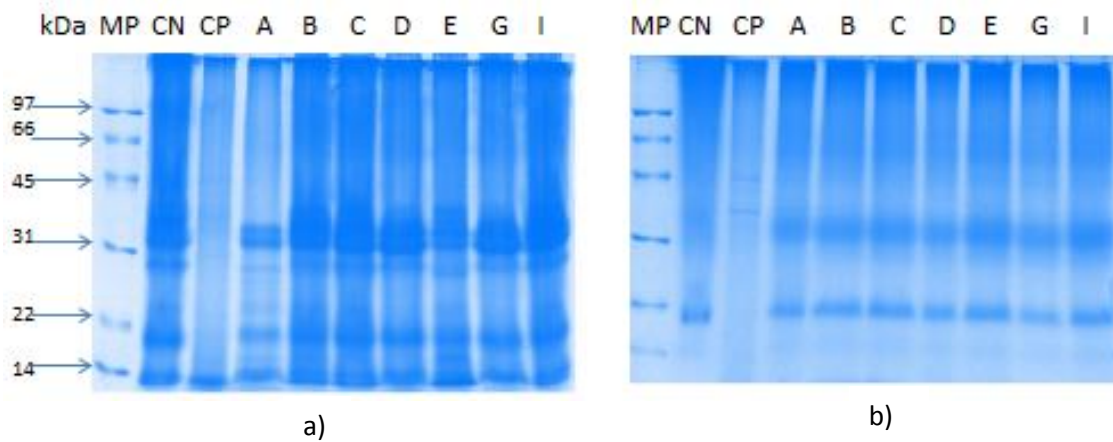


Figura 50. Perfil electroforético en gel SDS -PAGE teñido con azul de coomasie. Marcador de peso molecular: MP; Control negativo: CN; Control positivo: CP. a) hidrólisis de caseína a las 24 horas. b) hidrólisis de caseína a las 48 horas.

9.3.4 Prueba cuantitativa de hidrólisis de Azocaseína

Con base en los resultados cualitativos de actividad proteolítica se decidió hacer una prueba para cuantificar dicha actividad en cada una de las cepas en estudio.

Se usó como sustrato azocaseína porque la caseína es la principal proteína que se encuentra en la leche y ésta es la principal materia prima para la elaboración del queso Cotija.

En la tabla 9 se muestran los resultados con una actividad proteolítica baja en comparación a una proteasa comercial (Pronasa, Sigma) la cual presenta un valor 0,047 U/mg.

Cabe resaltar que la cepa con mayor actividad proteolítica fue la cepa E, seguida de la cepa D e I.

Tabla 9. Actividad proteolítica específica de cepas de *Enterococcus spp.* utilizando como sustrato azocaseína.

Cepa	U/mg proteína
Pronasa	0,047
A	$1,4 \times 10^{-3}$
B	$4,6 \times 10^{-3}$
C	$3,0 \times 10^{-3}$
D	$8,9 \times 10^{-3}$
E	$9,2 \times 10^{-3}$
G	$1,2 \times 10^{-3}$
I	$6,6 \times 10^{-3}$

10. Conclusiones

Se sabe que el género de *Enterococcus*, a pesar de pertenecer al grupo de las BAL, no se caracterizan por ser microorganismos proteolíticos ni lipolíticos, además de no ser un género predominante dentro de la microbiota del queso Cotija artesanal. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos en esta investigación podemos decir que las cepas de *Enterococcus* especies *faecium* y *faecalis*, aisladas del queso Cotija artesanal tienen actividad enzimática para hidrolizar sustratos como lo son ácidos grasos de cadena corta: acetato y butirato, así como capaces de hidrolizar la caseína, proteína principal de este alimento a una temperatura similar a la temperatura de su proceso de maduración.

Por lo tanto las cepas que fueron estudiadas podrían contribuir al desarrollo de las características organolépticas finales del queso Cotija aunque quizá no son los principales microorganismos encargados de las características finales de dicho producto.

Estas cepas presentan potencial biotecnológico, sin embargo es necesario optimizar las condiciones para la obtención de las enzimas de interés.

11. Perspectivas

Quedan como perspectivas de este trabajo determinar el peso molecular de las enzimas producidas por las cepas de *Enterococcus spp.* aisladas de queso Cotija artesanal madurado, en geles de electroforesis desnaturalizantes e identificación mediante el sistema LC-MS/MS (Cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem).

Por otro lado realizar la caracterización bioquímica de las enzimas y comprobar su potencial biotecnológico mediante la inoculación de las mismas en algún alimento fermentado o producto.

Optimizar las condiciones de producción de las enzimas a nivel matraz.

Anexos

Anexo 1. Conservación de cepas

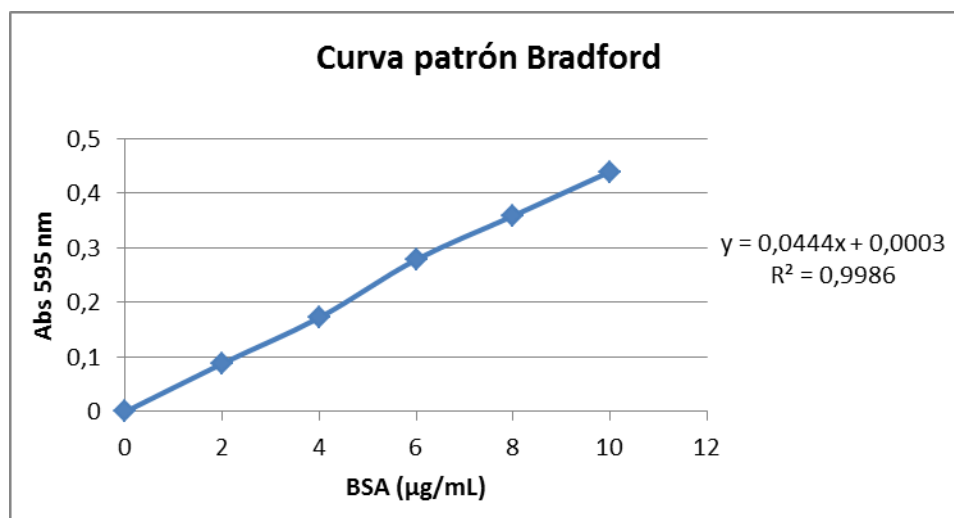
1. Se tomaron 500 μ L del medio líquido de la cepa previamente reactivada y se colocaron en un matraz con 10 mL de caldo MRS.
2. Se incubaron los matraces a 37 °C con agitación de 250 rpm durante 8 horas.
3. Se centrifugaron los 10 mL de medio a 10, 000 rpm durante 10 minutos y posterior a eso se desechó el sobrenadante.
4. Al pellet obtenido se le agregaron 2 mL de solución salina 0.85 % (pH neutro).
5. En tubos eppendorff estériles con capacidad de 1.5 mL se colocaron 800 μ L pellet resuspendido y 200 μ L de glicerol al 15 %.
6. La mezcla se homogenizó en vortex y se distribuyó en tubos para criopreservación.
7. Los tubos se conservaron en ultracongelador a – 70°C.

Anexo 2. Curva patrón BSA

1. A partir de un stock de BSA de 1.42 mg/mL se preparó un segundo stock de 100 µg/mL.
2. A partir del segundo stock (100 µg/mL) se preparó la siguiente curva por duplicado.

Tubo No.	Stock 2 (µL)	Agua destilada (µL)	(BSA) (µg/mL)
1	0	800	0
2	16	784	2
3	32	768	4
4	48	752	6
5	64	736	8
6	80	720	10

3. Adicionar 160 µL de muestra en cada pozo (microplaca de 96 pozos) y 40 µL del reactivo de Bradford y mezclar evitando crear burbujas. Colocar un blanco con agua destilada.
4. Esperar alrededor de 5 minutos.
5. Leer absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas (Espectro Biomate).
6. Graficar para obtener la curva patrón y los valores de la pendiente y ordenada al origen.



Anexo 3. Componentes del medio AT Y ALD

Medio AT

Para preparar 1 litro de este medio se agregaron los siguientes reactivos

Cantidad	Reactivo
10 g	Bactotripton
5 g	Extracto de levadura
10 g	Cloruro de sodio
10 mL	Tributirina
5 mL	Glucosa 20%
15 g	Agar
1 L	Agua destilada

Preparación

1. Se mezcló la bactotripton, el extracto de levadura, cloruro de sodio y la tributirina en agua destilada y por último se le ajustó el pH a 7.5.
2. Se emulsificó la tributirina con el ultraturax en velocidad mínima durante 2 minutos.
3. Posteriormente se agregó el agar y se disolvió.
4. Se esterilizó el medio en autoclave (121° C, 15 min).
5. Se dejó enfriar el medio y se añadió la glucosa previamente esterilizada en autoclave (121° C, 3 min).
6. Se homogenizó la glucosa y se distribuyó en cajas Petri.

Medio ALD

Para preparar 1 L del medio se necesitaron los siguientes reactivos

Cantidad	Reactivo
15 g	Leche Descremada
15 g	Agar
1 L	Agua destilada

Preparación:

1. Se agrega la leche descremada a la mitad del volumen de agua y se esteriliza en autoclave (121° C, 3 min).
2. Esterilizar aparte el agar en la mitad de agua sobrante (121° C, 15 min).
3. Una vez estériles las dos soluciones se procede a mezclar y distribuir en cajas Petri.

Anexo 4. Electroforesis

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, mediante su peso, bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por *Tiselius* en el año de 1937. *Raymond* y *Weintraub* en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como *Davis* y *Ornstein*. El dodesil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de las proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (García, 2000).

Fundamentos de la electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos – y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece al medio (García, 2000).

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas.

En el punto isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo (Nochumsons, 1985).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en la electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro (Campell, 1995).

Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Se trata de un tipo de electroforesis en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturiza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas (García, 2000).

Electroforesis nativa

Una electroforesis nativa es aquella que somete a las proteínas a migración sin desnaturización. En este caso las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantiene en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos (García, 2000).

Anexo 5. Preparación de reactivos para geles

- Acrilamida (30% T, 2.67% C)

87.6 g de acrilamida (29.2 g/100 mL)

2.4 g N'N'- bis-metilen-acrilamida (0.8 g/100 mL)

Llevar a un volumen total de 300 mL agua desionizada y almacenar a 4°C.

- SDS 10% (p/v)

Disolver 10g de SDS en 90 mL de agua y llevar a 100 mL agua desionizada.

- Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8

27.23g Tris base (18.15g/100mL)

80 ml de agua desionizada

Ajustar pH 8.8 con HCl 6 N, llevar a un volumen total de 150 mL con agua desionizada y almacenar a 4°C.

- Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8

6g DE Tris base

60 ml de agua desionizada

Ajustar pH 6.8 con HCl 6 N, llevar a un volumen total de 100 mL con agua desionizada y almacenar a 4°C.

- APS 10% (p/v). Pesar 100g de persulfato de amonio y disolver en 1 mL de agua desionizada.

- Buffer de carga 4x

Para un volumen final de 9.5 mL, mezclar 1.25 mL de Tris HCl 0.5 M, 2.5 mL de glicerol puro, 2.0 mL de SDS 10% (p/v) y 0.2 mL de azul de bromofenol 0.5% (previamente disueltos en etanol).

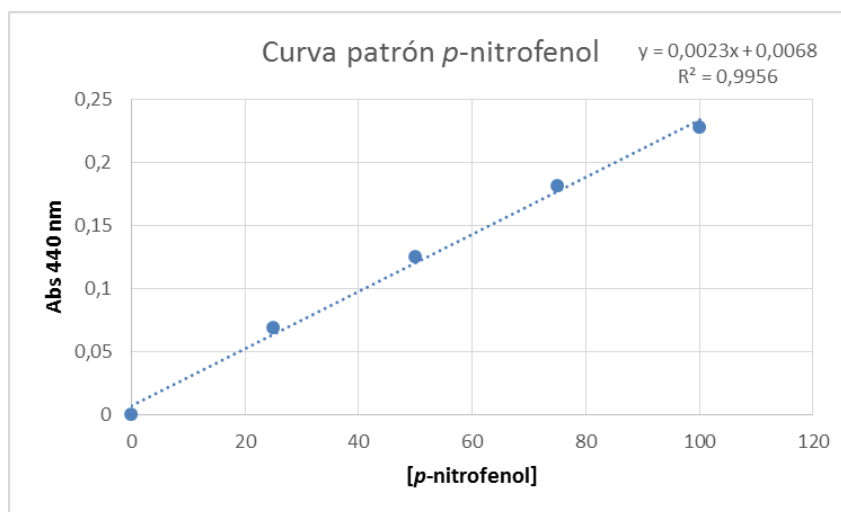
Hacer alícuotas de 950 μ L en tobos eppendorf y añadir 50 μ L de betamercapto etanol.

Anexo 6. Curva de *p*-nitrofenol

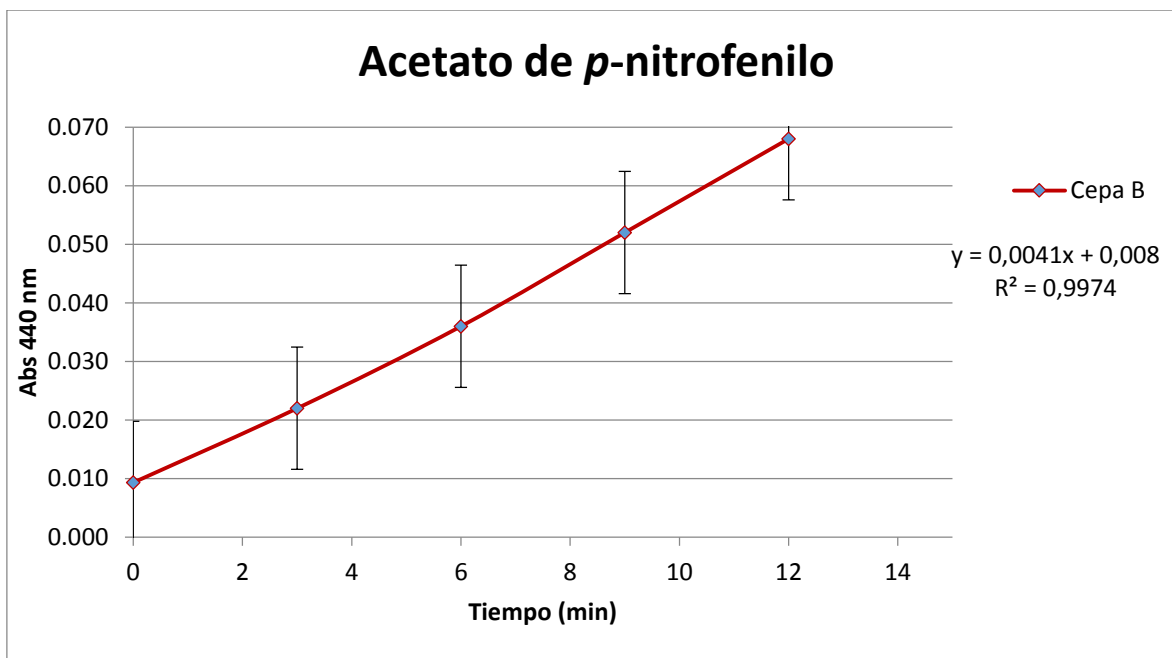
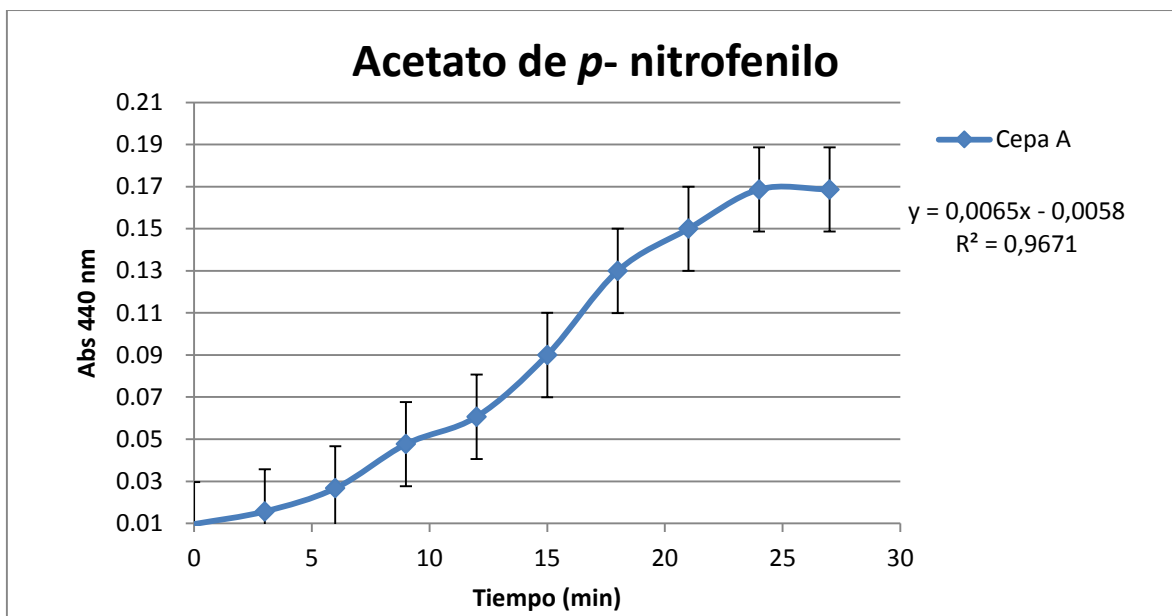
1. Se preparó un stock de *p*-nitrofenol de concentración 1 mM. Se pesaron 0.139 mg de *p*-nitrofenol y se disolvió en 1 mL de alcohol absoluto.
2. A partir del stock anterior se preparó la siguiente curva patrón por triplicado.

Tubo No.	Stock 2 (μL)	Agua destilada (μL)	[<i>p</i> -nitrofenol] (mM)
1	0	200	0
2	5	195	25
3	10	190	50
4	15	185	75
5	20	180	100

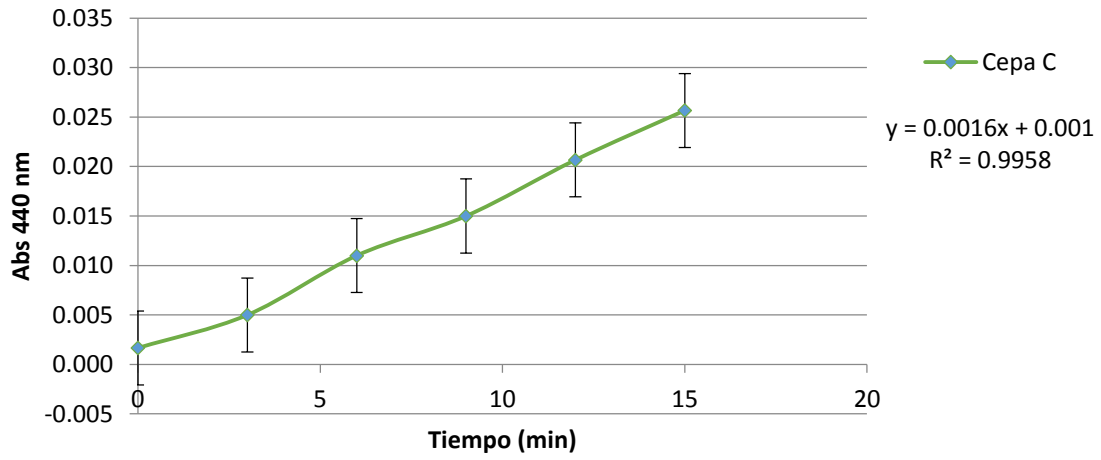
3. Adicionar 20 μL del buffer pH 7.5, 0.5 M, 20 μL de sustrato, 90 μL de agua destilada y 20 μL de extracto enzimático concentrado en cada pozo (microplaca de 96 pozos) evitando crear burbujas. Colocar un blanco con todo menos la muestra pero si el medio.
4. Leer absorbancia a 420 nm en el lector de microplacas (Espectro Biomate).
5. Graficar para obtener la curva patrón y los valores de la pendiente y ordenada al origen.



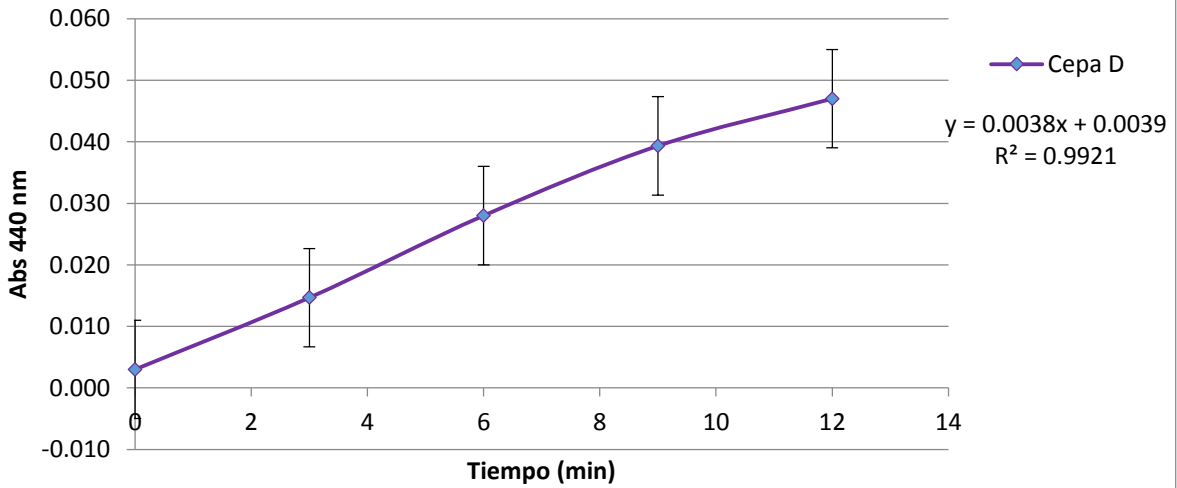
Anexo 7. Cinéticas de especificidad de sustrato con ésteres de *p*-nitrofenilo

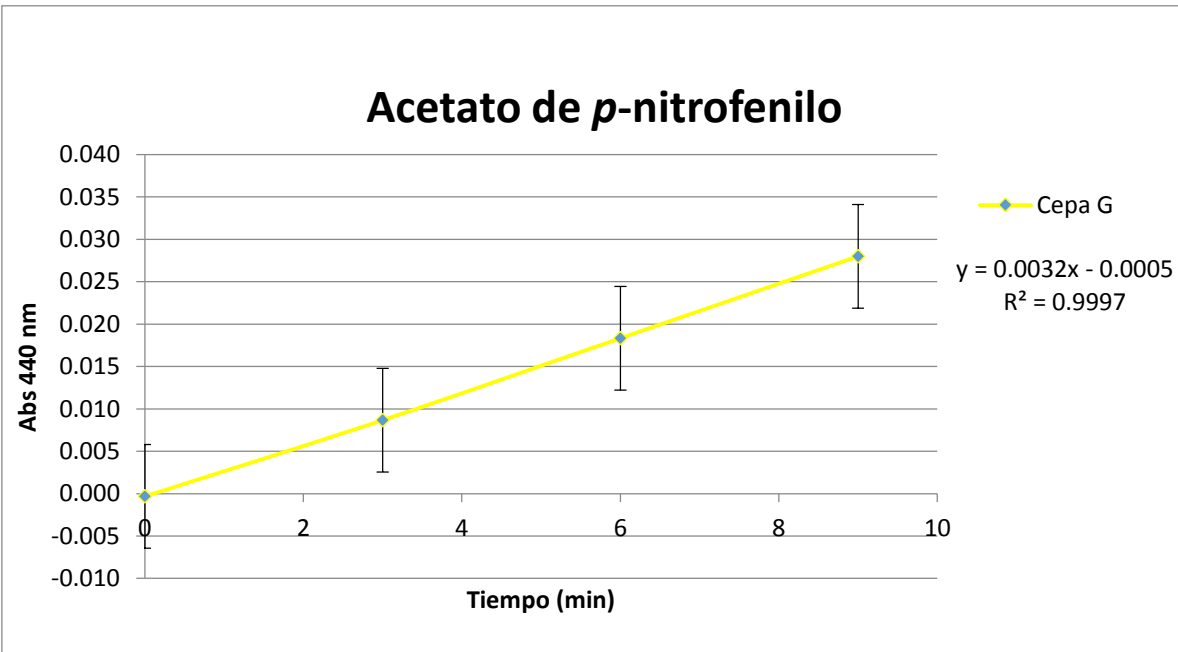
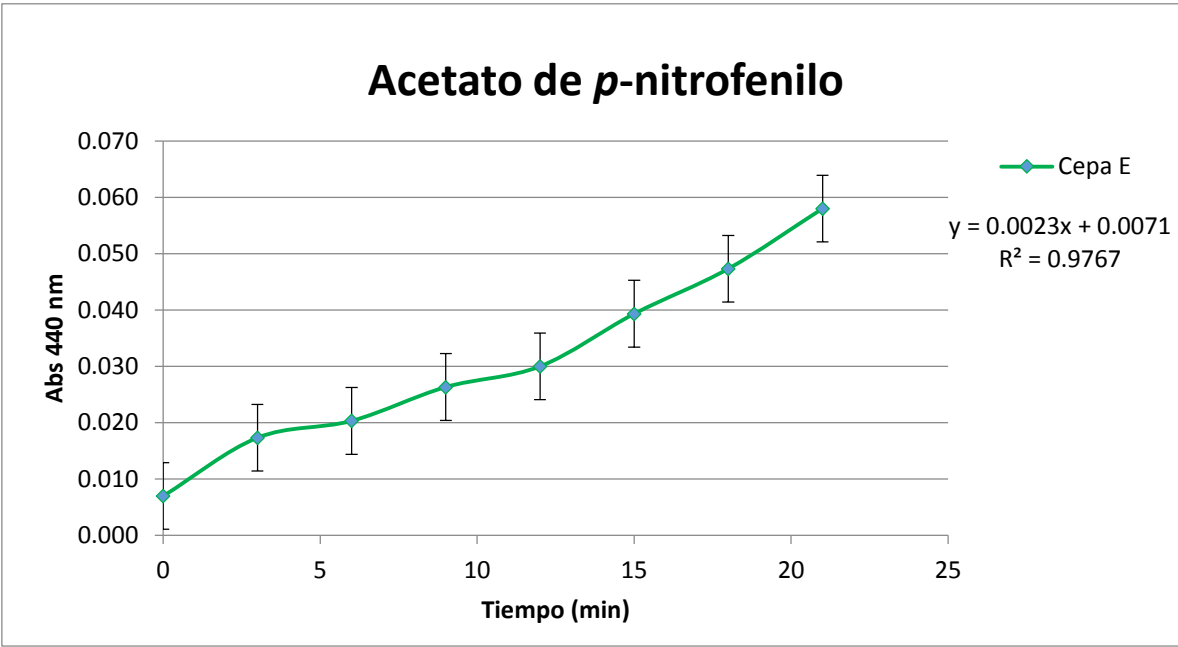


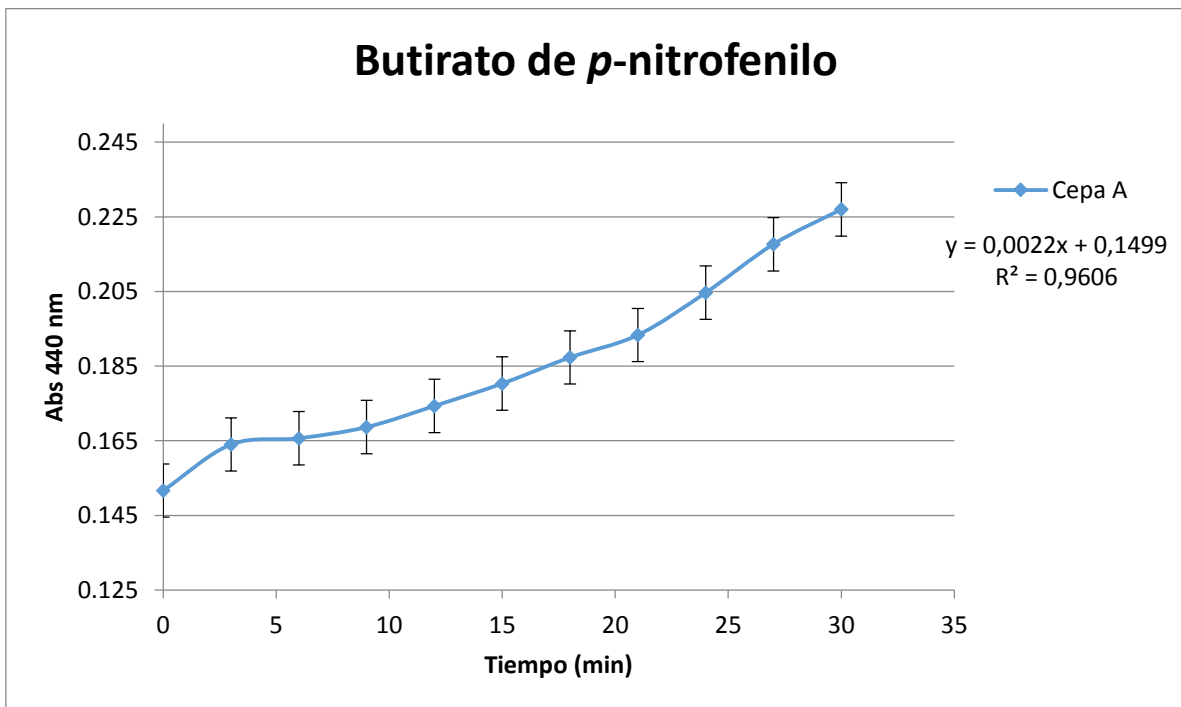
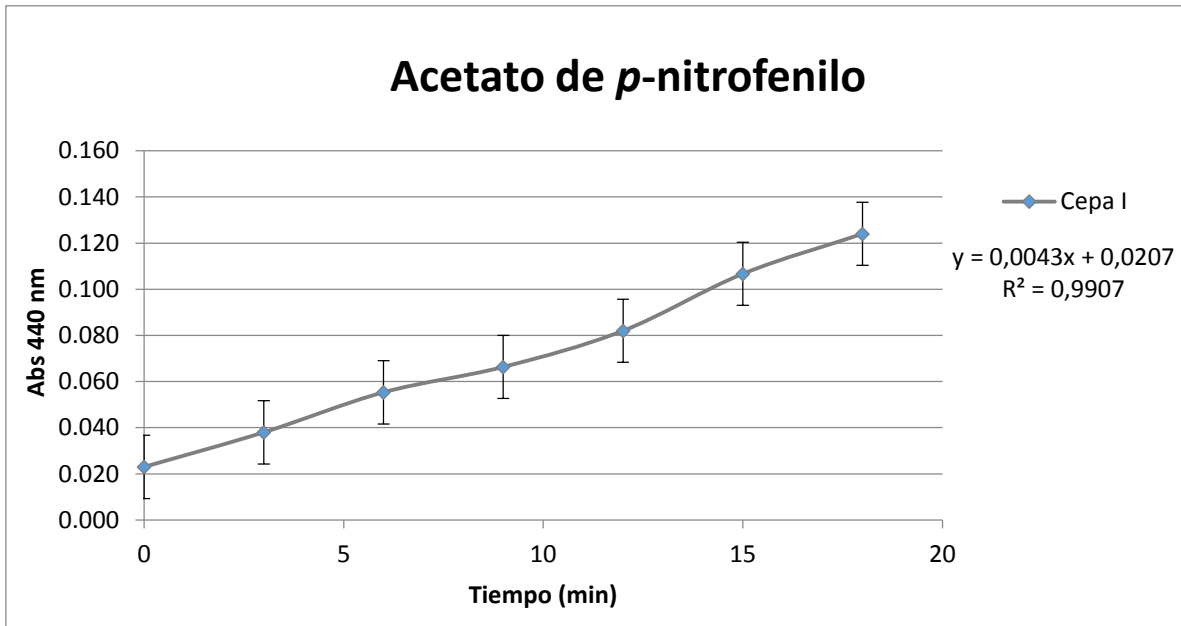
Acetato de *p*-nitrofenilo



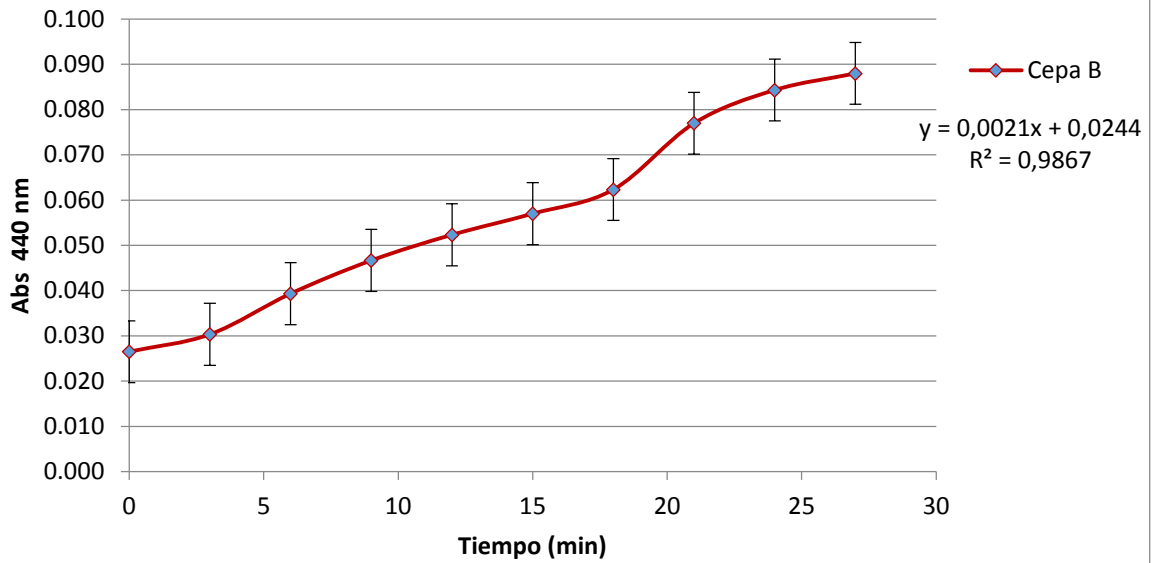
Acetato de *p*-nitrofenilo



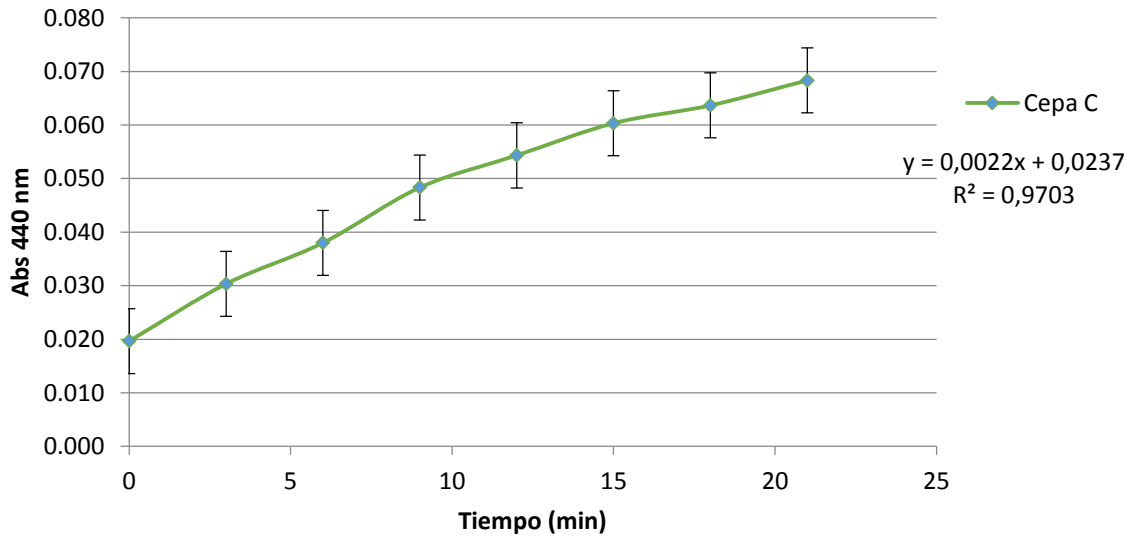


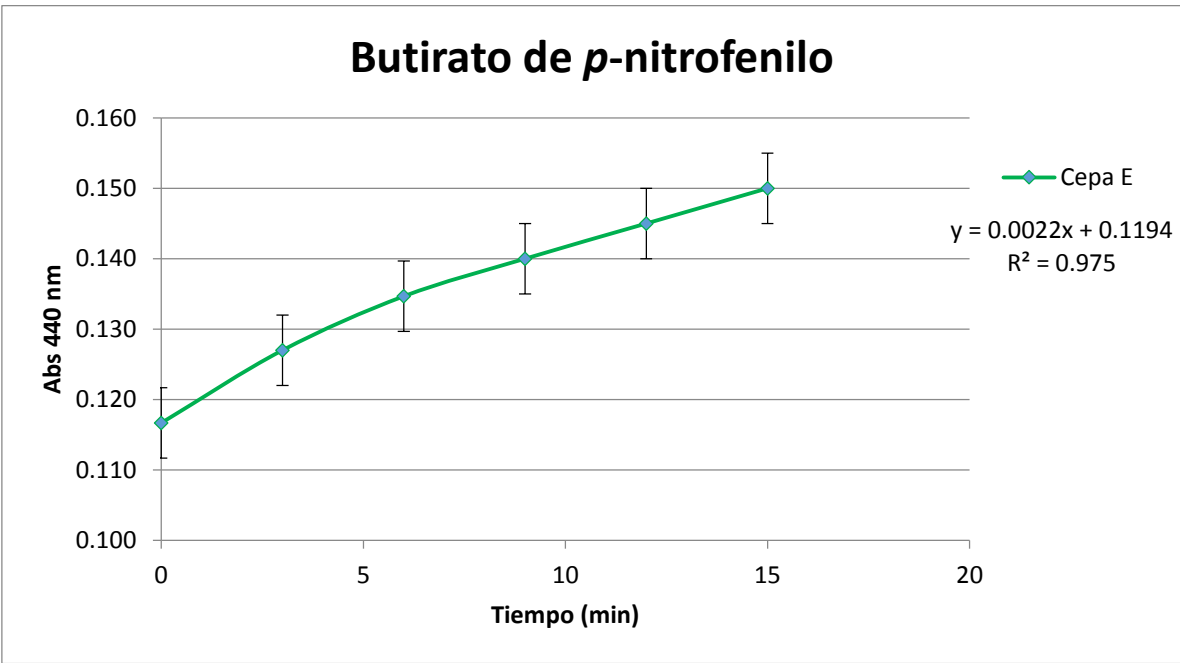
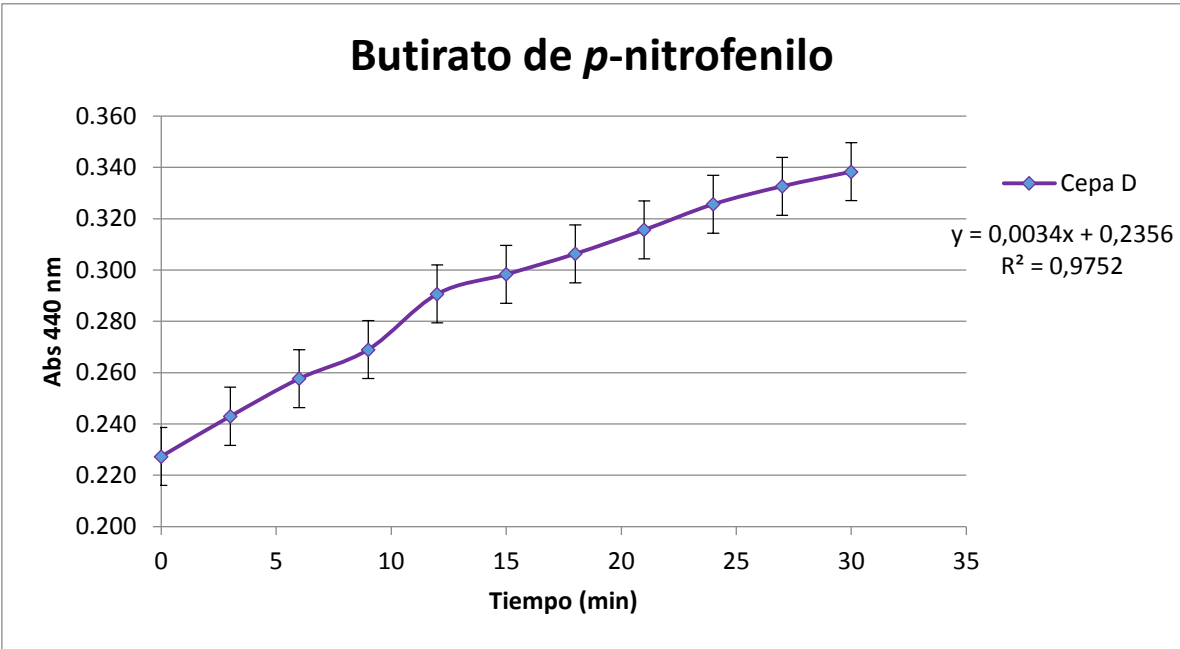


Butirato de *p*-nitrofenilo

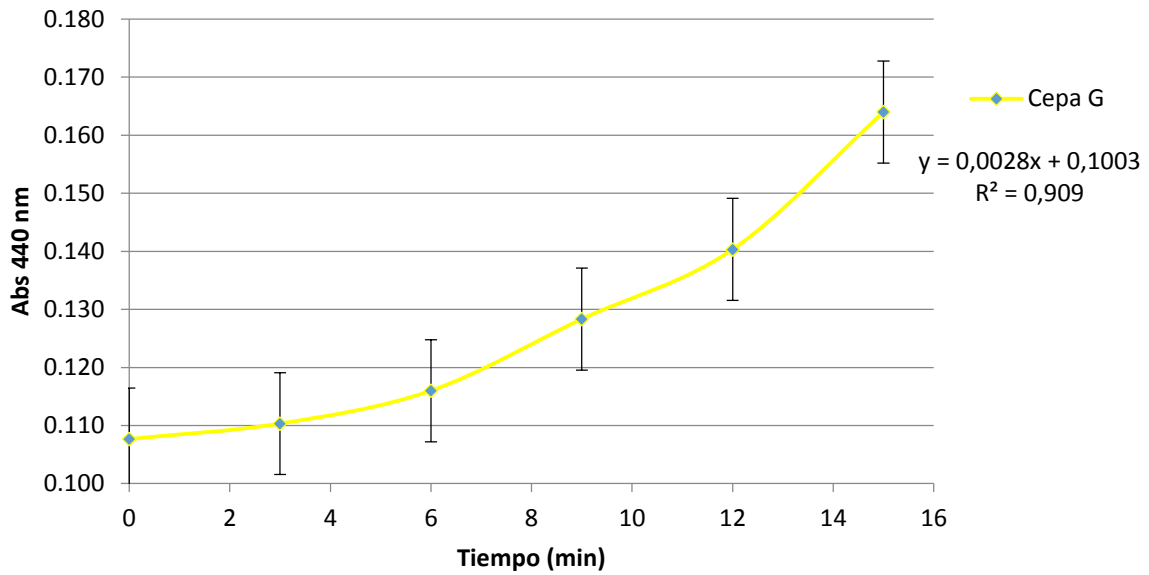


Butiratode *p*-nitrofenilo

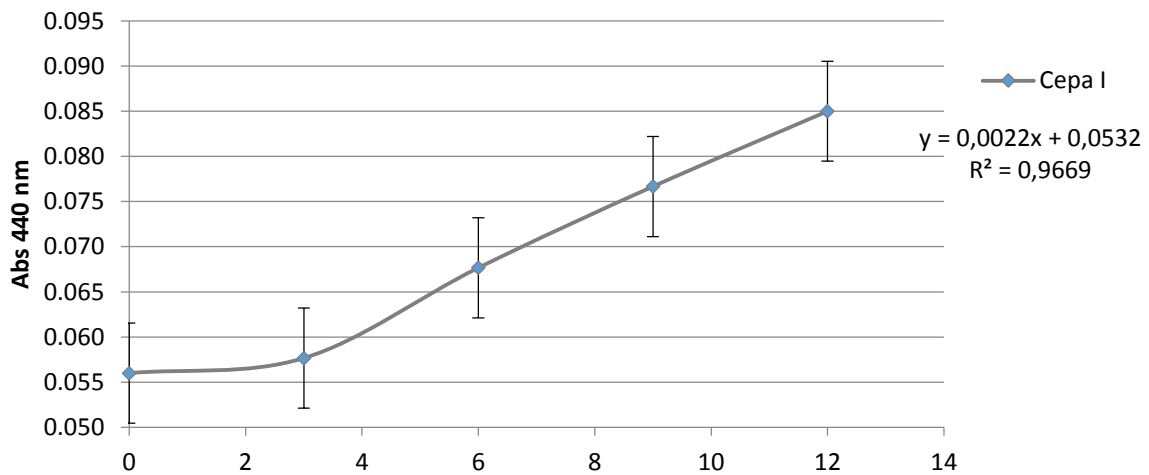


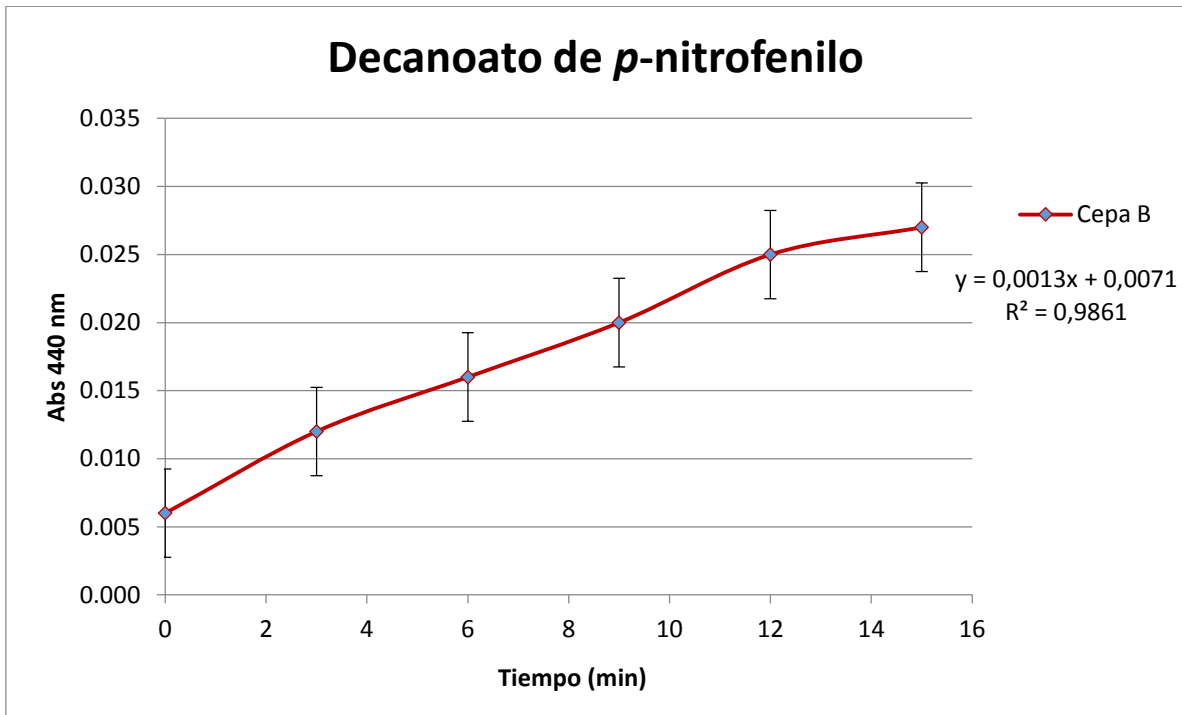
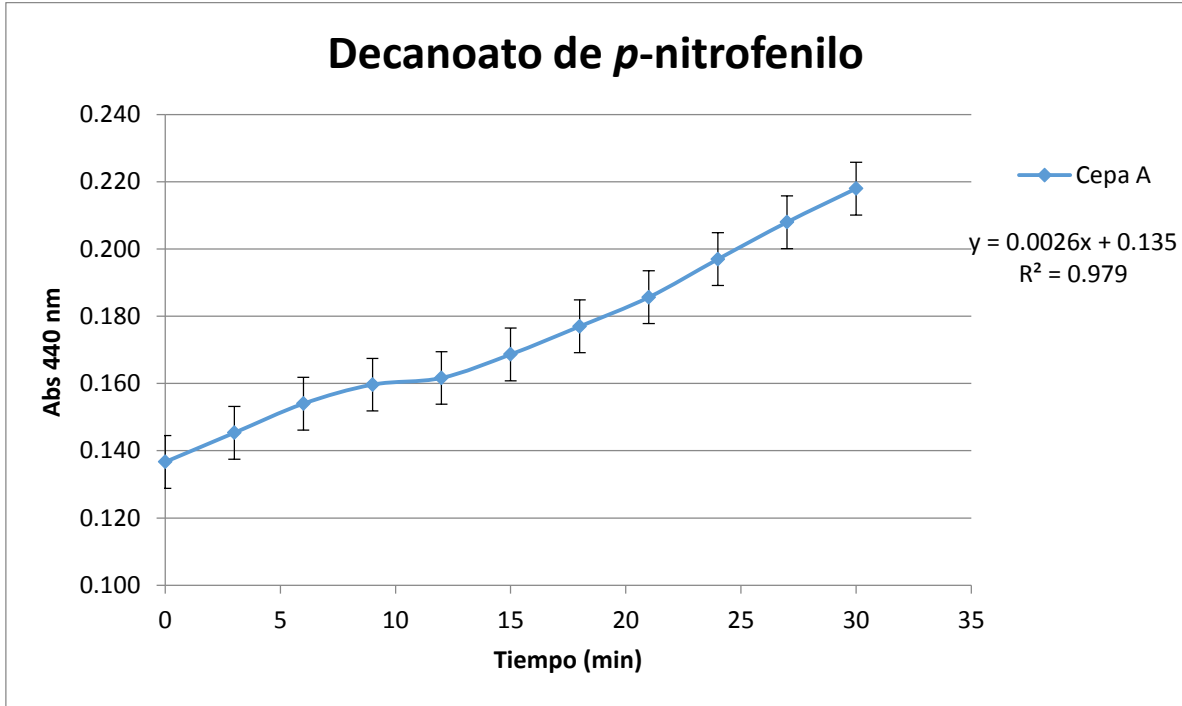


Butirato de *p*-nitrofenilo

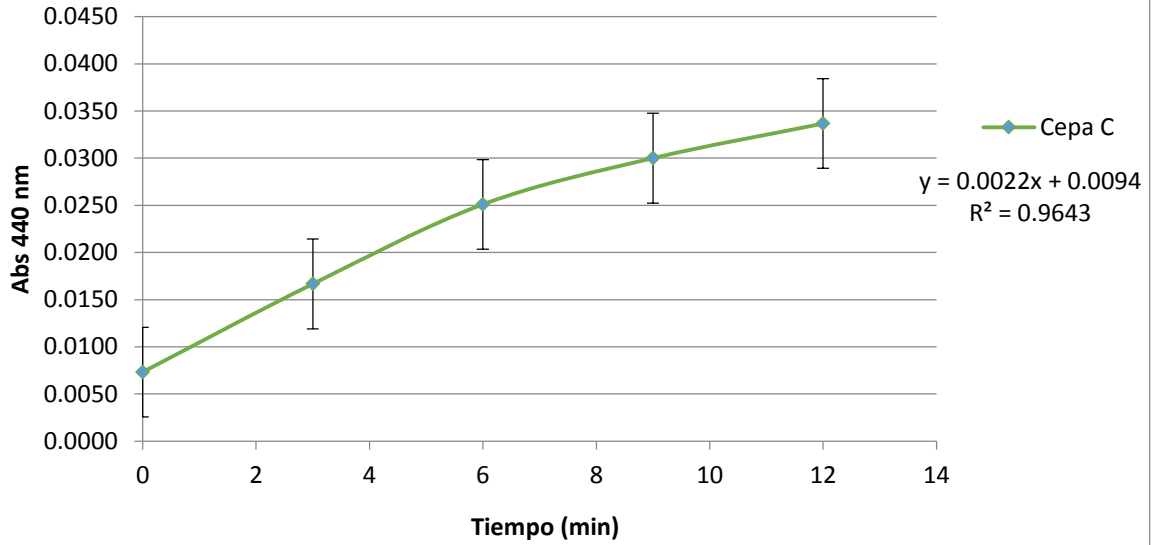


Butirato de *p*-nitrofenilo

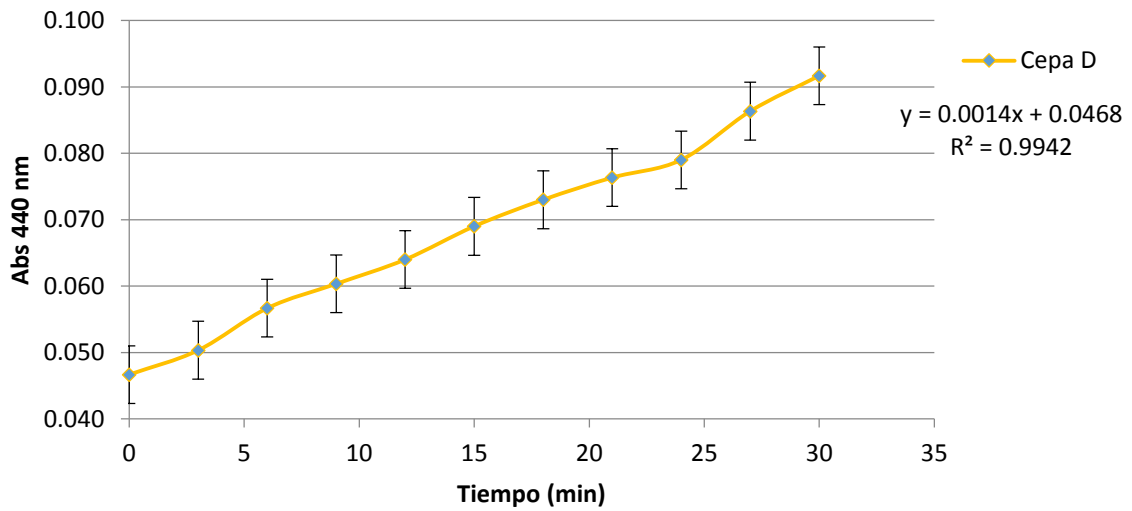




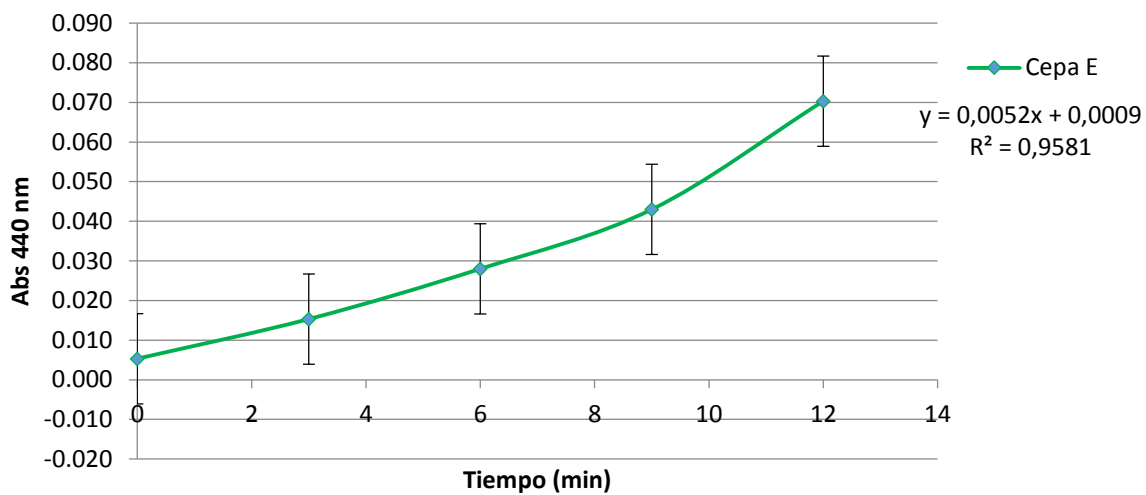
Decanoato de *p*-nitrofenilo



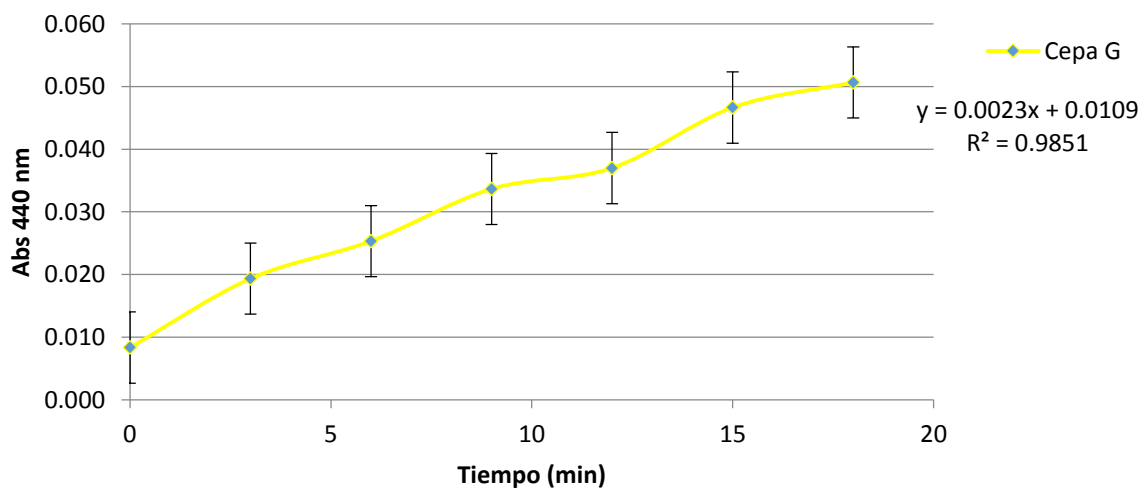
Decanoato de *p*-nitrofenilo

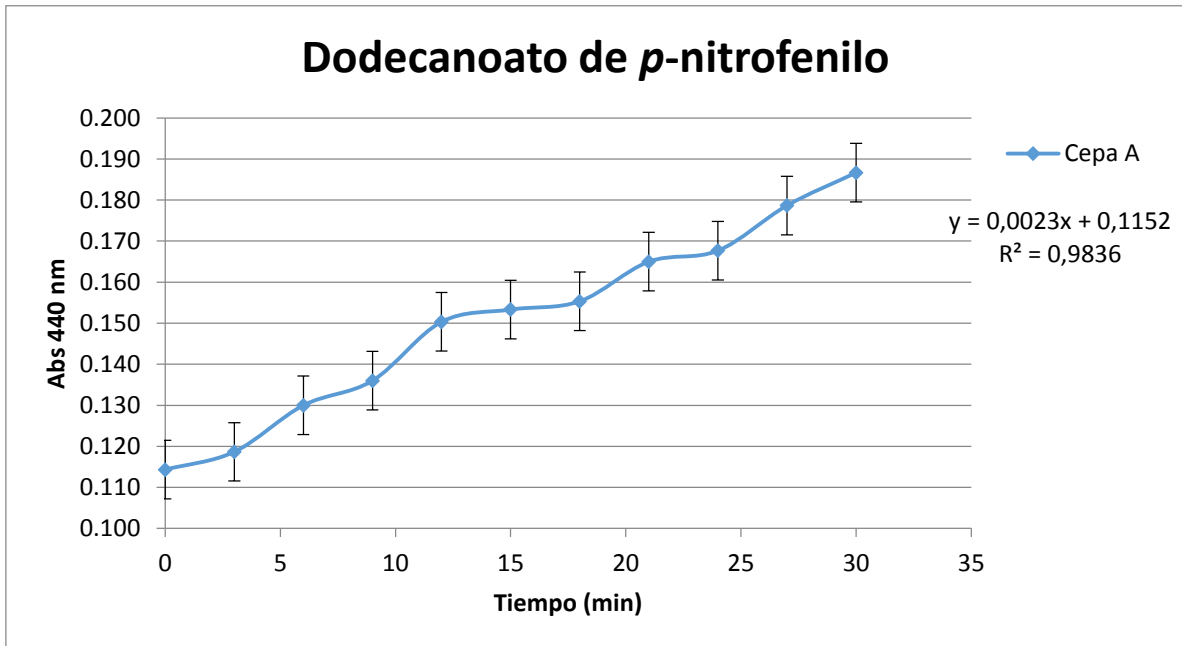
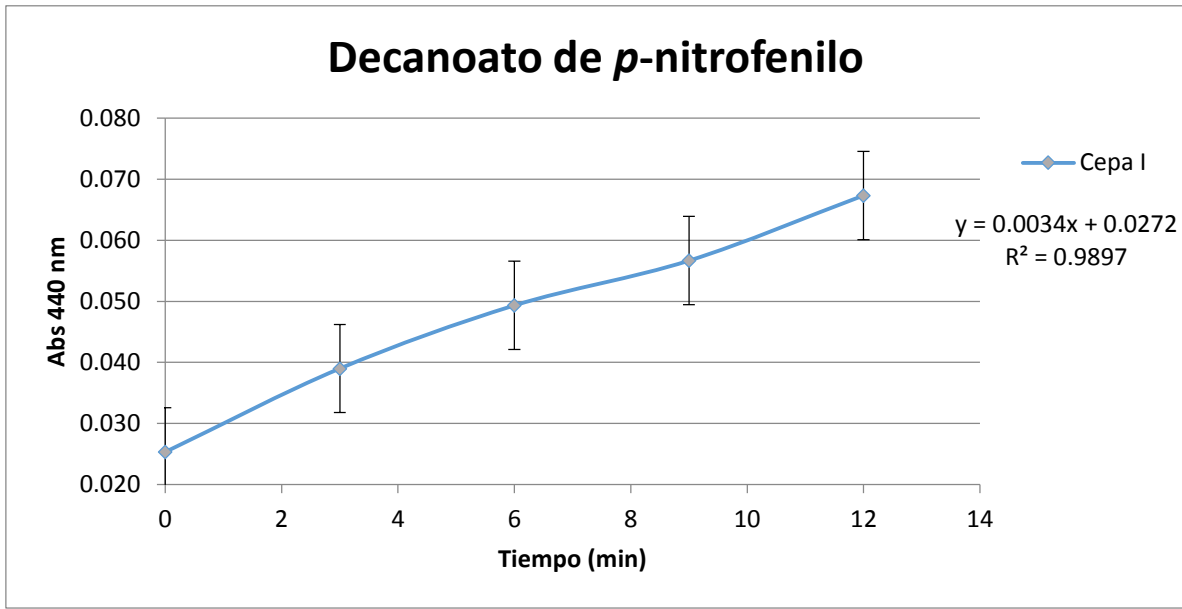


Decanoato de *p*-nitrofenilo

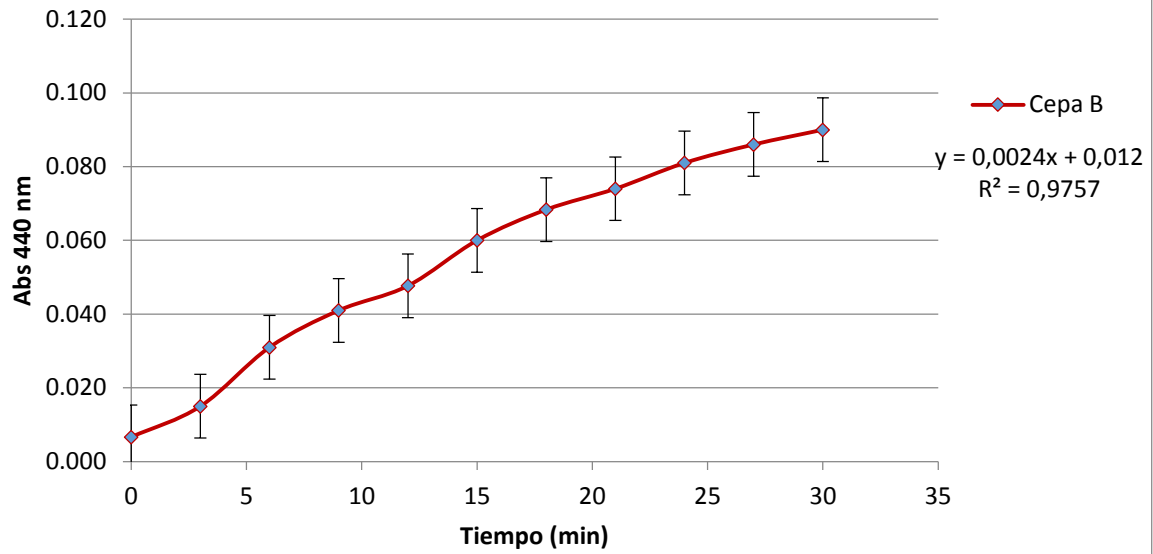


Decanoato de *p*-nitrofenilo

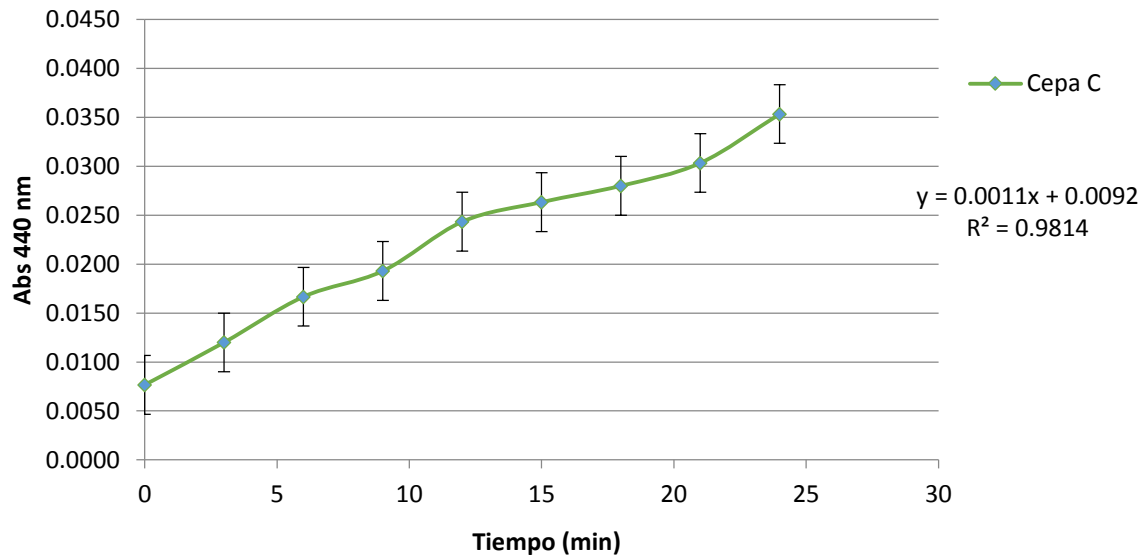




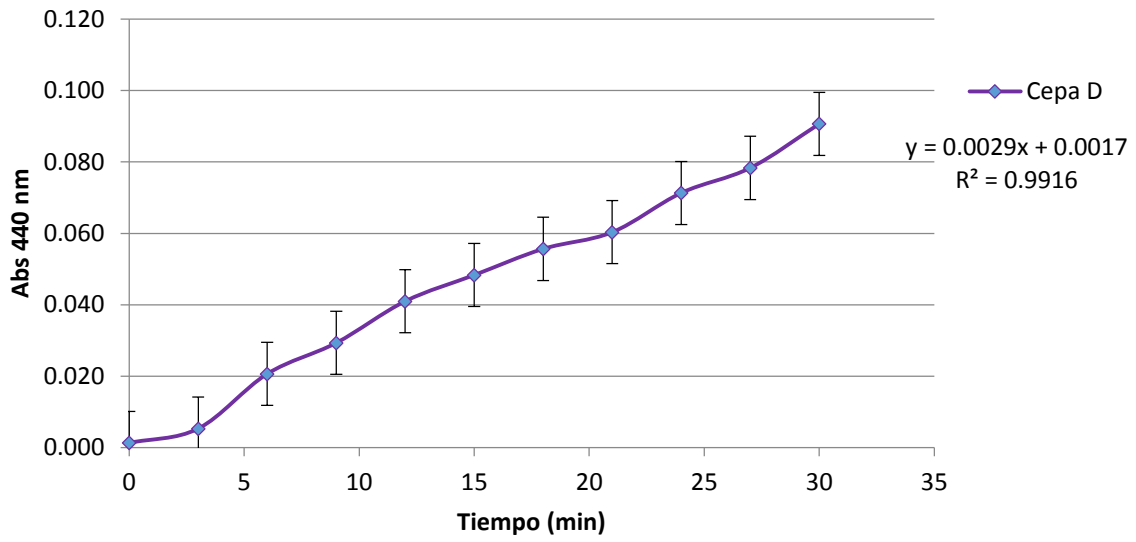
Dodecanoato de p-nitrofenilo



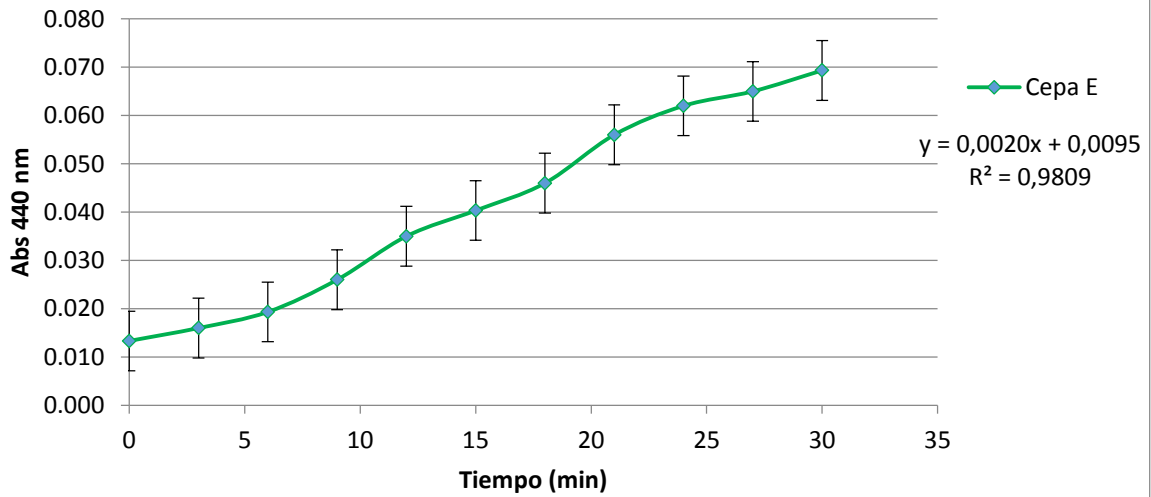
Dodecanoato de p-nitrofenilo



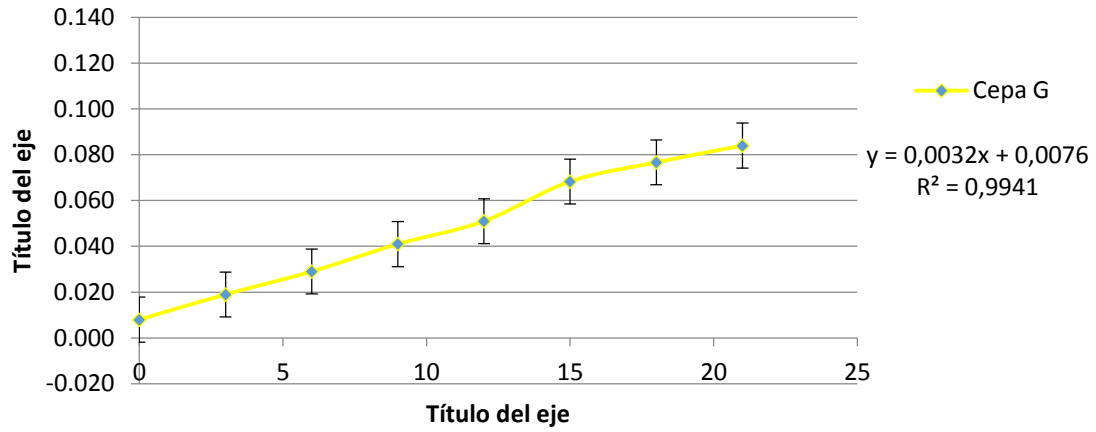
Dodecanoato de p-nitrofenilo



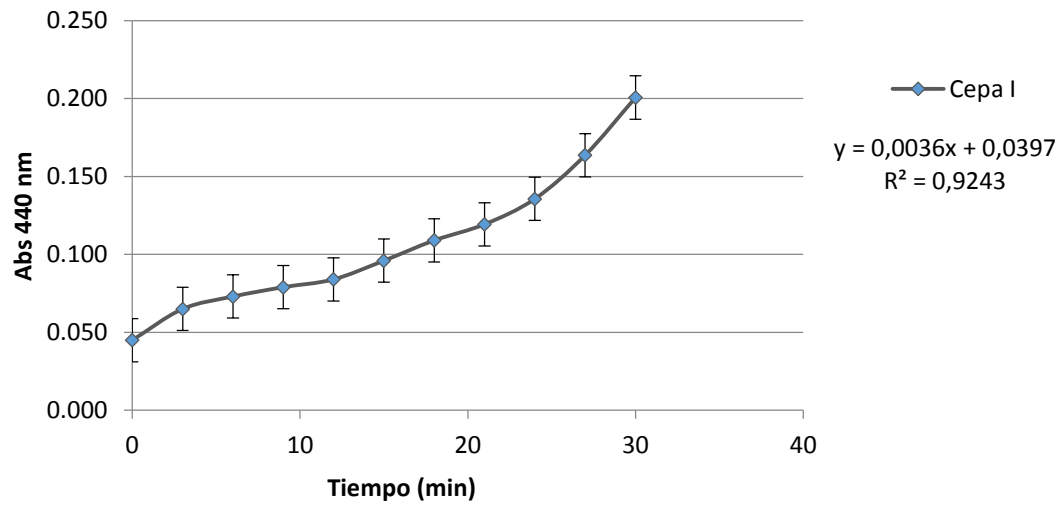
Dodecanoato de p-nitrofenilo

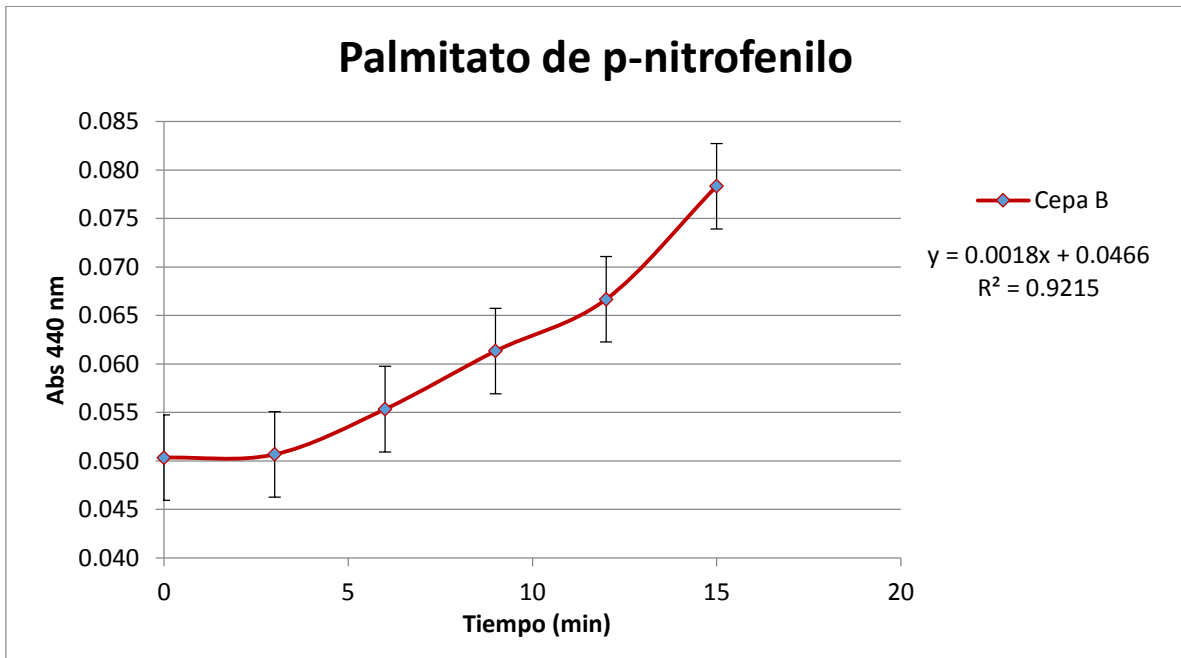
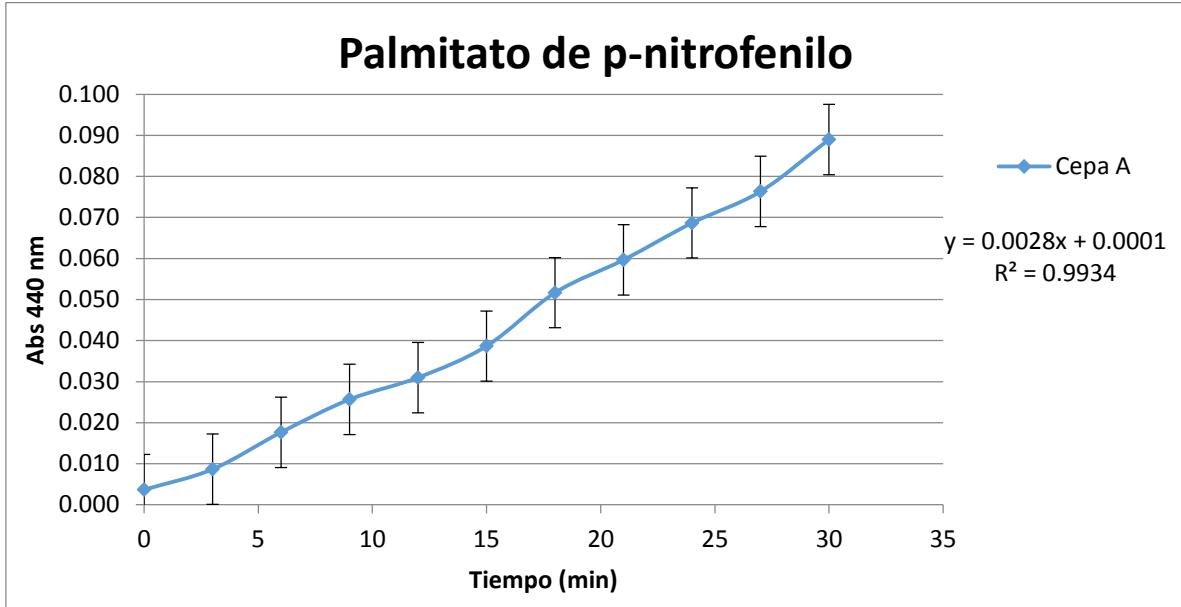


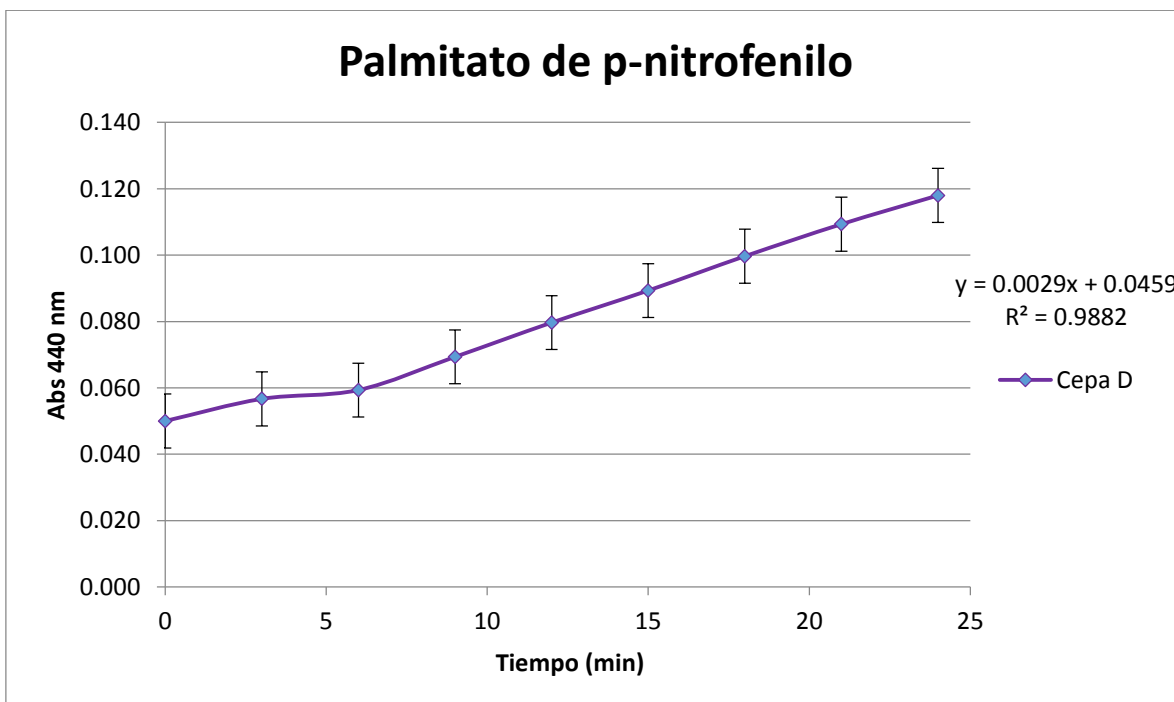
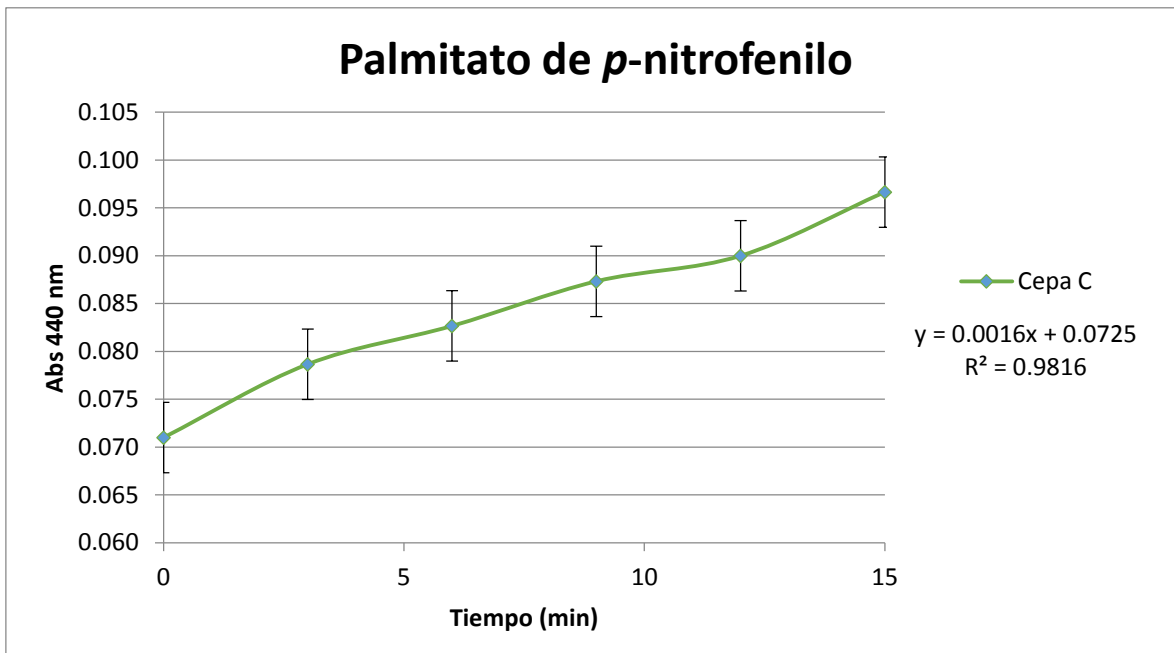
Dodecanoato de p-nitrofenilo

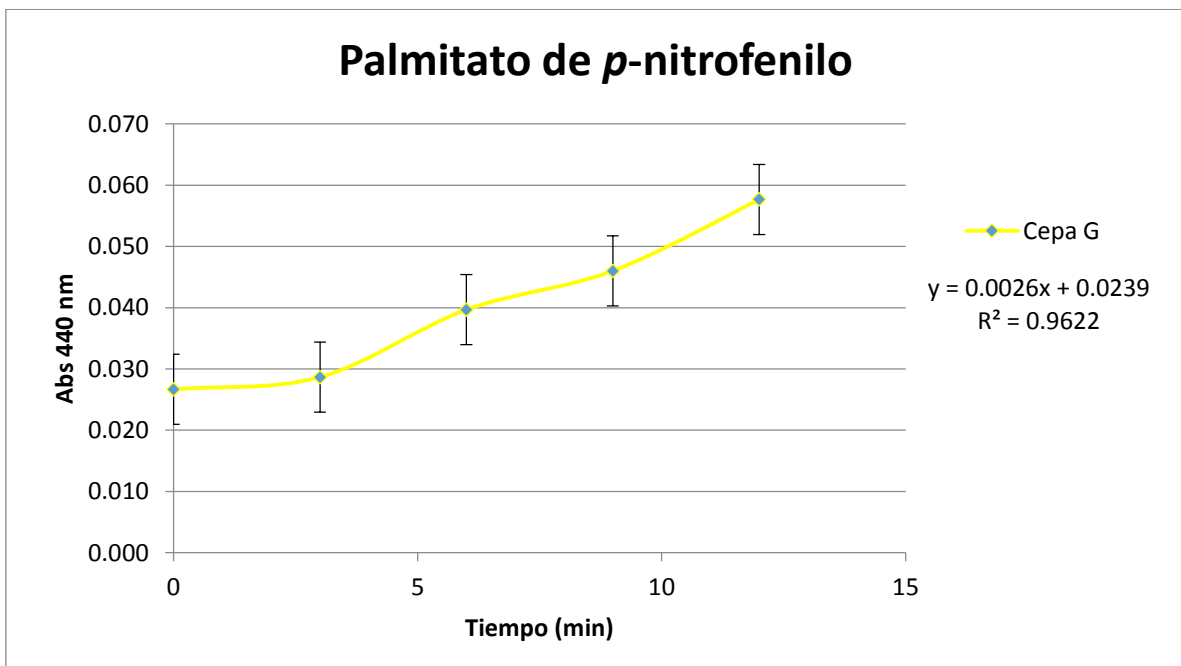
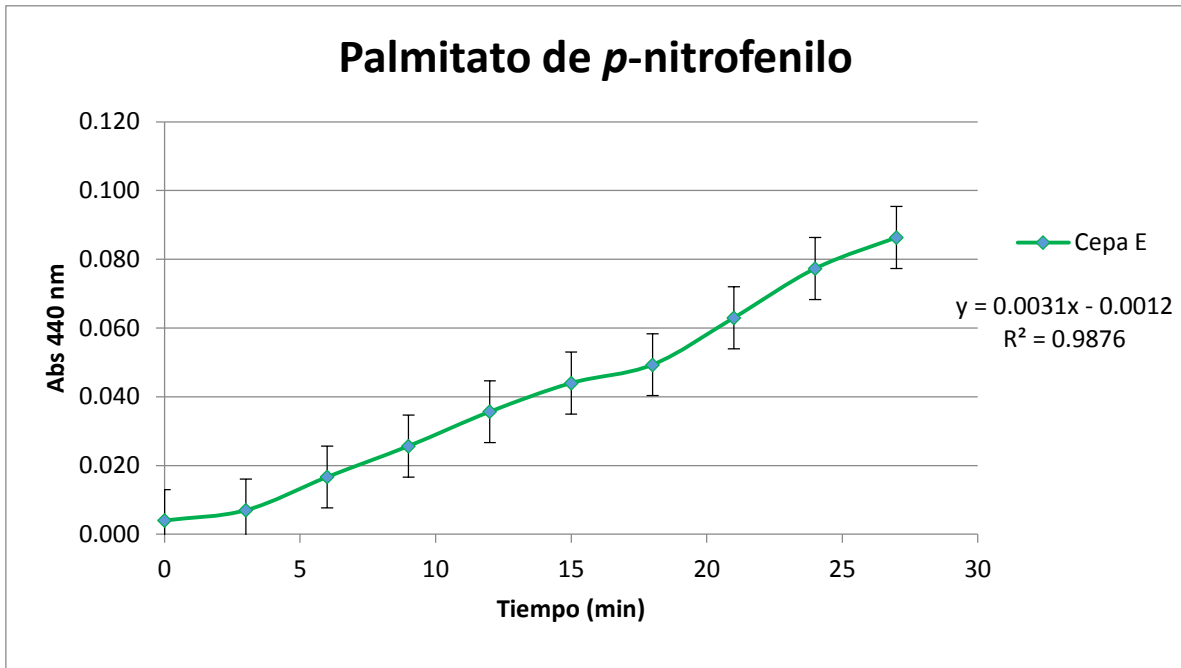


Dodecanoato de p-nitrofenilo

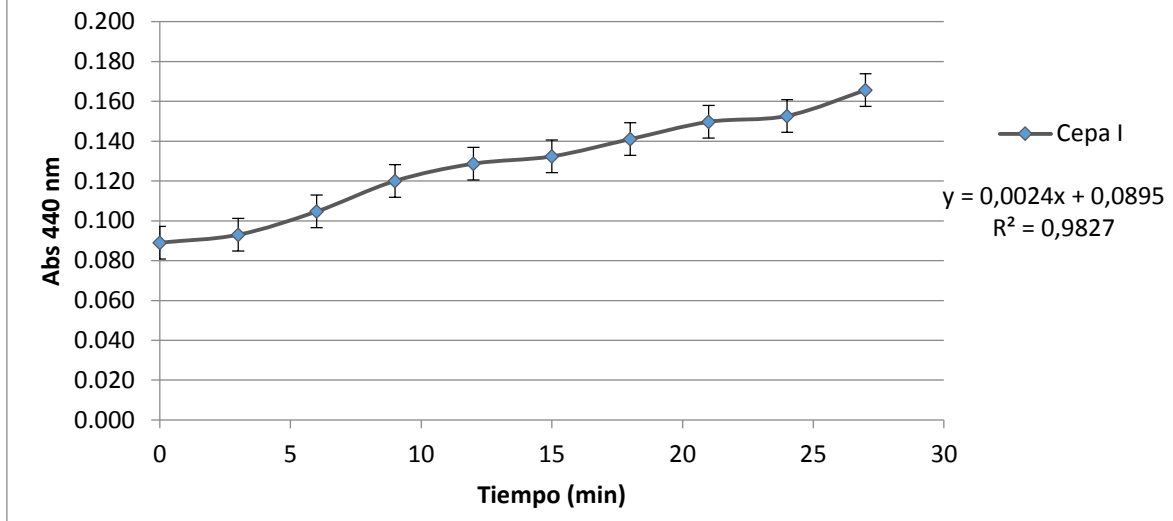








Palmitato de *p*-nitrofenilo



Anexo 8. Actividad del extracto enzimático concentrado usando como sustrato diferentes sustratos derivados de *p*-nitrofenol.

Cepa	Sustrato	m exp	vol.f/vol.i	m teórica	Act. Vol.	Proteína(mg)	U/mg
A	Acetato	0,0065	2,857	0,0023	8,94	313,6	0,1285
B	Acetato	0,0041	2,857	0,0023	6,09	1043	0,0243
C	Acetato	0,0016	2,857	0,0023	1,99	240,1	0,0418
D	Acetato	0,0038	2,857	0,0023	4,72	319,2	0,0561
E	Acetato	0,0023	2,857	0,0023	2,86	1099	0,0127
G	Acetato	0,0032	2,857	0,0023	3,97	310,1	0,0640
I	Acetato	0,0043	2,857	0,0023	5,34	1099	0,0242

Cepa	Sustrato	m exp	vol.f/vol.i	m teórica	Act. Vol.	Proteína(mg)	U/mg
A	Butirato	0,0022	2,857	0,0023	2,86	313,6	0,0429
B	Butirato	0,0021	2,857	0,0023	2,98	1043	0,0123
C	Butirato	0,0022	2,857	0,0023	2,86	240,1	0,0578
D	Butirato	0,0034	2,857	0,0023	4,60	319,2	0,0759
E	Butirato	0,0018	2,857	0,0023	3,35	1099	0,0102
G	Butirato	0,0028	2,857	0,0023	4,60	310,1	0,0554
I	Butirato	0,0022	2,857	0,0023	3,23	1099	0,0124

Cepa	Sustrato	m exp	vol.f/vol.i	m teórica	Act. Vol.	Proteína(mg)	U/mg
A	Decanoato	0,0026	2,857	0,0023	3,23	313,6	0,0515
B	Decanoato	0,0013	2,857	0,0023	1,74	1043	0,0236
C	Decanoato	0,0022	2,857	0,0023	2,73	240,1	0,0560
D	Decanoato	0,0014	2,857	0,0023	1,74	319,2	0,0279
E	Decanoato	0,0052	2,857	0,0023	6,58	1099	0,0290
G	Decanoato	0,0023	2,857	0,0023	2,86	310,1	0,0461
I	Decanoato	0,0034	2,857	0,0023	4,22	1099	0,0192

Cepa	Sustrato	m exp	vol.f/vol.i	m teórica	Act. Vol.	Proteína(mg)	U/mg
A	Dodecanoato	0,0023	2,857	0,0023	2,98	313,6	0,0449
B	Dodecanoato	0,0024	2,857	0,0023	3,48	1043	0,0143
C	Dodecanoato	0,0011	2,857	0,0023	1,37	240,1	0,0276
D	Dodecanoato	0,0029	2,857	0,0023	3,60	319,2	0,0564
E	Dodecanoato	0,0020	2,857	0,0023	2,61	1099	0,0115
G	Dodecanoato	0,0032	2,857	0,0023	4,60	310,1	0,0648
I	Dodecanoato	0,0036	2,857	0,0023	5,47	1099	0,0192

Cepa	Sustrato	m exp	vol.f/vol.i	m teórica	Act. Vol.	Proteína(mg)	U/mg
A	Palmitato	0,0028	2,857	0,0023	3,48	313,6	0,0568
B	Palmitato	0,0018	2,857	0,0023	2,24	1043	0,0111
C	Palmitato	0,0016	2,857	0,0023	1,99	240,1	0,0414
D	Palmitato	0,0029	2,857	0,0023	3,60	319,2	0,0571
E	Palmitato	0,0031	2,857	0,0023	3,85	1099	0,0179
G	Palmitato	0,0026	2,857	0,0023	3,23	310,1	0,0527
I	Palmitato	0,0024	2,857	0,0023	3,48	1099	0,0138

Anexo 9. Análisis de varianza (ANOVA) para los resultados de la prueba cuantitativa con ésteres de p-nitrofenilo y pruebas de múltiples rangos (LSD) con un nivel de 95.0% de confianza.

ANOVA unidireccional: especificidad vs. sustrato CEPA A

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
sustrato	5	C:10; C:12; C:16; C:2; C:4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
sustrato	4	0,015524	0,003881	380,91	0,000
Error	10	0,000102	0,000010		
Total	14	0,015626			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0031920	99,35%	99,09%	98,53%

Medias

sustrato	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
C:10	3	0,05150	0,00200	(0,04739; 0,05561)
C:12	3	0,04490	0,00301	(0,04079; 0,04901)
C:16	3	0,05677	0,00300	(0,05266; 0,06087)
C:2	3	0,12850	0,00346	(0,12439; 0,13261)
C:4	3	0,04290	0,00411	(0,03879; 0,04701)

Desv.Est. agrupada = 0,00319197

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

sustrato	N	Media	Agrupación
C:2	3	0,12850	A
C:16	3	0,05677	B
C:10	3	0,05150	B
C:12	3	0,04490	C
C:4	3	0,04290	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA unidireccional: ESPECIFICIDAD vs. SUSTRATO CEPA B

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
SUSTRATO	5	C:10; C:12; C:16; C:2; C:4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SUSTRATO	4	0,000509	0,000127	74,15	0,000
Error	10	0,000017	0,000002		
Total	14	0,000526			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0013102	96,74%	95,43%	92,66%

Medias

SUSTRATO	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
C:10	3	0,008900	0,001039	(0,007215; 0,010585)
C:12	3	0,014300	0,001039	(0,012615; 0,015985)
C:16	3	0,008100	0,000693	(0,006415; 0,009785)
C:2	3	0,024333	0,001607	(0,022648; 0,026019)
C:4	3	0,01230	0,00183	(0,01061; 0,01399)

Desv.Est. agrupada = 0,00131022

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

SUSTRATO	N	Media	Agrupación
C:2	3	0,024333	A
C:12	3	0,014300	B
C:4	3	0,01230	B
C:10	3	0,008900	C
C:16	3	0,008100	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs individuales de 95% de Fisher

ANOVA unidireccional: ESPECIFICIDAD vs. SUSTRATO CEPA C

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
SUSTRATO	5	C:10; C:12; C:16; C:2; C:4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SUSTRATO	4	0,003047	0,000762	36,74	0,000
Error	10	0,000207	0,000021		
Total	14	0,003254			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0045535	93,63%	91,08%	85,66%

Medias

SUSTRATO	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
C:10	3	0,06810	0,00745	(0,06224; 0,07396)
C:12	3	0,027633	0,001501	(0,021776; 0,033491)
C:16	3	0,03973	0,00530	(0,03388; 0,04559)
C:2	3	0,041833	0,001443	(0,035976; 0,047691)
C:4	3	0,05777	0,00397	(0,05191; 0,06362)

Desv.Est. agrupada = 0,00455353

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

SUSTRATO	N	Media	Agrupación
C:4	3	0,05777	A
C:10	3	0,06810	B
C:2	3	0,041833	C
C:16	3	0,03973	C
C:12	3	0,027633	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs individuales de 95% de Fisher

ANOVA unidireccional: ESPECIFICIDAD vs. SUSTRATO CEPA D

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
SUSTRATO	5	C:10; C:12; C:16; C:2; C:4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SUSTRATO	4	0,000323	0,000081	123,69	0,000
Error	10	0,000007	0,000001		
Total	14	0,000329			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0008079	98,02%	97,23%	95,54%

Medias

SUSTRATO	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
C:10	3	0,005533	0,000231	(0,004494; 0,006573)
C:12	3	0,01130	0,00000	(0,01026; 0,01234)
C:16	3	0,003567	0,000058	(0,002527; 0,004606)
C:2	3	0,014233	0,000058	(0,013194; 0,015273)
C:4	3	0,01517	0,00179	(0,01413; 0,01621)

Desv.Est. agrupada = 0,000807878

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

SUSTRATO	N	Media	Agrupación
C:4	3	0,01517	A
C:2	3	0,014233	A
C:12	3	0,01130	B
C:10	3	0,005533	C
C:16	3	0,003567	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs individuales de 95% de Fisher

ANOVA unidireccional: ESPECIFICIDAD vs. SUSTRATO CEPA E

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
SUSTRATO	5	C:10; C:12; C:16; C:2; C:4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SUSTRATO	4	0,000824	0,000206	100,52	0,000
Error	10	0,000020	0,000002		
Total	14	0,000844			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0014315	97,57%	96,60%	94,54%

Medias

SUSTRATO	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
C:10	3	0,02900	0,00282	(0,02716; 0,03084)
C:12	3	0,012067	0,000289	(0,010225; 0,013908)
C:16	3	0,017900	0,000346	(0,016058; 0,019742)
C:2	3	0,012667	0,001443	(0,010825; 0,014508)
C:4	3	0,007300	0,000000	(0,005458; 0,009142)

Desv.Est. agrupada = 0,00143155

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

SUSTRATO	N	Media	Agrupación
C:10	3	0,02900	A
C:16	3	0,017900	B
C:2	3	0,012667	C
C:12	3	0,012067	C
C:4	3	0,007300	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs individuales de 95% de Fisher

ANOVA unidireccional: ESPECIFICIDAD vs. SUSTRATO CEPA G

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
SUSTRATO	5	C:10; C:12; C:16; C:2; C:4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SUSTRATO	4	0,001004	0,000251	5,41	0,014
Error	10	0,000464	0,000046		
Total	14	0,001468			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0068118	68,39%	55,75%	28,88%

Medias

SUSTRATO	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
C:10	3	0,04610	0,00400	(0,03734; 0,05486)
C:12	3	0,06477	0,00306	(0,05600; 0,07353)
C:16	3	0,05277	0,00833	(0,04400; 0,06153)
C:2	3	0,06400	0,00721	(0,05524; 0,07276)
C:4	3	0,06743	0,00924	(0,05867; 0,07620)

Desv.Est. agrupada = 0,00681175

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

SUSTRATO	N	Media	Agrupación
C:4	3	0,06743	A
C:12	3	0,06477	A B
C:2	3	0,06400	A B
C:16	3	0,05277	B C
C:10	3	0,04610	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs individuales de 95% de Fisher

ANOVA unidireccional: ESPECIFICIDAD vs. SUSTRATO CEPA I

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
SUSTRATO	5	C:10; C:12; C:16; C:2; C:4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SUSTRATO	4	0,000361	0,000090	68,64	0,000
Error	10	0,000013	0,000001		
Total	14	0,000374			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0011466	96,49%	95,08%	92,09%

Medias

SUSTRATO	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
C:10	3	0,021667	0,001328	(0,020192; 0,023142)
C:12	3	0,023000	0,000346	(0,021525; 0,024475)
C:16	3	0,013767	0,001328	(0,012292; 0,015242)
C:2	3	0,024167	0,000764	(0,022692; 0,025642)
C:4	3	0,012433	0,001531	(0,010958; 0,013908)

Desv.Est. agrupada = 0,00114659

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

SUSTRATO	N	Media	Agrupación
C:2	3	0,024167	A
C:12	3	0,023000	A B
C:10	3	0,021667	B
C:16	3	0,013767	C
C:4	3	0,012433	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs individuales de 95% de Fisher

Bibliografía

Álvarez, B. R., Barragán, L. E. y Chombo, M. P. (2005). Reglas de uso. Marca Colectiva queso Cotija Región de Origen, Asociación Regional de Productores de queso Cotija, CIATEJ, El Colegio de Michoacán. Cotija de la Paz, Michoacán, México.

Agerholm-Larsen, L., Bell, M.L., Grunwald, G.K., Astrup, A. (2000). The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *Eur. J.Clin. Nutr.* 49, 346–352.

Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F. (2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research.* 68: 303-316.

Arizcun, C., Barcina, Y., Torre, P. (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology.* 38:17-24.

Arpigny, L., Jaeger, E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.

ARPQC Asociación Regional de Productores de queso Cotija. (2005). *Tríptico informativo.* México.

Ballesteros Ramírez N. (2006). Caracterización de la esterasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UMAM. México, D.F.

Beresfort T., Fitzsimons N., Cogan T. (2001). Recent advances in cheeses microbiology. *Journal Dairy Journal* 11:259-274.

Bradford, MM. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.

Brock, T.D. & M.T. Madigan. (1991). *Biology of microorganisms* (Sixth Edition). Prentice-Hall International (UK) Limited. London.

Brogden Kim A. (2000). Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 3rd ed. Editado por Amer Society for Microbiology press, Washington.

Campell MK. (1995). Biochemistry. 2 ed. Saunders: College Publishing.

Casillas, H. J. L. (2013). Caracterización molecular de la microbiota bacteriana del queso Cotija elaborado en diversas regiones de México, Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Castellano P., Belfione C., Fadale S., Vignolega G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Review Meat Science* 79(3):483-499.

Cervantes, E. F., Villegas, de G. A., Cesín, V. A. y Espinoza, O. A. (2008). Los quesos mexicanos genuinos: Patrimonio cultural que debe rescatarse, Mundi-Prensa, México D.F., México.

Chander, H., Ranganathan, B., Singh, J. (1979). Role of some fatty acids on the growth and lipase production by the *Streptococcus faecalis*. *Journal of Food Science*. 44:1566-1567.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1 – 20.

Dovat, A.M., Reinbold, G.W., Hammond, E.G., Vedamuthu, E.R. (1970). Lipolytic and proteolytic activity of enterococci and lactic group streptococci isolated from young Cheddar cheese. *Journal of Milk and Food Technology*, 33:365-372.

Eck, A. (1990). El queso. Ediciones Omega. Barcelona, España.

Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselmann, C. (1998). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 85, 521– 526.

Escobar Zepeda G. (2012). Estudio de la distribución espacial de la microbiota Bacteriana en queso Cotija por la técnica de FISH. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM, México.

Felis, GE., Dellaglio F., Torrani S. (2009). Taxonomy of probiotics microorganisms. Prebiotics and probiotics science and technology. 1st Edition. Springer. Pp 591-637.

Feria, CPF. (2007). Aislamiento y caracterización de Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Medellín, Colombia. Pp 84.

Foulquié, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J Food Microbiol.*, 106:1-24.

Fox P. , Guinne T., Cogan T. y McSweeney P. (2004). Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. 3er Edition. Volume 2 Major cheese Groups. ELSEVIER Academic Press.

Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. (1996). Production and characterisation of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *International Journal of Food Microbiology*. 29, 255–270.

Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., (2003). Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 105-122.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365–378.

García-Carreño, F Haard. (1993). Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*. 17: 97-113.

García Saturnino V. (2006). Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija. Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México.

García HM. (2000). Adaptación de geles de poliacrilamida a sistema PhastSystem. Tesis de Maestría. Facultad de Biología. UNAM. México, D.F.

Gardiner, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jagers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Stanton, C. (1999). Influence of a probiotic adjunct culture of

Enterococcus faecium on the quality of Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4907–4916.

Giraffa, G. (1995). *Enterococcus bacteriocins*: their potential use as anti-Listeria factors in dairy technology. *Food Microbiology* 551–556.

Giraffa, G. (2003). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. 26:163-171.

Gómez Castelo B. (2010). Identificación de bacterias halófilas presentes en queso Cotija por métodos independientes de cultivo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.

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

Hardie J., Whiley RA., (2006). The genus *Streptococcus* oral Prokaryotes. 3ra Edition. Springer. 4:76-107.

Harrington D., Sutcliffe I., Chanter N. (2002). The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. *Microbes and Infection*. 4(4):501-510.

Hassan AN., Franck JF. (2001). Starter cultures and their use in: *Applied Dairy Microbiology*. 123:345-350.

Hazen, G.G, Hause, J.A and Hubicki, J.A (1965). An automated system from the quantitative determination of proteolytic enzymes using azocasein. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 130: 761-768.

Hemati, B., Sußsmuth, R., Ezzat, N., El-Shafei, H., El-Soda, M. (1998). Isolation and characterization of an *Enterococcus* starter from Egyptian Domiati cheese. *Milchwissenschaft*. 53: 198-202.

Hernández Briones Verónica. (2007). Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huisin't Veld, J.H.J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41, 85–101.

Izquierdo E., Bednarczyk A., Schaeffer C., Cai Y., Marchioni E., Van Dorsselaer A y Ennahar. (2008). Production of Enterocin L50A, L50B, and IT, a new enterocin by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolate from Italian ryegrass in Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 52(6): 1917-1923.

Laemmli, UK. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.

Larpent, J.P. (1995). Las bacterias lácticas. En ICMSF, *Microbiología Alimentaria Vol. 2., Las fermentaciones alimentaris*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. pp. 3-17.

Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Goris, J., Christensen, H., Rusul, G. (2000). Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. Nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 19-24.

Laukova, A., Czikkova, S. (2001). Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on “bryndza”, a traditional Slovak dairy product from sheep milk. *Microbiological Research* 156, 31–34.

Lyhs, U. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Academic Dissertation, Department of Food and Environmental Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki. ISBN 952-91-4642-6.

López, R. & Ramos, M. (1991). Revisión: El caseinomacropéptido bovino. I. Características físicoquímica y actividad bilógica. *Revista Española de ciencia y Tecnología de Alimentos*. 32(6): 575-578.

Macedo, A.C., Malcata, F.X. (1997). Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. A. 205:25-30.

Maisnier-Patin, S., Forni, E., Richard, J. (1996). Purification, partial characterization and mode of action of enterococin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of

Enterococcus faecalis isolated from a cheese. *International Journal of Food Microbiology* 30, 255–270.

Martin PAM. (2008). Estudio polifásico de la diversidad microbiana de quesos artesanales elaborados con leche cruda de cabra. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España. Pp 317.

Marcos A, et al. (1977). “Screening” de las cepas proteolíticas del queso tipo manchego y acción de las proteasas de las suspensiones de celulosa sobre la alfa y beta caseínas. Archivos de zootecnia, vol. 26, número 102. Pp 189.

Nelson, D.L. & M.M. Cox. (2001). *Lehninger Principios de Bioquímica* (tercera edición). Ediciones Omega. Barcelona.

Nochumson S, inventors.(1985). FMC Corporation, assignee. Polyacrylamide cross-linked with a polysaccharide resin as electrophoretic gel medium. 4: 542,200.

Nunez, M., Rodríguez, J.L., García, E., Gaya, P., Medina, M. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology* 83, 671–677.

NMX-F-735-COFOCALEC (2011). Sistema Producto Leche – Alimento – Lácteo – Alimento lácteo regional – queso Cotija artesanal madurado – Denominación, especificaciones y métodos de prueba. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de junio de 2011.

NOM-121-SSA1 (1994). Norma Oficial Mexicana bienes y servicios, Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.

Olvera García M. (2010). Efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos antibacterianos en *Enterococcus* spp. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.

Olvera García M. (2013). Evaluación de la inocuidad de *Enterococcus* spp. aislados del queso Cotija. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.

O'Sullivan, M.G., Thornton, G., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K. (1992). Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends in Food Science and Technology* 3, 309– 314.

Prescott, L. M., Harley, J.P., Klein, D.A. (1999). Microbiología. 4ta Edición, Ed. Mc Graw-Hill Interoamericana. Zaragoza, España. Pp 515-518.

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 76, 93–105.

Serrano Maldonado E. (2010). Caracterización de la actividad antibacteriana producida por bacterias ácido lácticas aisladas de un alimento artesanal mexicano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.

Patrick RM., Rosenthal K., Pfaller MA. (2009). Cap 22: *Streptococcus*. En Patrick Murray, Microbiología Medica. 6ta Edición. España. El sevier. Mosby. ISBN. Pp 225-242.

Parra RA. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Revista Biotecnología Agropecuaria* 8(1):94-105.

Pouch Downes Frances. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods. 4th edition, American Public Health Association.

Rodriguez E., Calzada J., Arqes J., Rodríguez J. Nuñez M., Medina M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* 0157H.7 in chesse. *Journal Dairy Science* 15:51-57.

Ryan KS., Ray CG. (2004). Sherris Medical Microbiology. 4ta Edition. Mc Graw Hill. Pp 8385-8529.

Salminen, S. Von Wright, A. Ouwehand, A. (2004). Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3^a edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos.

- Shankar, N., Coburn P y Pillar C.** (2004). Enterococcal cytolisin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *International Journal of Medical Microbiology*. 293: 609-618.
- Simonetta, A.C., Moragues de Velasco, L.G., Frison, L.N.** (1997). Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Letters in Applied Microbiology* 24, 139–143.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H.** (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T.** (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto Caprino). *Journal of Applied Microbiology*. 89: 267-274.
- Tavaria, F.K., Malcata, F.X.** (1998). Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its Appellation d'Origine Protegéé region. *Journal of Food Protection*, 61: 601-607.
- Tsakalidou, E., Dalezios, I., Kalantzopoulos, G.** (1994). Isolation and partial characterization of an intracellular esterase from *Enterococcus faecium* ACA-DC 237. *Journal of Biotechnology*, 37: 201-208.
- Tulini F., Bisscola V., Choiset Y., Hymery N., Le Blay G., Pereira E., Chobert J., Haertlé T.** (2015). Evaluation of the proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* FT132 and *Lactobacillus paracasei* FT700, isolated from dairy products in Brazil, using milk proteins as substrates. *Eur Food Res Technol* 241:385–392.
- Valvuená E., Castro G., Lima K., Acosta W., Briñez W., Tovar A.** (2005). Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche. Pp 23-24.
- Villegas. A.** (2004). Tecnología quesera. Capítulo 13. Fichas técnicas. Edit. Trillas. Mexico, D.F. Pp: 316-321.

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

Fuentes de internet

Díaz Pérez M., Rodríguez Martínez C y Zhurbenko R. (2012). Enterococcus, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. Artículo de revisión. Centro Nacional de Biopreparados. La Habana Cuba.

http://bvs.sld.cu/revistas/hievol51_1_13/hie10113.htm

Grupo de investigación multidisciplinar en calidad y seguridad de alimentos fermentados autóctonos. Grupo de investigación Calidad y Seguridad de alimentos fermentados autóctonos. Universidad del país Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Facultad de Farmacia.

http://www.enpresa.ehu.es/p223content/es/contenidos/informacion/vri_encuentos/es_vri_en_cu/adjuntos/1_Elortondo_L.pdf.