



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN  
PROTEICO PRODUCIDOS POR ENTEROCOCCUS FAECIUM MXVK76**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**JIMENA ALEJANDRA SEGUNDO RUIZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX**

**2017**



## **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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor:** Gloria Díaz Ruiz  
**VOCAL:**                   **Profesor:** Oscar Hernández Meléndez  
**SECRETARIO:**       **Profesor:** Yenizey Merit Álvarez Cisneros  
**1er. SUPLENTE:**      **Profesor:** Aleida Mina Cetina  
**2° SUPLENTE:**       **Profesor:** Carmina Montiel Pacheco

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO S-132, DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA. DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA.

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros**

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dra. Edith Ponce Alquicira**

### **SUSTENTANTE:**

**Jimena Alejandra Segundo Ruiz**

## ÍNDICE GENERAL

### Contenido

<b>ÍNDICE DE TABLA</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	4
<b>3.1 BIOCONSERVACIÓN</b> .....	4
<b>3.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS</b> .....	6
<b>3.3 ENTEROCOCOS</b> .....	11
<b>3.4 BACTERIOCINAS</b> .....	12
<b>3.5 MÉTODOS DE PURIFICACIÓN PARA BACTERIOCINAS</b> .....	15
<b>3.6 ENTEROCINAS</b> .....	16
<b>3.7 APLICACIONES DE BACTERIOCINAS</b> .....	16
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	20
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	21
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>6.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	21
<b>6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b> .....	21
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	22
<b>7.1 PROCEDIMIENTO GENERAL</b> .....	22
.....	22
<b>7.2 CEPAS EN ESTUDIO</b> .....	23
<b>7.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO</b> .....	23
<b>7.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA</b> .....	25
<b>7.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA</b> .....	26
<b>7.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA Y ESPECTRO ANTIMICROBIANO (DIFUSIÓN EN AGAR)</b> .....	27
<b>7.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR</b> .....	27

<b>7.8</b>	CINÉTICA DE LA CEPA MXVK76.....	28
<b>7.9</b>	TRATAMIENTO CON PROTEINASA K Y TRIPSINA .....	29
<b>7.10</b>	TERMOESTABILIDAD .....	29
<b>7.11</b>	IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO ANTIMICROBIANO.....	30
<b>7.11.1</b>	PURIFICACIÓN POR ACETONA.....	30
<b>7.11.2</b>	PURIFICACIÓN POR ADSORCIÓN- DESORCIÓN .....	31
<b>7.11.3</b>	ELECTROFORESIS TRIS- TRICINA (SDS- PAGE).....	32
<b>8.</b>	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
<b>8.1</b>	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA .....	34
<b>8.2</b>	PRUEBAS DE ANTAGONISMO .....	34
<b>8.3</b>	DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO ANTIMICROBIANO Y LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA.....	36
<b>8.4</b>	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....	39
<b>8.4.1</b>	EXTRACCIÓN DE ADN .....	39
<b>8.4.2</b>	AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE LA REGIÓN ADN <sub>r</sub> 16S	39
<b>8.4.3</b>	SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO Y PURIFICADO .....	40
<b>8.5</b>	CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ANTIMICROBIANOS.....	44
<b>8.6</b>	ESTABILIDAD A PROTEASAS .....	45
<b>8.7</b>	ESTABILIDAD A PH Y TRATAMIENTOS TÉRMICOS.....	46
<b>8.8</b>	IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO ANTIMICROBIANO.....	50
<b>8.8.1</b>	EXTRACCIÓN CON ACETONA.....	50
<b>8.8.2</b>	PURIFICACIÓN POR ADSORCIÓN- DESORCIÓN .....	52
<b>9.</b>	CONCLUSIONES .....	57
<b>10.</b>	PERSPECTIVAS.....	58
<b>11.</b>	REFERENCIAS .....	59
<b>12.</b>	ANEXOS .....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
<b>Tabla 1.</b> Microorganismos patógenos encontrados en alimentos contaminados.....	6
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de enterocinas .....	16
<b>Tabla 3.</b> Cepas productoras y sensibles .....	24
<b>Tabla 4.</b> Composición de la mezcla de reacción para PCR.....	28
<b>Tabla 5.</b> Composición de los geles de concentración y separación ....	342
<b>Tabla 6.</b> Concentración de proteína calculada para todos los extractos .....	35
<b>Tabla 7.</b> Pruebas antagónicas de BAL contra microorganismos de deterioro y patógenos .....	36
<b>Tabla 8.</b> Actividad específica de las BAL en estudio .....	38
<b>Tabla 9.</b> Cepas alineadas por similitud con <i>Enterococcus faecium</i> MXVK76.....	42
<b>Tabla 10.</b> Actividad específica y rendimiento de la técnica de extracción por acetona.....	50
<b>Tabla 11.</b> Rendimiento de la actividad específica de cada paso en la adsorción- desorción .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
<b>Figura 1.</b> Fermentación láctica homofermentativa.....	8
<b>Figura 2.</b> Fermentación láctica heterofermentativa .....	8
<b>Figura 3.</b> Estrategia general de trabajo .....	22
<b>Figura 4.</b> Ejemplo cualitativo de inhibición de cepas productoras contra cepas sensibles.....	26
<b>Figura 5.</b> Halos de inhibición de los diferentes extractos contra <i>Listeria innocua</i> .....	36
<b>Figura 6.</b> ADN total extraído de la cepa MXVK76 .....	39
<b>Figura 7.</b> Fragmento amplificado y purificado del gen ADNr 16S.....	40
<b>Figura 8.</b> Secuencia forward del gen ADNr 16S .....	41
<b>Figura 9.</b> Secuencia reverse del gen ADNr 16S.....	41
<b>Figura 10.</b> Árbol filogenético de <i>Enterococcus faecium</i> (Cepa MXVK76) .....	43
<b>Figura 11.</b> Perfil de crecimiento, pH y actividad específica de la cepa MXVK76 en el tiempo .....	45
<b>Figura 12.</b> Estabilidad del compuesto antimicrobiano producido por la cepa MXVK76 en presencia de proteasas .....	46
<b>Figura 13.</b> Estabilidad del compuesto antimicrobiano producido por la cepa MXVK76 a procesos térmicos y pH.....	48
<b>Figura 14.</b> Estabilidad del extracto de la cepa MXVK76 a diferentes temperaturas .....	49

<b>Figura 15.</b> Halos de inhibición correspondientes al precipitado y al sobrenadante de la cepa MXVK76 .....	50
<b>Figura 16.</b> Gel de poliacrilamida al 17% con concentrado de la purificación por acetona .....	52
<b>Figura 17.</b> Halos de inhibición en la extracción por adsorción- desorción .....	53
<b>Figura 18.</b> Gel de poliacrilamida al 17% con concentrado de la purificación por adsorción- desorción.....	55
<b>Figura 19.</b> Gel de poliacrilamida al 17% con el extracto de <i>Enterococcus faecium</i> MXVK76. ....	56
<b>Figura 20.</b> Curva tipo para cuantificación de proteínas por el método de Bradford obtenido por el lector de placas (Synergy HTX)..	70

## 1. RESUMEN

En la actualidad, la demanda por parte del consumidor de obtener alimentos libres de compuestos químicos ha ido en aumento; esto realza la necesidad de producir alimentos con aditivos más naturales. Una de las mejores opciones de conservadores naturales son los producidos por las bacterias ácido lácticas (BAL), estos compuestos antimicrobianos han tomado gran importancia debido a que su actividad antimicrobiana es contra microorganismos de deterioro y algunos patógenos como *Listeria* presentes en los alimentos.

Uno de los compuestos antimicrobianos producidos por BAL son las bacteriocinas, éstas presentan una alta resistencia al calor, actividad inhibitoria en un amplio intervalo de pH y son inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal. La combinación de estas características les confiere un gran potencial para ser utilizadas como bioconservadores e incrementan la vida útil de los alimentos.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el compuesto antimicrobiano producido por la cepa *Enterococcus faecium* MXVK76.

La metodología propuesta para cumplir el objetivo fue identificar la cepa productora del compuesto antimicrobiano mediante la secuenciación del gen ADN<sub>r</sub> 16S. Posteriormente, se obtuvo el extracto crudo y se determinó su espectro antimicrobiano contra diferentes cepas patógenas y deteriorantes de alimentos. Se determinó la estabilidad del compuesto antimicrobiano a temperatura, pH y proteasas, para conocer si pueden resistir las condiciones de proceso de los alimentos.

Finalmente, se determinó la cinética de producción del compuesto antimicrobiano y se realizaron geles de tris- tricina para estimar el peso molecular del péptido responsable de la actividad antimicrobiana.

Se obtuvo ADN genómico íntegro con un tamaño mayor a los 10,000 pb, el cual fue utilizado como molde para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se obtuvo un amplicón de aproximadamente 1500 pb, el cual fue purificado y secuenciado. La secuencia obtenida tuvo una similitud del 100% con la cepa *Enterococcus faecium* de acuerdo a la base de datos reportada en NCBI. El compuesto antimicrobiano tipo bacteriocina presentó una alta actividad antimicrobiana contra cepas de *Listeria* spp, además demostró estabilidad a tratamientos de pasteurización a pH ácidos y perdió completamente la actividad antimicrobiana en presencia de tripsina y proteinasa K. Durante la cinética de producción se observó que la mayor actividad antimicrobiana se reporta durante la fase estacionaria del crecimiento de la cepa productora y también se observó una banda con actividad antimicrobiana de aproximadamente 5 kDa en un extracto semipurificado por adsorción-desorción.

Con los resultados obtenidos se demostró que la actividad antimicrobiana producida por *Enterococcus faecium* MXVK76 es de origen proteico, y de acuerdo a las características de la termoestabilidad, espectro antimicrobiano, peso molecular e inactividad en presencia de proteasas, se puede inferir que se trata de un compuesto antimicrobiano tipo bacteriocina.

## **2. INTRODUCCIÓN**

Actualmente los consumidores demandan alimentos menos procesados, libres de conservadores sintéticos y que mantengan sus características organolépticas y su inocuidad; por lo cual la industria alimenticia se ve comprometida en incorporar conservadores naturales en las líneas de procesos, sin perder la calidad microbiológica de los productos.

Una alternativa para cumplir con esta tendencia en la elaboración de alimentos es la bioconservación, la cual se define como el proceso mediante la cual se logra alargar la vida útil de un producto a través de la utilización de microbiotas naturales o de sus metabolitos (Aymerich *et al.*, 1998). La bioconservación permite conservar su calidad e inocuidad de un alimento a partir de sustancias naturales con propiedades antibacterianas y/o la incorporación de microorganismos capaces de producir sustancias inhibitorias que impiden el desarrollo de microorganismos que afectan la calidad (Pineda, 2004).

Los microorganismos empleados en la bioconservación pertenecen en su mayoría al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales han sido utilizadas como cultivos iniciadores y probióticos en alimentos fermentados.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 BIOCONSERVACIÓN

En la industria de alimentos existen grandes pérdidas económicas, así como de materia prima y producto final debido a que estos últimos sirven como sustrato para los microorganismos de descomposición y patógenos; causando alteraciones en los productos, ya sea a nivel físico, químico o sensorial.

Los alimentos pueden estar expuestos a diversos factores físicos, químicos o microbiológicos que disminuyen su inocuidad, además de poder causar un daño a la salud del consumidor. Por lo tanto, la industria de alimentos siempre está en la búsqueda de nuevas alternativas para mejorar los métodos de conservación de los alimentos.

Una de las alternativas modernas que pueden contribuir significativamente a lograr la inocuidad de los alimentos y minimizar la proliferación de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's), es la bioconservación, considerada como un enfoque ecológico para mejorar la seguridad y alargar la vida de anaquel de los alimentos (Ananou *et al.*, 2007).

Dentro de la conservación de los alimentos están incluidas técnicas utilizadas para obtener alimentos más seguros hasta la generación de alimentos mínimamente procesados y sin aditivos (Fuente *et al.*, 2010).

Los microorganismos patógenos que afectan más al ser humano por consumir alimentos contaminados son: *Salmonella sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Eschericia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*. En Estados Unidos el Servicio de Salud Pública identificó, también, a *Shigella*, *Vibrio vulnificus* y *Yersinia enterocolitica* como microorganismos principales que causan enfermedades a través de los alimentos (McCabe- Sellers *et al.*, 2004).

En la tabla 1, se presentan los efectos en la salud humana causados por microorganismos patógenos encontrados en alimentos (Fuente *et al.*, 2010).

**Tabla 1. Microorganismos patógenos encontrados en alimentos contaminados.**

<b>Microorganismo patógeno</b>	<b>Origen</b>	<b>Efectos</b>
<b><i>Campylobacter jejuni</i></b>	Carnes crudas o mal cocinadas, leche bronca y agua sin tratar	Diarrea
<b><i>Clostridium botulinum</i></b>	Alimentos enlatados, conservados o fermentados de preparación doméstica	Botulismo caracterizado por parálisis muscular
<b><i>Escherichia coli O157:H7</i></b>	Carnes mal cocidas, leche bronca y productos agrícolas	Puede producir una toxina mortal
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	Suelo y agua. Se ha encontrado en productos lácteos, carne cruda y mal cocido.	Listeriosis, enfermedad grave en mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos con un sistema inmune débil.
<b><i>Salmonella spp.</i></b>	Huevos crudos y mal cocidos, pollo y carne mal cocida, productos lácteos, mariscos, frutas y verduras.	Es la segunda causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos.
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Alimentos cocinados con alto contenido en proteínas (jamón cocino, ensaladas, pasteles, lácteos)	Produce una toxina que causa vómitos poco después de ser ingerida.
<b><i>Shigella</i></b>	Ensaladas, leche, productos lácteos y agua sucia	Ocasiona alrededor de 300 000 casos de enfermedades diarreicas.
<b><i>Vibrio vulnificus</i></b>	Mariscos crudos o mal cocidos	Causa gastroenteritis (síndrome de septicemia primaria)
<b><i>Yersinia enterocolítica</i></b>	Cerdo, productos lácteos y agrícolas.	Causa yersiniosis, enfermedad caracterizada por diarrea y/o vómitos.

\*Datos reportados por el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, 2010. (<http://www.cfsan.fda.gov/~mointro.html>)

Indudablemente, la conservación de alimentos es algo que al ser humano le ha preocupado desde mucho tiempo antes, el objetivo de todas las tecnologías implicadas en los procesos de conservación de alimentos es prevenir el deterioro y el crecimiento de microorganismos patógenos (Akbar y Anal, 2011). Se usan aditivos químicos en la producción de

alimentos pero esto ha llevado a que la Unión Europea restrinja el uso porque se utilizan muchos antibióticos y muchos promotores de crecimiento en la industria ganadera (Atterbury, 2009).

La protección y la preservación de los alimentos pueden lograrse mediante el uso de diferentes medios biológicos como lo es la bioconservación (Akbar *et al.*, 2016). Ésta se refiere al uso de microbiota natural o controlada o de sus productos antibacterianos para extender la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos (Stiles, 1996).

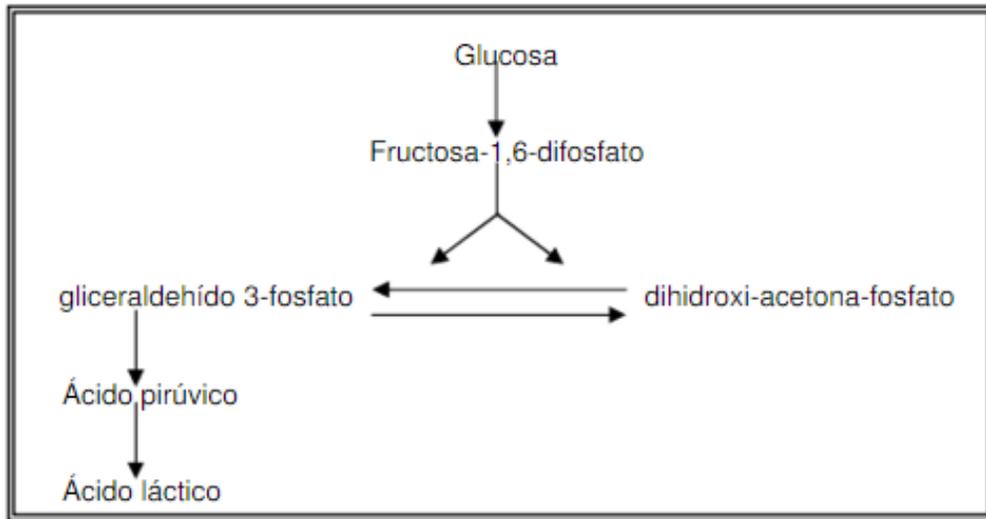
Dado que las bacterias ácido lácticas (BAL) se producen de manera natural en muchos sistemas alimentarios, tienen un gran potencial para ser usadas ampliamente dentro de la bioconservación, además de tener un gran potencial antimicrobiano gracias a sus productos metabólicos (Acuña *et al.*, 2012; Gálvez *et al.*, 2014).

### 3.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

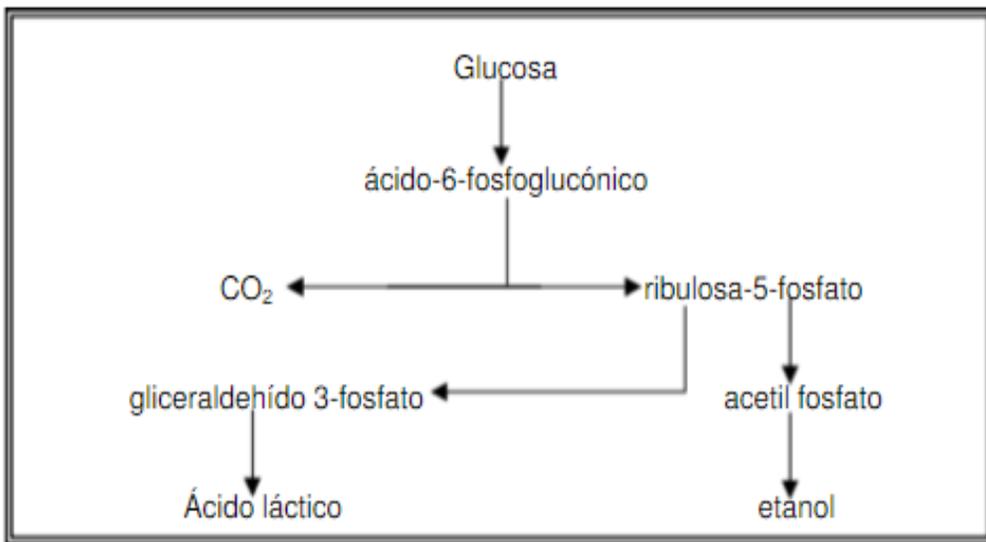
Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacilos o cocos Gram positivos, catalasa negativos, ácido tolerantes y no formadores de esporas. Pueden producir ATP sólo por el proceso de fermentación y son organismos anaerobios tolerantes y el principal producto de su fermentación es el ácido láctico (Khalid, 2011).

Pueden ser homofermentativas, heterofermentativas o ácido mixtas, dependiendo de la vía metabólica que presenten para catabolizar azúcares. Las bacterias homofermentativas transforman los azúcares, especialmente la glucosa en ácido láctico a través de la vía de Embden-Meyerhof. Todas las reacciones de glucólisis conducen de la hexosa a piruvato, el cual es el aceptor final de electrones y que se reduce enzimáticamente por D-lactato o L-lactato deshidrogenasa. Ejemplo de este tipo de bacterias son *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus*. En la vía heterofermentativa se forman cantidades

equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol o acetato a partir de glucosa por medio de la vía fosfocetolasa. Esta vía es utilizada por bacterias aerobias facultativas como *Lactobacillus casei* para metabolizar las pentosas, y por bacterias aerobias obligadas como *Leuconostoc sp.* para la fermentación de hexosas y pentosas. Casi todas las BAL pueden fermentar pentosas por lo que son heterofermentadoras facultativas con excepción de algunos lactobacilos. Esta vía se produce en el citosol, por lo que después de que la glucosa es transportada a la célula, ésta es fosforilada en glucosa 6- fosfato por la glucocinasa y a partir de aquí se pueden realizar dos reacciones de oxidación: la primera produce al gluconato 6- fosfato y la segunda, forma ribulosa 5- fosfato por descarboxilación. La ribulosa 5- fosfato puede ser epimerizada ya sea a ribosa 5- fosfato o a xilulosa 5- fosfato. Finalmente a partir de xilulosa 5- fosfato se obtiene acetil- fosfato y gliceraldehído 3- fosfato, donde este último se metaboliza en ácido láctico utilizando vía homofermentativa. Bacterias como *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella* y *Carnobacterium* son conocidas por tener una fermentación heterofermentativa (Ramírez *et al.*, 2011, Khalid, 2011). En las figuras 1 y 2 se muestra de manera resumida el proceso de cada una de las vías de la fermentación.



**Figura 1. Fermentación láctica homofermentativa (Bourgeois, 1995).**



**Figura 2. Fermentación láctica heterofermentativa (Bourgeois, 1995)**

El ácido láctico producido por las BAL tiene varias aplicaciones como son (Geisen *et al.*, 1992; Hugas y Monfort, 1997; Rubio, 2014):

- Inhibición del crecimiento de microorganismos causantes de alteraciones y patógenos, facilitando la conservación de los alimentos.

- Desnaturalización de las proteínas, permitiendo:
  - i) La coagulación proteica a un pH próximo al punto isoeléctrico de las proteínas cárnicas y, consecuentemente, el desarrollo de la textura y cohesión.
  - ii) La reducción de la capacidad de retención de agua por parte de las proteínas cárnicas, hecho que acelera el proceso de secado.
- Inducción de las reacciones de reducción de nitratos y nitritos de óxido nítrico, aportando el color deseado.
- Modulación de las reacciones enzimáticas que contribuyen al desarrollo del aroma y sabor.

Según Hofvendahl y Hahn Hägerdal (2000) dentro del grupo de bacterias ácido lácticas se encuentran *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*.

Las características que poseen las BAL para poderlas aplicar en la industria de alimentos (Mazzoli *et. al*, 2014) son:

1. Están consideradas como GRAS (Generalmente reconocido como seguro)
2. Son organismos que se adaptan a las condiciones de los procesos industriales, muestran una alta resistencia a pH's ácidos y tienen un intervalo de temperatura amplio y óptimo (20 y 45°C)
3. Son capaces de metabolizar numerosos monosacáridos (como hexosa y pentosa).
4. Producen muchos metabolitos con aplicaciones en la industria alimenticia como son: aromas, sabores (acetaldehído), agentes texturizantes (exopolisacáridos) y metabolitos con capacidad antimicrobiana (ácido láctico).

Las bacterias ácido lácticas además de producir ácido láctico, producen otro tipo de metabolitos y pueden ser clasificados en cuatro grupos.

1. Metabolitos del oxígeno como el peróxido de hidrógeno. Reaccionan con el ión superóxido liberando radicales hidroxilo capaces de oxidar los lípidos de la membrana celular y alterar el material genético (Block, 1991). La acumulación de peróxido de hidrógeno en la célula ocurre por la ausencia de la enzima catalasa (Kandler y Weiss, 1986), que se encuentra en las células de los tejidos animales y vegetales cuya función es descomponer el peróxido de hidrógeno originado por el metabolismo celular en agua y oxígeno.
2. Productos provenientes del catabolismo celular:
  - a) Ácido láctico. Es un ácido débil que en su estado no disociado puede atravesar la membrana celular microbiana hasta llegar a un equilibrio entre el interior y el exterior, disipando el potencial de la membrana y reduciendo el pH intracelular, lo que causa la muerte de los microorganismos (Gould, 1991).
  - b) Acetaldehído. Puede inhibir la división celular de *E. coli*, levaduras y bacterias Gram positivas y negativas (Daeschel, 1989).
3. Reuterina ( $\beta$ - hidroxipropanoaldehído), es una molécula altamente soluble y con pH neutro, producida por *Lactobacillus reuterii* bajo condiciones anaeróbicas en presencia de glicerol. Su mecanismo de acción consiste en la inactivación de las enzimas que poseen grupos sulfhidrilo, tales como la ribonucleótido reductasa, una enzima universal que cataliza la primera etapa de la biosíntesis de ADN (Talarico y Dobrogosz, 1989).
4. Péptidos de bajo peso molecular:
  - a) Peptidoglucano hidrolasas (PGH's). Son enzimas que hidrolizan los enlaces covalentes del peptidoglucano

(principal componente de la pared celular de bacterias) y pueden tener un uso potencial para el control de patógenos en la industria de alimentos. Se clasifican de acuerdo al tipo de enlace que hidrolizan como (García Cano *et al.*, 2014):

- ❖ N- acetilglucoamidasas: hidrolizan el enlace  $\beta$ - 1,4 de la cadena de glicanos dejando un extremo de N-acetilglucosamina reductor.
  - ❖ N- acetilmuramidasas: hidrolizan el mismo enlace que las anteriores, sin embargo dejan un extremo ácido N-acetilmurámico reductor libre. También llamadas lisozimas, y si forman un anillo 1,6-anhidro en el N-acetilmurámico, son llamadas transglicosilasas lácticas.
  - ❖ N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas: rompen el enlace amida entre el N-acetilmurámico y la L-alanina del péptido.
- b) Bacteriocinas. Son péptidos antimicrobianos con capacidad de inhibir microorganismos patógenos perjudiciales para la salud humana, representan una excelente estrategia para el control de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, entre otros (De la Fuente y Barboza, 2010).

### 3.3 ENTEROCOCOS

El género *Enterococcus* pertenece a la familia *Enterococcaceae* y presentan morfología en forma de cocos en parejas o en cadenas Gram positivo. Son microorganismos no esporulados, catalasa y oxidasa negativos y son anaerobios facultativos y sus condiciones de crecimiento óptimo son de 35°C y pH 7.5, pero presenta un amplio intervalo de temperatura que va de 5- 50°C y también un gran intervalo de pH, 4.4-

9.6 (Salminen *et al.*, 2012). Los enterococos representan uno de los grupos de BAL con gran importancia, ya que se encuentran en diferentes fuentes como: en el ambiente, en el tracto gastrointestinal, en alimentos fermentados y productos frescos (Fortina, 2004; Álvarez- Cisneros *et al.*, 2011; Kadri *et al.*, 2015).

El género *Enterococcus* incluye más de 20 especies, siendo *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, las dos especies predominantes, especialmente en productos lácteos fermentados y contribuyen a la maduración y al desarrollo del aroma de ciertos quesos o salchichas fermentadas; pero también pueden ser responsables del deterioro de algunos productos cárnicos cocidos (Giraffa, 2003).

Algunos enterococos tienen la capacidad de producir bacteriocinas (enterocinas) que retardan el deterioro de los alimentos o que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium spp* y *Bacillus spp* (Ennahar *et al.*, 2000; Sarantinopoulos *et al.*, 2002; Giraffa, 2003).

### 3.4 BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas tienen un gran potencial como bioconservadores en una gran cantidad de alimentos (Ennahar *et al.*, 1999). Son péptidos antibacterianos de bajo peso molecular (por lo regular, menos de 10 kDa) y estables en amplios intervalos de pH y tratamientos térmicos. Además, pueden ser activas contra bacterias relacionadas taxonómicamente.

Existen diferentes clasificaciones para las bacteriocinas (Klaenhammer, 1993; Heng y Tagg 2006), pero una de las más utilizadas es la descrita por Cotter *et al.*, (2005):

- Clase I. Lantibióticos, péptidos de entre 19 y 39 aminoácidos de longitud, con un peso menor a 5 kDa. Contienen residuos de lantionina o  $\beta$ - metil- lantionina y son termoestables
- Clase II. Bacteriocinas que no contienen lantionina, péptidos termoestables pequeños (menos de 10 kDa) que inducen la permeabilidad de la membrana y la salida de moléculas del interior de la bacteria.
- Clase III. Bacteriolisinas o proteínas bacteriolíticas; termolábiles, de alto peso molecular (mayor de 30 kDa) y su modo de acción es mediante la lisis de la pared celular.

Actualmente, la única bacteriocina aprobada por FDA para usarse como conservador en alimentos es la nisina, ésta es producida por *Lactococcus lactis* y tiene un peso molecular de 3.5 kDa, se encuentra conformada por 34 aminoácidos con residuos deshidratados y cinco anillos de lantionina (Beristain- Bauza *et al.*, 2012).

Para que una bacteriocina sea considerada como compuesto antimicrobiano debe cumplir con los siguientes criterios (Gautam y Sharma, 2009):

- La cepa productora debe estar dentro de la categoría GRAS.
- Deben ser reconocidas y aceptadas para su uso en alimentos por una autoridad reguladora.
- Deben tener un espectro de inhibición que puede incluir microorganismos patógenos o tener actividad contra alguna bacteria en particular.
- Su adición en los productos debe de presentar efectos benéficos, tales como mejorar la seguridad, calidad y/o sabor.
- Alta actividad antimicrobiana a bajas concentraciones.

Existen diversos mecanismos para explicar la actividad bactericida de las bacteriocinas. El más atinado es el de la formación de poros. Algunas bacteriocinas pertenecientes a la clase I, como la nisina, tienen un modo dual de acción: pueden unirse al lípido II, el cual es un receptor universal y el principal transportador de subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular, bloqueando la síntesis adecuada de la pared celular, causando la muerte. También, la nisina se une al lípido II por dos de sus anillos amino-terminales formando un complejo de ocho bacteriocinas lantibióticas y cuatro lípidos II para comenzar el proceso de inserción de la membrana y la formación de poros, lo que conduce a una muerte celular rápida. En cuanto a la clase II, éstas tienen una estructura anfílica helicoidal que les permite insertarse en la membrana de la célula diana, lo que lleva a la despolarización y a la muerte (Álvarez- Cisneros *et al.*, 2011).

El espectro antimicrobiano de las bacteriocinas permite clasificarlas en tres grupos en función de la actividad (Chen y Hoover, 2003; Cotter *et al.*, 2005; Álvarez- Cisneros *et al.*, 2011; Olvera- García *et al.*, 2015):

- Espectro de acción reducido: inhiben el crecimiento de bacterias pertenecientes al mismo género.
- Espectro de acción intermedio: además de inhibir otros géneros de BAL, inhiben patógenos encontrados en los alimentos como *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *C. botulinum*.
- Amplio espectro de inhibición: Inhiben los microorganismos patógenos antes mencionados y a otros como *Propionibacterium sp.* y *Bacillus sp.*

### 3.5 MÉTODOS DE PURIFICACIÓN PARA BACTERIOCINAS

Los métodos de extracción y purificación de bacteriocinas dependen de su naturaleza; como primera operación para la purificación está la precipitación diferencial la cual se basa en la disminución de la solubilidad de las proteínas, reparto selectivo a una fase en un sistema de dos fases o precipitación por afinidad. De esa manera la precipitación puede ser realizada por la adición de sales, solventes o polímeros orgánicos, por alteraciones de pH y temperatura o por la adición de ligandos (Olvera-García *et al.*, 2015).

Algunos ejemplos de estos métodos se enlistan a continuación:

- Adsorción- Desorción: En este método lo que se utiliza son las alteraciones del pH. El medio se ajusta a un pH de 5 para permitir la adsorción del compuesto antimicrobiano a la membrana celular bacteriana (Dündar *et al.*, 2014). Y después se lleva a un pH de 2 para facilitar la desorción y liberación del compuesto de interés de la membrana celular de la bacteria hacia el medio. (Álvarez Cisneros, 2010).
- Precipitación con sulfato de amonio: Se basa en la solubilidad de las proteínas en disoluciones salinas concentradas, en este caso en una solución de sulfato de amonio. La sal extrae el agua unida a las proteínas y, por tanto, éstas precipitan al perder solubilidad (Quesada, 2007).
- Precipitación con acetona: Basado en la solubilidad de las proteínas en un solvente orgánico (Chung *et al.*, 2011).

### 3.6 ENTEROCINAS

Las enterocinas son bacteriocinas producidas por las especies de *Enterococcus* como *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. munditi*. Muchas de las enterocinas producidas por estos microorganismos tienen actividad bactericida contra bacterias presentes en los alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sp*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera* y *Bacillus cereus* (Álvarez- Cisneros *et al.*, 2011).

Como ya se ha mencionado, existen diferentes clasificaciones para las bacteriocinas, pero una sola enterocina puede pertenecer a varios grupos o subgrupos, por la heterogeneidad de sus características, por lo cual se propuso una clasificación tomando en cuenta las características de las enterocinas (tabla 2).

**Tabla 2. Clasificación de enterocinas (Franz *et al.*, 2007)**

Clase	Clasificación
<b>I</b>	Enterocinas lantibióticas
<b>IIa</b>	Familia pediocina de enterocinas activas contra <i>Listeria</i> , con secuencia consensual (YGNGVXC) cercana a N- terminal y como péptido líder GG.
<b>IIb</b>	Enterocinas sintetizadas sin un péptido líder
<b>IIc</b>	Otra línea de enterocinas pero que no son parte de la familia de pediocinas
<b>IIIa</b>	Péptidos cíclicos
<b>IV</b>	Proteínas largas

### 3.7 APLICACIONES DE BACTERIOCINAS

Actualmente se ha demostrado que las bacteriocinas presentan un alto potencial en la biopreservación de carne, productos lácteos, alimentos enlatados, pescado, bebidas alcohólicas, ensaladas, huevo, productos de panificación, vegetales fermentados (Beristain- Bauza *et. al*, 2012).

Las bacteriocinas pueden ser utilizadas en alimentos de diferentes maneras (Cleveland *et. al*, 2001):

- adicionadas directamente al producto, purificadas o semipurificadas.
- o como un ingrediente en la elaboración de alimentos (aditivos).

A continuación se enlistan algunas aplicaciones de las bacteriocinas:

- ✓ En los productos enlatados como granos de elote, chícharos, papas, hongos y zanahorias se aplican para controlar el crecimiento de termófilos esporulados. Debido a su baja acidez (pH >4.5), son susceptibles al crecimiento de esporas resistentes a tratamientos térmicos como *Bacillus stearothermophilus* y *Clostridium thermosaccharolyticum*. Al adicionar nisina se inhiben estos microorganismos y además de alargar la vida de anaquel de estos productos a temperatura ambiente (Delves- Broughton, 2005; Beristan- Bauza *et al.*, 2012).
- ✓ Investigaciones actuales han demostrado la inhibición de *L. monocytogenes* en langosta y *C. botulinum* en alimentos marinos empacados con atmósferas modificadas gracias a la adición de bacteriocinas (Pilet y Leroi, 2011).
- ✓ Con el fin de disminuir el uso de nitritos y otros aditivos, se agregan en productos cárnicos para inhibir *C. botulinum*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* y *E. coli* (Naidu *et al.*, 2006).
- ✓ Las bacteriocinas son adicionadas en los vinos para prevenir el crecimiento de las BAL y asegurar la ausencia de la fermentación maloláctica, evitando la disminución del pH del producto que causa defectos en el vino. En la cerveza, inhiben el crecimiento de lactobacilos y pediococos que provocan una cerveza con un exceso

de acidez y sabores extraños (Naidu *et al.*, 2006; Beristain- Bauza *et al.*, 2012).

- ✓ En cuanto a productos lácteos, el uso de bacteriocinas es más común. En los quesos controlan el crecimiento de BAL, ya que un exceso de ellas proveerá de sabores extraños a los productos, por otro lado su aplicación promueve la aceleración de su maduración (Beshkova y Frengova, 2012). En la leche, previene la esporulación de bacterias termofílicas resistentes al calor que pueden sobrevivir a la pasteurización (Ekbal *et al.*, 2012). El principal objetivo de su actividad antimicrobiana es inhibir microorganismos como *Clostridium* y *Listeria*, en estos productos (Cleveland *et al.*, 2001).

Para las bacteriocinas producidas por enterococos existen muchos estudios sobre su aislamiento y caracterización. Las enterocinas han sido aisladas de diferentes alimentos como queso, carne, pescado salchichas; así como de animales y seres humanos. Las enterocinas son generalmente activas contra bacterias Gram positivas (*Listeria* spp. y *Clostridium* sp.) y contra Gram negativas (*E. coli* y *Vibrio cholerae*) (Foulquié *et al.*, 2006).

Las enterocinas se han utilizado como cultivo iniciador en la producción de productos cárnicos fermentados. El género *Enterococcus* es parcialmente competitivo durante la fermentación de la carne e inhibe fuertemente el crecimiento de *Listeria* spp (Aymerich *et al.*, 2000). La aplicación de estas enterocinas se ha estudiado en una variedad de alimentos fermentados, pero normalmente bajo condiciones piloto, los informes de optimización para la producción de enterocinas y el crecimiento de *Enterococcus* durante la fermentación son raros. Sin embargo, los estudios cinéticos de fermentación pueden analizarse para comprender la relación entre la producción de bacteriocina, el crecimiento

de la cepa productora y el ambiente microbiano en el que debe crecer.  
(Álvarez- Cisneros *et al.*, 2011).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La tendencia general de reducir el uso de aditivos químicos en los productos alimenticios, centra las investigaciones en el estudio y caracterización de compuestos antimicrobianos de origen proteico producidos por BAL como son las bacteriocinas. Estos compuestos naturales pueden sustituir de forma parcial el uso de conservadores químicos en alimentos como parte de una tecnología de barreras y así satisfacer las necesidades de consumir alimentos más naturales.

Sin embargo para poder proponer aplicaciones en la industria de alimentos como conservadores, se deben encontrar microorganismos productores de compuestos antimicrobianos tipo bacteriocina y posteriormente conocer sus características de estabilidad frente a diferentes temperaturas, pH, proteasas y espectro antimicrobiano.

Por otra parte, conocer la actividad antimicrobiana del compuesto tipo bacteriocina permite utilizarlo contra microorganismos de deterioro o patógenos como *Listeria monocytogenes* que es resistente a métodos de conservación convencionales.

Por todo lo anterior, es importante para la industria de alimentos la identificación y caracterización de nuevos conservadores de origen natural, para futuras aplicaciones; por lo tanto saber las condiciones de crecimiento y la actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* MXVK76 podrían ayudar en la industria alimentaria para utilizarlo como parte de la bioconservación.

## 5. HIPÓTESIS

Si el compuesto antimicrobiano producido por la cepa *Enterococcus faecium* MXVK76 es de tipo bacteriocina, entonces se espera que presente alta actividad anti-*Listeria*, estabilidad a altas temperaturas, pH ácidos y proteasas y que tenga un peso molecular menor a 10 kDa.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar las características bioquímicas del compuesto antimicrobiano producido por *Enterococcus faecium* MXVK76.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Realizar pruebas antagónicas de los extractos crudos obtenidos de diferentes BAL contra diferentes cepas deteriorantes y patógenas; para rescatar las cepas productoras que tengan un mayor espectro de inhibición y utilizarlas en las pruebas posteriores.

- Identificar mediante el gen ADNr 16S la similitud de las cepas con especies que se encuentran en la base de datos de NCBI.

- Determinar la actividad específica y el espectro inhibitorio del compuesto antimicrobiano.

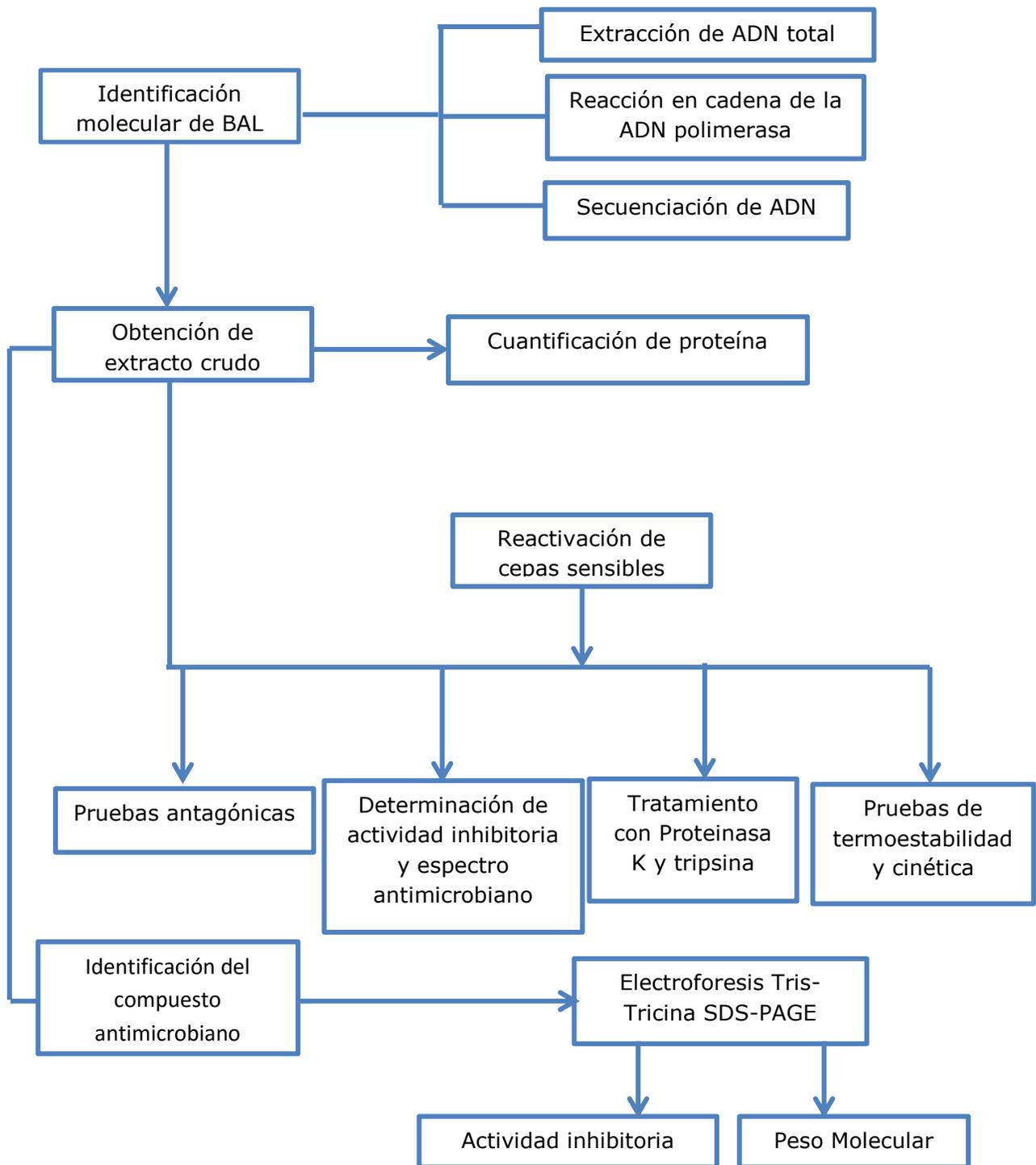
- Determinar la estabilidad del extracto antimicrobiano a diferentes temperaturas, pH y proteasas.

- Determinar el perfil de crecimiento de la cepa con actividad antimicrobiana.

- Determinar el peso molecular del compuesto antimicrobiano mediante electroforesis Tris- Tricina SDS- PAGE.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 PROCEDIMIENTO GENERAL



**Figura 3. Estrategia general de trabajo**

## 7.2 CEPAS EN ESTUDIO

En la tabla 3 se presentan todas las cepas sensibles y las productoras utilizadas en este estudio y aisladas de diferentes fuentes. Las cepas productoras fueron activadas en un tubo con 10 mL de caldo de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe, Difco™, E.U.A) a 37°C durante 18 horas. Las cepas sensibles se activaron en 10 mL de caldo TSB (Caldo Soya y Tripticaseína, DIBICO®, México) a 37°C por 18 horas. La cepa *Enterococcus faecium* MXVK29 fue utilizada como control positivo para las pruebas de actividad (Álvarez- Cisneros *et al.*, 2010).

## 7.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Para obtener el extracto crudo se realizó el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (cepas productoras) en 10 mL de MRS y fueron incubadas a 37°C durante 18 horas, posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C (Eppendorf 5810 R, Hamburgo, Alemania). Se separaron las células del sobrenadante por decantación y a éste último se le ajustó el pH entre 6.5 y 7 con NaOH 0.1 N. Posteriormente se esterilizó por filtración utilizando membranas estériles de 0.22 µm (Millipore, Darmstad, Alemania).

El filtrado obtenido se etiquetó como extracto crudo y se fraccionó en alícuotas, las cuales fueron almacenadas a -20°C hasta su uso (Álvarez- Cisneros *et al.*, 2010).

**Tabla 3. Cepas productoras y sensibles**

<b>CEPAS PRODUCTORAS</b>		
<b>CLAVE</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>TIPO DE BACTERIA</b>
<b>2S</b>	<i>Enterococcus faecium</i> <sup>a</sup>	Gram (+)
<b>3S</b>	<i>Enterococcus faecium</i> <sup>a</sup>	Gram (+)
<b>4S</b>	<i>Enterococcus faecium</i> <sup>a</sup>	Gram (+)
<b>3</b>	<i>Pediococcus sp.</i> <sup>b</sup>	Gram (+)
<b>6</b>	<i>Enterococcus faecium</i> <sup>b</sup>	Gram (+)
<b>7</b>	<i>Enterococcus faecalis</i> <sup>b</sup>	Gram (+)
<b>478</b>	<i>Enterococcus faecium</i> <sup>c</sup>	Gram (+)
<b>MXVK76</b>	<i>Enterococcus faecium</i> <sup>c</sup>	Gram (+)
<b>MXVK29*</b>	<i>Enterococcus faecium</i> <sup>c</sup>	Gram (+)
<b>CEPAS SENSIBLES</b>		
<b>A</b>	<i>Lactobacillus curvatus</i> <sup>d</sup>	Gram (+)
<b>B</b>	<i>Weissella spp</i> <sup>d</sup>	Gram (+)
<b>C</b>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <sup>e</sup>	Gram (+)
<b>D</b>	<i>Lactobacillus casei</i> <sup>e</sup>	Gram (+)
<b>E</b>	<i>Micrococcus luteus</i> <sup>e</sup>	Gram (+)
<b>F</b>	<i>Leuconostoc sp.</i> <sup>d</sup>	Gram (+)
<b>G</b>	<i>Lactobacillus sp.</i> <sup>d</sup>	Gram (+)
<b>H</b>	<i>Lactobacillus sp.</i> <sup>d</sup>	Gram (+)
<b>I</b>	<i>Leuconostoc sp.</i> <sup>d</sup>	Gram (+)
<b>J</b>	<i>Carnobacterium sp.</i> <sup>d</sup>	Gram (+)
<b>K</b>	<i>Listeria innocua</i> ATCC33090 <sup>f</sup>	Gram (+)
<b>L</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>e</sup>	Gram (+)
<b>M</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> LM47 <sup>g</sup>	Gram (+)
<b>N</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A <sup>g</sup>	Gram (+)
<b>O</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> LM88 <sup>h</sup>	Gram (+)
<b>P</b>	<i>Clostridium sporogenes</i> <sup>e</sup>	Gram (+)
<b>Q</b>	<i>Bacillus cereus</i> <sup>e</sup>	Gram (+)
<b>R</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> LM82 <sup>h</sup>	Gram (+)
<b>S</b>	<i>Salmonella</i> Thyphi <sup>e</sup>	Gram (-)
<b>T</b>	<i>Escherichia coli</i> <sup>e</sup>	Gram (-)

Aisladas de diferentes fuentes <sup>a</sup>chorizo tipo español, <sup>b</sup>peperoni y <sup>d</sup>salchichas.

<sup>c</sup>Aisladas de chorizo mexicano por el grupo de trabajo del Dr. M. Collins de Queen's University of Belfast.

<sup>e</sup>Facultad de química.

<sup>f</sup>Christian Hansen, Horsholm, Dinamarca.

<sup>g</sup>Dr. Iniesta, Universidad de Murcia, España.

<sup>h</sup>Dr. Urruburu, Universidad de Valencia, España.

\*Cepa de referencia

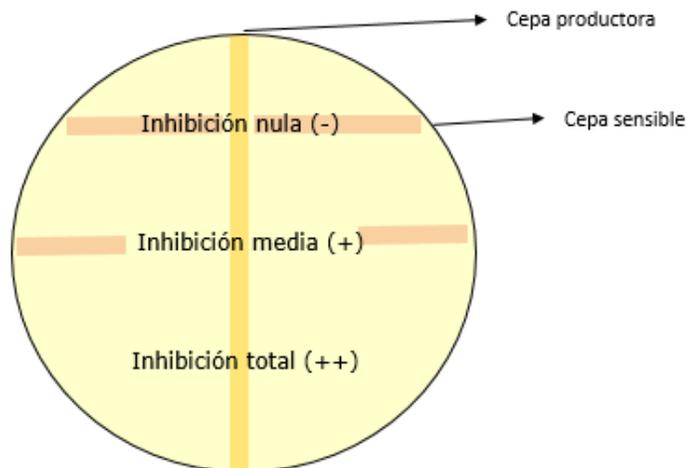
#### 7.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Se cuantificó la cantidad de proteína de cada extracto por el método de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad Protein Assay, CA, E.U.A). Utilizando un lector de placas Synergy HTX (BioTek, Vermont, E.U.A) a una longitud de onda de 595 nm., siguiendo las indicaciones del manual, se realizó una curva tipo utilizando albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, E.U.A) con una concentración de 200 µg/mL. Esta concentración se fue diluyendo de 10 en 10, comenzando en una concentración de 100% de BSA de 200 µg/mL y 0% de agua destilada, hasta llegar a una concentración de 10% de BSA (200 µg/mL) y 90% de agua destilada (Anexo I).

Una vez hecha la curva tipo, se continuó con la cuantificación de proteína de los extractos obtenidos anteriormente, esto con el fin de obtener el contenido de proteína en cada uno para calcular la actividad específica. En los pozos de la microplaca se colocaron 30 µL de muestra (extracto), 130 µL de agua y 40 µL de reactivo de Bradford para obtener un total de 200 µL, para el blanco se utilizó 160 µL de agua y se utilizó nuevamente el lector de placas con las condiciones anteriormente mencionadas.

## 7.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

El antagonismo microbiano es la inhibición, deterioro o muerte de un microorganismo por acción de otro. (Pérez y Terrón *et al.*, 2014). En cajas de caldo TSB con agar al 1.5% se inoculó con un hisopo estéril la cepa productora a estudiar, de manera que la caja Petri quedara dividida a la mitad. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Una vez que creció la cepa productora, con otro hisopo estéril se inocularon las cepas sensibles a la izquierda y a la derecha de la línea de crecimiento de la cepa productora, y se volvió a incubar la caja durante 24 horas a 37°C. Los resultados fueron reportados de forma cualitativa según el nivel de inhibición que mostrara la cepa productora ante la cepa sensible: recibe el nombre de inhibición nula (-) cuando la cepa productora no evita el crecimiento de la cepa sensible, inhibición media (+) cuando la cepa sensible crece aproximadamente a la mitad de la línea inoculada e inhibición total (++) al ser inhibida totalmente la cepa sensible por la productora (Figura 4).



**Figura 4. Ejemplo cualitativo de inhibición de cepas productoras contra cepas sensibles.**

## 7.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA Y ESPECTRO ANTIMICROBIANO (DIFUSIÓN EN AGAR)

Se vertió caldo TSB con agar al 0.8% inoculado previamente con 70  $\mu$ L de las cepas sensibles (Tabla 1), a una densidad óptica de 0.23 a 600 nm, en placas con caldo TSB al 1.5% de agar. Una vez que solidificó se hicieron pozos con pipetas Pasteur estériles y se colocaron 30  $\mu$ L de extracto crudo. Se incubaron las cajas a 37°C durante 18 horas y se verificó la formación de halos de inhibición alrededor de los pozos. La actividad se reportó en unidades específicas de mm de inhibición/mg de proteína en el extracto crudo (actividad específica) (Álvarez- Cisneros et al., 2010). De esta prueba se seleccionaron las cepas productoras que presentaron mejor actividad inhibitoria contra la mayoría de las cepas sensibles para realizar las pruebas posteriores.

## 7.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La identificación molecular se realizó únicamente para las cepas productoras seleccionadas en el apartado anterior. La extracción de ADN se hizo a partir de un cultivo de 24 horas de la cepa de interés utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, E.U.A) y siguiendo las recomendaciones del proveedor. Posteriormente, el ADN fue visualizado a través de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar la integridad y fue utilizado como molde para amplificar el ADNr 16S con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (García-Cano *et. al.*, 2014). En la tabla 4 se observan las concentraciones finales de los componentes utilizados para una mezcla de reacción de PCR de 25  $\mu$ L. Las condiciones usadas en el PCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 95°C por 2 min, 42°C por 30 seg, 72°C por 4 min y un ciclo final de 10 minutos a 72°C.

**Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción para PCR para ADNr 16S**

	Concentración final		Concentración final
<b>Primer rD1 10</b> <b>μM</b>	0.2 μM	<b>DNA total</b>	50 ng
<b>Primer fD1 10</b> <b>μM</b>	0.2 μM	<b>Pfu DNA polimerasa</b>	1.28 U
<b>DNTP's 10 mM</b>	2 mM		

Terminando la reacción se corrió un gel de agarosa al 1% para comprobar la amplificación del fragmento ribosomal de 1500 pb. Posteriormente se cortó la banda de interés y se purificó de acuerdo al manual GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, E.U.A)

El producto obtenido de la purificación fue secuenciado en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la DCBS de la UAM-Iztapalapa.

#### 7.8 CINÉTICA DE LA CEPA *ENTEROCOCCUS FAECIUM* MXVK76

Con el fin de conocer en qué etapa del crecimiento de *Enterococcus faecium* MXVK76 se tiene la mayor actividad inhibitoria, se realizó una cinética de 24 horas. En un matraz con 50 mL de caldo MRS se inoculó la cepa en estudio y se tomaron alícuotas cada 2 horas durante 24 horas. De las diferentes alícuotas se determinó el crecimiento microbiano ( $OD_{600}$  nm), pH, actividad antimicrobiana y concentración de proteína. El experimento se realizó por duplicado, obteniendo los promedios y desviación estándar en cada punto del muestreo. Los resultados fueron graficados contra el tiempo con el programa Sigma Plot 13.0.

## 7.9 TRATAMIENTO CON PROTEINASA K Y TRIPSINA

El objetivo de este tratamiento es conocer si el compuesto antimicrobiano tipo bacteriocina es inactivado con proteasas (característica principal de una bacteriocina), evaluando una concentración determinada de proteinasa K y tripsina sobre la actividad del compuesto antimicrobiano.

Se preparó una solución stock (20 mg/mL) de cada una de las enzimas y se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 10, 5 y 1 mg/mL de extracto crudo (Anexo II). Como control se utilizó extracto crudo sin proteasas. Los diferentes tratamientos fueron incubados a 37°C, tomando muestras cada hora durante 3 horas. Finalmente las enzimas fueron inactivadas a 90°C durante 10 minutos y se evaluó la actividad específica de las diferentes muestras de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 7.6. Se calculó la actividad residual de los diferentes tratamientos.

## 7.10 TERMOESTABILIDAD

Una prueba importante para decidir la aplicación de las bacteriocinas es la estabilidad que presentan a pH y temperaturas. El extracto crudo fue dividido en tres fracciones de 5 mL y cada una fue ajustada con NaOH 0.1 N a valores de pH de 4, 7 y 9, cada fracción fue seccionada en tres alícuotas de 120 µL que fueron sometidas a tratamientos térmicos de proceso como pasteurización (63°C/30 min), esterilización (121°C/15 min) y un control (no fue sometido a ningún tratamiento). Después del tratamiento, las alícuotas se enfriaron a temperatura ambiente y se les ajustó el pH a 7 para evaluar la actividad específica.

Por otra parte se determinó la estabilidad del compuesto antimicrobiano a diferentes temperaturas (40, 60, 80 y 100°C) tomando alícuotas cada media hora durante 5 horas. Finalmente se evaluó la actividad específica.

## 7.11 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO ANTIMICROBIANO

### 7.11.1 PURIFICACIÓN POR ACETONA

Se realizó una purificación con el método de precipitación por acetona descrito por Chung *et al.*, (2011); con el fin de conseguir un extracto más concentrado y libre de impurezas.

En 100 mL de caldo MRS, se inoculó la cepa *Enterococcus faecium* MXVK76 durante 24 horas a 37°C y se obtuvo el extracto crudo. Se mezclaron en una proporción 1:3 el extracto crudo y acetona (previamente congelada a -20°C) y se mantuvo la mezcla a esa temperatura durante 2 horas, posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos y se separó el sobrenadante con un rotavapor a una temperatura de 65°C durante 90 minutos a 20 rpm; y el pellet se dejó en la estufa a 70°C para evaporar la acetona remanente.

Se realizó una prueba de actividad al pellet (re suspendido en agua) y al sobrenadante libre de acetona, para determinar si el compuesto antimicrobiano se encontraba en el precipitado o en el sobrenadante.

### 7.11.2 PURIFICACIÓN POR ADSORCIÓN- DESORCIÓN

De igual manera se hizo la extracción y purificación por el método de adsorción-desorción dependiente del pH. (Dündar *et al.*, 2004; Álvarez-Cisneros *et al.*, 2010).

Un cultivo de 300 mL de *Enterococcus faecium* MXVK76 con 16 horas de crecimiento fue sometido a un tratamiento térmico a 70°C durante 30 minutos con el fin de inactivar las proteasas que pudieran encontrarse en el medio (Katla *et al.*, 2003). Posteriormente se realizó una adsorción del compuesto antimicrobiano ajustando el extracto crudo a pH 5 con NaOH 10 M y se mantuvo en agitación durante 18 horas a 4°C. Pasado el tiempo, se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4°C, el pellet obtenido se lavó dos veces con buffer de fosfatos (5 mM fosfato de sodio, pH 6.5) y nuevamente se centrifugó. Para la desorción, el pellet obtenido fue re-suspendido en una solución de metanol al 30% acidificado a pH 1 con HCl 1N y se dejó en agitación durante 18 horas a 4°C.

Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y éste se disolvió en 13 mL de agua destilada en un rotavapor a 65°C por 10 min a 20 rpm para eliminar el metanol presente.

Finalmente el remanente libre de metanol se concentró en la liofilizadora (FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry Systems, LABCONCO, Missouri, E.U.A), el liofilizado se diluyó en 1 mL de agua estéril y se evaluó la actividad específica. Finalmente se refrigeró hasta su utilización.

### 7.11.3 ELECTROFORESIS TRIS- TRICINA (SDS- PAGE)

Con el fin de identificar el peso molecular del péptido que presenta la actividad antimicrobiana se realizaron geles de Tris-Tricina al 17% de acuerdo a la metodología descrita en Haider *et al.*, (2012).

Los geles se prepararon de acuerdo a la Tabla 5.

**Tabla 5. Composición de los geles de concentración y separación**

	Bis-acrilamida 30%	Buffer Tris- HCl 2.5 M pH 8.8	Agua destilada	TEMED	APS (30 mg/mL)	Volumen total
<b>Gel de Concentración 4%</b>	0.66 mL	0.76 mL	3.42 mL	5 µL	150 µL	~5 mL
<b>Gel de Separación 17%</b>	5.60 mL	4.6 mL	-	6 µL	100 µL	~10 mL

Se prepararon microtubos con 15 µL de muestras y 15 µL de buffer de carga 2X (5 mL Tris- HCl 1M pH 6.8, 12 mL glicerol, 4 g SDS y 10 mg de azul de bromofenol) y por otra parte se preparó el marcador (2.5 mL buffer de carga 2X, 100 µL de mercaptoetanol y 2.4 mL de agua estéril y 1 µL de marcador Natural Polypeptide SDS-Page (Bio-Rad, CA, E.U.A). El marcador se somete a tratamiento térmico de 65°C durante 2 minutos y las muestras a 70°C durante 5 minutos.

Las muestras fueron analizadas en una cámara de electroforesis de proteínas (Mini Protean 3Cell, Bio-Rad, CA, E.U.A) durante 140 minutos a 80V en buffer de corrida 1X (25 mM Tris, 25 mM Tricina y 0.05% SDS).

Una vez terminada la corrida, el gel fue cortado por la mitad. La primera mitad se colocó en solución renaturalizante (Tris HCl 100 mM y Tritón 1% pH 8) durante toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente se realizó una prueba de actividad, colocando el gel (previamente lavado 3 veces con agua estéril) sobre una caja de Petri

inoculada con el microorganismo sensible e incubado a 37°C durante toda la noche.

La otra mitad se colocó en una solución fijadora (40% metanol y 10% ácido acético) durante 20 minutos, después en una solución teñidora (azul de Comassie R250 (Bio- Rad) 0.25% en 10% de ácido acético) durante 20 minutos y finalmente en una solución desteñidora (10% ácido acético) hasta observar las bandas teñidas, haciendo recambios de solución desteñidora.

Finalmente, los geles fueron analizados con el software Image Lab (Bio- Rad, CA, E.U.A) en el equipo Gel Doc™ XR (CA, E.U.A) y se compararon los geles de actividad con los teñidos para identificar el tamaño de la banda del péptido que presentaba a la actividad antimicrobiana.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Se determinó la concentración de proteína de los extractos neutros obtenidos a partir de las 9 cepas productoras de compuestos antimicrobianos. En la tabla 6 se observa que el extracto con mayor concentración de proteína corresponde a la cepa 7 ( $267.35 \pm 21.57 \mu\text{g/mL}$ ) y el extracto de la cepa MXVK76 resultó tener menor cantidad de proteína ( $201.507 \mu\text{g/mL}$ ), pero su valor es parecido al de la cepa control (MXVK29).

**Tabla 6. Concentración de proteína calculada para todos los extractos.**

EXTRACTOS**					
	3	6	7	478	2s
<b>Conc. de proteína (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	$267.07 \pm 3.69$	$250.04 \pm 2.56$	$267.35 \pm 21.57$	$210.59 \pm 26.68$	$239.54 \pm 3.97$
EXTRACTOS**					
	3S	4S	MXVK76	MXVK29	
<b>Conc. de proteína (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	$232.44 \pm 24.69$	$231.31 \pm 3.12$	$201.51 \pm 0.59$	$202.08 \pm 14.76$	

\*\* Los resultados son el promedio  $\pm$  desviación estándar de dos repeticiones.

- Los valores finales de proteínas fueron ajustados con sus respectivos factores de dilución

### 8.2 PRUEBAS DE ANTAGONISMO

Las pruebas antagónicas son un método cualitativo y rápido para saber si los microorganismos producen algún tipo de compuesto antimicrobiano y a qué cepas sensibles inhiben. En la Tabla 7 se observan los resultados de las pruebas de antagonismo de los 9 extractos contra las 21 cepas sensibles. Todos los extractos inhiben en diferentes proporciones a las cepas sensibles, lo cual indica que estas bacterias lácticas pueden producir algún tipo de metabolito con actividad antimicrobiana como ácido láctico, bacteriocinas, peptidoglucano hidrolasas, entre otros.

**Tabla 7. Pruebas antagónicas de BAL contra microorganismos de deterioro y patógenos (Sobrenadantes sin tratamiento)**

Clave	Cepas productoras								
	3	6	7	478	2S	3S	4S	MXVK76	MXVK29
<i>Lactobacillus curvatus</i>	-	-	-	++	++	-	+	+	+
<i>Weisella</i> spp.	-	-	-	-	++	-	-	+	++
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	+	+	-	-	+	+	++	++
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>Micrococcus luteus</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Leuconostoc</i> sp.	+	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.	-	-	-	-	++	-	+	+	-
<i>Lactobacillus</i> sp.	-	++	-	-	+	+	+	-	+
<i>Leuconostoc</i> sp.	+	++	+	+	+	+	-	+	+
<i>Carnobacterium</i> sp.	-	-	+	+	++	+	++	+	++
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	++	+	++	-	+	+	++	++	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> LM47	-	+	+	+	-	-	+	++	++
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	-	+	-	-	+	-	+	+	++
<i>Listeria monocytogenes</i> LM88	++	+	-	++	-	-	++	+	+
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	+	+	+	+	++	++	+
<i>Bacillus cereus</i>	++	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> LM82	-	-	++	-	-	-	+	+	+
<i>Salmonella Typhi</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	-	-	-	++	+

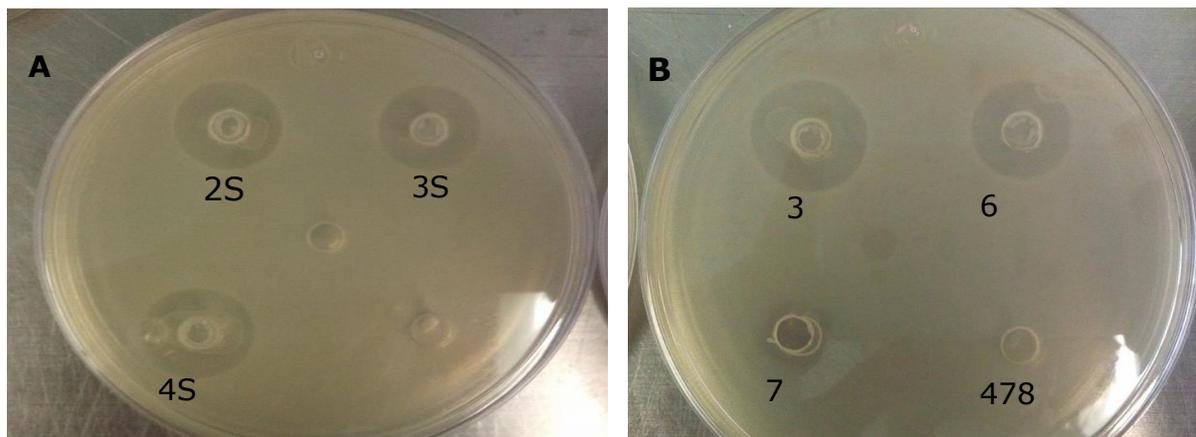
\*Inhibición total (++), Inhibición media (+), Inhibición nula (-)

### 8.3 DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO ANTIMICROBIANO Y LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

Se realizaron determinaciones cuantitativas para conocer el espectro antimicrobiano de los extractos neutros de las cepas productoras, esto con el fin de saber qué bacterias son inhibidas con compuestos antimicrobianos diferentes al ácido láctico, además se determinó la actividad específica contra las diferentes cepas sensibles.

En la Figura 5 se observan los halos de inhibición obtenidos por las cepas 2S, 3S, 4S, 3, 6 y 7 contra *Listeria innocua* (ATCC33090), sin embargo, el extracto 478 no presentó inhibición contra este microorganismo sensible.

En la tabla 8 se observan los resultados de la actividad específica de los diferentes extractos en estudio. Los resultados reportados indican que la inhibición de todas las cepas sensibles puede ser por la producción de ácido láctico, ya que al neutralizar el efecto ácido, únicamente el extracto neutro de la cepa MXVK76 presentó actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram positivas deteriorantes.



**Figura 5. Halos de inhibición de los diferentes extractos contra *Listeria innocua*. A) Cepas 2S, 3S Y 4S; B) Cepas 3, 6, 7 y 478**

Algunos autores reportan que las BAL producen bacteriocinas que inhiben el crecimiento de cepas del género de *Listeria*, en particular algunas enterocinas (Parente y Hill, 1992; Klaenhammer, 1993; Cintas *et al.*, 2000; Álvarez- Cisneros *et al.*, 2010; Asurmendi *et al.*, 2015), por lo que la posible producción de estos metabolitos puede explicar la actividad antimicrobiana contra *Listeria*.

Con respecto a *Escherichia coli*, no se observó inhibición por ninguna de las cepas en estudio, ya que los espectros de inhibición de las bacteriocinas producidas por BAL se encuentran reducido a las relacionadas taxonómicamente (Kang y Lee, 2005).

De acuerdo a lo reportado por Álvarez- Cisneros *et al.*, (2010), el extracto de la cepa MXVK29 inhibió a todos los géneros de *Listeria* que se utilizaron y el de la cepa MXVK76 presenta un comportamiento similar a ésta, por lo tanto los siguientes procedimientos se hicieron únicamente para la cepa *Enterococcus faecium* MXVK76, además de inhibir a una mayor cantidad de cepas sensibles en comparación con las demás productoras.

**Tabla 8. Actividad específica de las BAL en estudio (Sobrenadantes con un pH ajustado a 7)**

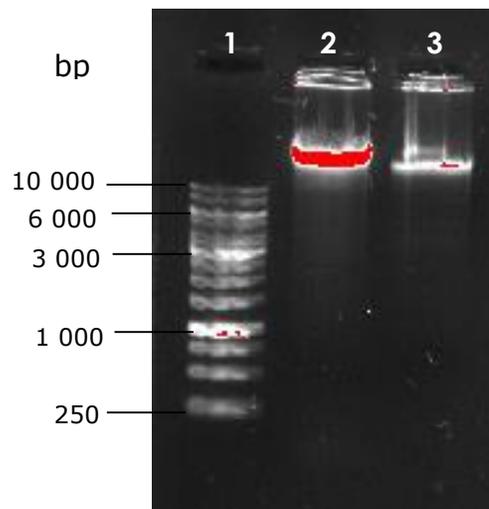
CEPAS SENSIBLES	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (mm/μg proteína)**								
	3	6	7	478	2S	3S	4S	MXVK76	MXVK29
<b><i>Listeria innocua</i> ATCC33090</b>	2.06±0.18	1.4±0.07	1.5±0	0.24±0.08	1.60±0.07	1.43±0	0.51±0.22	1.25±0.006	0.25±0.08
<b><i>Lactobacillus curvatus</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0.5±0.17	1.82±0.17
<b><i>Weisella spp.</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0.51±0.17	1.9±0.25
<b><i>Lactobacillus casei</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0.33±0.33	0.99±0.83
<b><i>Escherichia coli</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>Carnobacterium sp.</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>Listeria monocytogenes</i> LM47</b>	0	0	0	0.16±0.16	0	0	0	0	0.08±0.08
<b><i>Listeria monocytogenes</i> Scott A</b>	0	0	0	0	0	0	0	0.75±0.01	0.17±0
<b><i>Listeria monocytogenes</i> LM88</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.41±0.08
<b><i>Clostridium sporogenes</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*\*Los resultados son el resultado del promedio ± desviación estándar de un ensayo con su repetición.

## 8.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

### 8.4.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Una vez obtenido el ADN genómico con el kit de extracción, se visualizó en un gel de agarosa para confirmar su integridad y tamaño. El perfil electroforético del ADN total de la cepa MXVK76 se muestra en la figura 6; el tamaño de la banda de ADN genómico se encuentra por encima de los 10000 pb, lo que nos demuestra que no hay degradación y que está íntegro para utilizarlo como molde para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S.



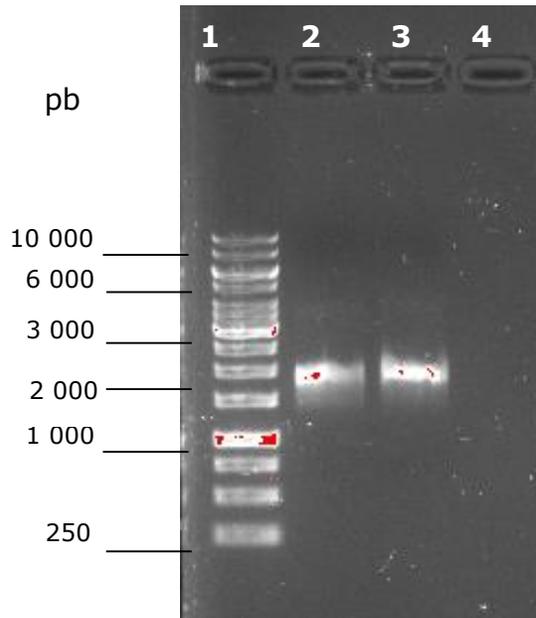
**Figura 6. ADN total extraído de la cepa MXVK76.**

**Carril 1: Marcador comercial de 1 kb Thermo Scientific. Carril 2 y 3: ADN de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK76**

### 8.4.2 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE LA REGIÓN ARNr 16S

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede replicar un gen de ADN entre miles de genes repetidas veces. Esto se realiza con la ayuda de oligonucleótidos, iniciadores o primers que se unen a cada una de las dos cadenas del ADN que ya están separadas, por lo que la selección de los primers es de gran importancia en esta metodología. Una vez obtenido el fragmento del gen ADNr 16S de aproximadamente 1500 pb, se realizó una purificación para poder secuenciar el fragmento.

En la figura 7 se pueden observar los fragmentos amplificados y purificados del gen ADNr 16S de la cepa MXVK76, una vez corroborado el fragmento puro, éste se envió a secuenciar.



**Figura 7. Fragmento amplificado y purificado del gen ADNr 16S**  
**Carril 1: Marcador comercial de 1 kb Thermo Scientific.**  
**Carril 2 y 3: Fragmentos purificados del gen ADNr 16S de la cepa MXVK76**

#### 8.4.3 SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO Y PURIFICADO

Del fragmento purificado se obtuvieron 2 secuencias, la secuencia forward (figura 8) y la reverse (figura 9), ambas secuencias se analizan mediante algoritmos del programa BLAST del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

```

5'-GGCAGTAACGCATGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGACACGCTTCTT
TAGTCGCACCCGAGCTTGCTCAAGGAAAAAGAGGAGTGCGAAGGGGAGTAAAC
GTGGTTAAACTGCCCATCAGAAAGGGATAACAATTGGAAACAGGTGCTAATACCGT
ATAACAATCAAACCCGCATGGTTATTATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGAT
GACTGGACCCGAGGCGCATTAACTAGTTGGTGAGGTCACGGCTCCCAAGGCACG
TTGTTTCACTACATGACAGGGTGATACGGGCCATGGACGGTAAGTTACATTCCTTC
CCGTATCCTAGTG-3

```

**Figura 8. Secuencia forward del gen ADNr 16S**

```

5'-
GGACCTTCGATACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTA
GGCGGCTGGCTCAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGG
TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGGCGTGCTGAT
CCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGA
ACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTAC
TTCCATTGGAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGGTGATTTGACGT
CATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAA
TGGTGGCAGCTAACAAATGAGGGGGGCGCTCGTTGCTTTTTTTTTTCCCAACATCTC
ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCCCCACCTGTCACCTTGCCCCCGAAGGGGA
AGCTCTATCTCTAGAGTGCTCAAAGGATGTTTAGTCCTGTTTATAGTTATTCTTGAC
GCA-3

```

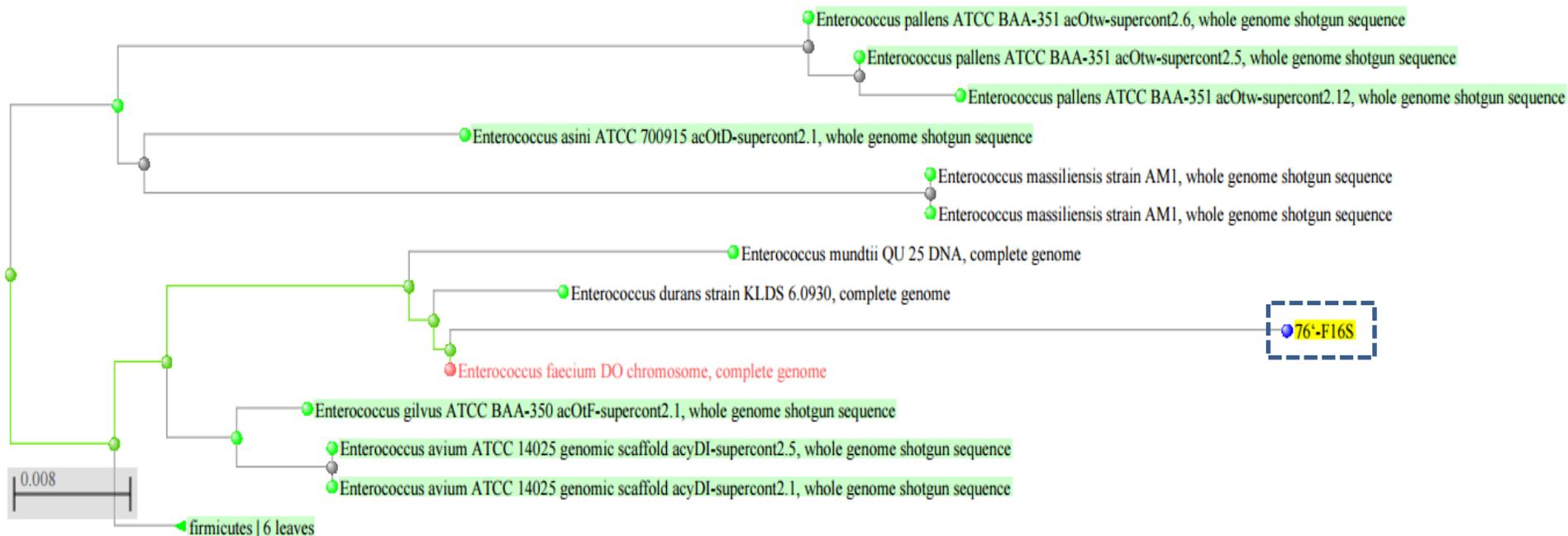
**Figura 9. Secuencia reverse del gen ADNr 16S**

En la tabla 9 se muestran la similitud que presenta la secuencia del gen ADNr 16S de la cepa MXVK76 con *Enterococcus faecium*, algunos autores como Rodicio y Mendoza (2004), han indicado que porcentajes de similitud mayores al 90% indican una identificación confiable a nivel especie para *Enterococcus faecium*.

En la figura 10 se observa el árbol filogenético obtenido a partir de la página de NCBI, la cual relaciona taxonómicamente la secuencia testigo con las secuencias de la base de datos, como se observa, la cepa en estudio está relacionada directamente con la especie *faecium* del género enterococos y está relacionada con otras especies del mismo género como: *avium*, *durans*, *munditi*, etc., y pertenece al filo firmicutes (bacterias Gram positivas).

**Tabla 9. Cepas alineadas por similitud con *Enterococcus faecium* MXVK76**

Secuencias que producen alineamientos significativos	Cepas aisladas de:	Similitud (%)	Score (Bits)	Valor E
<b><i>Enterococcus faecium</i> DO, genoma completo</b>	Sangre	95%	5208	0.0
<b><i>Enterococcus faecium</i> strain ISMMS VRE 11, genoma completo</b>	Sangre	95%	5202	0.0
<b><i>Enterococcus faecium</i> strain E1, genoma completo</b>	Sangre	95%	5197	0.0
<b><i>Enterococcus faecium</i> strain ISMMS VRE 10 genoma</b>	Sangre humana	95%	5225	0.0
<b><i>Enterococcus faecium</i> strain ISMMS VRE 8, genoma completo</b>	Sangre humana	95%	5197	0.0
<b><i>Enterococcus faecium</i> strain ISMMS VRE 7, genoma completo</b>	Sangre humana	95%	5192	0.0

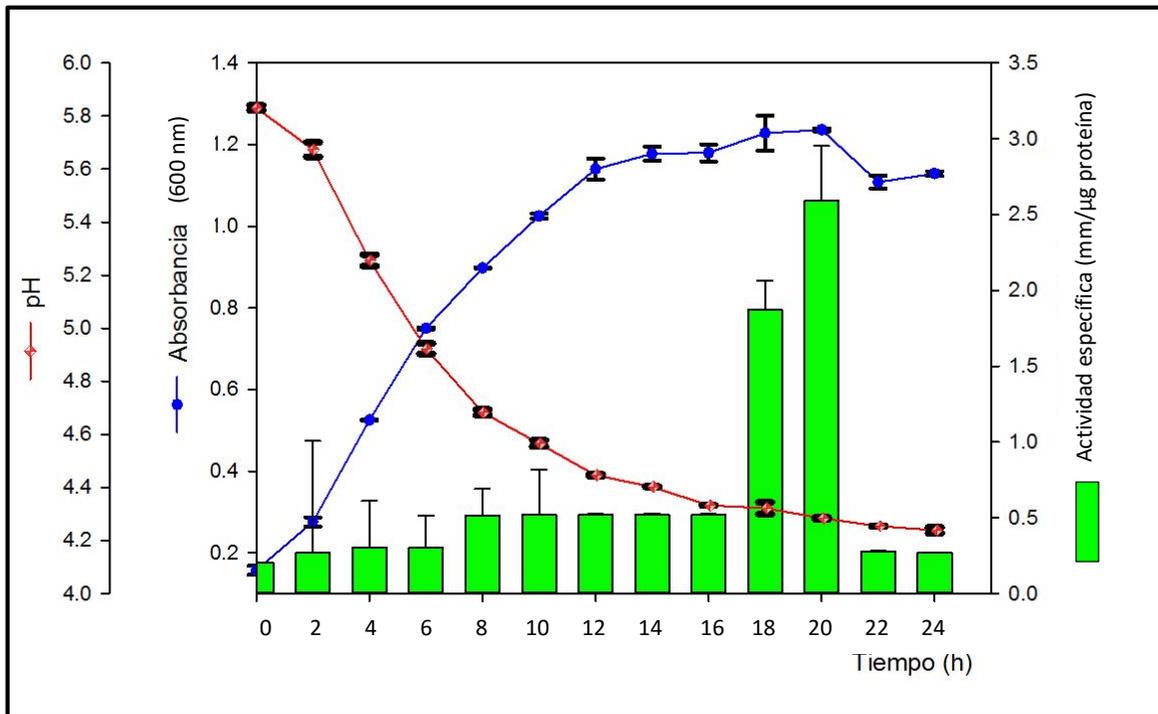


**Figura 10. Árbol filogenético *Enterococcus faecium* MXVK76**

## 8.5 CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ANTIMICROBIANOS

Para conocer las condiciones en que la cepa MXVK76 produce el mayor efecto inhibitorio, se realizó una cinética en la cual se evaluó la densidad celular, el pH y la actividad específica en el transcurso del tiempo. En la figura 11 se observa el perfil cinético, en el cual la absorbancia y la actividad específica van incrementando conforme transcurre el tiempo; y el pH disminuye hasta llegar a 4.2, donde se mantiene constante. La disminución del pH se debe a la producción de la BAL provocando la acidificación del medio conforme aumenta su crecimiento celular.

La producción de bacteriocinas por BAL está asociada a la fase de crecimiento exponencial y termina al final de esta fase (Parente *et al.*, 1997) Pero en este caso, la mayor actividad específica se presenta entre las 18 y 22 horas, lo que corresponde a un metabolito secundario. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores que reportan la producción de algunas bacteriocinas como metabolitos secundarios (De Vuyst y Vandamme, 1994; Álvarez- Cisneros *et al.*, 2010). Pasando esta fase la absorbancia disminuye, viéndose afectada la actividad específica, esto se debe probablemente a la readsorción de la bacteriocina a la superficie de la célula a pH bajo (4.2) lo que puede causar la disminución de la actividad inhibitoria (Franz *et al.*, 1999).



**Figura 11. Perfil de crecimiento, pH y actividad específica de la cepa MXVK76.**

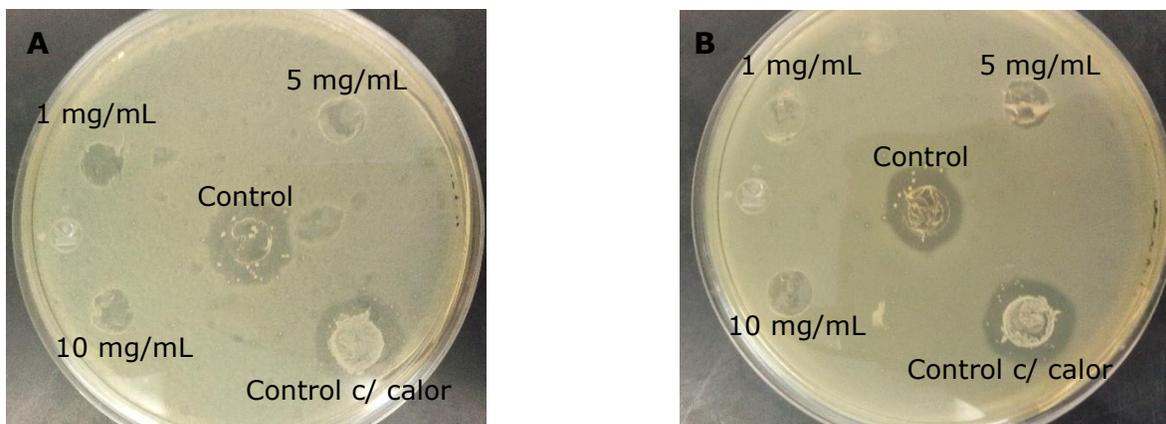
### 8.6 ESTABILIDAD A PROTEASAS

El tratamiento con enzimas proteolíticas es una de las pruebas más reportadas por diversos autores para identificar la naturaleza proteica de los compuestos antimicrobianos (Kang y Lee, 2005; Todorov y Dicks, 2005; Salvucci *et al.*, 2016). Las enzimas proteolíticas que se utilizan frecuentemente son: pepsina, tripsina, pronasa, proteinasa K, papaína, entre otras.

En este experimento se evaluaron tres concentraciones diferentes de proteinasa K y tripsina en el extracto crudo de la cepa MXVK76. En todas las concentraciones se tiene una pérdida total de la actividad. Estos resultados son similares a los reportados por algunos autores (Du Toit *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2002; Kang y Lee, 2005, Álvarez- Cisneros *et al.*, 2010; İspirli *et al.*, 2016), los cuales indican que la pérdida de actividad

señala que el compuesto antimicrobiano es de origen proteico, característica de las bacteriocinas.

En las Figuras 12A y 12B se muestra que no existe inhibición contra *Listeria innocua* en ninguno de los tratamientos, tanto de proteinasa K como de tripsina, a las 3 horas de incubación.



**Figura 12A: Estabilidad del compuesto antimicrobiano producido por la cepa MXVK76 a proteinasa K contra *Listeria innocua*. Figura 12B: Estabilidad del compuesto antimicrobiano producido por la cepa MXVK76 a tripsina contra *Listeria innocua*.**

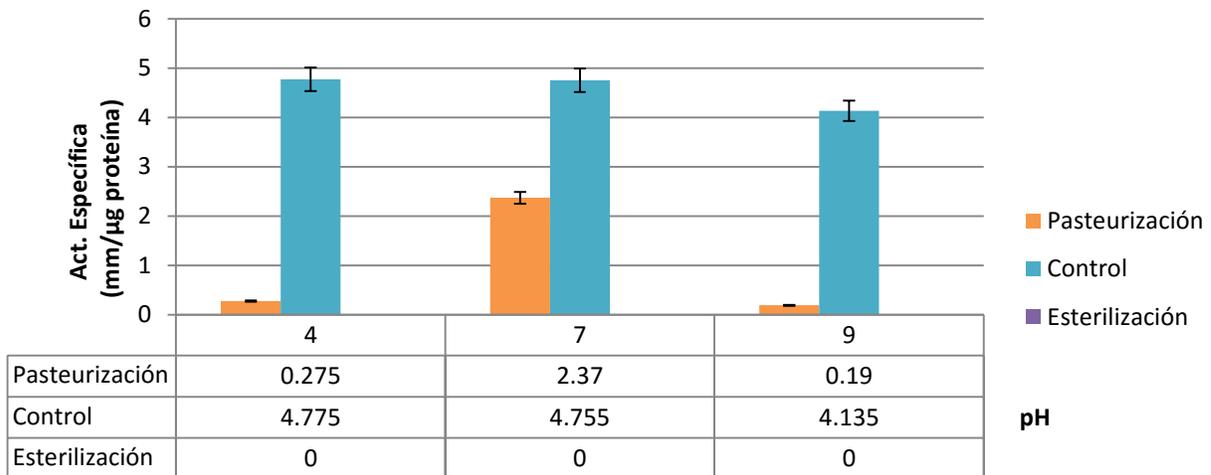
### 8.7 ESTABILIDAD A PH Y TRATAMIENTOS TÉRMICOS

Las pruebas de estabilidad se realizaron con el objetivo de conocer si el compuesto antimicrobiano de origen proteico producido por la cepa MXVK76 resiste algunos tratamientos térmicos (pasteurización y esterilización) y cambios de pH a los que son sometidos los alimentos durante su procesamiento.

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos para el compuesto antimicrobiano de origen proteico producido por la cepa MXVK76, donde se puede observar que el control (sin tratamiento térmico) presenta mayor actividad a pH ácido ( $4.775 \pm 0.389$  mm/ $\mu$ g proteína) que a pH neutro o básico; algunos autores (Moreno *et al.*, 2002; Foulquié y col.,

2003; Álvarez- Cisneros *et al.*, 2011; İspirli *et al.*, 2015) indican que los compuestos antimicrobianos tipo bacteriocina pueden aumentar su actividad antimicrobiana en condiciones ácidas porque esto favorece sus características catiónicas, al tener proteínas cargadas, éstas se unen a los fosfolípidos cargados negativamente y así logran interaccionar con la membrana de las células sensibles e inhibirlas; además de que la solubilidad de las bacteriocinas aumenta cuando el pH es menor que el valor de su punto isoeléctrico (8.3- 10.7) produciendo la repulsión entre las proteínas y aumentando su solubilidad (Álvarez- Cisneros *et al.*, 2010; Ebrahimipour *et al.*, 2011).

Sin embargo, al evaluarse el efecto de la combinación de pH y temperatura se observa en la figura 13 que en condiciones de pasteurización a pH básico, la actividad disminuye en un 86.96%; por otra parte, en procesos de esterilización se pierde completamente la actividad en todos los valores de pH, ya que la temperatura de este proceso es mucho mayor de lo que pueden soportar las bacteriocinas. El resultado obtenido indica que este compuesto antimicrobiano puede ser utilizado en productos que tengan operaciones unitarias de pasteurización en su proceso, lo cual puede ayudar en procesos de bioconservación. Estos resultados son similares a los reportados por Hwanhlem *et al.* (2017).

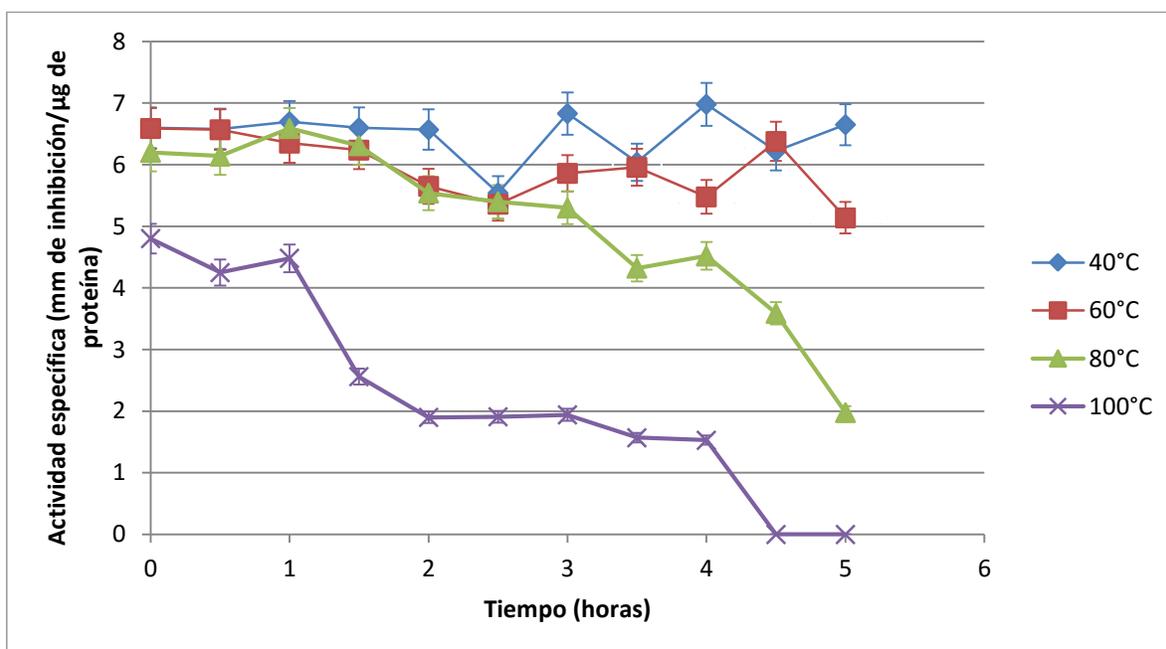


**Figura 13. Estabilidad del compuesto antimicrobiano producido por la cepa MXVK76 a procesos térmicos y pH.**

En la Figura 14 se observan las diferencias que existen en las actividades específicas cuando el extracto de la cepa MXVK76 se somete a diferentes temperaturas durante 5 horas. Los tratamientos a 40, 60 y 80°C no muestran diferencias durante las primeras 2.5 horas, sin embargo la temperatura de 80°C comienza a disminuir paulatinamente hasta las 5 horas, pero no pierde completamente su actividad inhibitoria. La temperatura de 100°C mantiene la actividad durante la primera hora, posteriormente empieza a decaer llegando a una actividad nula a las 4.5 horas.

Según Hwanhlem *et al.* (2017), después de calentar el extracto de una cepa de *Enterococcus faecalis* durante 100°C por 30 minutos, la bacteriocina siguió manteniendo su actividad inhibitoria. El extracto de la cepa MXVK76 mantiene su actividad inhibitoria a 100°C hasta la primera hora; para un alimento no es necesario someterlo a más de una hora a 100°C, por lo que la bacteriocina bien podría utilizarse. Estos resultados también son similares a los reportados por Ispirli *et al.* (2015), quienes

realizaron pruebas de resistencia a temperatura de 60, 80 y 100°C para comprobar que la actividad antimicrobiana del extracto de la cepa de *Enterococcus faecium* extraída de intestino humano está presente después de 30 minutos y efectivamente, después de este tiempo la actividad continúa.



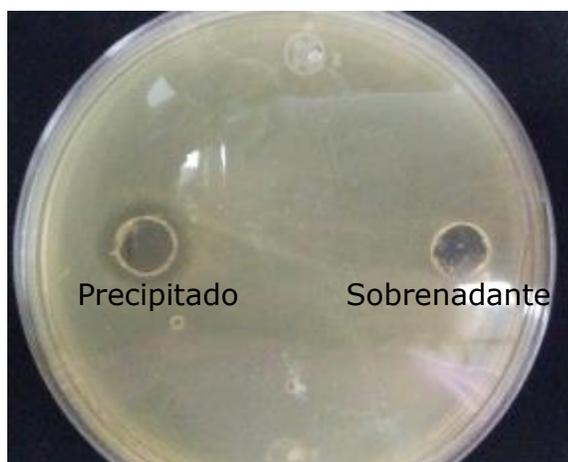
**Figura 14. Estabilidad del extracto de la cepa MXVK76 a diferentes temperaturas.**

## 8.8 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO ANTIMICROBIANO

### 8.8.1 EXTRACCIÓN CON ACETONA

Para la extracción del compuesto antimicrobiano se realizó una precipitación con acetona, la cual se fundamenta en la solubilidad que presentan las proteínas o péptidos en solventes orgánicos (Chung *et al.*, 2011).

Una vez obtenido el precipitado y el sobrenadante, se realizó una prueba de actividad antimicrobiana para conocer en qué fase se tiene el compuesto antimicrobiano. En la figura 15 se observa que la actividad antimicrobiana se tiene en el precipitado, por lo que se descartó el sobrenadante. Chung *et al.* (2011) reportan que la actividad antimicrobiana se presentó en la fase líquida al semipurificar mediante esta técnica a una pediocina; por lo que su pediocina al ser soluble en solventes orgánicos se quedó en el sobrenadante; contrario a los resultados aquí presentados, la actividad antimicrobiana se encontró en el precipitado eso significa que la cepa *Enterococcus faecium* MXVK76 no es soluble en solventes orgánicos, ocasionando que la enterocina precipitara (González *et al.*, 1994).



**Figura 15. Halos de inhibición correspondientes a las fases obtenidas en la extracción con acetona (precipitado y sobrenadante) del extracto de la cepa MXVK76 contra *Listeria innocua*.**

En la tabla 10 se observan los porcentajes de recuperación del compuesto antimicrobiano a partir del extracto libre de células que representa el 100% de la actividad. En la fase del precipitado, se logró recuperar el 60% de la actividad inicial, debido a que algunas proteínas no son estables en algunos solventes, lo que provocó una pérdida de actividad del 40% o probablemente el solvente que en este caso fue acetona, no fue el adecuado. Katharopoulos *et al.*, (2016) utilizan una combinación de etanol y dietil éter y su rendimiento es más alto (92%) que lo obtenido en el presente trabajo.

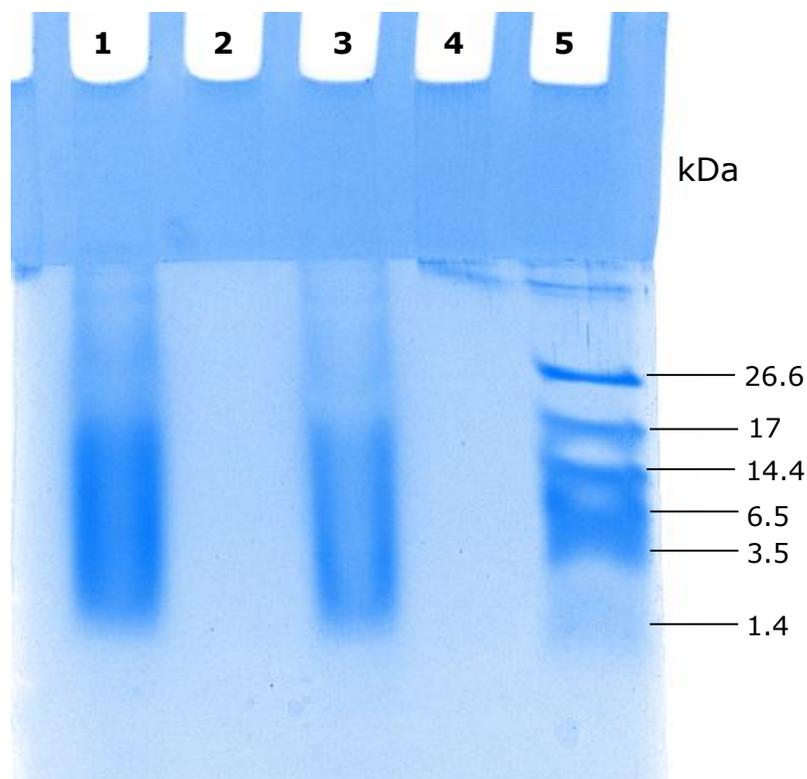
**Tabla 10. Actividad específica y rendimiento de la técnica de extracción por acetona.**

	Volumen (mL)	*Concentración de proteína (µg)	*Actividad (mm de inhibición)	Actividad específica (mm inhibición/µg)	Rendimiento (%)
<b>Extracto crudo</b>	<b>300</b>	<b>2364</b>	<b>5x10<sup>3</sup></b>	<b>2.12±0.006</b>	<b>100</b>
<b>Precipitado</b>	<b>5</b>	<b>2820</b>	<b>3x10<sup>3</sup></b>	<b>1.050±0.003</b>	<b>60</b>
<b>Sobrenadante</b>	<b>10</b>	<b>0.22</b>	<b>0</b>	<b>0±0</b>	<b>0</b>

\*Valores cuantificados en el volumen total de la etapa.

Una vez extraído y concentrado el compuesto antimicrobiano de origen peptídico, se realizó un gel de acrilamida TRIS- TRICINA al 17% con el fin de conocer el perfil proteico del extracto.

En la figura 16 se observa el gel de acrilamida utilizando las muestras obtenidas con la precipitación con acetona, el perfil de las muestras no presenta ninguna banda definida, estos resultados son similares a los reportados por Pinto *et al.* (2009), quienes atribuyen este barrido al probable arrastre de componentes del medio de cultivo en el que se produce el compuesto antimicrobiano, y el método de extracción utilizado no es muy eficiente para la visualización de proteínas.



**Figura 16. Gel de poliacrilamida al 17% con el concentrado de la purificación por acetona. Carril: 1 y 3, concentrado MXVK76. Carril 5: Marcador Natural Polypeptide SDS- PAGE.**

Con estos resultados se decidió utilizar otro método de extracción, donde se puedan definir las bandas del compuesto antimicrobiano.

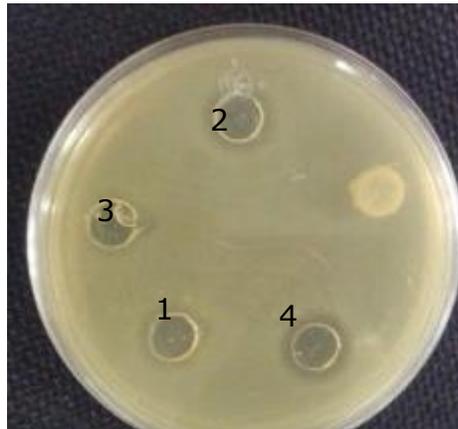
#### 8.8.2 PURIFICACIÓN POR ADSORCIÓN- DESORCIÓN

Se utilizó el método de adsorción- desorción descrito por Yang *et al.* (1992). Este método consiste en cambiar el pH del cultivo para facilitar primero, que el compuesto antimicrobiano se adhiera a la membrana celular y después para que el compuesto se desprege de la célula y quede en el medio para lograr la actividad antimicrobiana. Este método concentra de mejor manera el extracto de la cepa, además de que la pérdida total es bastante baja y es un procedimiento económico para grandes cantidades de medio a concentrar. Además es útil para proteínas

de sistemas biológicos en los que la adsorción y la liberación de receptores específicos dependen directamente del pH (Yang *et al.*, 1992; Álvarez-Cisneros, 2010)

En la figura 17 están los halos de inhibición formados por cada una de las etapas de este método de concentración. En la última etapa, que fue la del extracto concentrado y liofilizado es donde el halo de inhibición tiene un tamaño más grande que en los demás.

En la tabla 11 está el rendimiento obtenido de cada etapa del proceso de adsorción- desorción, siendo mayor el rendimiento obtenido en el liofilizado que en el extracto crudo.



**Figura 17. Halos de inhibición en la extracción por adsorción- desorción contra *Listeria innocua*. Pozo 1: Extracto crudo de la cepa MXVK76 . Pozo 2: Etapa de adsorción. Pozo 3: Etapa de desorción. Pozo 4: Liofilizado**

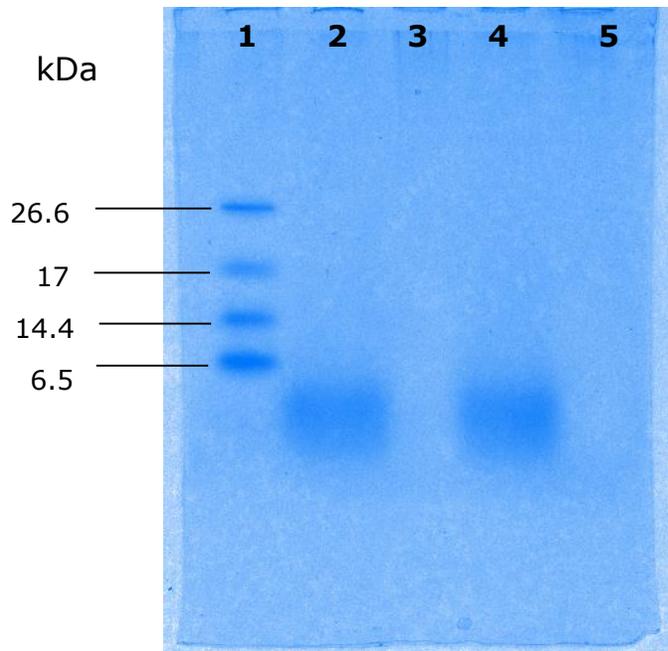
**Tabla 11. Rendimiento de la actividad específica de cada paso en la adsorción- desorción.**

	Volumen (mL)	Concentración de proteína ( $\mu\text{g}$ )	Actividad (mm de inhibición)	Actividad específica (mm de inhibición/ $\mu\text{g}$ )	*Rendimiento (%)
<b>1. Extracto crudo</b>	<b>300</b>	<b>2,364</b>	<b><math>5 \times 10^3</math></b>	<b><math>2.12 \pm 0.006</math></b>	<b>100</b>
<b>2. Adsorción</b>	<b>250</b>	<b>1,585</b>	<b><math>3.1 \times 10^3</math></b>	<b><math>1.95 \pm 0.108</math></b>	<b>62</b>
<b>3. Desorción</b>	<b>50</b>	<b>750</b>	<b><math>1.8 \times 10^3</math></b>	<b><math>2.40 \pm 0.653</math></b>	<b>36</b>
<b>4. Liofilizado</b>	<b>5</b>	<b>40.01</b>	<b><math>1.0 \times 10^3</math></b>	<b><math>25.0 \pm 0.050</math></b>	<b>20</b>

\*Valores cuantificados en el volumen total de la cepa

A pesar de que en el liofilizado se formó un halo de inhibición más grande que en los demás, su cantidad de proteína fue más baja en comparación con las otras etapas de la purificación, por eso el porcentaje de rendimiento es bajo. En la etapa de adsorción y desorción también hubo actividad específica, aunque fue mínima, debido a que en el caso de la adsorción, pudiesen quedar en el medio un poco del compuesto antimicrobiano provocando la inhibición y en la desorción como el compuesto está despegado de la pared celular, causa actividad antimicrobiana.

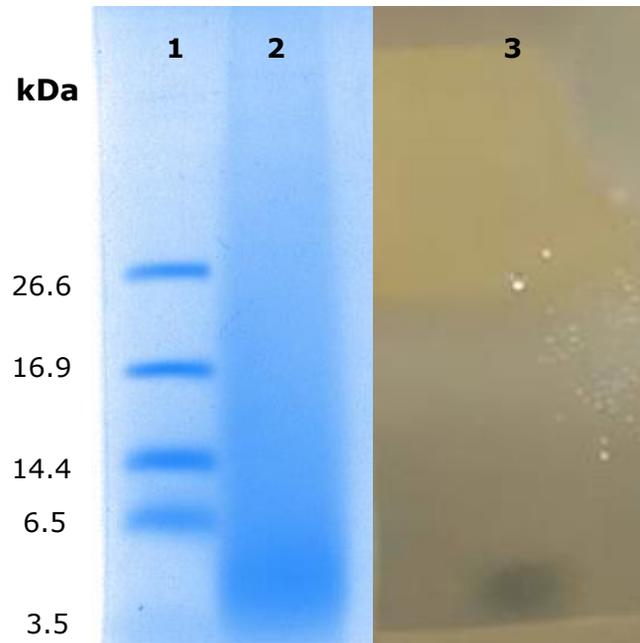
En la figura 18 se observa una banda entre 3.5 y 6.5 kDa en el gel de acrilamida al 17% del extracto liofilizado, el tamaño obtenido es característico de bacteriocinas, ya que de acuerdo a la clasificación de Cotter *et al.* (2005), éstas tienen pesos moleculares menores a 10 kDa.



**Figura 18. Gel de poliacrilamida al 17% con el concentrado de la purificación por adsorción-desorción. Carril 1: Marcador Natural Polypeptide SDS- PAGE. Carril 2 y 4: Concentrado *Enterococcus faecium* MXVK76**

Con estos resultados y con lo obtenido en las pruebas de actividad antimicrobiana, se realizó nuevamente un gel para determinar si la banda del péptido observada por la técnica de adsorción-desorción presenta actividad antimicrobiana, además de definir el peso molecular aproximado.

Para la prueba de actividad se cortó el gel por la mitad y una mitad se tiñó y la otra se analizó con el microorganismo sensible para identificar el péptido activo. En la figura 19 se pueden observar ambos geles acoplados, el gel de tinción muestra una banda difusa, la cual es característica de las bacteriocinas de acuerdo a algunos autores (Pardo *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2009; Todorov *et al.*, 2013). Con respecto al gel de actividad, se puede observar un halo de aproximadamente 5 kDa, lo que indica que el compuesto antimicrobiano producido por *Enterococcus faecium* MXVK76 es un péptido antimicrobiano tipo bacteriocina con alta actividad anti listeria.



**Figura 19. Gel de poliacrilamida al 17% con el extracto de *Enterococcus faecium* MXVK76. Carril 1: Marcador Natural Polypeptide SDS-PAGE. Carril 2: Concentrado MXVK76 por absorción desorción. Carril 3: Gel de actividad contra *Listeria innocua* ATCC3309D.**

## 9. CONCLUSIONES

- De todas las cepas en estudio, extraídas de productos cárnicos, sólo la cepa MXVK76 demostró inhibir a la mayoría de las cepas sensible como *Listeria*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, por mencionar algunas, además de mostrar un comportamiento con la cepa de referencia, *Enterococcus faecium* MXVK29.
- La cepa MXVK76 presentó una similitud del 95% con *Enterococcus faecium* de acuerdo a la base de datos del NCBI.
- El perfil cinético muestra que la mayor actividad antimicrobiana se presenta en la fase estacionaria, entre las 18 y 20 horas con un pH entre 4.2 y 4.4.
- El compuesto antimicrobiano es de origen proteico, ya que la actividad inhibitoria fue nula después de los tratamientos con proteasas, además es estable a tratamientos de pasteurización (ácido, neutro y básico) y soporta temperaturas de 100°C durante 1 hora.
- El método de concentración y purificación por adsorción- desorción fue más efectivo para extraer el compuesto producido por la cepa MXVK76, obteniendo un rendimiento de 20% y una banda con actividad antimicrobiana de aproximadamente 5kDa.
- Las características de estabilidad a tratamientos térmicos y pH's, pérdida de actividad antimicrobiana en presencia de proteasas y tamaño molecular menor a 5 kDa, infiere que se trata de una enterocina de clase I con actividad antimicrobiana contra cepas relacionadas taxonómicamente.

## 10. PERSPECTIVAS

- Obtener e identificar la secuencia del péptido antimicrobiano y clasificarlo dentro del grupo de las bacteriocinas producidas por Enterococos (enterocinas).
- Caracterizar molecularmente el péptido para identificar la organización genética y compararlo con otras bacteriocinas.
- Evaluar otros métodos de purificación que mejoren los rendimientos de extracción del compuesto antimicrobiano.
- Evaluar la actividad antimicrobiana en matrices complejas de alimentos y su interacción con otros conservadores naturales y químicos.

## 11. REFERENCIAS

- Acuña, L.**, Picariello, G., Sesma, F., Morero, R. D. y Bellomio A. (2012) A new hybrid bacteriocina, Ent35- MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram- positive and Gram- negative bacteria. *FEBS Open Bio* (2): 12-19.
- Akbar, A.**, y A.K. Anal (2011). Food safety concerns and food- borne pathogens, Salmonella, Escherichia coli and Campylobacter. *FUUAST Journal of Biology*. 1(1):5- 17.
- Akbar, A.**, Ali I., y A.K. Anal (2016). Industrial perspectives of lactic acid bacteria for biopreservation and food safety. *Journal of Animal and Plant Sciences* 26(4):938- 948
- Álvarez- Cisneros, Y.M.**, Fernandez, F., Wachter- Rodarte, C., Aguilar, M. y Ponce- Alquicira, E. (2010) *Enterococcus faecium* MXVK29 strain active against *Listeria spp.* *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90 (14): 2475- 2481.
- Álvarez- Cisneros, Y.M.**, Sáinz Espuñes, T.R., Wachter, C., Fernández, F. J. y Ponce- Alquicira, E. (2011). Enterocins: Bacteriocins with applications in the food industry. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*: 1330- 1341.
- Ananou, S.**, Maqueda, M., Martínez- Bueno, M. y Valdivia E. (2007). Biopreservation an ecological approach to improve the safety and shelf- life of foods. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.

- Asurmendi, P.**, García, M.J., Pascual, L., Barberis, L., (2015). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* by lactic acid bacteria isolated from brewer's grains used as feedstuff in Argentina. *Journal of Stored Products Research* 61: 27-31.
- Atterbury, R.J.** (2009). Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. *Microbial Biotechnology* 2(6): 601- 602
- Aymerich, M.T.**, Hugas, M. y Monfort, J.M. (1998). Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Science and Technology International*, 4: 141-158
- Aymerich, M.T.**, Garriga, M., Yila, J., Vallier, J., Monfort, J. M. Hugas, M. (2000). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products *Journal of Food Protection* 63 (6): 721- 726.
- Beristain- Bauza, S.C.**, Palou, E. y López- Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 6: 64-78.
- Beshkova, D.** y Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*. 12(4): 1- 14.
- Block, S.S.** (1991). Peroxygen compounds in disinfection, sterilization and preservation. *Ed. S.S. Block, Lea y Feabiger Philadelphia*: 169-180.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(2): 248-254.

- Bourgeois, C. M.** y Larpent, J. R. (1995). Microbiología Alimentaria II: Fermentaciones Alimentarias. *Ed. Acribia, Zaragoza*
- Chen, H. y Hoover, D.G.** (2003) Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Technology*, 2: 82- 99.
- Chung, D.M.**, Kim K.E., Jeong, S.Y., Park, C.S., Ahn, K.H., Kim, D.H., Kang, D.O., Chun, H.K, Yoon, B.D., Koh, H.B., Kim, H.J. y Choi, N.S. (2011). Rapid concentration of some bacteriocin- like compounds using an organic solvent. *Food Science and Biotechnology*, 20 (5): 1457- 1459.
- Cintas, L.**, Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L.S., Holo, H., Hernández P.E. y Nes, I.F. (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A y L50B, the sec- dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N- terminal extensión termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology*, 182: 6806- 6814.
- Cleveland, J.**, Montville, T.J., Nes, I.F. y Chikindas, M.L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20.
- Cotter, P.D.**, Hill, C. y Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 10: 777- 788.
- Daeschel, M.A.** (1989) Antimicrobial substances from acid lactic for use as food preservative. *Food technology*, 43: 164- 167.
- De la Fuente, N.M.** y Barboza, J.E. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Guanajuato. Acta Universitaria*, 20: 43- 52.

- De Vuyst, L.** y Vandamme, E.J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. *Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom*: 91- 142.
- Delves- Broughton, J.** (2005). Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 57(12): 525-527.
- Du Toit, M.**, Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T. y Holzapfel, W.H. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 482- 494.
- Dündar, H.**, Atakay, M., Çelikbiçak, Ö., Salih, B y Bozoğlu, F. (2014). Comparison of two methods for purification of enterocin B, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* W3. *Preparative Biochemistry Biotechnol.* 45(8): 796- 809.
- Ebrahimipour, G.**, Moradi, A., Mehrdad, M., Alaei, H. y Marzban, A. (2011). Evaluation of antimicrobial substance produced by a bacterium isolated from *Parmacella iberica*. *Jundishapur Journal of Microbiology Biotechnology* 4(3): 131- 140.
- Ekbal, M.**, Ibrahim, A. y Elbarbary, H.A. (2012). Effect of bacteriocin extracted from *Lactobacillus acidophilus* on the shelf- life of pasteurized milk. *Journal of American Science*, 8 (2): 620- 626.
- Ennahar, T.**, Sashihara, K. y Sonomoto, A. I. (1999). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology*, 24: 85- 106.

- Ennahar, S.**, Deschamps, N. (2000). Anti- Listeria effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 449- 457.
- Fortina, M.G.**, Ricci, G., Mora, D. y Manachini, P.L. (2004) Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus sp. nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1717- 1721.
- Foulquié, M.R.**, Callewart, R., Devreese, B., Beeumen, J. V. y De Vuyst, L. (2003). Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 214- 229.
- Foulquié, M.R.**, Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. y De Vuyst, L. (2006) The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 1-24.
- Franz, C.M.A.P.**, Worobo, R. W., Quadri, L. E. N., Schillinger, U., Holzappel, W. H., Vederas, J. C. y Stiles, M.E. (1999). Atypical locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2170- 2178.
- Franz, C.M.A.P.**, Van Belkum M.J., Holzappel, W.H., Abriouel, H. y Galvez A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*, 31: 293- 310.
- Fuente, S. N.** y Barboza, C. J. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta universitaria- Universidad de Guanajuato*, 20: 43- 52.

- Gálvez, A.**, Grande, M. J., Lucas, R. y Pérez, R. (2014) Food biopreservation. *SpringerBriefs in Food, Health and Nutrition*. 3-14.
- García, C. I.**, Campos, G. M. y Contreras C. M. (2014). Expression, purification and characterization of a bifunctional 99- kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-015- 6593-2.
- Gautam, N.** y Sharma, N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian Journal Microbiology*, 49 (3): 204-211.
- Geisen, R.**, Lücke, F.K. y Kröchel, L. (1992). Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtschaft*, 72 (6): 894-898.
- Giraffa, G.** (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of Food Microbiology*, 49 (3): 204- 211.
- Gonzalez, B.**, Arca, P., Mayo, B. y Saurez J.E. (1994). Detection, purification and partial characterization of plantarin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2158-2163.
- Gould, G.** (1991). Antimicrobial compounds in Biotechnology and food ingredients. Goldberg, I.R. Williams. *VNRVAN Nostrand Reinhold*, New York: 464- 467.
- Haider, S.R.**, Reid, H.J. y Sharp, B.L. (2012) Tricine- SDS- PAGE. *Protein Electrophoresis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 869. *Springer Science Business Media, LLC*: 81- 91.

**Heng, N.C.K** y Tagg, J.R. (2006). Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 1-2.

**Hofvendahl, K.** y Hahn- Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 87-107.

**Hugas, M.** y Monfort, J.M. (1997). Bacterial starter cultures of meat fermentation. *Food Chemistry* 59: 547-554.

**Hwanhlem, N.,** Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y. y Haertlé, T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. *Food Control*, doi: 10.1016/j.foodcont.2017.02.060

**İspirli, H.,** Demirbaş, F. y Dertli E. (2015). Characterization of functional properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from human gut. *Canadian Journal of Microbiology* 61: 861- 870

**İspirli, H.,** Demirbaş, F. y Dertli E. (2016). Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish White cheese. *LWT- Food Science and Technology*, doi: 10.1016/j.lwt.2016.09.010.

**Kadri, Z.,** Spitaels, F., Cnockaert, M., Praet, J., El Farricha, O., Swings, J. y Vandamme, P. (2015) *Enterococcus bulliens* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from camel milk. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108: 1257- 1265.

**Kandler, O.** y Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*. In "*Manual of systematic bacteriology*", 2.

- Kang, J.H.** y Lee, M.S. (2005). Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1169- 1176.
- Katla, T.**, Netersatd, K., Vancanneyt, M., Swings, J. y Axelsson, L. (2003). Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to Sakacin P, Sakacin A, Pediocin PA-1 and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8): 4431- 4473.
- Khalid, K.** (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1: 1-13.
- Klaenhammer, T.R.** (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 39- 86.
- Mazzoli, R.**, Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. A. y Pessione, Enrica. (2014) Towards lactic acid bacteria- based biorefineries. *Biotechnology Advances*, 32: 1216- 1236.
- McCabe- Sellers, B.J.** y Beattie, S.E. (2004) Food safety: emerging trends in foodborne illness surveillance and prevention. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 11: 1708-1717
- Moreno, M.R.F.**, Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M. y De Vustm, L. (2002) Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 147- 157.
- Naidu, A.S.**, Unal, R. y Tulpinski, J. (2006). Bacteriocins: antimicrobial activity and applications. *Food Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Florida: 1391- 1437.

- Olvera- García, M.**, Serrano- Maldonado, C. E. y Quirasco, M. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *BioTecnología*, 19: 25- 43.
- Pardo, M.F** y Natalucci, C.L. (2002). Electrophoretic Analysis (Tricine- SDS- PAGE) of Bovine Caseins. *Acta Farm. Bonaerense* 21(1): 57- 60.
- Parente, E.** y Hill, C. (1992). A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 290- 298.
- Parente, E.**, Brienza, C., Ricciardi, A. y Addario, G. (1997). Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18: 62- 67.
- Pérez y Terrón, R.**, González- Montfort, T.S. y Muñoz. J.R. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, Puebla: 53- 60.
- Pilet, M.F.** y Leroi, F. (2011). Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fresh seafood and seafood products. In *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*, 1: 1-21.
- Pineda, D.** (2004). Bioconservación de los alimentos. *Dirección de Innovación y Desarrollo Tecnológico. Ministerio de Economía*. <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2016/Art.%20Bioconservaci%C3%B3n%20de%20los%20Alimentos.pdf>  
[Última consulta 1 de febrero de 2017]

- Pinto, A. L.,** Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho F., Teixeira, P. y A. Gibbs, P. (2009). Characterization of anti- Listeria bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non- fermented seafood. *Aquaculture Research*.
- Quesada, M.S.** (2007). Manual de experimentos de laboratorio para bioquímica. EUNED, Costa Rica. 27-27.
- Ramírez, J. C.,** Rosas, P., Velázquez, M., Ulloa, J. A. y Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* 2(7): 1-16.
- Rodicio, M.** y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNR 16s: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22: 238- 245.
- Rubio, M. R.** (2014). Productos cárnicos fermentado- curados funcionales y seguros. Nueva vía de ingestión de probióticos. *Universitat de Girona*.
- Salminen, S.,** Von Wright, A., Ouwehand, A. y Lahtinen, S. (2012) Lactic Acid Bacteria. *Microbiological and functional aspects* (Vol. Fourth Edition). U.S.A.: CRC Press.
- Salvucci, E.,** Guy J. L. y Pérez, G. (2016). Technological properties of Lactic Acid Bacteria isolated from raw cereal material. *LWT- Food Science and Technology*, doi: 10.1016/j.lwt.2016.02.043.
- Sarantinopoulos, P.,** Kalanrzopoulos, G. y 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.

- Stiles, M.E.** (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2-4): 331-45.
- Talarico, T.L.** y Dobrogosz, W.J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 674- 679.
- Todorov, S.D.** y Dicks, L.M.T. (2005). Effect of growth médium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. *Food Technology and Biotechnology*. 43: 165-173.
- Todorov, S.D.**, Vaz- Velho, M., Gombossy, B.D. y Heinrich, H.W. (2013). Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicao, a fermented meat product from North- West of Portugal. *Food Control* 30: 111- 121.
- Yang, R.**, Johnson, M. C. y Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Enviromental Microbiology* 58(10): 3355- 3359.

## 12. ANEXOS

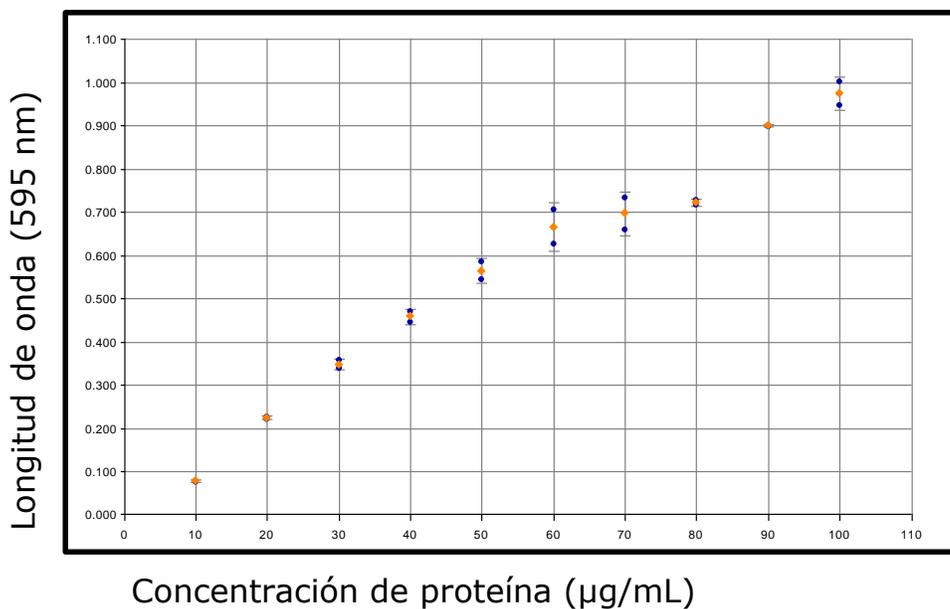
### ANEXO I.

#### Concentraciones de BSA y agua para la realización de la curva tipo

SOLUCIÓN BSA (μL)	AGUA (μL)	VOLUMEN TOTAL (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL DE PROTEÍNA (μg/mL)
25	475	500	10
50	450	500	20
75	425	500	30
100	400	500	40
125	375	500	50
150	350	500	60
175	325	500	70
200	300	500	80
225	275	500	90
250	250	500	100

$$\text{Abs} = [\text{Conc. de proteína}] * 0.00939 \div 0.047$$

$$R^2 = 0.977$$



**Figura 20. Curva tipo para cuantificación de proteína por el método de Bradford obtenida del lector de placas (Synergy HTX)**

ANEXO II.

**Volumen de proteasas y extracto MXVK76**

<b>Volumen de PROTEINASA K (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Volumen de extracto MXVK76 (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Conc. Final (mg/mL)</b>	<b>Volumen de TRIPSINA (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Volumen de extracto MXVK76 (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Conc. Final (mg/mL)</b>
500	500	<b>10</b>	500	500	<b>10</b>
250	750	<b>5</b>	250	750	<b>5</b>
50	950	<b>1</b>	50	950	<b>1</b>