



Universidad Nacional Autónoma de México

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Capacidad antagónica de *Lactobacillus fermentum* sobre bacterias patógenas de interés en alimentos

Tesis

que para optar por el grado de:

Maestro en ciencias

Presenta:

Biol. Karla Patricia Palacios Robledo

Tutor principal:

Maricarmen Quirasco Baruch

Facultad de Química

Miembros del comité tutor:

Romina Rodríguez Sanoja

Instituto de Investigaciones Biomédicas

José Adelfo Escalante Lozada

Instituto de Biotecnología

Ciudad de México. Junio, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1. Enfermedades de transmisión por alimentos.....	3
1.2. Cepas patógenas utilizadas en este estudio.....	4
1.3. Queso bola de Ocosingo, Chiapas.....	7
1.4. Bacterias ácido lácticas (BAL).....	10
1.4.1. Género <i>Lactobacillus</i>	14
1.4.2. <i>Lactobacillus fermentum</i>	16
1.5. Estudios que revelan actividad antibacteriana por parte de <i>L. fermentum</i>	16
1.6. Metabolitos antimicrobianos.....	18
1.7. Bacteriocinas.....	21
1.8. Péptido glicano hidrolasas (PGHs).....	24
1.9. Motivos de lisina o Dominios LysM.....	27
2. ANTECEDENTES.....	28
2.1 Estudio del queso bola en el grupo de trabajo.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVO GENERAL.....	31
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
7. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	32
7.1. Diagrama experimental.....	32
7.2. Cepas aisladas del queso bola de Ocosingo, Chiapas.....	33
7.3. Cepas patógenas utilizadas en el estudio.....	33
7.4 Verificación de pureza de las cepas de <i>L. fermentum</i>	33
7.5 Conservación de las cepas.....	33
7.6 Identificación molecular de las cepas de <i>L. fermentum</i>	33
7.6.1 Extracción de ADN.....	33
7.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	34
7.6.3. Secuenciación de amplicones.....	35
7.7. Cinética de crecimiento.....	35
7.8. Obtención del extracto crudo.....	36

7.9. Condiciones de concentración del extracto crudo.....	36
7.9.1 Liofilización.....	36
7.9.2. Precipitación con TCA.....	36
7.9.3. Precipitación con sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	36
7.10 Determinación de proteína por el método Bradford.	37
7.11 Determinación del efecto antibacteriano mediante difusión en agar.	37
7.12. Electroforesis SDS- PAGE	38
7.13. Zimogramas.	38
7.14 Secuenciación de proteínas	39
7.14.1 Procesamiento químico de las muestras.....	39
7.14.2 Análisis espectrométrico	39
7.14.3 Búsqueda e identificación de los péptidos secuenciados.	39
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
8.1 Purificación de las cepas.	40
8.2. Cinéticas de crecimiento.	43
8.3. Determinación del efecto antibacteriano.....	44
8.4 Electroforesis SDS-PAGE y zimogramas.....	46
8.5 Secuenciación de proteínas	52
9. Conclusiones	63
10. Bibliografía	64
ANEXO	70
A. Preparación de Buffer de muestra para Tris- Glicina 4x.....	70
B. Buffer de muestra Tris- tricina 4x.....	70
C. Buffer de electroforesis Tris- Glicina 10x	71
D. Solución de trabajo de Acrilamida / Bisacrilamida al 30 %	71
E. Buffer Tris 1.5 M, pH 8.8 (Separador)	71
F. Buffer Tris 0.5 M, pH 6.8 (Concentrador)	71
G. Aps 10 % (Persulfato de Amonio)	71
H. SDS al 10 %	71
I. Solución teñidora	71
J. Secuencias consenso de las cepas de <i>L. fermentum</i>	72

Esta tesis fue realizada en el laboratorio 312 del conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

El comité tutor estuvo integrado por:

Dra. Romina Rodríguez Sanoja Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. José Adelfo Escalante Lozada Instituto de Biotecnología, UNAM.

Este trabajo fue financiado por: Apoyo PAPIIT-DGAPA-UNAM IN222717 e IN229319. Se reconoce a CONACyT por la beca de maestría y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por el apoyo para la asistencia a congresos.

Jurado de examen:

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

Dr. Victor Humberto Bustamante Santillán

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Dr. Francisco Ruiz Terán

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

Resumen.

El queso bola de Ocosingo, Chiapas, es un queso artesanal elaborado con leche cruda de vaca y ausencia de un cultivo iniciador, por esta razón, es importante conocer la microbiota presente pues en los quesos madurados, suelen predominar las bacterias ácido lácticas (BAL), que además de producir ácido láctico pueden producir otros compuestos de origen proteínico con actividad bacteriolítica tales como péptido glicano hidrolasas (PGHs) y bacteriocinas, importantes por su potencial como bioconservadores.

En el grupo de trabajo fueron aisladas algunas cepas del queso bola, que posteriormente fueron identificadas por medio de secuenciación del gen ribosomal 16S. Algunas de estas cepas fueron identificadas como *Lactobacillus fermentum*, para este trabajo se ocuparon 3 de estas cepas (7₁, 7₂ y 9).

El objetivo de este trabajo fue identificar a las proteínas/péptidos responsables de la actividad bacteriolítica de tres cepas de *L. fermentum*, aisladas del queso bola de Ocosingo, y evaluar su actividad contra bacterias patógenas de interés en alimentos (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomonas aeruginosa*) y de esta manera conocer el papel que podrían desempeñar estas cepas en la inocuidad del queso.

Para ello se realizaron cinéticas de crecimiento para determinar el tiempo en el que las cepas alcanzan la fase estacionaria temprana, ya que, en trabajos anteriores, realizados por el grupo de trabajo, se ha reportado que durante este momento del crecimiento es cuando hay una mayor producción de péptidos antibacterianos. Posteriormente se realizaron pruebas de difusión en agar en donde se utilizó como tratamiento el extracto crudo concentrado de diferentes maneras y se observaron halos de inhibición contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

Para corroborar dicha actividad se realizaron perfiles electroforéticos y zimogramas contra los microorganismos indicadores. Se observaron bandas de inhibición de diferentes tamaños. La primera con una masa de ~20 kDa mostró actividad contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*; las otras bandas observadas tenían una masa aproximada de ~60 y ~80 kDa y se pudo observar actividad contra *S. entérica* serovar Typhimurium, y *Y. enterocolitica*.

Estas bandas fueron secuenciadas por el método LC/MS y posteriormente se realizó un análisis de los péptidos obtenidos. Los resultados mostraron que la banda de ~20 kDa corresponde a una peptidasa perteneciente a la familia M23 con un dominio LysM de unión a peptidoglicano. Para las bandas de ~60 y 80 kDa se llegó a la conclusión de que son la misma enzima, una glucosaminidasa con 5 dominios LysM de unión a peptidoglicano, la de menor masa sufrió hidrólisis, pero conservó su acción lítica.

1. Introducción.

En la actualidad, 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 ha visto la necesidad de incorporar conservadores naturales en sus procesos; una alternativa para cumplir esta demanda en la elaboración de alimentos es la bioconservación, la cual se define como el proceso mediante el cual se logra alargar la vida útil de un producto a través de la utilización de microorganismos o sus metabolitos (Aymerich *et al.*, 2000). 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. Las BAL son capaces de sintetizar proteínas (bacteriocinas y PGHs), además de otros metabolitos que tienen efecto antagónico hacia otros microorganismos.

1.1. Enfermedades de transmisión por alimentos.

Los alimentos pueden contaminarse con agentes físicos (cuerpos extraños), químicos (plaguicidas, fungicidas, medicamentos) o biológicos (bacterias, hongos, virus, parásitos); esta contaminación puede producir riesgos para la salud de los consumidores, lo que representa grandes cargas económicas para las diversas comunidades y naciones. La inocuidad es uno de los cuatro grupos básicos de características que, junto con las nutricionales, las organolépticas y las comerciales, componen la calidad total de los alimentos.

Un alimento inocuo es aquel que no genera efectos adversos sobre la salud, ni en la calidad de vida del consumidor, ni presenta riesgos físicos, químicos ni biológicos. La insalubridad de los alimentos ha representado un problema de salud para el ser humano desde los albores de la historia, y muchos de los problemas actuales en esta materia no son nuevos. Aunque los gobiernos de todo el mundo se están esforzando al máximo por aumentar la salubridad del suministro de alimentos, la existencia de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) sigue siendo un problema de salud significativo tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo (Uribe y Suarez 2006).

Las enfermedades diarreicas causan más de la mitad de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria, con 550 millones de personas que enferman y 230.000 que mueren cada año (OMS, 2015). Los niños corren un riesgo especial de padecer enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos: 220 millones enferman y 96.000 mueren cada año. Dichas enfermedades, se deben a la ingesta de carne y huevos crudos o mal cocidos, verduras y frutas mal lavadas, y productos lácteos contaminados con patógenos como: *Salmonella* spp, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Clostridium* spp, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Vibrio cholerae*, considerados como agentes clásicos y bacterias emergentes como *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp, *Yersinia* spp, entre otros. Se estima que en México mueren alrededor de 16,000 personas por ETA (OMS, 2015).

1.2. Cepas patógenas utilizadas en este estudio.

Los peligros biológicos de origen alimentario incluyen organismos como bacterias. Estos organismos están frecuentemente asociados a manipulación y productos crudos contaminados en un establecimiento. Varios de esos microorganismos están naturalmente presentes en el ambiente donde los alimentos se producen.

La mayoría de las bacterias patogénicas prefieren la franja de temperatura entre 20 y 45°C, pero muchas pueden crecer a temperaturas de refrigeración o a temperaturas elevadas (arriba de 45°C). Las bacterias crecen normalmente en ambientes con agua disponible y pH entre 4 y 9 (OPS, 2015).

Los organismos patógenos utilizados en este estudio se encuentran citados en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas patógenas de interés en alimentos.

Cepas patógenas	Características	Gram	Afectaciones y donde encontrarlos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Son bacilos, móviles con flagelos polares, aerobios estrictos, metabolismo oxidativo no fermentativo, crecen entre 10 y 42 °C. Presentes frecuentemente en: suelo, agua y de aquí pasan a las plantas o animales.	-	Presenta problemas en la industria alimentaria ya que puede descomponer los alimentos que se mantienen en refrigeración al mantener un metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas. Los alimentos implicados: frutas y vegetales crudos, agua y leche no pasteurizada (Murray <i>et al.</i> , 2014)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Células en forma de bastón u ovoideas, no esporulados, capaz de crecer dentro de un amplio rango de temperaturas, desde -1 °C hasta +40 °C. Presenta cápsula. Algunas cepas producen una enterotoxina termoestable.	-	Se puede transmitir a través del contacto con animales, ingestión de productos alimenticios contaminados principalmente leche o agua. Los síntomas son diarreas agudas y/o con vómito; sin embargo, la fiebre y el dolor abdominal son los síntomas que la definen. (http://depa.fquim.unam.mx/bioseguridad/agentes/bacterias)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacilos cortos, anaerobios facultativos. Capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (1 °C a 45 °C) y una elevada concentración de sal. Altamente patógena, hemolítica.	+	Los alimentos contaminados son los principales vehículos de transmisión, los más comunes son: leche, queso, vegetales frescos, pollo, setas, pavo, entre otros. Los síntomas por listeriosis incluyen fiebre y escalofríos, dolor de cabeza, malestar estomacal y vómitos. Se puede desarrollar septicemia o meningitis principalmente en bebés y niños. En la mayoría de los casos causan enfermedades gastrointestinales en adultos, aunque también pueden desarrollarse otras enfermedades si otros órganos son infectados. (Farber y Peterkin, 1991).

<p><i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium</p>	<p>Bacilos cortos anaerobios facultativos, no esporo formadores. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 35 y 43 °C. Sin embargo, es capaz de sobrevivir a temperaturas bajas hasta 5 °C y mueren a temperaturas superiores a 46 °C. Altamente patógena</p>	<p>-</p> <p>Generalmente causa gastroenteritis transmitida por la ingestión de alimentos, agua contaminados por las heces de un animal o persona infectados. Cuando el intestino está infectado, los síntomas comienzan generalmente entre 12 y 48 horas después de la ingestión de las bacterias. Se producen náuseas y cólicos abdominales, seguidos por diarrea acuosa, fiebre y vómitos. Por lo general, la <i>Salmonella</i> remite en un término de 1 a 4 días. A veces entran en el torrente sanguíneo causando bacteriemia y se propagan, causando infecciones o acúmulos de pus (abscesos) en zonas distantes, tales como huesos, arterias, articulaciones, tracto urinario y pulmones. (Uribe y Suarez, 2006).</p>
<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Cocos, anaerobios facultativos, productores de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulados que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se halla colonizada, aunque no infectada. Altamente patógena, debido a que produce diferentes toxinas</p>	<p>+</p> <p>Se puede localizar en cualquier alimento y produce una intoxicación muy aguda. Esta aparece entre las 2 y 12 horas después de la ingestión de la toxina que genera el patógeno y provoca vómitos intensos (Cervantes <i>et al.</i>, 2014).</p>

1.3. Queso bola de Ocosingo, Chiapas.

El queso bola se elabora en Ocosingo, el municipio más grande del estado de Chiapas (Figura 1). Se localiza en la región de las Montañas de Oriente o Lacandonia, al este del estado. La vegetación es muy abundante, propia de la selva subtropical, con una rica biodiversidad. El mapa físico de

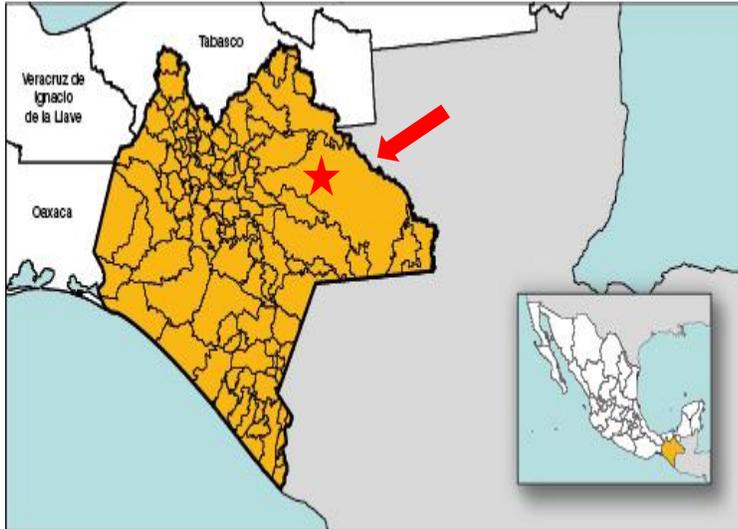


Figura 1. Mapa de Ocosingo, Chis.

Ocosingo presenta los siguientes climas: cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (62.10%), cálido subhúmedo con lluvias en verano (12.38%), semicálido húmedo con lluvias en verano (12.27%), cálido húmedo con lluvias todo el año (11.17%). La precipitación pluvial se ubica entre 1500mm y 3400mm por año mientras que la temperatura media anual se sitúa entre 18 y 28 °C.

El queso bola (Figura 2), surge por primera vez en el año 1927 teniendo como cuna el Rancho Laltic (“Señor de la tierra” en Tzeltal), según López *et al.*, (2015) cuenta que existen varias versiones sobre cómo surgió la elaboración de este queso. Una de las versiones cuenta que la esposa del dueño del rancho Elvira Martínez de Solórzano, efectuó un viaje a Inglaterra, donde una familia residente compartió con ella conocimientos sobre la quesería. A su regreso ella compartió sus conocimientos con su esposo Fidelino Solórzano y comenzaron a preparar el queso forrado hasta que el resultado fue exitoso. Más tarde enseñaron a otras personas, quienes difundieron la técnica pasando de generación en generación hasta la actualidad.



Figura 2. Queso bola.

Se trata de un queso con marca colectiva, elaborado con leche cruda de vaca de doble propósito, cruza de cebú y pardo suiza. Su elaboración puede dividirse en dos fases: la hechura de la pasta, por cuajado mixto (por cuajo y acidez natural), y la confección del forro, a partir de leche descremada.

Este es un queso original y atípico dentro de los quesos mexicanos, por su forma y proceso. Se presenta como una bola dura, con un diámetro entre 8 y 12 cm y un peso comprendido entre 400 g y 1 kg aproximadamente. Una corteza dura de caseína, a manera de corteza, encierra la pasta del queso propiamente dicho. Cuando el producto es fresco, por ejemplo, de una a dos semanas, tras eliminar la corteza con un cuchillo, se halla una pasta blanca o amarillo marfil, blanda, algo ácida y aromática.

Elaboración (Figura 3):

- ✚ Recepción y colado. La leche se recibe por la mañana y se cuela en un lienzo de algodón de trama fina.
- ✚ Cuajado y reposado. Previamente a la adición del cuajo, se agrega crema, si el queso será doble crema, si no, se tratara de queso crema solamente. Se agrega entonces una dosis de cuajo líquido y se deja reposar la leche durante 24 horas aproximadamente.
- ✚ Levantado o manteadado. Al otro día, se coloca cuidadosamente la cuajada en una bolsa o manto de algodón.
- ✚ Escurrido. Tras incorporar sal fina (3- 4 %) a la cuajada, se deja escurrir el suero durante unas horas.
- ✚ Salado. Después de 20-24 horas de escurrido, se sala la cuajada y se cambia la manta.
- ✚ Madurado de la pasta. La masa se deja reposar para que madure, en un lapso de varios días, cambiando la manta cada tres días. Según las reglas de la marca colectiva territorial, propiedad de los queseros organizados, este queso debe madurar al menos 21 días en condiciones ambientales.
- ✚ Moldeado. Se forman porciones de unos 400 g o más, se compacta con las manos y se les da forma esférica. Finalmente, las piezas se forran con dos capas sucesivas de cuajada colada y caliente, elaborada con leche completamente descremada. Este material, rico en caseína, al enfriarse y orearse se endurece y funciona como un verdadero empaque protector.

De este queso se puede consumir tanto el núcleo y de preferencia solo la envoltura interna tras calentarla, asarla o freírla ya que la capa externa se encuentra expuesta a la intemperie en todo momento (Villegas *et al.*, 2013).

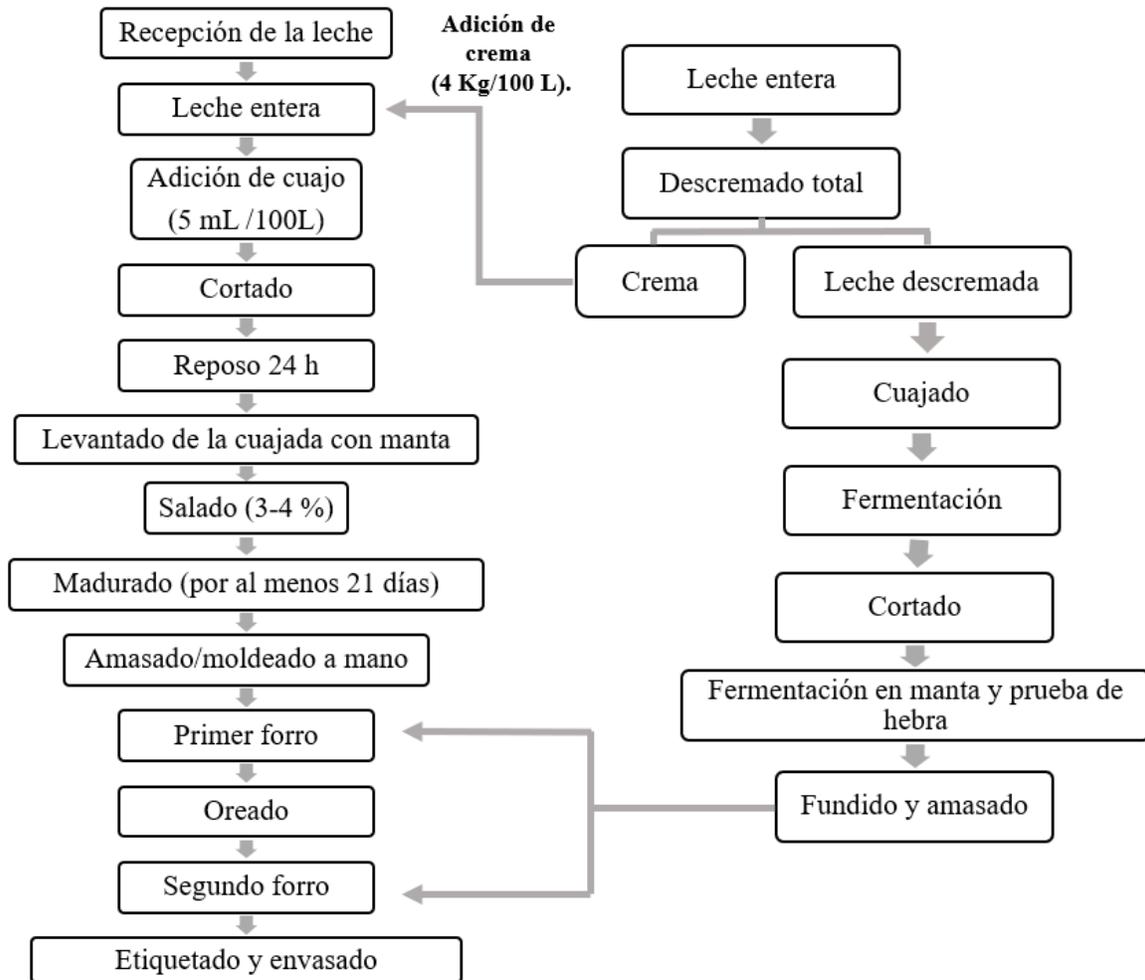


Figura 3. Diagrama de la elaboración del queso de bola. Fuente: Villegas *et al.* (2013).

Todo queso de leche cruda madurado, contiene abundantes microorganismos activos, con un metabolismo atenuado o en latencia. Para quesos madurados de leche cruda se reportan: $1 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ UFC/g de mesófilos aerobios, coliformes totales en un rango de $1 \times 10^2 - 1 \times 10^4$ UFC/g, levaduras y mohos en un rango de $1 \times 10^3 - 1 \times 10^6$ UFC/g (resultados obtenidos del queso Cotija artesanal madurado. Fuente: comunicación oral Dra. Maricarmen Quirasco Baruch).

Por otra parte, Villegas *et al.*, (2013) afirman que la cuenta de mesófilos aerobios totales del núcleo del queso bola de Ocosingo es baja, con un promedio de 3.8 log₁₀ UFC/g en las muestras del queso analizadas.

En otro estudio realizado por Escobar *et al.*, (2012), se trabajó con un queso bola madurado 50 días y se observó para todos los casos menos de 30 NMP/g de coliformes fecales y totales y la ausencia de patógenos (Tabla 2) que pueden contaminar los quesos de leche cruda: *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, lo que evidencia que el núcleo de este queso es inocuo.

Tabla 2. Contenido de microorganismos patógenos en el núcleo del queso bola de Ocosingo, madurado 50 días. (Escobar *et al.*, 2012)

Quesería	Época	Coliformes totales (NMP/g)	Coliformes fecales (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocitogenes</i>
A	Secas	<30	<30	<30	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	Lluvias	<30	<30	<30	Ausencia	Ausencia	Ausencia
B	Secas	<30	<30	<30	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	Lluvias	<30	<30	<30	Ausencia	Ausencia	Ausencia
C	Secas	<30	<30	<30	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	Lluvias	<30	<30	<30	Ausencia	Ausencia	Ausencia

1.4. Bacterias ácido lácticas (BAL).

Las bacterias ácido lácticas, presentan en la actualidad una gran importancia biotecnológica, dada su presencia en una gran cantidad de procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano (productos lácteos, vegetales, cárnicos y de panadería, así como bebidas alcohólicas) y animal (ensilados). Estas bacterias no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas de los alimentos, sino que generan ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos debido a su marcada capacidad antagonista, la cual favorece su proliferación en el alimento, en detrimento de cualquier otro grupo microbiano presente en la materia prima (alimento crudo) o que contamine el producto posteriormente (Ramírez *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha podido comprobar que algunas cepas de bacterias ácido lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, son beneficiosas para la salud, tanto humana como animal, actuando como probióticos en la producción de péptidos bioactivos y como vehículos transportadores de moléculas con valor terapéutico (Nouaille *et al.*, 2003). Además, tienen capacidad antagónica

contra otras bacterias, la que se basa en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas como las péptido glicano hidrolasas (PGHs) y bacteriocinas (Vázquez *et al.*, 2009).

Su aplicación puede hacerse inoculando la bacteria para que produzca el agente antibacteriano directamente en el alimento o usando dicho agente, previamente purificado, como aditivo alimentario (Savijoki *et al.*, 2006, Vázquez *et al.*, 2009, Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2014).

Su presencia puede tener un efecto en el desarrollo de características sensoriales deseables ya que producen enzimas intracelulares (peptidasas, lipasas y enzimas de catabolismo de aminoácidos), las cuales desempeñan un papel importante en el desarrollo del sabor de quesos durante la maduración. Después de la hidrólisis inicial de caseínas por la renina, proteasas endógenas de la leche y proteasas bacterianas de la pared celular, las peptidasas son capaces de degradar los péptidos resultantes en aminoácidos libres; estos pueden ser subsecuentemente catabolizados a componentes de aroma volátiles por varias rutas enzimáticas. También esterases y lipasas catalizan hidrólisis de triglicéridos de la grasa de leche (compuestos en un 70 % por ácidos grasos saturados como el ácido palmítico, ácido mirístico y ácido esteárico; el otro 30% son monoinsaturados como el ácido oleico y poliinsaturados como el ácido linoleico y el ácido α -linolénico) en ácidos grasos libres, que más adelante son convertidos en componentes aromáticos (Lindmark, 2008; Navarro, 2012) y, por otro lado, pueden producir agentes texturizantes, como exopolisacáridos, los cuales aportan consistencia al producto.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representados por varios géneros, con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa y catalasa negativos, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr *et al.*, 2002; Vázquez *et al.*, 2009). Además, las BAL son ácido tolerantes, la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no podrían (Carr *et al.*, 2002).

Los principales géneros que conforman este grupo son: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Salminen *et al.*, 2004).

Según la fermentación de la lactosa, las BAL se clasifican en homofermentativas (producen solo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias como CO₂, H₂O₂, etc.) y según la temperatura de crecimiento en mesófilos, termófilos y psicrótrofos (Bertrand, 2003).

Homofermentativas: El grupo homofermentativo compuesto de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas al convertir un mol de glucosa en dos moles de ácido láctico (Figura 4), además de que se produce más del 85 % de ácido láctico a partir de glucosa.

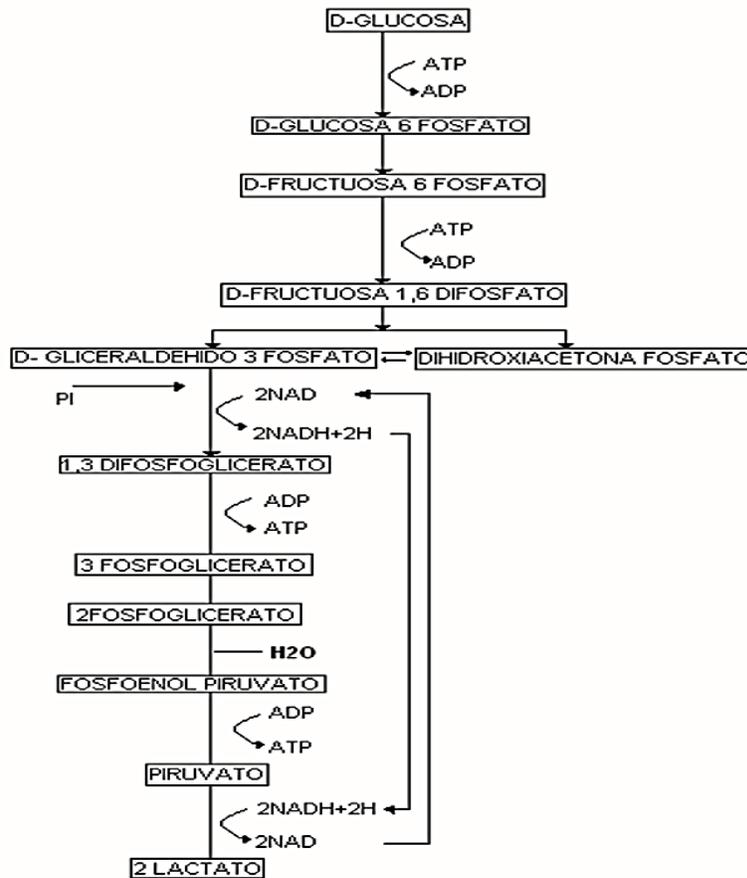


Figura 4. Fermentación homoláctica (Parra, 2010)

Las bacterias pertenecientes a este grupo, poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de la fosfoacetolasa; como no poseen piruvato descarboxilasa, transfieren el hidrógeno formado por acción de la fosfotriosa- deshidrogenasa al ácido pirúvico, con ayuda de la NAD^+ , y lo transforma en ácido láctico.

Heterofermentativas: Producen solamente 50 % de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, un mol de etanol y 1 mol de CO_2 . 1 mol de ATP es generado por mol de glucosa. Este grupo está compuesto por varios géneros entre los que se encuentran: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Este grupo de bacterias contiene la enzima fosfoacetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa isomerasa; así que, en lugar de seguir la vía (EMP), utilizan las vías de la hexosa monofosfato o la de las pentosas fosfato (Figura 5).

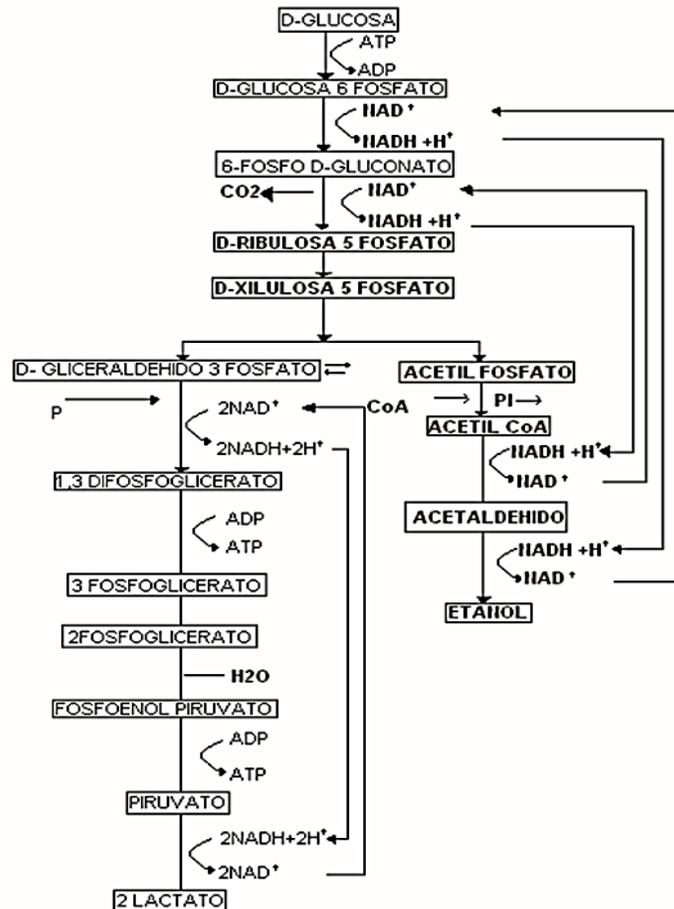


Figura 5. Fermentación heteroláctica (Parra, 2010)

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

- ✚ Son consideradas como Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS por sus siglas en inglés).
- ✚ Son organismos que se adaptan a las condiciones de los procesos industriales, muestran una alta resistencia a pH ácido y tienen un intervalo de temperatura óptima amplia (20-45°C).
- ✚ Son capaces de metabolizar numerosos monosacáridos (como hexosas y pentosas).
- ✚ Producen metabolitos con aplicaciones en la industria alimenticia como son: aromas, sabores, agentes texturizantes y metabolismo con capacidad antimicrobiana.
- ✚ Además de producir ácido láctico también pueden producir otro tipo de metabolitos que previenen el crecimiento de bacterias patógenas.

1.4.1. Género *Lactobacillus*

Las colonias de *Lactobacillus* aisladas en medios sólidos como el agar BD LBS (también conocido como Rogosa Agar) son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza.

Los lactobacilos pueden encontrarse en productos lácteos, quesos, granos, productos cárnicos o de pescado, agua, cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas, col y otras verduras fermentados, ensilajes, masas agrias y pulpas (Venema *et al.*, 1996), aunque también forman parte de la microbiota normal de la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina de muchos animales de temperatura estable, incluyendo al hombre. También pueden encontrarse en hábitats secundarios como los fertilizantes de origen orgánico. Algunas especies individuales se han adaptado a determinados nichos ecológicos, que son de hecho sus hábitats naturales, siendo muy difícil encontrarlos fuera de estos (Bergey, 2009). No desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados hidrogenados y aminas en el queso (Bergey, 2009).

Presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos como aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Por eso, estos compuestos se incluyen en el medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe).

Crece bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6.4 – 4.5 y con un óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.2. Son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4.0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras (Bergey, 2009).

Tannok (2005), menciona una reorganización de las especies en tres grupos: A, B y C, basándose en caracteres moleculares y en las características fisiológicas. Con esta clasificación las especies se agrupan en relación a sus características fenotípicas (letras mayúsculas) y la adscripción a cada uno de los tres grupos filogenéticos se indica con letras minúsculas (a, grupo I; b, grupo II; c, grupo III).

- ✚ Grupo A. Homofermentativos estrictos. Incluye los lactobacilos del grupo I y algunas especies de otros géneros que son homofermentativos obligados, fermentan las hexosas casi exclusivamente a ácido láctico por la vía Embden-Meyerhoff; no fermentan las pentosas ni el gluconato.
- ✚ Grupo B. Heterofermentativos facultativos. Formado por lactobacilos del grupo II y la mayoría de especies de enterococos, lactococos, pediococos, estreptococos, tetragenococos y vagococos. Fermentan las hexosas casi exclusivamente a ácido láctico por la vía Embden-Meyerhoff o, al menos por algunas especies, hasta ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico bajo condiciones limitantes de glucosa. También pueden fermentar las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético por la vía de fosfoacetolasa inducible.
- ✚ Grupo C. Heterofermentativos estrictos. Integrado por leuconostocs, lactobacilos del grupo III, oenococos y weissellas que son heterofermentativos estrictos. fermentan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono (CO₂). También fermentan las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético. En general, ambas vías involucran a la fosfoacetolasa. Entre estas especies se encuentra *Lactobacillus fermentum*.

1.4.2. *Lactobacillus fermentum*

Las células son bastones inmóviles (0.5-0.9 μm de espesor y muy variables en longitud), que se presentan individualmente o en pares. Obligadamente heterofermentativos.

Requieren de factores esenciales para su crecimiento como: pantotenato de calcio, niacina y tiamina. *L. fermentum* ha sido aislado de productos lácteos, masa fermentada, material vegetal en fermentación, estiércol, aguas residuales, boca, vagina y heces de humanos. *Lactobacillus fermentum* no puede distinguirse definitivamente de *Lactobacillus reuteri* por simples pruebas fisiológicas. Los métodos genotípicos utilizados proporcionan resultados claros (Dellaglio *et al.*, 2004). *Lactobacillus cellobiosus* (Rogosa *et al.*, 1953) ha sido reclasificado como un sinónimo posterior de *Lactobacillus fermentum* (Dellaglio *et al.*, 2004)

1.5. Estudios que revelan actividad antibacteriana por parte de *L. fermentum*.

Yan y Lee (1997), reportan una bacteriocina producida por *L. fermentum*, Fermentcin B, concentrada por precipitación con sulfato de amonio a partir del extracto crudo extracelular, también utilizaron una columna cromatográfica en donde utilizaron el extracto crudo y las fracciones obtenidas fueron dializadas en un buffer Tris-HCl para semipurificar las muestras y midieron el efecto de la temperatura, pH y enzimas. Como resultado comentan que Fermentcin B es producida durante la fase de crecimiento exponencial de *L. fermentum* en medio MRS, tiene actividad inhibitoria de bajo espectro, tiene una masa molecular de 1 a 3 kDa, es estable hasta 100 °C y un rango de pH de 3.0 a 8.0. Pierde su actividad después de un tratamiento con proteinasa K, amiloglucosidasa y α - quimotripsina.

Kannahi y Viji (2014) reportan que el extracto crudo de *Lactobacillus fermentum* aislado de una muestra de mantequilla, tomada a las 10 horas de crecimiento en medio de cultivo MRS, mostró actividad antimicrobiana en pruebas de difusión en agar contra *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*.

Phirawat *et al.*, (2016) purificaron y caracterizaron Fermentcin SD11, una bacteriocina producida por *Lactobacillus fermentum* SD11 aislada de la cavidad bucal humana. Sus condiciones óptimas

de crecimiento y producción de bacteriocina fueron en un ambiente ácido con pH 5.0 a 6.0 a 37 °C bajo condiciones aeróbicas o anaerobias por 12 horas. Fue purificada usando tres pasos, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía por filtración en gel y HPLC fase reversa.

La masa molecular que encontraron fue de 33,000 Da usando SDS-PAGE y confirmaron 33,593.4 Da por cromatografía espectrometría-líquida acoplada a masas (Figura 6). Tiene actividad contra patógenos orales y *Candida*. Es estable entre 60- 80 °C en un rango de pH de 3.0 a 7.0. Es sensible a enzimas proteolíticas (proteínasa K y tripsina) pero no es afectada por α -amilasa, catalasa y lisozima.

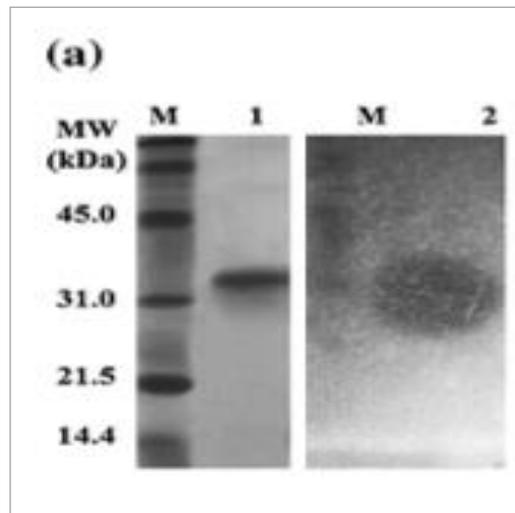
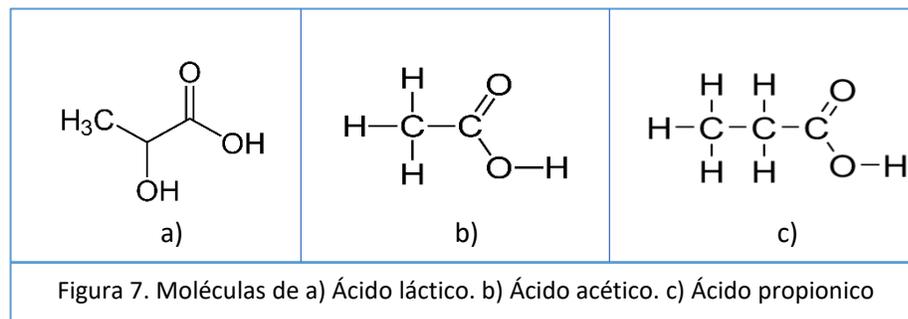


Figura 6. a) Tricina-SDS-PAGE análisis de la bacteriocina purificada de *L. fermentum* SD11. Línea 1 gel teñido con azul brillante de Coomassie, línea 2 gel donde se muestra la actividad vs. *S. mutans* ATCC 25175 y línea M Estándares de masa molecular. (Phirawat *et al.*, 2016)

1.6. Metabolitos antimicrobianos.

Un metabolito antimicrobiano se define como un compuesto producido por microorganismos, que tienen un efecto sobre microorganismos patógenos o de descomposición de alimentos (Olson y Aryana, 2008; Erginkaya *et al.*, 2014).

- ✚ Ácidos orgánicos. El ácido láctico (Figura 7) es el metabolito que producen en mayor cantidad las BAL. Su forma no disociada es tóxica, ya que difunde a través de la membrana celular por ser liposoluble y, una vez dentro, dependiendo del pH puede disociarse en mayor o menor medida, liberando iones H^+ que acidifican el citoplasma. En el intento de bombear los iones de hidrógeno (H^+), la célula microbiana consume enormes cantidades de energía que conducen a la muerte celular. Las BAL heterofermentativas también producen ácido acético y propiónico (Figura 7) que tienen un efecto antibacteriano más fuerte debido a su alto valor de pKa comparado con el del ácido láctico, estos ácidos permanecen en mayor porcentaje en su forma no disociada en comparación del ácido láctico (4.87, 4.75 y 3.8 pKa respectivamente), teniendo un amplio rango de actividad inhibitoria frente a hongos, levaduras y bacterias (Gould, 1991; Magnuson, 2003 y Salminen, 2004).



- ✚ Etanol. Es producido por la fermentación de los carbohidratos por las BAL heterofermentativas. Presenta un efecto bactericida sobre células vegetativas de bacterias, pero no es efectivo contra esporas bacterianas. Su actividad antimicrobiana resulta de la desnaturalización de las proteínas presentes en las células, también daña la estructura

lipídica de la membrana del citoplasma. Tiene por inconveniente una escasa difusión y además es inactivado por ácidos orgánicos (Sagdic *et al.*, 2014).

- ✚ Peróxido de hidrógeno. En presencia de oxígeno, las BAL son capaces de generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a través de la acción de las flavoproteína oxidasas, NADH oxidasas y superóxido dismutasas. En ausencia de una fuente de grupo hemo, las BAL no producen catalasa para la eliminación de H_2O_2 ; sin embargo, éste no se acumula en cantidades significativas porque es descompuesto por peroxidasas y pseudocatalasas (Ouwehand y Vesterlund, 2004). Su efecto antimicrobiano es debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilo de las proteínas, causando la desnaturalización de un cierto número de enzimas y la peroxidación de los lípidos de membrana, provocando el aumento de la permeabilidad de la misma. También es precursor de la formación de radicales libres como el superóxido y el hidroxilo, que pueden dañar el material genético de las células bacterianas (Erginkaya *et al.*, 2014).

- ✚ Dióxido de carbono. Se forma durante la fermentación heteroláctica de las hexosas. Tiene un doble efecto antibacteriano; su formación crea un ambiente anaeróbico y además inhibe las descarboxilasas enzimáticas mediante la disminución del pH extra e intracelularmente y su acumulación en la bicapa lipídica causa disyunción en la permeabilidad de la membrana (Salminen, 2004).

- ✚ Diacetilo. El citrato puede convertirse en diacetilo (2,3-butanodiona) vía piruvato (Figura 8). Es responsable del aroma característico asociado a la mantequilla. Su actividad antibacteriana es más efectiva a valores menores a pH 7. Es más efectivo contra bacterias Gram negativas que Gram positivas. Sin embargo, la cantidad necesaria para que se presente actividad antibacteriana es muy alta y afecta el sabor y aroma de los productos (Magnuson, 2003 y Salminen, 2004).

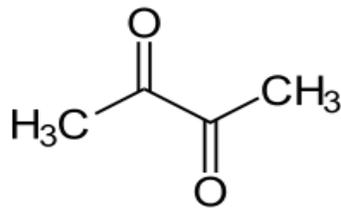


Figura. 8 Molécula de diacetilo (2,3-butanodiona)

- ✚ Reuterina (β -hidroxipropanoaldehído), es una molécula altamente soluble y con pH neutro, producida por *Lactobacillus reuteri* bajo condiciones anaeróbicas en presencia de glicerol (Figura 9). Tiene actividad antibacterial, antifúngica, antiprotozoaria y antiviral. Su mecanismo de acción consiste en la inactivación de las enzimas que poseen grupos sulfhidrilo, tales como la actina, que forma el citoesqueleto, la GSH-reductasa y las ATPasas transportadoras de Ca^{2+} de la membrana plasmática y el retículo endoplásmico; también es un inhibidor de la ribonucleótido reductasa, una enzima universal que cataliza la primera etapa de la biosíntesis del ADN (Magnusson, 2003).

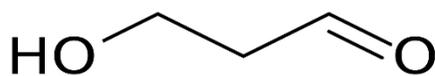


Figura. 9 Molécula de reuterina

- ✚ Reuteri ciclina. Es un compuesto producido por *L. reuteri* que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas (Figura 10). Tiene una masa molecular de 349 Da y es anfifílica. Su actividad inhibitoria aumenta a altas concentraciones de sal (2 %) y pH bajo (4.5). Se distribuye dentro de la membrana citoplasmática y disipa selectivamente el gradiente de pH transmembranal (Salminen, 2004).

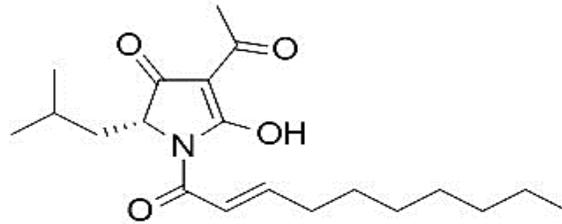


Figura. 10 Molécula de reuteri ciclina

1.7. Bacteriocinas.

Las bacteriocinas tienen un gran potencial como bioconservadores en una gran cantidad de alimentos (Ennahar *et al.*, 1999). Son péptidos de baja masa molecular (por lo regular, menos de 10 kDa) y estables en amplios intervalos de pH y tratamientos térmicos, tienden a adoptar estructuras helicoidales anfifílicas (Nes *et al.*, 1996).

El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona de acuerdo al tipo de bacterias al que afectan, se han distinguido tres grupos: a) bacteriocinas con un estrecho rango de acción, restringido a microorganismos de la misma especie; b) bacteriocinas con un rango intermedio que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram positivas y c) bacteriocinas con amplio rango de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram positivas (Cintas *et al.*, 2001; Beristain *et al.*, 2012).

Muchas de las bacteriocinas producidas por las BAL son activas solo contra otras BAL, pero todas muestran actividad contra bacterias Gram positivas y en ocasiones contra bacterias Gram negativas.

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) (Figura 11):

- ✚ Clase I. Lantibióticos, péptidos de entre 19 y 38 aminoácidos de longitud, con una masa menor a 5 kDa. Contienen residuos de lantionina o β -metil-lantionina y son termoestables. La lantionina se obtiene por la condensación de una serina deshidratada (dehidroalanina) con el grupo sulfhidrilo de una cisteína vecina, con lo que se forma un puente entre los dos residuos. Cuando los aminoácidos que se unen son una treonina deshidratada (deshidrobutilina) y cisteína, lo que se forma es la β -metil-lantionina. La formación del puente entre residuos del péptido es catalizada enzimáticamente y forma un anillo en la estructura del lantibiótico, característica estructural importante de las bacteriocinas clase I. Se pueden enlazar al lípido II, el mayor transportador de subunidades de peptidoglicano del citoplasma a la pared celular, lo que evita la síntesis correcta de la pared, con la consecuente muerte celular; además, pueden usar al lípido II como molécula de acoplamiento para insertarse en la membrana e iniciar la formación de poros.

- ✚ 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. Esta clase está formada por un grupo heterogéneo de moléculas, dentro de las que destacan:
 1. Con alta especificidad contra *Listeria monocytogenes*, tipo pediocinas (clase IIa)
 2. Compuestas por dos péptidos (clase IIb)
 3. Poseen unión covalente entre el extremo N- y el C- terminal, esto es, que tienen una estructura circular (clase IIc).

- ✚ Clase III. Bacteriolisinas o proteínas bacteriológicas; termolábiles, de alta masa molecular (mayor de 30 kDa) y su modo de acción es mediante la lisis de la pared celular. En general, poseen el dominio catalítico (homólogo a las endopeptidasas) en el extremo N-terminal y el de reconocimiento al sustrato, en C-terminal. A diferencia de las otras clases de bacteriocinas, no tienen relacionado un gen que confiera inmunidad a la bacteria productora (Cotter *et al.*, 2005).

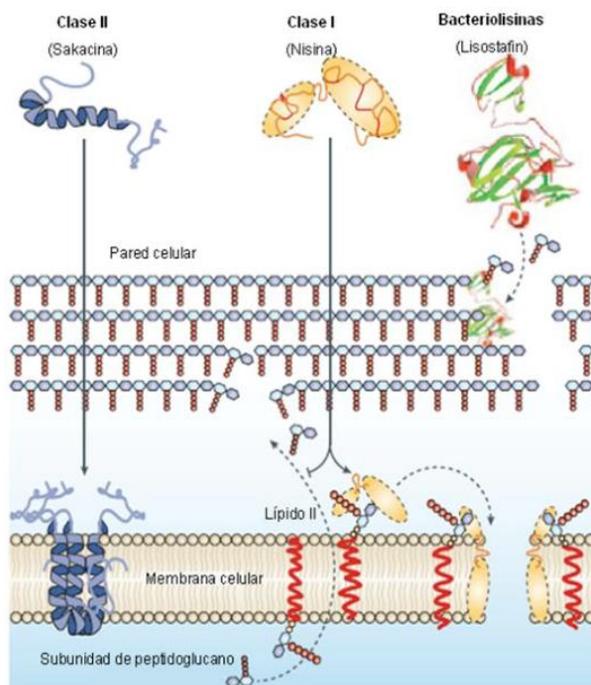


Figura 11. Mecanismo de acción de las bacteriocinas (adaptado de Cotter *et al.*, 2005)

Las bacterias Gram positivas, se caracterizan por tener un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana, en este caso el modo de acción de las bacteriocinas es la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos; después se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica. De este modo se forman poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana muy probablemente debido a la vesiculación del protoplasma, la formación de poros y la desintegración completa de la célula (Bizani *et al.*, 2005). La única bacteriocina aprobada para su utilización como conservador en alimentos por la FDA (denominada tipo GRAS) y aceptada como aditivo alimentario en otros 45 países es la Nisina. Esta bacteriocina es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y tiene una masa molecular de 3.5 kDa. La marca comercial más usada es Nisaplin. Otra bacteriocina comercial es la pediocina PA-1, denominada Atla 2341, que inhibe el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos (McAuliffe *et al.*, 2001)

1.8. Péptido glicano hidrolasas (PGHs).

Las peptidoglicano hidrolasas (PGHs) son enzimas que hidrolizan el peptidoglicano, principal componente de la pared celular de bacterias.

Las PGHs están involucradas en un gran número de funciones que requieren la modificación de la red rígida del peptidoglicano durante el crecimiento y la división celular. Algunas de estas funciones incluyen:

- ✚ Regulación del crecimiento de la pared celular
- ✚ Intercambio de unidades de peptidoglicano durante el crecimiento
- ✚ Separación de las células hijas durante la división celular y la autólisis, que generalmente se induce en condiciones adversas como la falta de nutrientes
- ✚ Escisión del peptidoglicano en la síntesis de flagelo y otras estructuras celulares que lacanzan el espacio extracelular (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Eckert *et al.*, 2006; Vollmer *et al.*, 2008).

En las bacterias, las PGHs son también conocidas como endolisinas y se encuentran involucradas en diferentes procesos fisiológicos y ecológicos (Vollmer *et al.*, 2008 y Ferrand *et al.*, 2015)

Tienen masas moleculares que pueden ir desde los 27 kDa de la lisostafina, hasta los 137 kDa de la proteína Atl, la principal autolisina de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* (Kumar, 2008; Götz *et al.*, 2014).

Las PGHs se clasifican por su especificidad catalítica sobre los distintos tipos de enlaces covalentes del peptidoglicano. De este modo, existen N-acetilmuramidasa y N-acetilglucosaminidasas encargadas de digerir enlaces de la cadena glucosídica, así como N-acetilmuramyl-L-alanina amidasa (denominadas comúnmente amidasa, Ami), endopeptidasas (EPasas) y carboxipeptidasas (CPasas) que digieren enlaces de la cadena peptídica (Figura 12).

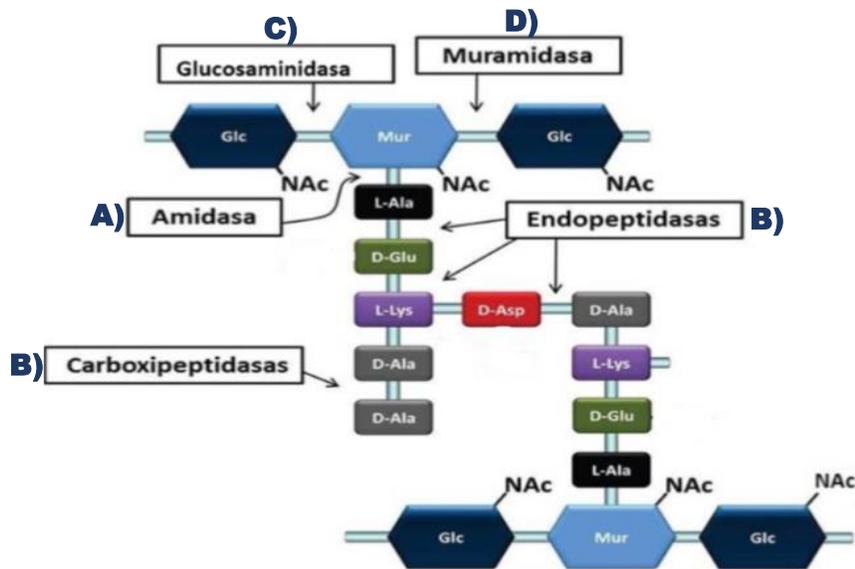


Figura 12. Sitios de acción de las PGHs en la pared celular bacteriana (Modificado de Chapot-Chartier y Kulakauskas 2014).

A) N- acetilmuramoyl- L- alanina amidasas o amidasas hidrolizan el enlace amida formado entre el ácido N acetilmuramico y la L-alanina del extremo N-terminal. Estas enzimas han sido encontradas en bacterias, bacteriófagos y genomas de profagos. Generalmente el sitio catalítico está fusionado por el extremo N o C terminal a otro módulo de función que es responsable de la unión de la proteína a la pared celular (López *et al.*, 1981; Young, 1992; Shockman y Höltje, 1994).

B) Las peptidasas son enzimas que hidrolizan la unión entre los aminoácidos del peptidoglicano. Dependiendo del enlace que rompen entre los aminoácidos se pueden denominar: DD- peptidasas si rompen el enlace entre D-aminoácidos y DL o LD- peptidasas si rompen enlaces entre D y L aminoácidos.

Dependiendo de su especificidad se clasifican como:

- Carboxipeptidasas, hidrolizan el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos
- Endopeptidasas, son enzimas que rompen completamente los puentes formados por los péptidos y son metal dependientes (Zn^{2+})

C) N- acetilglucosaminidasas se distribuyen ampliamente en bacterias, hidrolizan los enlaces glucosídicos β -1,4 entre el residuo N-acetil- β -D-glucosamina y los monosacáridos adyacentes, del peptidoglicano, dejando un extremo GlcNAc reductor. Existe una gran variedad de estas enzimas, pero las más conocidas son: LytB producida por *Streptococcus pneumoniae*, AtlA y AtlD producidas por *Enterococcus faecalis* y AcmA, AcmB y AcmC de *Lactococcus lactis* (Vollmer *et al.*, 2008)

D) N- acetil- β -D-muramidasa o muramidasa hidrolizan los enlaces glucosídicos β -1,4 entre los residuos ácido-N-acetil murámico y la N-acetil glucosamina del peptidoglicano, dejando libre un extremo MurNAc reductor, llamadas lisozimas, o formando un anillo 1,6-anhidro en MurNAc, conocidas como transglicosilasas líticas (Vollmer *et al.*, 2008; Layec *et al.*, 2008). Hay pocas enzimas caracterizadas que presentan esta actividad.

Algunas PGHs han sido utilizadas como agentes antibacterianos, por ejemplo:

- Lisostafina, es una metaloenzima dependiente de zinc de 27 kDa, producida por *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. Presenta actividad endopeptidasa ya que hidroliza los enlaces glicina-glicina específicos de la pared celular de *S. aureus* y especies relacionadas. Tiene aplicaciones terapéuticas para tratar infecciones causadas por este microorganismo (Kumar, 2008).
- Lisozima de huevo de gallina, una muramidasa descubierta en 1922 por Alexander Fleming. Está clasificada como GRAS por la FDA y como aditivo alimentario por la Unión Europea con actividad bacteriostática, bacteriolítica y bactericida. Su principal aplicación es en la industria quesera, contra *Clostridium tyrobutyricum*, que provoca la hinchazón de los quesos, pero también es utilizada como conservador en carnes, embutidos, pescado, verduras, frutas y en el control de la actividad bacteriana en vinos (Callewaert *et al.*, 2011, Galet *et al.*, 2013).

1.9. Motivos de lisina o Dominios LysM

El motivo de lisina (LysM), fue descubierto por primera vez en la lisozima del fago ϕ 29 de *Bacillus*, detectado en el extremo C- terminal. Se han reportado más de 4000 proteínas, tanto de procariontes como eucariontes, que contienen uno o más motivos de Lisina. Estos motivos generalmente tienen una longitud de 44 a 65 residuos de aminoácidos y pueden unirse a diferentes tipos de peptidoglicano y quitina, ya que actúan como antígenos o como proteínas de unión. En bacterias están ampliamente distribuidas en peptidoglicano hidrolasas y en peptidasas, así como quitinasas, esterases y nucleotidasas.

Generalmente, estos motivos se encuentran separados por secuencias que consisten en residuos de serina, treonina, aspartato o prolina, los cuales forman una región flexible entre los motivos.

En procariontes estos dominios poseen estructura secundaria y redes de puentes de hidrógeno, por lo que los puentes disulfuro no son esenciales para su estructura y función (Ponting *et al.*, 1999). Tienen diferentes puntos isoeléctricos (pIs), en un rango de 4 a 12. En algunos casos, un organismo puede expresar una proteína con dominios LysM parálogos con diferentes puntos isoeléctricos; por ejemplo, las PGHs AcmA y AcmD de *Lactococcus lactis*, contienen tres motivos LysM en la región C terminal, con pIs alrededor de 10 a 4 respectivamente. La función exacta de estos dominios LysM con pI bajo se desconoce, pero se han observado en muchas bacterias y se hipotetiza que podría servir como una adaptación a los cambios de pH en el ambiente o para unirse específicamente a una pared celular modificada.

Los dominios LysM mejor caracterizados son los de la *N*- acetilglucosaminidasa (AcmA) de *L. lactis*, estos dominios se unen de manera no covalente a la pared celular, permitiendo el adecuado posicionamiento del sitio catalítico con su sustrato y posteriormente llevar a cabo la lisis celular (Buist *et al.*, 1995). Interesantemente, los dominios LysM de glicosilasas como las *N*- acetilglucosaminidasas y las *N*- acetilmuramididasas se encuentran localizadas río abajo del sitio activo de la enzima en el extremo C terminal, por otro lado, en endopeptidasas se encuentran presentes en el extremo N terminal, río arriba del sitio activo. Posiblemente, la razón de la diferente topología, sea proveer un posicionamiento adecuado de los dominios del sitio activo hacia sus sustratos específicos. Cuando todos los motivos LysM son removidos de una proteína, la unión a

péptido glicano se pierde, resultando en una pérdida total de la actividad hidrolítica (Buist *et al.*, 2008).

2. ANTECEDENTES.

2.1 Estudio del queso bola en el grupo de trabajo.

García (2017), encontró que algunas cepas aisladas del queso bola del género *Lactobacillus* presentaban actividad antibacteriana extra celular contra microorganismos indicadores como *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Esta actividad se produjo en medio MRS. Los resultados fueron observados mediante difusión en agar, en la que se aplicó el sobrenadante de la fermentación libre de células, neutralizado y concentrado por liofilización. La actividad reportada en zimogramas se realizó a partir de la muestra concentrada por precipitación con TCA.

Se observó la presencia de actividad inhibitoria en todas las cepas que analizó, al menos en contra de alguna de las bacterias indicadoras. En la Figura 13 se muestra un ejemplo de ensayo de difusión en agar, además de las bandas de lisis observadas por zimografía, a) contra *Listeria* y b) y c) contra *S. aureus*. Se observaron bandas con actividad bacteriolítica con masas moleculares características de PGHs (>60 kDa) y de bacteriocinas (~11 kDa).

Concluye que las cepas 3B y 7A fueron las que mostraron una mayor actividad, la cual puede estar dada por compuestos como bacteriocinas y PGHs por lo que *L. fermentum* puede contribuir a la inocuidad del queso de bola de Ocosingo.

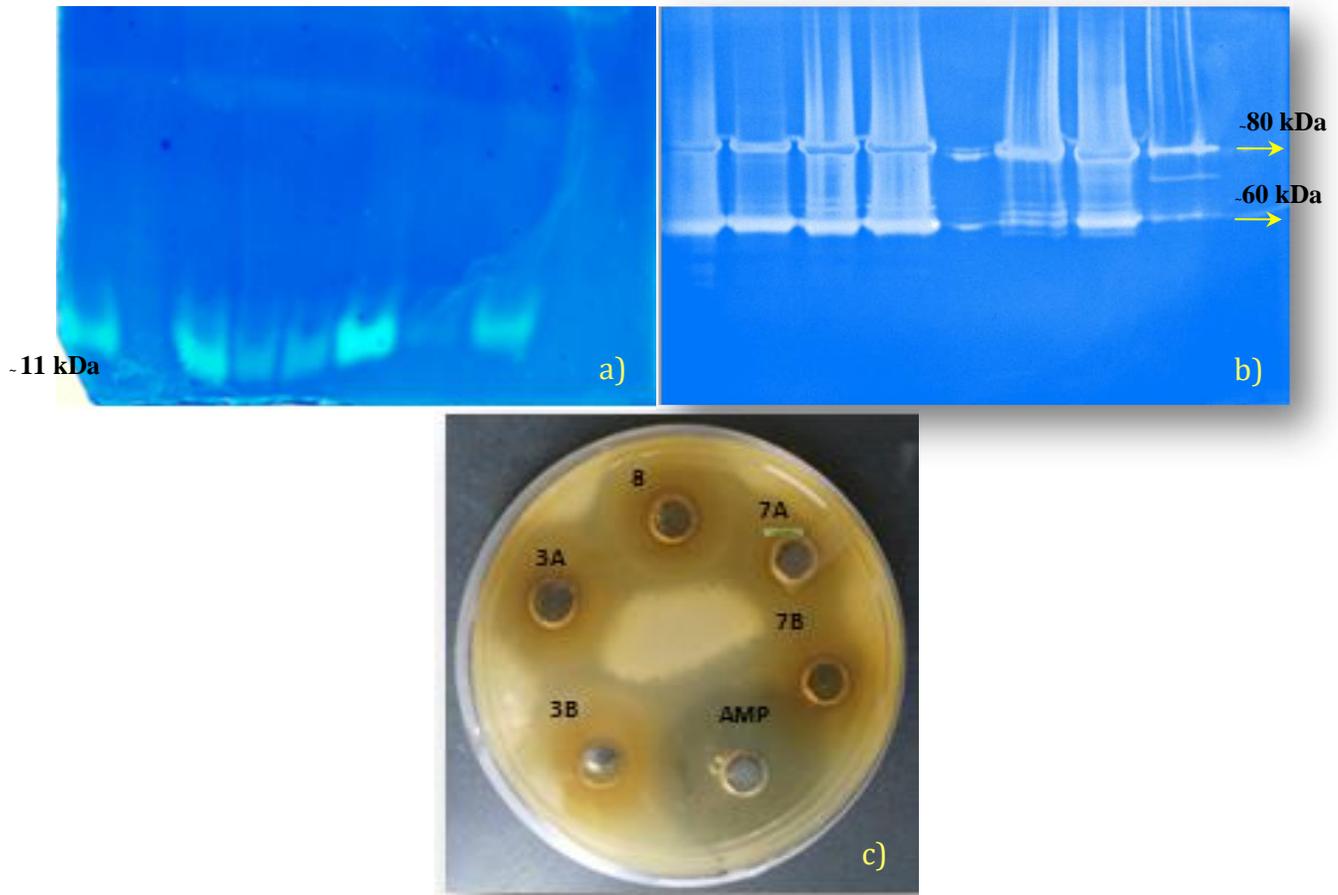


Figura 13. a) Zimograma vs. *L. innocua* SDS-PAGE 10 %. b) Zimograma vs. *S. aureus*, SDS-PAGE 10 %. c) Prueba difusión en agar vs *S. aureus*, ampicilina (10 mg/mL) como control. García (2017)

3. JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad la demanda de alimentos que contengan una menor cantidad de aditivos químicos ha aumentado, lo que ha llevado a la investigación y caracterización de compuestos antimicrobianos producidos por BAL. Estos compuestos son de gran importancia puesto que pueden sustituir en algunos casos el uso de conservadores químicos en alimentos.

El queso bola de Ocosingo, producido en Ocosingo, Chiapas, de manera artesanal, presenta características distintivas debido a la composición de la leche y a las condiciones climáticas de la región, que ayudan a diferenciar la microbiota presente. Según Escobar *et al.*, (2012), gracias a esta microbiota y la maduración adecuada del queso se puede asegurar la inocuidad del mismo.

En este caso, los compuestos de origen proteínico son de gran importancia pues al ser un queso elaborado con leche no pasteurizada, no se adicionan conservadores químicos. *Lactobacillus fermentum* es parte de la microbiota presente de manera natural en el queso de tal manera que las bacteriocinas y/o PGHs producidas por estas cepas pueden formar una barrera contra bacterias patógenas.

Distintos autores han reportado actividad antibacteriana de *L. fermentum* contra distintas cepas patógenas de interés en alimentos, también se han encontrado bacteriocinas en cepas aisladas de diferentes cavidades del cuerpo humano, pero no hay reportes sobre la actividad de cepas aisladas de *L. fermentum* de quesos mexicanos ni sobre su potencial contribución a la inocuidad de estos.

4. HIPÓTESIS.

- ✚ La actividad antibacteriana producida por las cepas de *Lactobacillus fermentum* aisladas del queso bola de Ocosingo se deberá a compuestos extracelulares de carácter proteínico como bacteriocinas y peptidoglicano hidrolasas (PGHs).

5. OBJETIVO GENERAL.

- ✚ Caracterización e identificación de la fracción proteínica extracelular con actividad antibacteriana producida por *Lactobacillus fermentum* aislado del queso bola de Ocosingo, Chiapas.

6. OBJETIVOS PARTICULARES.

- ✚ Determinar el número y la masa molecular de las proteínas y/o péptidos producidos por *L. fermentum* que presentan actividad antibacteriana.
- ✚ Identificar a las proteínas con actividad antibacteriana mediante la secuenciación de las bandas con actividad lítica.

7. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

7.1. Diagrama experimental

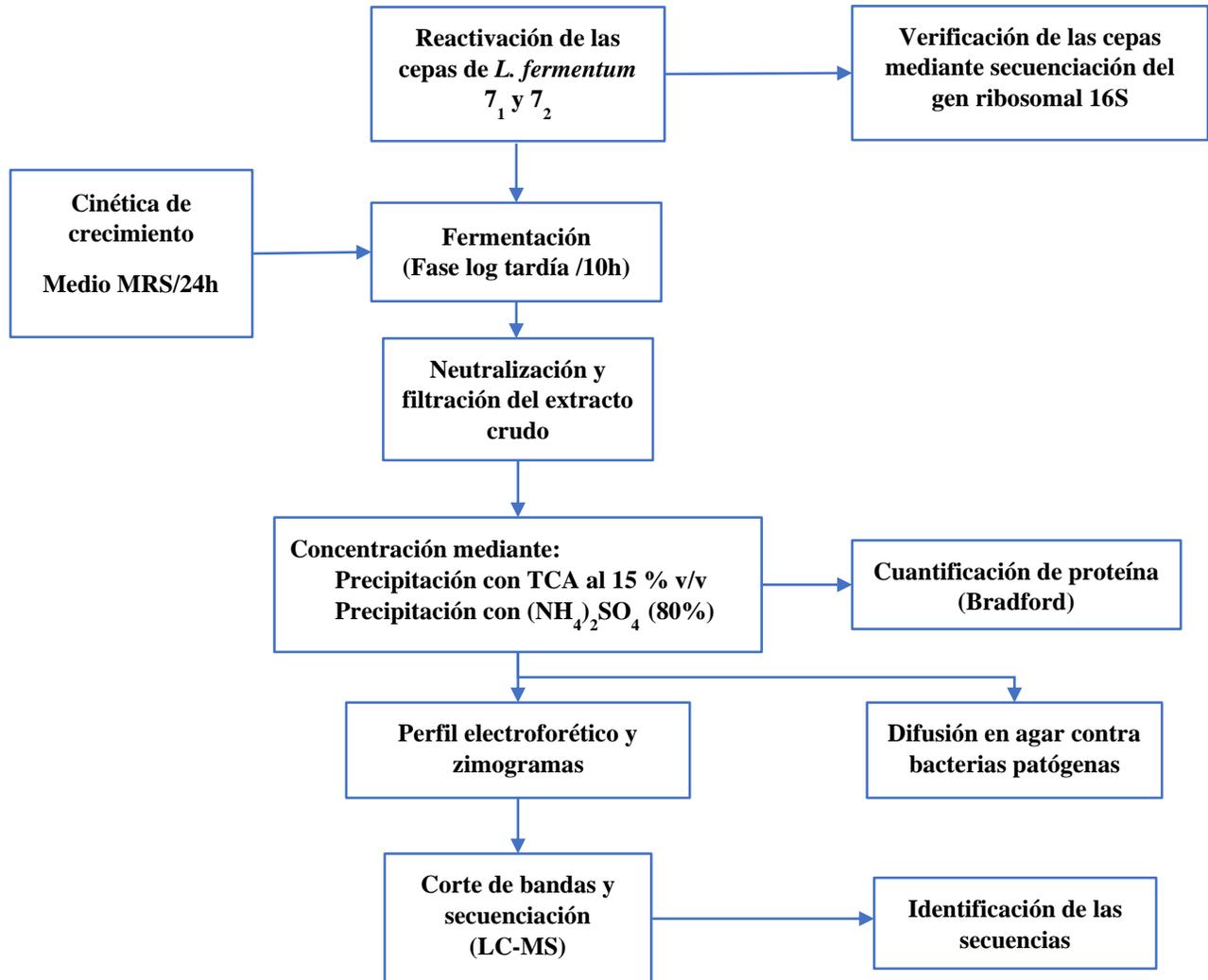


Figura 14. Diagrama general de la metodología experimental

7.2. Cepas aisladas del queso bola de Ocosingo, Chiapas.

Las cepas utilizadas fueron aisladas del queso bola de Ocosingo por Sheila I. Grajales de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Fueron aisladas a partir del queso bola y posteriormente se realizó extracción de ADN de las colonias aisladas. Los microorganismos fueron identificados a través de la secuenciación del gen ribosomal 16S completo.

7.3. Cepas patógenas utilizadas en el estudio.

Las cepas patógenas utilizadas en el estudio fueron *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *P. aeruginosa* y *Y. enterocolitica*, obtenidas del cepario de la Facultad de Química de la UNAM. Se encontraban criopreservadas a -20 °C por lo que, para su utilización, fueron reactivadas en medio de cultivo BHI a 37 °C.

7.4 Verificación de pureza de las cepas de *L. fermentum*

Una vez reactivados los microorganismos, se realizó tinción de Gram para observar la pureza del cultivo y las características morfológicas esperadas para cada cepa.

7.5 Conservación de las cepas.

Al confirmar la pureza de las cepas reactivadas, en un criovial se colocaron 750 µL del medio de cultivo en caldo MRS (OXOID) para las cepas de *L. fermentum* y BHI para los patógenos más 750 µL de glicerol al 30 % (v/v) estéril y se almacenaron a -20 °C

7.6 Identificación molecular de las cepas de *L. fermentum*

7.6.1 Extracción de ADN

Se inocularon 100 µL de la cepa en 50 mL de caldo MRS durante toda la noche a 37 °C con agitación 250 rpm. Se centrifugó durante 15 min a 8000 rpm para formar un paquete celular y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se realizaron dos lavados con solución salina isotónica estéril (0.85 %). Para realizar la extracción se utilizó el kit comercial Fast DNA de Genetic ID.

Las células se resuspendieron en buffer de lisis (1 mL) en tubos eppendorf de 2 mL y se adicionaron 50 µL de lisozima (10 mg/mL). Esta reacción fue incubada a 35 °C/20 min/ 400 rpm. Pasado este tiempo, se adicionaron 2.5 µL de proteinasa K y se volvió a incubar 30 min/65 °C/600 rpm; hecho esto, se adicionaron 500 µL de cloroformo, se agitó por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm/5 min/4 °C, en seguida se tomó la fase acuosa y se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL donde se añadió 1 mL de buffer de unión, esto se centrifugó a 10,000 rpm/5 min/4 °C. El sobrenadante fue

transferido a una columna de purificación y se realizaron lavados con 1 mL de buffer de lavado y con 600 µL de etanol frío al 75 %. Finalmente, se agregó buffer TE para obtener el ADN en tubos Eppendorf de 1.5 mL y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

7.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se efectuó para amplificar el gen ribosomal 16S, utilizando los cebadores fD1 y rD1, considerados como universales, ya que se usan para la mayoría de las eubacterias (Weisburg *et al.*, 1991). En la Tabla 3 se muestran las secuencias de estos cebadores.

Tabla 3. Secuencias de cebadores utilizados.

Primer	Secuencia
fD1	CCGAATCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC

Para esta reacción se preparó la mezcla de acuerdo con las especificaciones del proveedor de la enzima Pfu (Thermo Scientific) la proporción de los componentes se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Proporción de los componentes de la PCR.

Componente	Concentración final	Volumen (µL)
Agua	-----	Completar vol.final
Buffer	1X	5
Primer fD	1 µM	1
Primer rD	1 µM	1
dNTPs	1 µM	1
ADN molde	3 ng/µL	5*
ADN polimerasa	1.25 U	0.4
Volumen final	-----	50

* volumen necesario para tener una cantidad de 150 ng por reacción

Se preparó en primer lugar una mezcla maestra adicionando todos los componentes comenzando por el agua y terminando con la ADN polimerasa. Esta mezcla fue repartida en tubos eppendorf de 200 µL a los cuales se les adicionó 5 µL de ADN (aproximadamente 150 ng/reacción). Posteriormente la reacción de PCR se efectuó en el termociclador Techgene de Techne. Las condiciones de reacción se especifican en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de PCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	35 ciclos
Desnaturalización	95 °C	2 min	
Alineamiento	42 °C	0.5 min	
Extensión	72 °C	3 min	
Extensión final	72 °C	10 min	
Conservación	4 °C	∞	

Los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio al 1 %. Para cargar las muestras se agregaron 2 μ L de buffer de carga por cada 5 μ L de la reacción de PCR y se utilizó el marcador Gene Ruler 1 Kb de ThermocScientific. Los productos de PCR fueron purificados con el kit QIAEX II de Qiagen.

7.6.3. Secuenciación de amplicones.

Los productos de PCR, con una concentración de aprox. 0.5 ng/ μ L se mandaron secuenciar a MACROGEN Co. Seúl, Corea. Las secuencias obtenidas (mostradas en el anexo) fueron analizadas mediante la herramienta BLASTn (Basic Local Aligment Search Tool) que es un programa capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentran en la base de datos secuencias de ARN ribosomal 16S (Bacterias y Arqueas) del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

7.7. Cinética de crecimiento

Se preparó un preinóculo en un tubo de ensayo con tapa de rosca con 10 mL de medio MRS estéril se colocaron 200 μ L del contenido de un criovial y se dejó incubando por 12 horas a 37 °C. Posteriormente, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio MRS estéril, se adicionaron 200 μ L del preinóculo y se tomaron alícuotas de 1 mL cada 2 horas, desde el tiempo cero hasta las 24 h de crecimiento, bajo las condiciones ideales de incubación (37 °C / 250 rpm). El crecimiento se determinó a través de la densidad óptica de cada uno de los puntos de la cinética de crecimiento a una longitud de onda de 600 nm con el espectrofotómetro, usando como blanco agua destilada. A la par se determinó el pH con un potenciómetro acoplado a un microelectrodo para volúmenes pequeños. Al final se graficó el logaritmo natural de la densidad óptica y pH en función del tiempo para determinar la fase logarítmica tardía de las cepas.

7.8. Obtención del extracto crudo

Se preparó un preinóculo en un tubo de ensayo con tapa de rosca con 10 mL de medio MRS estéril se colocaron 200 μ L del contenido de un criovial y se dejó incubando por 12 horas a 37 °C. Posteriormente, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio MRS estéril, se adicionaron 200 μ L del preinóculo, incubando bajo las condiciones seleccionadas. La fermentación se detuvo durante la fase logarítmica tardía (dato obtenido a partir de las cinéticas de crecimiento) para la posterior obtención de los compuestos extracelulares. Cada muestra fue centrifugada a 12,000 g durante 15 minutos a 4 °C en una centrífuga Biofuge. Los sobrenadantes obtenidos se neutralizaron a pH 7 con NaOH 50 % m/v y posteriormente se filtraron con una membrana de 0.22 μ m (Millipore).

7.9. Condiciones de concentración del extracto crudo

7.9.1 Liofilización

Se utilizaron 50 mL del extracto crudo; filtrado y neutralizado y se liofilizó en un sistema Freeze Dry System, Feezone 4.5 de Labconco. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a -20 °C. Para su uso, las muestras fueron resuspendidas en 1 mL de buffer de fosfatos 100 mM a pH 7.

7.9.2. Precipitación con TCA

Se precipitaron 50 mL del extracto crudo con ácido tricloro acético (TCA) concentración final del 15 % v/v del volumen total a precipitar y se dejó en reposo a 4°C durante 2 horas. La muestra se centrifugó a 25,000 g durante 15 min, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 mL de acetona al 90 % v/v para volver a ser centrifugado utilizando las mismas condiciones, por lo menos dos veces más, esto con el fin de eliminar los restos de TCA en la muestra. Finalmente, se dejó la muestra en campana de extracción para que el remanente de acetona se evaporara. El precipitado se resuspendió en 500 μ L de buffer de fosfatos 100 mM a pH 7.

7.9.3. Precipitación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Se utilizaron 250 mL del extracto crudo, filtrado y neutralizado. Para comenzar la precipitación, la muestra se llevó al 50 % (p/v) de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (291 g/L). La sal se agregó lentamente manteniendo la muestra en hielo y agitación suave con barra magnética procurando que no se hiciera espuma, durante 20 min. Se retiró de agitación y se centrifugó a 12,000 g por 20 min. a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y el pellet se desechó. Posteriormente el sobrenadante se llevó a

una saturación de 80 % (p/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (194 g/L) y se procedió como en el paso anterior. Para finalizar, la muestra se centrifugó a 30,000 g. El sobrenadante fue desechado y se recolectó el material precipitado. Este fue resuspendido en 2 mL de buffer de fosfatos 100 mM pH 7.

Finalmente se realizó una diálisis para eliminar el exceso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ donde se utilizó una membrana de celulosa de tamaño de corte de 1 kDa; se introdujo la membrana en una cubeta con buffer de fosfatos 100 mM pH 7 y se dejó en agitación y refrigeración a 4 °C durante 24 horas, haciendo un cambio de buffer 2-3 veces. Pasadas las 24 horas, la muestra se almacena a -20 °C hasta su uso.

7.10 Determinación de proteína por el método Bradford.

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

7.11 Determinación del efecto antibacteriano mediante difusión en agar.

Para la determinación del efecto antibacteriano se realizaron pruebas de difusión en agar. Se utilizaron microorganismos patógenos de interés en alimentos. Se realizó un preinóculo de la cepa utilizada en 5 mL de caldo y se dejó crecer por aproximadamente 12 horas a 37 °C. Pasado este tiempo se realizó una dilución 1:100 con medio de cultivo estéril. Para la preparación de las cajas se colocaron 30 mL de medio con agar al 0.85 % m/v en un tubo Falcon estéril y se agregaron 70 μL del cultivo por cada mL de agar, se agitó suavemente para no formar burbujas y se vació en la caja.

Con la parte superior de una punta para micropipeta P1000 estéril, se hicieron pozos sobre el agar y en cada uno se agregaron 200 μL de las muestras a analizar ($\sim 160 \mu\text{g}/\text{mL}$), además se colocó un control positivo (Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y dos controles negativos (medio MRS y buffer de resuspensión). Las cajas se incubaron a las condiciones de crecimiento del microorganismo blanco de 8-12 h en una estufa estática. Finalmente se midió el diámetro del halo de inhibición con ayuda de un vernier, restando el diámetro del pozo (0.9 cm).

7.12. Electroforesis SDS- PAGE

Para la identificación de los compuestos de naturaleza proteínica (PGHs\bacteriocinas) y determinación de su masa molecular, se realizó electroforesis en geles de SDS- PAGE- Glicina al 10 % y al 14 % con el equipo Mini Protean 3 System, Electrophoresis Module de Bio-Rad Laboratories (Mini-Protean II Electrophoresis Cell, instruction manual). Se emplearon las muestras tratadas con los diferentes métodos de concentración (precipitación con TCA al 15 %, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80 %) y se colocó el marcador de masa molecular Precision Plus Protein All Blue Standards, una mezcla de 10 proteínas recombinantes teñidas de azul (10–250 kD)

Las muestras analizadas fueron tratadas antes de la electroforesis con un buffer de carga 4X (Tris-HCl 1M pH 6.8, glicerol al 24 % (v/v), SDS al 8 % (p/v), azul brillante de Coomassie al 0.02 % y 2- mercaptoetanol 0.2 M), las muestras se calientan a ebullición durante 5 min. y posteriormente se colocan alícuotas en cada pozo del gel cuidando que la concentración de proteína en todos los pozos sea igual (~17 μ g). Las condiciones de la electroforesis fueron 80 V durante 15 min a temperatura ambiente y pasado este tiempo a 120 V en refrigeración a 4 °C durante 1 h 45 min. Aproximadamente (las preparaciones de los reactivos se muestran en el anexo)

7.13. Zimogramas.

Para corroborar y detectar la actividad del compuesto antibacteriano de las cepas utilizadas, se realizaron zimogramas contra los microorganismos indicadores (cepas patógenas). Para su preparación se utilizó la misma composición de los geles SDS- PAGE- Glicina 10 y 14 % más la adición del microorganismo indicador como sustrato.

Se inocularon 100 mL de caldo BHI con los microorganismos indicadores (patógenos) y se dejó en incubación a 37 °C durante 12 horas sin agitación. Posteriormente los microorganismos se inactivaron con esterilización en autoclave. La muestra se centrifugó a 8500 rpm durante 15 min. a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se recuperó el precipitado, posteriormente se hizo un lavado con 35 mL de solución salina isotónica (0.85 % NaCl) y se centrifugó nuevamente, esto se repitió tres veces. El tercer lavado se realizó con 8.5 mL de solución y se midió la DO (600 nm) a partir de una disolución 1:100 para determinar la cantidad necesaria de muestra para realizar los geles (DO= 8-10). Las condiciones para la corrida fueron las mismas que para los perfiles electroforéticos, al igual que el tratamiento de las muestras. Finalmente se incubaron a 37 °C a 50

rpm en una solución buffer de fosfatos 100 mM pH 7 y tritón al 1 % por 24 horas. Se tiñeron con una solución de azul de metileno al 0.1 % y KOH al 0.01 % durante 20 min. Para desteñir los geles se realizan varios lavados con agua destilada hasta que se pudieron observar las bandas de lisis. En los geles que presentan actividad lítica, se observan bandas transparentes.

7.14 Secuenciación de proteínas

El análisis de secuenciación de proteínas se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología (IBT) en la unidad de Proteómica

7.14.1 Procesamiento químico de las muestras

Las muestras fueron previamente reducidas con ditiotreitól (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquiladas con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y digeridas “in gel” con Tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). En el procesamiento de las muestras con tripsina se utilizó una solución que contiene 50mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) y la incubación fue de 18 horas a temperatura de 37 °C.

7.14.2 Análisis espectrométrico

Los péptidos producidos por hidrólisis enzimática fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba Accela (Thermo-Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI). En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 5-85 % B (acetonitrilo con 0.1 % de ácido fórmico) en 120 min utilizando una columna capilar RP-C18 hecha en casa (0.75 µm de diámetro interno y 10 cm de largo). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/min.

7.14.3 Búsqueda e identificación de los péptidos secuenciados.

Los péptidos obtenidos a partir de la secuenciación, fueron comparados mediante el algoritmo BLASTp (protein-protein BLAST) del NCBI. Una vez realizado el BLASTp se tomaron en cuenta las secuencias con el porcentaje de identidad más alto. Posteriormente se hizo un alineamiento múltiple de los péptidos encontrados mediante secuenciación contra las secuencias de referencia encontradas en el BLASTp con el programa CLUSTAL W. Mediante la base de datos Pfam se corroboraron las secuencias con alto porcentaje de identidad para identificar dominios o motivos reportados dentro de las secuencias.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Purificación de las cepas.

Al inicio del trabajo experimental, fue necesario comprobar que las cepas estuvieran puras. Se partió de una fermentación en medio MRS durante 18 horas, posteriormente se realizaron frotis y se tiñeron por la técnica de Gram. Se observaron al microscopio y se encontró que las cepas estaban contaminadas. Como se analizaron 6 viales por muestra y todos se observaban contaminados por cocos, se tomaron los viales en los que se observó un conteo más bajo de cocos. Para la purificación se inocularon cajas Petri con agar MRS, la inoculación se hizo mediante estrías por agotamiento. Para poder observar diferencias coloniales, se dejaron en incubación por 18 horas a 37 °C. Pasado este tiempo se hicieron frotis de diferentes colonias que coincidían con la morfología esperada (colonias pequeñas de 2-5 mm, convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos), se tiñeron por la técnica de Gram y se vieron en el microscopio, observándose únicamente bacilos Gram positivos. Posteriormente se inocularon cajas Petri con agar LB y se hicieron pruebas de oxidasa y catalasa.

En la Figura 15 se pueden observar bacilos cortos Gram positivo, para las distintas cepas analizadas, además mostraron ser oxidasa y catalasa negativos que también corresponden con las características descritas por Bergey (2009) para *L. fermentum*.

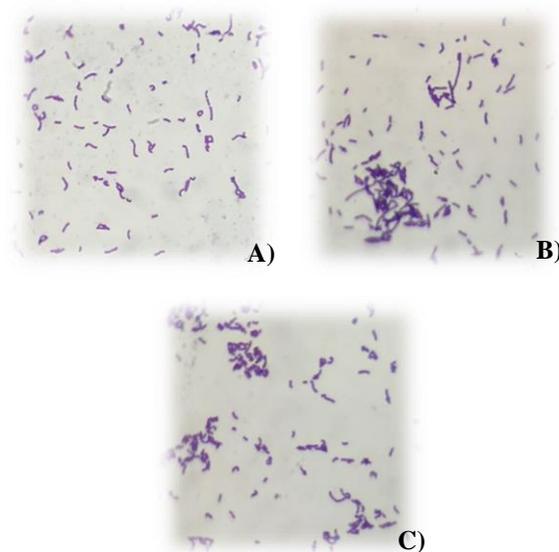


Figura 15. Tinción de Gram de las cepas de *L. fermentum* A) cepa 7₁, B) cepa 7₂, C) cepa 9

Para corroborar la identidad de los bacilos observados, se realizó secuenciación del gen ribosomal 16S. Para ello se hizo una fermentación en medio MRS durante 12 horas a 37 °C, posteriormente se recuperó el paquete celular. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial Fast DNA de Genetic ID. Después, mediante espectrofotometría, se realizó la cuantificación de la concentración de ADN y la relación $A_{260/280}$ para determinar la pureza del ADN extraído (Tabla 6). Los valores de concentración >20 ng/mL se consideran adecuados, mientras que la relación $A_{260/280}$ con un valor entre 1.8-2.0 indica que el ADN tiene una pureza óptima (Gallou *et al.*, 2015).

Tabla 6. Concentración de ADN y $A_{260/280}$

Cepa	Concentración	$A_{260/280}$
7_1	60.85	2.01
7_2	68.63	2.02
9	58.39	2.02

El gen 16S fue amplificado mediante PCR a partir del ADN extraído de las muestras, después se hizo un gel de agarosa al 1 %, esperando encontrar bandas de 1500 pb correspondiente al gen 16S (Figura 16).

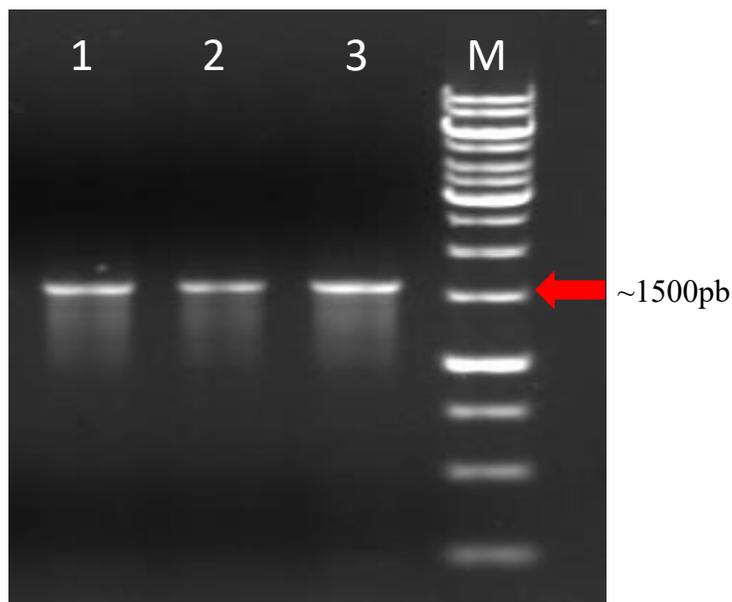


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1 %, teñido con bromuro de etidio 0.1 % de los amplicones del gen 16S. (M) marcador de masa molecular 1Kb. (1) amplicón de la cepa 9. (2) amplicón de la cepa 7_2 (3) amplicón de la cepa 7_1

Como se esperaba, los productos de amplificación del ADNr 16S tuvieron aproximadamente 1500 pb, esto se puede observar claramente en la Figura 16, lo que indica una correcta amplificación. Los productos de PCR fueron purificados con el kit DNA Clean & Concentrator TM-5” y se ajustaron a 5 ng/μL y se secuenciaron.

Los resultados de la secuenciación de los amplicones en ambos sentidos, fueron alineados para obtener una secuencia consenso mediante el programa Clustal W. Posteriormente, las secuencias consenso fueron analizadas mediante el algoritmo BLASTn (Basic Local Alingment Serch Tool), que realiza alineamientos locales de las secuencias depositadas en la base de datos GenBank del NCBI. Para ello se utilizó la base de datos secuencias de ARN 16S ribosomal (Bacterias y Arqueas). En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos a partir del BLASTn de las secuencias consenso.

Tabla 7. Resultados obtenidos mediante BLASTn de las secuencias del gen 16S de las cepas de trabajo.

Cepa	Especie	Cobertura (%)	Valor e	Identidad (%)	Clave NCBI
7 ₁	<i>L. fermentum</i>	99	1×10^{-103}	97.14	NR_104927.1
7 ₂		100	0.0	92.29	NR_113335.1
9		98	0.0	86.78	NR_104927.1

8.2. Cinéticas de crecimiento.

Con el fin de determinar el tiempo en el cual las cepas alcanzan la fase logarítmica tardía, momento en el cual se ha reportado que hay una mayor producción de péptidos antimicrobianos, se realizaron cinéticas de crecimiento (Fig.18) esto se hizo a partir de una fermentación de 50 mL a 37 °C con agitación de 250 rpm. Las mediciones de pH y de densidad óptica (DO) se realizaron cada dos horas durante 24 horas y se hicieron por triplicado. Se calculó el Ln de la DO_{600nm} para obtener la velocidad de crecimiento de cada cepa.

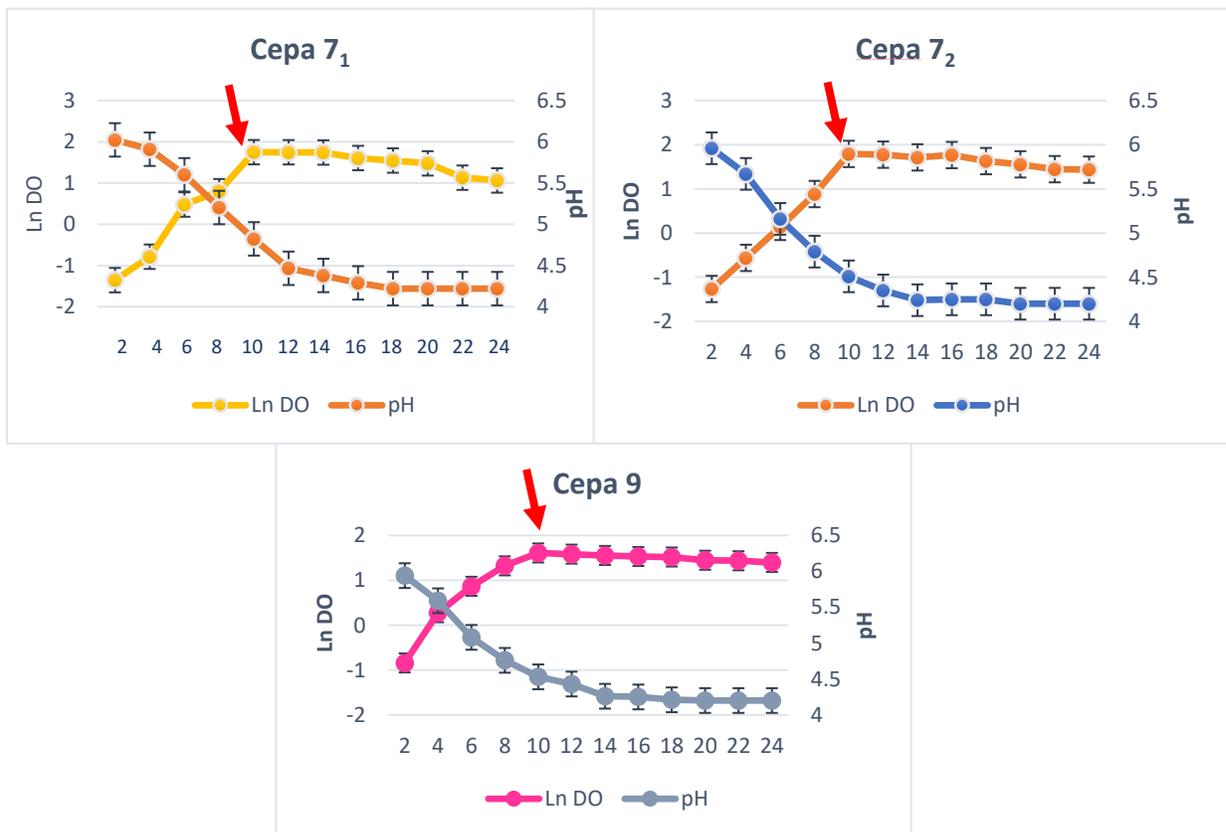


Figura 17. Cinéticas de crecimiento de las cepas de *L. fermentum* analizadas. La flecha roja señala el momento en que la fermentación alcanza el inicio de la fase estacionaria.

De acuerdo con las cinéticas de crecimiento (Figura 17), los tiempos en que cada cepa alcanza el inicio de la fase estacionaria (marcada con flechas rojas) y el descenso del pH es semejante, también se puede observar la disminución del pH a medida que pasa el tiempo de fermentación, esto debido a la producción de ácidos orgánicos, ácido láctico principalmente, partiendo de un pH de 6 al inicio de la fermentación, llegando a un valor de casi 4 al finalizar las 24 horas. Esta fase de crecimiento es de interés ya que se ha reportado que la mayor producción de compuestos antimicrobianos se lleva a cabo en la fase logarítmica tardía o en la estacionaria temprana, lo que también está relacionado con una mayor producción de biomasa y la producción de ácidos orgánicos que es directamente proporcional al crecimiento (Serrano, 2010). Es posible que *L. fermentum* se comporte de la misma manera durante el proceso de maduración del queso bola y esté relacionado con la acidificación de la pasta del núcleo del queso. Este punto se tomó como referencia para detener la fermentación, para ello, se eliminaron las células mediante centrifugación y posteriormente se neutralizó el extracto crudo y se procedió a probar la actividad inhibitoria del concentrado extracelular por medio de difusión en agar contra patógenos de interés en alimentos.

8.3. Determinación del efecto antibacteriano.

Para determinar el efecto antibacteriano se realizaron pruebas de difusión en agar en donde se utilizaron diferentes métodos de concentración de proteínas: precipitación con sulfato de amonio, precipitación con ácido tricloroacético (TCA), liofilización y ultrafiltración. Para ello se inocularon cajas Petri con agar BHI con los microorganismos blanco (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica*, y *S. enterica* serovar Typhimurium) y se hicieron pozos para agregar los concentrados extracelulares obtenidos mediante precipitación con TCA y sulfato de amonio (~160 µg/mL), un control positivo, en este caso ampicilina (100 µg/mL) y dos controles negativos, buffer de la muestra y medio MRS estéril. Las cajas permanecieron en incubación a 37 °C alrededor de 7 horas, cuando ya se observa un tapete uniforme de células y puede observarse el halo de inhibición producido por el control positivo (Figuras 18 y 19).

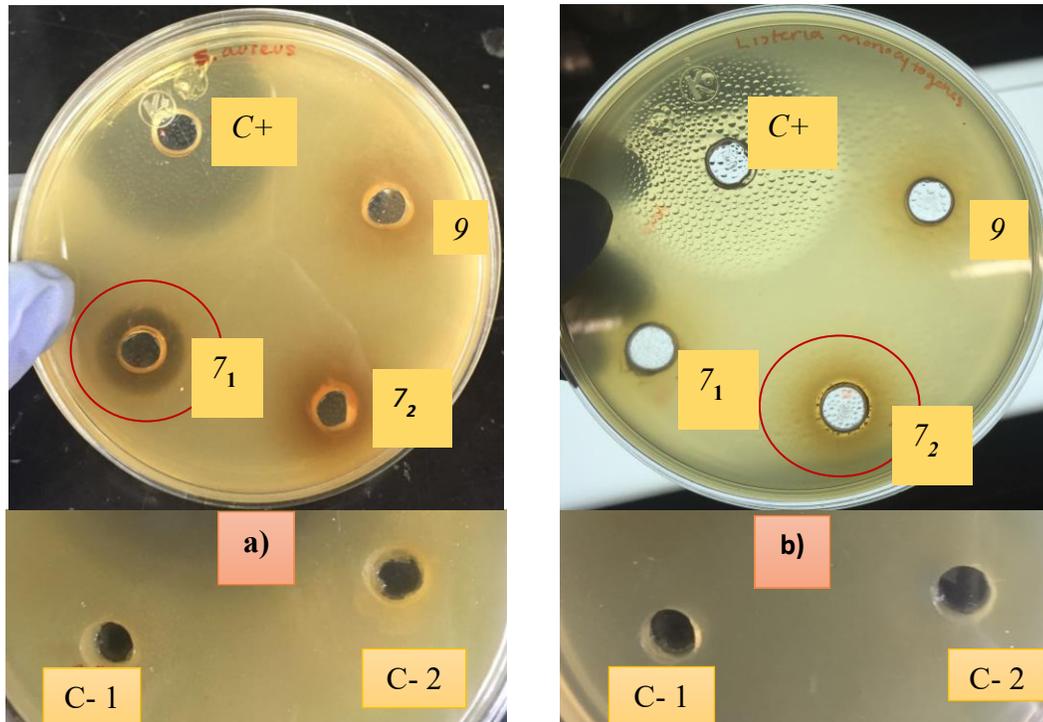


Figura 18. Difusión en agar de las muestras precipitadas con sulfato de amonio al 80% vs. a) *S. aureus* y b) *L. monocytogenes*. Control positivo (C+) ampicilina (100 µg/mL), control negativo 1 (C-1) buffer de la muestra, control negativo 2 (C-2) medio de cultivo MRS estéril. Los círculos rojos enmarcan los halos de inhibición observados.

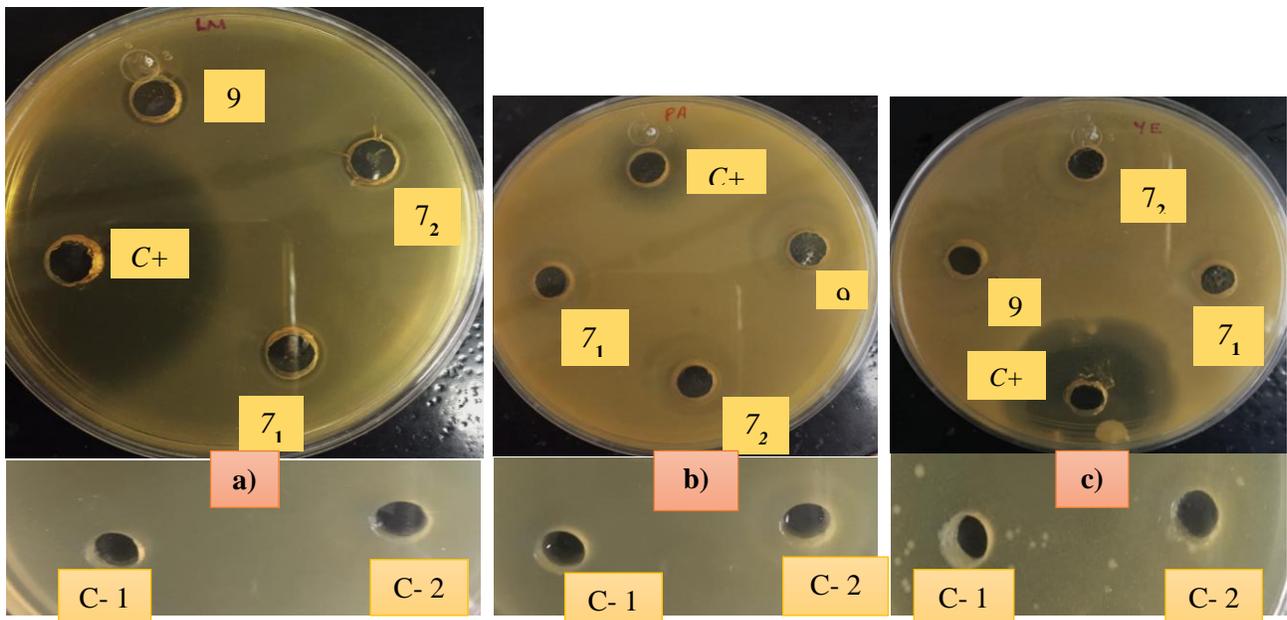


Figura 19. Difusión en agar de las muestras precipitadas con TCA vs. a) *L. monocytogenes*, b) *P. aeruginosa* y c) *Y. enterocolitica*. Control positivo (C+) ampicilina (100 µg/mL), control negativo 1 (C-1) Buffer de la muestra, control negativo 2 (C-2) medio de cultivo MRS estéril.

Como ya se mencionó, se probaron diferentes métodos de concentración de las proteínas extracelulares producidas en la fermentación en medio MRS. Las cajas con el tratamiento de liofilización no dieron resultados positivos, por lo que no se muestran. Por otro lado, en la Figura 18 se probaron sobrenadantes de fermentación precipitados con sulfato de amonio, en la Figura 18a se puede observar un halo de inhibición por parte de la cepa 7₁ contra *S. aureus* de ~0.83 cm y en la Figura 18b se puede observar otro halo de inhibición con la cepa 7₂ contra *L. monocytogenes* de ~0.20 cm. Para las muestras precipitadas con TCA en la Figura 19 a) se pueden observar pequeños halos de inhibición por parte de las tres cepas contra *L. monocytogenes* y en las Figuras 19 b) y c) se puede observar halos difusos, causados posiblemente por bacteriostasis, contra *P. aeruginosa* y *Y. enterocolitica*.

Este método no es muy sensible, es por ello que se realizaron geles de electroforesis y zimogramas para corroborar dicha actividad.

8.4 Electroforesis SDS-PAGE y zimogramas.

Una vez precipitadas las proteínas a partir del extracto crudo extracelular, se realizó la electroforesis en geles SDS- Tris- Glicina, para obtener el perfil electroforético y su zimograma para observar la actividad lítica de las proteínas contra los microorganismos blanco. Para ello se utilizó extracto crudo precipitado con TCA al 15 % y sulfato de amonio al 80 %; las muestras fueron calentadas a ebullición en el buffer de carga en condiciones desnaturalizantes. Los geles se realizaron al 10 y 14 % de acrilamida. Para la detección de la actividad lítica se emplearon zimogramas utilizando como sustrato células del organismo indicador previamente esterilizadas. Al término de la corrida electroforética los geles se incubaron en una solución renaturalizante (especificada en la metodología) durante 18 h para que las proteínas recobraran su actividad, después se tiñeron con azul de metileno y se dejaron desteñir en agua destilada hasta observar bandas traslucidas. La cantidad de proteína se estandarizó y se colocaron ~17µg por pozo, tanto en la electroforesis como en el zimograma. Se utilizó un marcador de baja masa molecular con el fin de comparar las proteínas que pudieran encontrarse en los intervalos de masa molecular característicos de las PGHs (30 kDa-140 kDa) y bacteriocinas (aproximado 10 kDa).

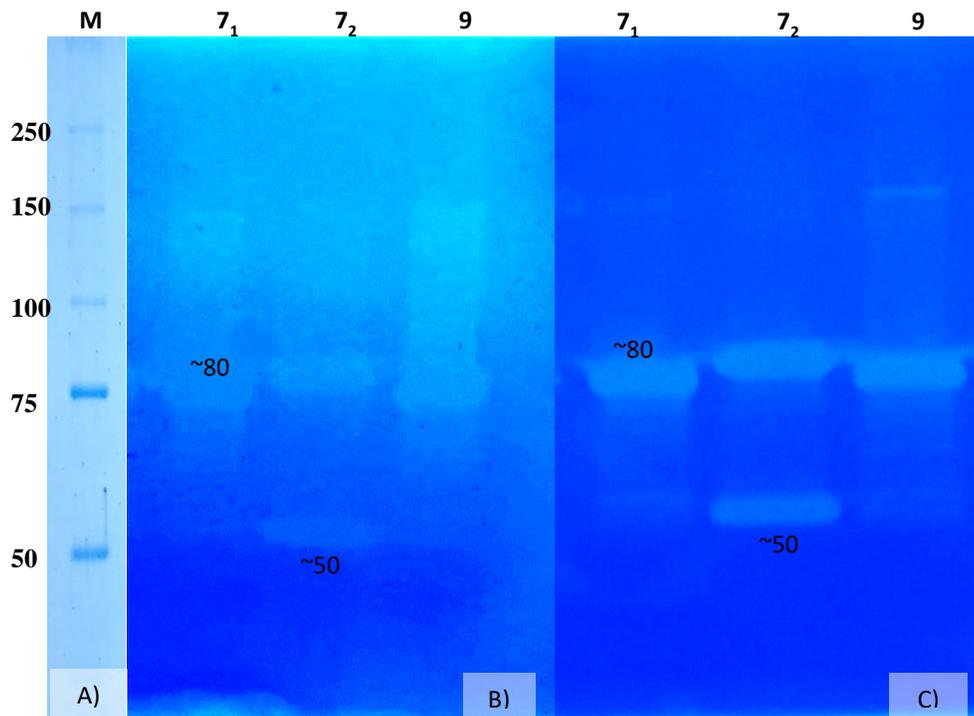


Figura 20. Electroforesis SDS- PAGE 10%. A) Marcador de masa molecular, B) Zimograma vs. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Precipitación con sulfato de amonio al 80%, C) Zimograma vs. *Y. enterocolitica*. Precipitación con sulfato de amonio al 80%

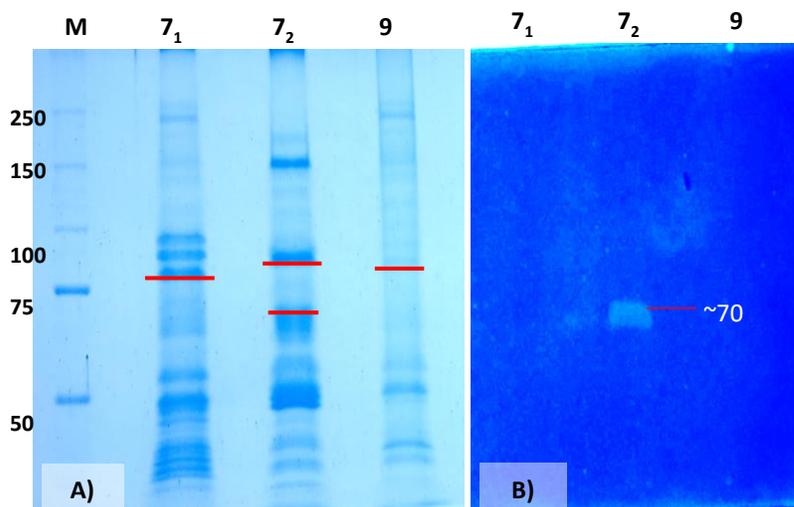


Figura 21. A) Electroforesis SDS- PAGE 10 % y B) Zimograma vs. *P. auruginosa*. Muestras obtenidas mediante precipitación con TCA al 15 %.

La precipitación con sulfato de amonio no es tan dañina para las proteínas ya que se ha demostrado que estabiliza su estructura (Duong-Ly y Gabelli, 2014), pero al dializarlas la muestra puede diluirse demasiado, reduciendo la cantidad de proteína por mL; por otro lado, si la muestra no se desala correctamente, el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ puede interferir en el corrimiento de las muestras durante la electroforesis. Esto se puede observar en los zimogramas de la Figura 20B y 20C en donde la definición de las bandas de lisis no es muy buena, aunque se pueden observar un patrón de bandas de lisis similar, estas bandas se encuentran en una masa aproximada de entre 60 y 80 kDa, según lo reportado por diferentes autores estas masas moleculares podrían corresponder a PGHs. Debido a los problemas con las muestras precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se decidió trabajar únicamente con las muestras precipitadas con TCA.

A pesar de que la precipitación con TCA puede causar la desnaturalización de las proteínas y la pérdida de su función, algunas proteínas y en este caso las PGHs pueden conservar su actividad bacteriolítica (Koontz, 2014). En la Figura 21B, se observa una banda de aproximadamente 70 kDa contra *P. aeruginosa* correspondiente a la cepa 7₂.

Dado que los mejores resultados en la prueba de difusión en agar y en zimografía fueron observados por las cepas 7₁ y 7₂ los últimos análisis de zimografía fueron realizados sólo con estas dos cepas. Para esto, se realizaron geles y zimogramas SDS- PAGE al 14 % para obtener una mejor separación de las bandas y cortarlas para su posterior secuenciación.

En la Figura 22B, alrededor de los 60 kDa se pueden observar 3 bandas en lugar de 1 como se observaba en los zimogramas SDS- PAGE al 10 % a partir de esto se decidió cortar la banda con mejor definición que tiene una masa aproximada de 60 kDa perteneciente a la cepa 7₂ y también fue cortada la banda perteneciente a la cepa 7₁ con tamaño aproximado de 80 kDa.

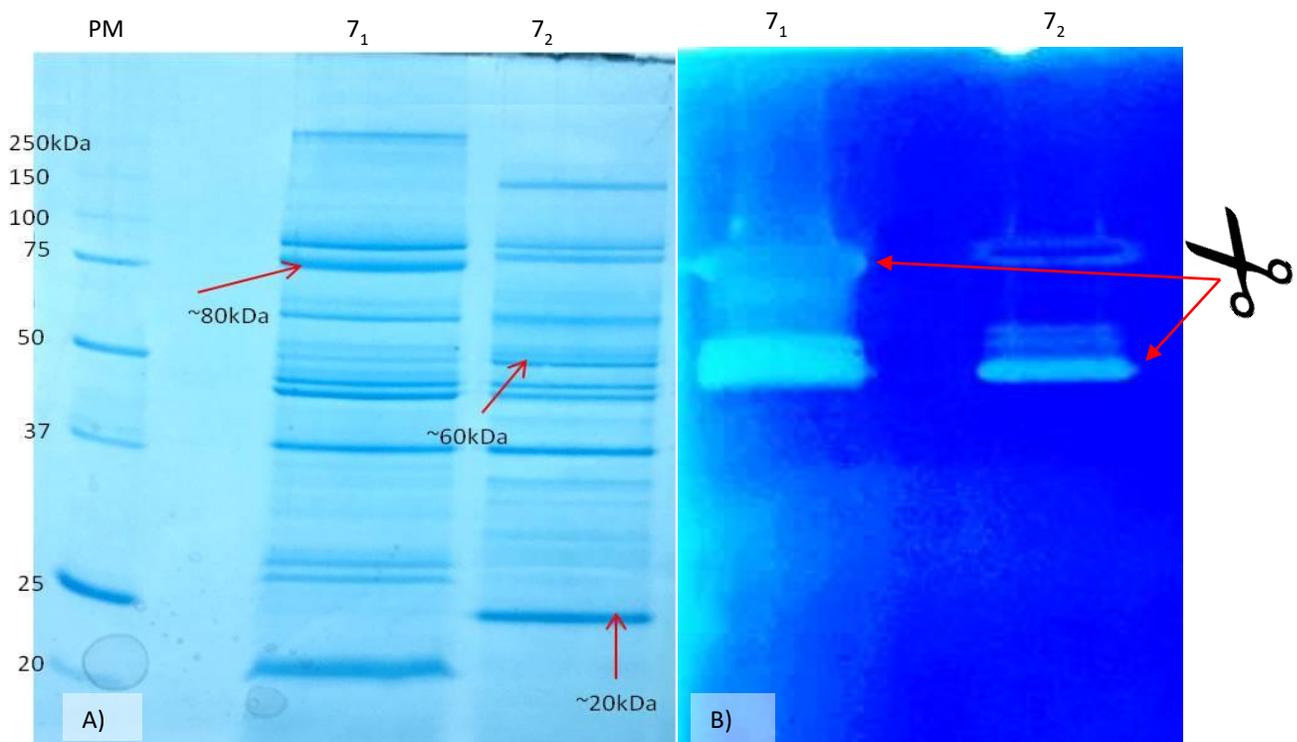


Figura 22. A) Electroforesis SDS-PAGE 14 %. B) zimograma vs *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, utilizando la muestra precipitada con TCA al 15 %

En la Figura 23 se pueden observar bandas de menor masa molecular, aproximadamente 20 kDa activas contra *L. monocytogenes* y *S. aureus* respectivamente, que podrían corresponder con los halos de inhibición observados en la difusión en agar.

Estos resultados coinciden con lo reportado por García en 2017 (trabajo que es antecedente directo de este); en el cual, se observaron bandas de lisis intensas de una masa molecular de ~60 kDa y ~80 kDa contra todas las cepas que analizaron, además observó bandas de lisis contra *L. monocytogenes* de menor masa molecular ~10 kDa.

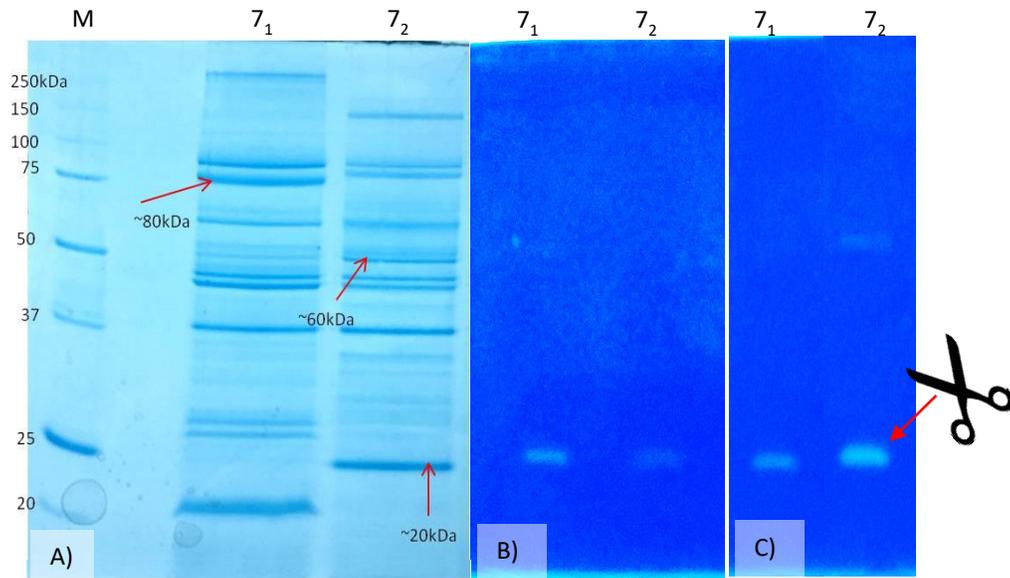


Figura 23 A) Electroforesis SDS-PAGE 14% y zimogramas vs B) *L. monocytogenes* y C) *S. aureus*, utilizando las muestras precipitadas con TCA al 15 %

Para conocer la identidad de las bandas de proteína con actividad antibacteriana, se hizo un gel especial de acrilamida al 14 % en donde se hicieron carriles más grandes, uniendo dos pocillos, esto con la finalidad de poner más proteína por carril y ver bandas mejor definidas, posteriormente se compararon con zimogramas corridos bajo las mismas condiciones que la electroforesis. Se cortaron las bandas de proteína que correspondían a las bandas de lisis, señaladas con una flecha roja (Figuras 22 y 23) y se mandaron a secuenciar en la unidad de proteómica del IBT (Instituto de Biotecnología) mediante la técnica LC/MS (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas), que permite identificar proteínas a partir del espectro de masas de su huella peptídica.

En la Tabla 8, se resumen los resultados de la actividad lítica en zimogramas y la actividad inhibitoria y bacteriostática observada en las pruebas de difusión en agar, demostrando que las proteínas precipitadas a partir del extracto crudo extracelular, producido por *L. fermentum*, pueden lisar tanto bacterias Gram positivas como negativas.

Tabla 8. Resumen de la actividad bactericida en zimogramas y difusión en agar.

Gram	Inhibición	Cepa 7₁	Cepa 7₂
-	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	I/Z (~80 kDa y 60 kDa)	I/Z (~80 kDa y 60 kDa)
-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	I/Z (~80 kDa y 60 kDa)	I/Z (~80 kDa y 60 kDa)
-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B/DA	I/Z (~80 kDa y 60 kDa) B/DA
+	<i>Staphylococcus aureus</i>	I/DA (0.81cm) I/Z (~20 kDa)	I/Z (~20 kDa)
+	<i>Listeria monocytogenes</i>	I/Z (~20 kDa)	I/DA (0.16 cm) I/Z (~20 kDa)

I/Z inhibición/zimograma, I/DA inhibición/ difusión en agar, B/DA bacteriostasis/difusión en agar

La actividad de las cepas mostrada contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* tanto en zimogramas como en la prueba de difusión en agar es de gran interés, ya que estos microorganismos son patógenos muy importantes en alimentos, principalmente en aquellos con alto contenido proteínico como el queso. *S. aureus* se caracteriza por producir una poderosa enterotoxina, que al ingerirse ocasiona intoxicaciones severas para el consumidor (Murray, 2014). *L. monocytogenes* también es de gran importancia pues este microorganismo es uno de los principales causantes de ETAS causadas por la ingesta de alimentos elaborados con leche cruda. Para quesos artesanales como el de Ocosingo, la manipulación y la obtención de la materia prima pueden ser puntos de contaminación del queso.

8.5 Secuenciación de proteínas

La secuenciación de proteínas se llevó a cabo a partir de las bandas que mostraron actividad lítica en geles de SDS-PAGE, estas bandas fueron cortadas del gel y fueron procesadas en la Unidad de Proteómica del IBT-UNAM. Los péptidos generados de la digestión con tripsina de las tres bandas fueron comparados mediante el algoritmo BLASTp (protein-protein BLAST) del NCBI. Una vez realizado el BLASTp se tomaron en cuenta las secuencias con el porcentaje de identidad más alto. Posteriormente se hizo un alineamiento múltiple de los péptidos encontrados mediante secuenciación contra las secuencias encontradas en el BLASTp con el programa CLUSTAL W. Mediante la base de datos Pfam se analizaron las secuencias con alto porcentaje de identidad para identificar dominios o motivos reportados dentro de las secuencias.

Para este estudio fueron secuenciadas tres bandas con diferentes masas moleculares; ~20 kDa, ~60 kDa y ~80 kDa.

Para la **proteína de ~20 kDa** se encontraron los siguientes péptidos:

1. FANNNSLVDSLAK
2. NNNIQNLIYVGQQLLIK
3. ESGGSYTAQNGNYYGK
4. AYLGGDYSAANQER
5. VANKYVASR
6. YGSWSAAK
7. SFWLANGWY

En la Tabla 9 se observan los resultados obtenidos a partir del BLASTp realizado con los péptidos anteriores.

Tabla 9. Resultados del BLASTp para la banda de ~20 kDa

Descripción prot. ~20 kDa	Cobertura	e-value	Identidad	Microorganismo	Número de acceso NCBI	Masa molecular kDa
Proteína con dominio lysM	41.14 %	2×10^{-29}	90.32 %	<i>L. fermentum</i>	CDN25954.1 SPE16399.1 WP_080637833.1 WP_021350141.1 WP_003682671.1	22.33-24.09
Proteína con dominio lysM de unión a peptidoglicano	42.15 %	2×10^{-29}	90.32 %		AGL88336.1 WP_100184171.1	

Los péptidos analizados coincidieron con proteínas reportadas en el genoma de *L. fermentum*, con un porcentaje de identidad de más del 85 % y una cobertura de más de 40 %, además coinciden con el tamaño de la banda secuenciada ~20 kDa. Como se observa en la Tabla 9, se encontraron proteínas reportadas con diferentes nombres: proteína con dominio lysM y proteína con dominio lysM de unión a peptidoglicano; pero al ser analizadas, se observó que las secuencias son muy similares y solo difieren en algunos residuos, estas diferencias pueden observarse en la Figura 24 marcadas por un recuadro morado. También se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias encontradas mediante el BLASTp contra los péptidos encontrados por secuenciación.

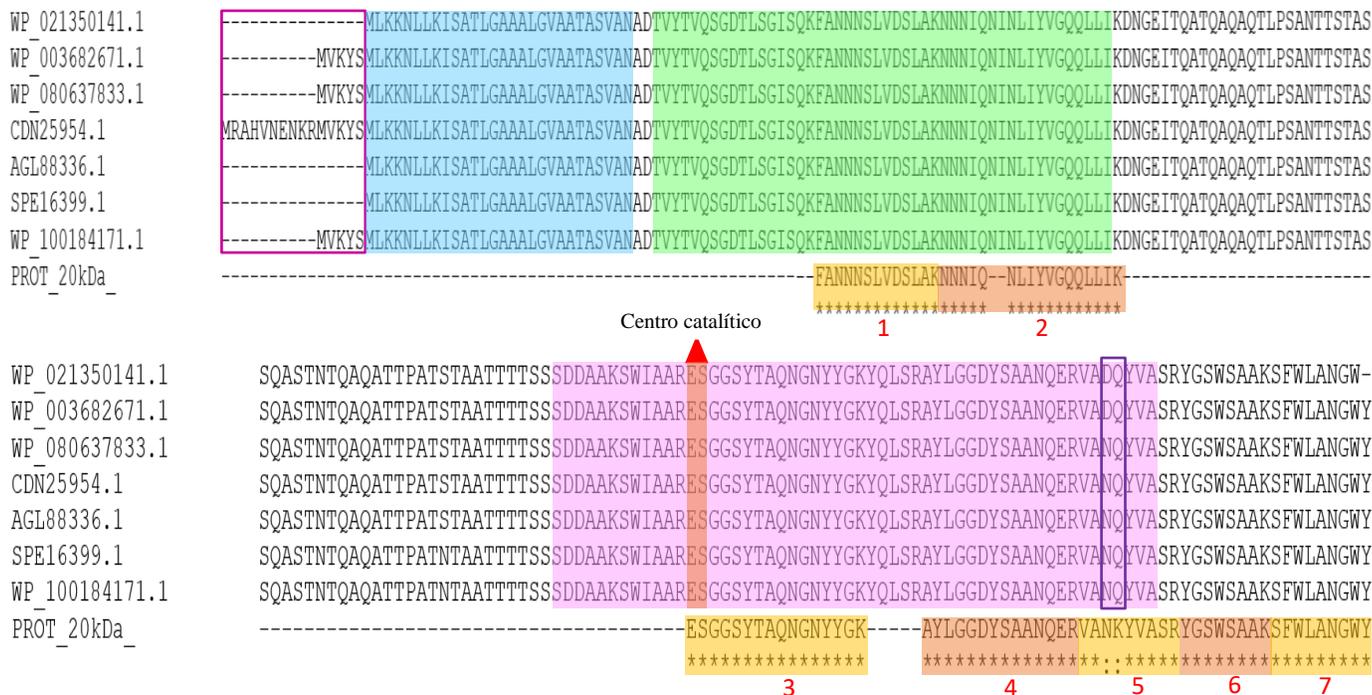


Figura 24. Alineamiento múltiple de los péptidos obtenidos de la secuenciación de la proteína de ~20 kDa por LC-MS (marcados en Amarillo y rojo, los números indican la cantidad de péptidos analizados) contra las secuencias generadas a partir del BLAST. (*) Residuo altamente conservado, (:) Sustituciones conservadas, el alineamiento fue realizado con la herramienta Clustal W. En color azul se encuentra marcado el péptido señal, en color verde el dominio LysM, en color rosa el dominio parecido a lisozima y en color rojo se muestra el posible centro catalítico reportado reportado para estas secuencias en el NCBI. En los recuadros morados, las principales diferencias entre las secuencias analizadas.

Estas secuencias se buscaron en las bases de datos de Pfam y Uniprot, en todas coincidieron dos regiones; marcado en color azul se encuentra una secuencia reportada como un péptido señal de 28 residuos, en color verde un dominio LysM de unión a peptidoglicano de 48 residuos y en rosa un dominio parecido a lisozima de 53 residuos.

Como se observa en la Figura 24, los péptidos encontrados por secuenciación son idénticos a los reportados en las secuencias, a excepción de dos residuos, una Asn (N) y una Lys (K) observados en uno de los péptidos secuenciados, aunque son sustituciones conservadas, ya que poseen similitud hidrofílica. Tomando en cuenta como referencia la coincidencia de los péptidos obtenidos contra las secuencias, se puede decir que la banda de ~20 kDa posiblemente pertenece a la superfamilia de dominios de tipo lisozima. Esta superfamilia contiene varios miembros, que incluyen transglucosilasas líticas solubles (SLT), lisozimas de clara de huevo de ganso (GEWL),

lisozimas de clara de huevo de gallina (HEWL), quitinasas, lisozimas de bacteriófago lambda, endolisinas, autolisinas, quitosanasas. Todas estas enzimas cortan enlaces glicosídicos β - 1,4 entre los residuos de MurNAc y GlcNAc; en contraste con la lisozima, estas enzimas no hidrolizan el sustrato usando una molécula de agua, en vez de eso, la reacción resulta en la formación de un enlace anhidro 1,6 en el residuo MurNAc. El ácido glutámico (E) es un aminoácido catalítico invariable en esta familia, este residuo es generalmente seguido por una serina conservada (S), ambos suelen encontrarse más comúnmente en transglicosilasas líticas (Pei y Grishin, 2005²).

Las lisozimas bacterianas ayudan a mantener la estructura de la pared celular durante el crecimiento y la división celular y juegan un papel importante en algunos sistemas de transporte macromolecular (Jimin y Grishin, 2005¹). Esto corresponde con los halos de inhibición observados en difusión en agar en las Figuras 18a y 18b y en las bandas observadas en zimogramas en la Figura 23, en donde se observó actividad por parte de esta enzima contra *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, posiblemente la lisis tenga que ver con el tipo de pared celular que presentan, que es Gram positivo. Es posible que esta proteína sea utilizada por *L. fermentum* para realizar procesos fisiológicos como, por ejemplo, el reciclaje del peptidoglicano durante la elongación o división celular.

Para la **proteína de ~60 kDa** los péptidos obtenidos mediante secuenciación fueron los siguientes:

1. YMSLKKNLLK
2. FANNNSLVDSLAK
3. YSNLLGDTSYTDVAQK
4. TYDLTQLDSIAIANTPVITNK
5. LSQDGYATDPYYSSSLISLVK

En la Tabla 10 se observan los resultados obtenidos a partir del BLASTp realizado con los péptidos anteriores.

Tabla 10. Resultados del BLASTp para la banda de ~60 kDa

Descripción prot. ~60 kDa	Cobertura	e-value	Identidad	Microorganismo	Número de acceso NCBI	Masa molecular kDa
Proteína con dominio lysM de unión a peptidoglicano	11.79 %	1×10^{-10}	61.67 %	<i>L. fermentum</i>	WP_107759348.1 WP_087061748.1 WP_057194147.1 WP_015639625.1 WP_114807160.1	75.35-79.09
Manosil-glicoproteína endo- β - N-acetilglucosaminidasa	11.45 %	5×10^{-11}	53.87 %		KPH03121.1 ESS02286.1 AOR74326.1 EQC59736.1	

Los péptidos analizados coincidieron con proteínas pertenecientes a *L. fermentum* con un porcentaje de identidad de más del 50 % y una cobertura de más del 10 %. Sin embargo, el tamaño de las proteínas no coincidió con el tamaño observado, de ~60 kDa.

En la Tabla 10, se encuentran las proteínas reportadas con diferentes nombres: proteína con dominio lysM de unión a peptidoglicano y Manosil-glicoproteína endo- β - N-acetilglucosaminidasa; pero al ser analizadas, se observó que las secuencias son muy similares y sólo difieren en algunos residuos, estas diferencias pueden observarse en la Figura 25 marcadas por un recuadro morado. También se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias encontradas mediante el BLASTp contra los péptidos encontrados por secuenciación.

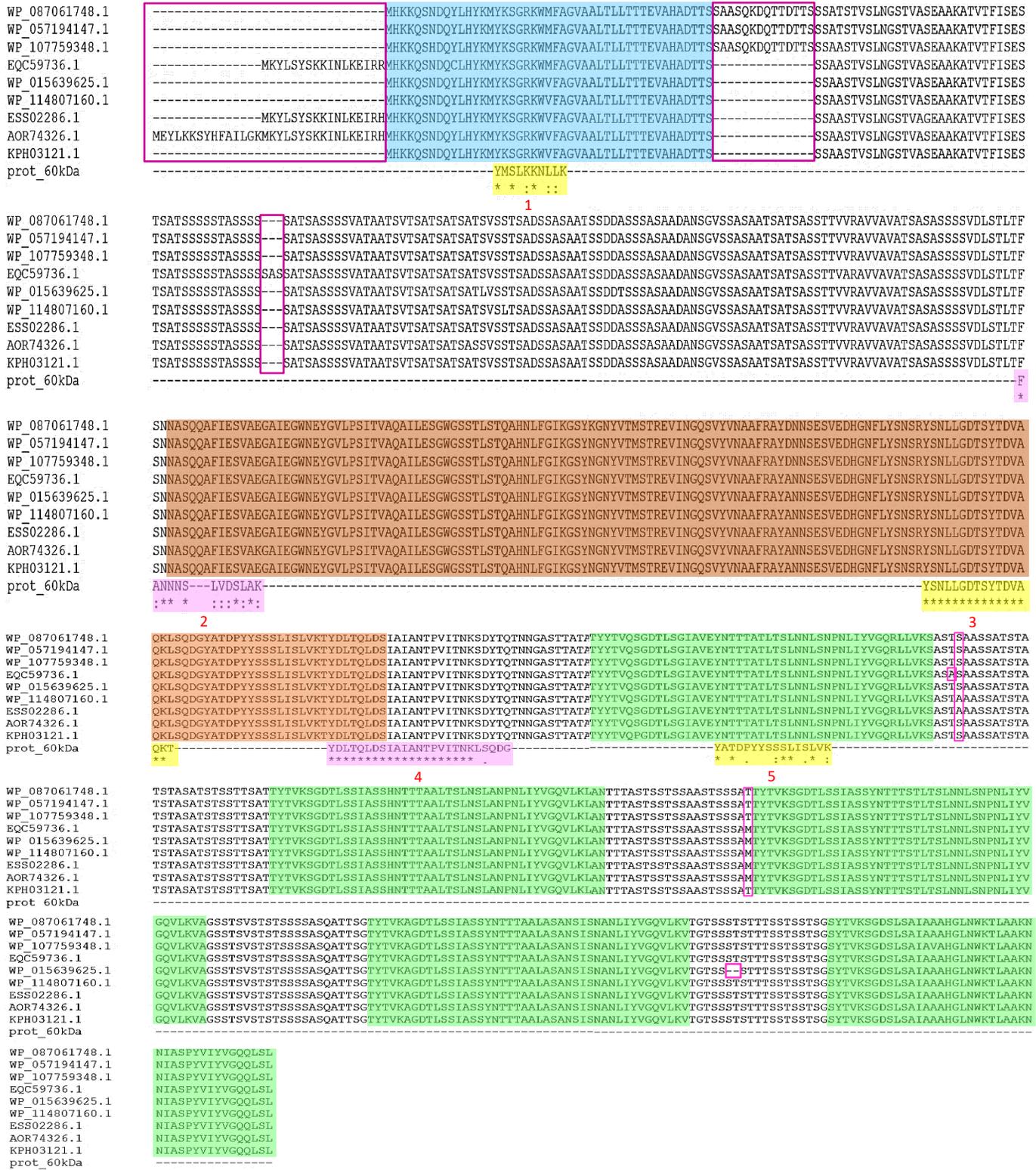


Figura 25. Alineamiento múltiple de los péptidos obtenidos de la secuenciación de la proteína de ~60 kDa por LC-MS (marcados en amarillo y rosa, los números indican la cantidad de péptidos analizados) contra las secuencias generadas a partir del BLASTp. (*) Residuo altamente conservado, (:) Sustituciones conservadas, (.) sustituciones semi conservadas. El alineamiento fue realizado con la herramienta Clustal w. En el recuadro azul se encuentra marcado el péptido señal, en anaranjado el dominio glucosaminidas y en verde los dominios LysM reportados para estas secuencias en las bases de datos Pfam y Uniprot. En los recuadros morados, las principales diferencias entre las secuencias analizadas.

A pesar de que el tamaño de las secuencias encontradas no coincidió con lo observado en la electroforesis, al analizar las secuencias y compararlas con lo obtenido en el BLASTp de los péptidos de la proteína de ~80 kDa se vio que las secuencias coinciden; por lo que se piensa que la proteína de ~60 kDa es la misma que la de ~80 kDa aunque de alguna manera sufrió hidrólisis, lo que hizo que tuviera una menor masa molecular aunque sin perder la actividad. Esto podría deberse a que posiblemente se perdieron algunos motivos LysM, pero se ha visto que, aunque algunos de estos dominios sean removidos, no se pierde la actividad. Un ejemplo de esto es un estudio realizado por Eckert *et al.*, (2006) con la N- acetilglucosaminidasa AcmA de *L. lactis* que tiene 4 motivos LysM, en donde se observó que cuando la PGH tenía uno, dos o cuatro motivos de lisina, la actividad lítica se reducía, pero la actividad óptima apareció cuando la proteína sólo contenía 3 motivos LysM, y al removerlos todos, la actividad hidrolítica desaparecía por completo.

Para la **proteína de ~80kDa** los péptidos encontrados por secuenciación fueron:

1. QSNDQYLHYKMYK
2. FANNNSLVDSLAK
3. EVINGQSVYVNAAFR
4. AYANNSESVEDHGNFLYSNSR
5. YSNLLGDTSYTDVAQK
6. LSQDGYATDPYYSSSLISLVK
7. TYDLTQLDSIAIANTPVITNK
8. VAGSSTSVSTSTSSSSASQATTSGT
9. VTGTSSSTSTTSSTSTSGSYTVK
10. SGDSLSAIAAAHGLNWK
11. TMSTRNNIASPYVIYVGQQLSL

En la Tabla 11 se observan los resultados obtenidos a partir del BLASTp realizado con los péptidos anteriores.

Tabla 11. Resultados del BLASTp para la banda de ~80 kDa

Descripción prot. ~80 kDa	Cobertura	e-value	Identidad	Microorganismo	Número de acceso NCBI	Masa molecular kDa
Proteína con dominio lysM de unión a peptidoglicano	31.58 %	1×10^{-10}	54.55 %	<i>L. fermentum</i>	WP_075667346.1 WP_046948926.1 WP_070955876.1 WP_118033641.1	75.35-79.09
Manosil-glicoproteína endo- β - N- acetilglucosaminidasa	30.69 %	5×10^{-11}	53.78 %		AOR74326.1 EQC59736.1 ESS02286.1 PWM28940.1	

Los péptidos analizados coincidieron con proteínas reportadas en el genoma de *L. fermentum* con un porcentaje de identidad de más del 50 % y una cobertura de más de 30 %. El tamaño de las secuencias coincidió con el tamaño esperado de la banda, que era de ~80 kDa.

En la Tabla 11, se encuentran las proteínas reportadas con diferentes nombres: proteína con dominio lysM de unión a peptidoglicano y Manosil-glicoproteína endo- β - N- acetilglucosaminidasa, pero al ser analizadas, se observó que las secuencias son muy similares y solo difieren en algunos residuos, estas diferencias pueden observarse en la Figura 26 marcadas por un recuadro morado. También se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias encontradas mediante el BLASTp contra los péptidos encontrados por secuenciación.

A diferencia de la proteína de ~60 kDa, los péptidos obtenidos de la secuenciación fueron más, dando una mejor cobertura hasta el final de la proteína, lo que permite corroborar que esta proteína tiene 5 dominios LysM, que se unen de manera no covalente a la pared celular y le proveen a la proteína el posicionamiento adecuado del sitio activo hacia su sustrato específico; estos dominios, se encuentran marcados en verde en la Figura 25 y 26. En la Figura 26 se puede observar en azul un péptido señal, que coincide con uno de los péptidos secuenciados. Los péptidos señal se encuentran en proteínas que serán destinadas a ser secretadas al espacio extracelular, al periplasma, etc. La secuencia señal se elimina generalmente en la proteína madura, aunque hay algunos casos muy aislados en los que el péptido señal no es removido (UniProt, 2019). Este puede ser uno de esos casos, aunque es difícil corroborarlo puesto que no hay ningún reporte sobre PGHs en *L. fermentum*; este péptido señal fue encontrado mediante un programa de predicción de péptidos señal con la herramienta SignalP.

En color anaranjado se puede observar el dominio glucosaminidasa reportado en Pfam y Uniprot para estas secuencias, que coincide con varios de los péptidos encontrados por secuenciación. Este dominio se caracteriza por hidrolizar los enlaces glucosídicos β -1,4 entre el residuo N-acetil- β -D-glucosamina, dejando un extremo GlcNAc reductor. Se podría pensar que deberían ser efectivas contra bacterias Gram positivas, debido a que la pared celular se encuentra expuesta, pero llama la atención que en los zimogramas realizados contra microorganismos Gram positivos (*S. aureus* y *L. monocytogenes*) sólo se observa una banda de lisis tenue con una masa molecular de aproximadamente 60 kDa (Figura 23c) que pudiera corresponder a la N- acetil glucosaminidasa antes descrita. Steen *et al.*, en 2003 observaron que los dominios LysM de la autolisina AcmA de *Lactococcus lactis* son capaces de reconocer a cualquier tipo de peptidoglicano; sin embargo, la presencia de ácidos teicoicos o lipoteicoicos pueden entorpecer su adhesión a la pared celular ya que al removerlos la proteína puede adherirse a un componente que es igual en todos los casos, la N- acetilglucosamina y el ácido N- acetil murámico. Esto podría explicar por qué no se observan bandas de inhibición correspondientes a la glucosaminidasa (~60 y ~80 kDa) en zimogramas. Los ácidos lipoteicoicos sólo pueden ser removidos con un tratamiento prolongado con ácido tricloroacético o con una solución de hidróxido de sodio (Rodríguez y Rodríguez, 1987), por lo tanto, el tratamiento realizado a las células para elaborar los geles de zimografía puede no ser suficiente para la eliminación de estos polímeros, impidiendo la unión de los dominios LysM con el peptidoglicano. Por otra parte, la actividad observada en difusión en agar contra *L.*

monocytogenes y *S. aureus* podría deberse a la acción de la proteína parecida a lisozima de 20 kDa producida por *L. fermentum*, aunque ambas proteínas lisan el enlace glucosídico entre el ácido N-acetil murámico y la N-acetil glucosaminidasa, es posible que la proteína de menor masa sea capaz de alcanzar más fácilmente su sustrato debido a su tamaño.

Por otro lado, se observó actividad en zimogramas contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Y. enterocolítica* que son Gram negativas y además son patógenos muy importantes en la industria alimenticia ya que son de los principales microorganismos implicados en las enfermedades de transmisión por alimentos (ETAs). Una característica importante en bacterias Gram negativas es que la red de peptidoglicano se encuentra protegida por una membrana externa, lo que dificulta la unión de enzimas como las PGHs, ya que los dominios de unión a péptido glicano o dominios LysM se unen de manera no covalente a éste. Se hipotetiza que la razón por la que no se observaron halos de inhibición en la prueba de difusión en agar pero sí se observaron bandas de lisis en zimografía contra éstas, tiene que ver con el proceso de elaboración de zimogramas, pues las células embebidas en el gel de poliacrilamida son previamente inactivadas por temperatura, lo que probablemente dejaría más accesible al peptidoglicano, permitiendo la unión de la enzima a su sustrato. Hay otra banda que se observó con una masa de 70 kDa (Figura 21B), que podría ser la misma glucosaminidasa hidrolizada, que tuvo actividad contra *P. aeruginosa* que también es Gram negativa, esto es de interés ya que dicha bacteria está relacionada con la descomposición de los alimentos y se caracteriza por sintetizar una cápsula, conocida como exopolisacárido mucoide, la cual protege al microorganismo de la fagocitosis y de la actividad de algunos antibióticos (Murray *et al.*, 2014).

En la literatura han sido reportadas diferentes enzimas o péptidos antimicrobianos producidos por *L. fermentum*, pero en la mayoría se relaciona con bacteriocinas. Se han caracterizado diversas PGHs en *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, entre otros (Layec *et al.*, 2008), pero no hay reportes específicamente sobre *L. fermentum*.

Este trabajo es importante puesto que da luz sobre el papel que desempeña *L. fermentum* en la inocuidad del queso bola de Ocosingo.

9. Conclusiones

- La actividad antibacteriana extracelular producida por *L. fermentum* aislado del queso bola es de carácter proteínico
- La actividad antimicrobiana producida durante la fase logarítmica tardía por *L. fermentum* presenta bandas de lisis con una masa molecular de ~60 y ~80 kDa, estas bandas fueron identificadas como PGHs con actividad β - N- acetilglucosaminidasa y mostraron actividad contra, *S. enterica* serovar Typhimurium, *P. aeuruginosa* y *Y. enterocolitica*.
- Se observaron bandas de actividad lítica en zimogramas con masa molecular de aproximadamente 20 kDa, esta proteína fue identificada como una proteína con dominio parecido a lisozima. Estas bandas encontradas en zimogramas, coinciden con los halos de inhibición observados en la prueba de difusión en agar contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*.
- *L. fermentum* puede contribuir a la inocuidad del queso de Ocosingo gracias a los péptidos antimicrobianos que produce y a su capacidad para acidificar el medio en el que se desarrolla. Aunque dicha actividad, también depende la concentración inicial de los microorganismos, tanto *L. fermentum* como los posibles patógenos en el queso.

10. Bibliografía

- Aymerich MT, Garriga M, Ylla J, Vallier J, Monfort JM, Hugas M (2000) Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection*. 63: 721-726
- Bergey. W.W. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2ª Ed. 3 vol. Ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, U.S.A.
- Beristain, B. S., Palou, E. y López, M. A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 6: 64-78.
- Bertrand, C. (2003). Evolution of lactoglobulin and lactalbumin content during yogurt fermentation. *International Dairy Journal*. 13: 39-45.
- Bizani, D., Motta, A., Morrissy, A., Terra, R., Souto, A. y Brandelli, A. (2005). Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin like peptide produced by *Bacillus cereus*, *International Microbiology*. 8: 125-131.
- Buist, G., Kok, J., Leenhouts, K.J., Dabrowska, M., Venema, G., and Haandrikman, A. J. (1995). Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *Journal of Bacteriology*. 177: 1554–1563
- Buist, G., Steen, A., Kok, J., y Kuipers, O. P. (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Molecular Microbiology*. 68(4): 838–847.
- Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C.W. y Lavigne, R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion Biotechnology*. 22: 164–171.
- Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4): 281-370.
- Cervantes, G.E., García, G.R. y Salazar, S.P. (2014). Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 61: 28-40.
- Chapot- Chartier, M. P. y Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 13: S9.

- Cintas, L. M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I. F. y Hernández, P. E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*. 74, 281-305.
- Cotter, P. D., Hill, C. y Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 10: 777-788.
- Dellaglio, F., Torriani, S. y Felis, G. E. (2004). Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa *et al.*, (1953) as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 809–812.
- Duong-Ly, C. K. y Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Laboratory Methods in Enzymology. Protein part C*. 85-94.
- Eckert, C., Lecerf, M., Dubost, L., Arthur, M. y Mesnage, S. (2006). Functional analysis of AtlA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*. 188: 8513-8513.
- Elsser-Gravesen, D. y Elsser-Gravesen, A. (2014). Biopreservatives. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*. 143: 29-49.
- Ennahar, T., Sashihara, K. y Sonomoto, A. I. (1999). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology*. 24: 85-106.
- Erginkaya, Z., Kalkan, S., Ünal, E. (2014). *Microbial Metabolites as Biological Control Agents in Food Processing: Strategies for Quality Assessment*. New York. pp. 225-260.
- Escobar, R. M., Pérez, E. D., Mejía, R. F., Ávila, V. D. A., Arvizo, M. V. y Nava, G. J. (2012). Microbiological profile of two artisanal mexican cheese during manufacturing process. *Journal of Food Protection*. 75: 136.
- Farber, J. M. y Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*. 55: 476– 511.
- Ferrand, A. J., Haley, K. P., Lareau, N. M., Heilbronner, S., McLean, J. A., Foster, T., Skaar, E. P. (2015). An iron- regulated autolysin remodels the cell wall to facilitate heme acquisition in *Staphylococcus lugdunensis*. *Infection and immunity*. 83: 3578-3589.
- Galet, M. V., Talbert, N.J., Hernández, M. P., Gavara, R. y Goddard, M. J. (2013). Covalent immobilization of lysozyme on ethylene vinyl alcohol films for nonmigrating antimicrobial packaging applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 27: 6720-6727.

- Gallou, A., Suaste, D. A., Serna, D.M., Andrade, M.G. (2015). Manual de prácticas del laboratorio de biología molecular. Unidad de promoción y vinculación -SENASICA.
- García, T. J. I. (2017). Evaluación de la capacidad antagonista de *Lactobacillus* sp. aislados de queso de Ocosingo contra patógenos de interés en alimentos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.
- Götz, F., Heilmann, C. y Stehle, T. (2014). Functional and structural analysis of the major amidase (Atl) in *Staphylococcus*. International Journal of Medical Microbiology. 304: 156-163.
- Gould, G. (1991). Antimicrobial compounds in biotechnology and food ingredients. Goldberg, I. R. y R. Williams. Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 464-467.
- Heng, N.C.K y Tagg, J.R. (2006). Class distinction for bacteriocins. Nature Reviews Microbiology. 4: 1-2.
- Kannahi, M. y Viji, N. (2014). Isolation and characterization of bacteriocin producing Lactobacilli from dairy butter sample. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 29: 183-186.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 12: 39-86.
- Kumar, J. K. (2008). Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. Applied Microbiology and Biotechnology. 80: 555–561.
- Koontz, L. (2014). TCA precipitation. Laboratory Methods in Enzymology. Protein part C. 3-10.
- Layec, S., Decaris, B. y Leblond-Bourget, N. (2008). Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. Research in Microbiology. 159: 507-515.
- Lindmark, M. H. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. Food and Nutrition Research. 52
- López, R., García, E. y Ronda, C. (1981) Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*. Reviews of Infection Diseases. 3: 212–223

- López, R., Hernández, M. A., Villegas, A. y Santosmoreno, A. (2015). Caracterización socio técnica del Queso Bola de Ocosingo, Chiapas. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*. 2:345-353
- Lortal, S. y Chapot-Chartier, M.P. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*. 15: 857-871.
- Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. Ph. D. Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences. Upsala, Suecia. pp. 3-10.
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E.A. y Pessione, E. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*, 32: 1216-1236.
- McAuliffe, O., Ross, R., Hill, C. (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*; 25(3):285-308.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. G., Kobayashi, S. M., Pfaller, A. (2014). *Microbiología médica*. 7ª ed. Ed. Elsevier. Madrid, España.
- Navarro, G.M.J. (2012). Propiedades de enzimas lipolíticas bacterianas y aplicaciones. *Anales de veterinaria de Murcia*. 28: 45-65.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. y Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 70:113-128.
- Nouaille, S., Ribeiro, L.A., Miyoshi, A., Pontes, D., Le Loir, Y., Costa, S., Langella, P. y Azevedo, V. (2003). Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research*. 2:102-111.
- Olson, D. y Aryana, K. (2008). An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *Food Science and Technology*. 41: 911-918.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2015). Peligros biológicos. Inocuidad de alimentos- control sanitario. Fecha de consulta, Octubre 2017. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838%3A2015-peligros-biologicos&catid=7678%3Ahaccp&Itemid=41432&lang=es

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos. Fecha de consulta, agosto 2017. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/>
- Ouwehand, C. y Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Salminen, S. A. y Ouwehand eds. Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. 3^a Ed. New York. Marcel Dekker. Cap 11.
- Parra, H.R. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Facultad de ciencias agropecuarias. 8: 93-105.
- Pei, J. y Grishin, N. V. (2005)¹. COG3926 and COG5526: a tale of two new lysozyme- like protein families. Protein Science. 14: 2574- 2581.
- Pei, J. y Grishin, N. V. (2005)². The Ps protein from bacteriophage phi- 6 is a distant homolog of lytic transglycosylases. Protein Science. 14: 1370-1374.
- Phirawat, W., Supatcharin, P. y Rawee, T. (2016). Purification, Characterization and optimum conditions of Fermencin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum* SD11. Applied Biochemistry and Biotechnology. 179: 572–582.
- Ponting, C.P., Aravind, L., Schultz, J., Bork, P., and Koonin, E.V. (1999) Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. Journal of Molecular Biology. 289: 729–745.
- Ramírez, R. J., Ulloa, R. P., Gonzáles, V. M., Ulloa, A. J. y Romero, A. F. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente, año 2, No. 7.
- Rodríguez, A. J. y Rodríguez, Y. E. (1987). Bioquímica microbiana. 2^a Ed. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de ciencias biológicas.
- Rogosa, M., R. F. Wiseman, J. A. Mitchell, M. N. Disraely y A. J. Beaman. (1953). Species differentiation of oral lactobacilli from man including description of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *Lactobacillus cellobiosus* nov. spec. Journal of Bacteriology. 65: 681–699.
- Sagdic, O., Tornuk, F., Öztürk, I., Karasu, K., Yilmaz, M. (2014). Biological Preservation of Foods. En: Ravishankar, R. V. y Jamuna, A. B. eds. Microbial Food Safety and Preservation Techniques. New York: CRC Press. Pp. 453-476.

- Salminen, S., Von Wright, A. y Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3a edición. Marcel Dekker Inc. Nueva York, NY.
- Savijoki, K., Ingmer, H. y Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 394-406.
- Serrano, C. (2010). Caracterización de la actividad antibacteriana producida por cepas de BAL aisladas de un alimento artesanal mexicano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.
- Shockman, G.D. y Höltje, J.V. (1994) Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. *Bacterial Cell Wall (Ghuysen J-M & Hakenbeck R, eds)*, pp. 131–166. Elsevier, Amsterdam.
- Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K. J., Khattabi, M. E., Grijptra, F., Zomer, A. L., Venema, G., Kuipers, O. P. y Kok, J. (2003). Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 23874-23881.
- Tannok, W. G. (2005). Probiotics and prebiotics. *Scientific Aspects*. Caister Academic Press. Gran Bretaña. Pp. 53-54.
- Uribe, C. y Suarez, M.C. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Medica*. 37: 151-158.
- Vázquez, S. M., Suárez, H. y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias microbianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 36: 64-71.
- Venema, G; Huis, J. H. J. y Hugenholtz, J. (1996). Lactic Acid Bacteria: Genetics, metabolism and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 299-316.
- Villegas, G. A., Cervantes, E. F., Cesín, V. A., Espinoza, O. A, Hernández, M. A., Santos, M. A., Martínez, C.A. (2013). Los quesos mexicanos genuinos: patrimonio cultural que debe rescatarse. 2ª ed. Colegio de Postgraduados. México.
- Vollmer, W., Joris B, Charlier, P. y Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*. 32: 259-86.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173: 697-703.

- Yan, T. R. y Lee, C. S. (1997). Characterization of a partially purified bacteriocin, Fermentcin B, from *Lactobacillus fermentum*. *Biotechnology Letters*. 19:741-744.
- Young, R. (1992). Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiology Reviews*. 56: 430–481.

Referencias de internet

- http://depa.fquim.unam.mx/bioseguridad/agentes/bacterias/bac_yenter.html. Fecha de consulta 19-03-19
- UniProt (2019) <https://www.uniprot.org/help/signal>

ANEXO

A. Preparación de Buffer de muestra para Tris- Glicina 4x

Tris 0.5 M, pH 6.5	2.5 mL	0.125 M
SDS al 10 %	2.5 mL	2.5 %
*2- Mercaptoetanol	2.5 mL	25 %
Glicerol	2.5 mL	25 %
Azul de Bromofenol	1 mg	0.1 mg/mL
		Concentración Final

Llevar todo a un volumen de 9 mL, hacer alícuotas de 900 mL y cuando se vaya a usar añadir 100 mL de β - mercapto. Mantener a -20

B. Buffer de muestra Tris- tricina 4x

Tris HCl pH 6.8 1 M	1 mL
Glicerol	3 g ó 2.4 nL
SDS	0.8 g
Coomasie G 250	2 mg
Agua destilada	Completar \rightarrow 10 mL

Llevar todo a un volumen de 9 mL, hacer alícuotas de 900 mL y cuando se vaya a usar añadir 100 mL de β - mercapto. Mantener a -20

C. Buffer de electroforesis Tris- Glicina 10x

Stris base	3.038 g	0.25 M
Glicina	15.01 g	2 M
SDS	1 g	1 %
		Concentración Final

D. Solución de trabajo de Acrilamida / Bisacrilamida al 30 %

Acrilamida	29.2 g	29.2 %
Bisacrilamida	0.8 g	0.8 %
Mezcla Total	30 g	30 %
		Concentración Final

Disolver en 100 mL de agua desionizada y posteriormente filtrar con papel Whatman N° 1 y forrar el recipiente donde se almacenará con aluminio. Mantener a 4 °C

E. Buffer Tris 1.5 M, pH 8.8 (Separador)

- 181.65 g de tris base, enrasar con agua desionizada hasta un volumen de 1 L. Ajustar a pH 8.8 con HCl.

F. Buffer Tris 0.5 M, pH 6.8 (Concentrador)

- 60.55 g tris base, enrasar con agua desionizada hasta un volumen de 1 L. Ajustar a pH 6.8 con HCl.

G. Aps 10 % (Persulfato de Amonio)

- Pesar 100 mg y diluir en un volumen final de 1 mL con agua desionizada (Esta preparación debe ser de 1 semana de antigüedad máximo).

H. SDS al 10 %

- Disolver 10 g de SDS en 80 mL de agua desionizada, una vez devuelto se lleva al pH 7.2 con 10 N de NaOH, finalmente se completa hasta 100 mL de agua desionizada. Calentar a 68 °C para disolver completamente el SDS.

I. Solución teñidora

Solución A

Azul de metileno	0.3 g
Agua destilada	30.0 mL

Solución B

Hidróxido de potasio (KOH)	0.1 g
Agua destilada	100 mL

Mezclar las dos soluciones.

J. Secuencias consenso de las cepas de *L. fermentum*.

Cepa 7₁

GGCCAATTGATAACTGAAGTGGTGCATCGGAACTGGATAACTTGATTGCACCTGA
TTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCC
AGAAGCGGGGGCGACAACATGGTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTT
GTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTG
CGGTGCACGATGTTAGCTAGGTGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGATGATA
ACGCATAAAGCACCCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAAGGTTGAAACTCAATG
GGACTGAGACACGGGCCATACTCCTACGGCAGGGCCTGTAGTTAATACGGAATCT
TCCACAATGTACCTTACCAGTGCAAGCCTGATGGAACAACCTCCGAGAGAACGAACC
TCTCCTCCGTGAACGCAATGACAGGTGGTGTAGATCAATATATGAACGTGTTCGTGA
GAGCTCTTTTTACACACCTCTTCATAACAACCCAGACTTTCGGGCGCATCTCTAGTTAC
TAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTACTATATCTAGCTCAGATATATCTCAGGA
TGGGGGGGGAGTCACCCAACCATCTATCCCCTTTTATTTCCAAACAACAATATTATT
TTGCACCACCCTCATCTCGTACTCCTGACATCATCGCT

Cepa 7₂

CACGTAGGTACAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGGGGACAACATTTGGAAACAACG
GATGCTTTAATAACCGGCCATAACAACGTTGTTTTTCGCATGAACAACGCTTTTAAAA
GAGATGGCTTCTTCTCGCTATCACTTCTTGGGGATCAGGACCTGCGGTGCCAATTAG
CTTTGTGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCCCAAAGGCGATGATGCAATAGCCGAGTTG
AGAAGAGACTGATCGGCCACGGAATGGGACTGGGAGACACGGCCCATTACTCCTTT
ACGGGAGGCAAGCAGTAGGGGAAATCTTCCACCAAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG
GCAACACCGGCGTGAGTGAAGAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAA
GAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGG
ATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTC
GGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAG
TGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCG
AAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAAC
AGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGG
GTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTTTAAACTCAAAGGGATTGGACGGGGGGCCCGCACCAGCCGGTGGA
GCATGTGGTTTTAATTCCAAGCTAACGCGAAAAAACCTTAACCAGGGTCTTGACATT
CTT

Cepa 9

CGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCG
CATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTC
TGGATGGACCTTTGGCGGAGCGTTAGAATTTCCGGCTTGGCCGAAGAAACGGCCCTTC
ACAAAGGGCCGAATGTTCTATAGGGCGGATTTGGACAGACTTAGGTTGCGTCCCCA
ACCGGGACCTTAGAACTCCGGTCCCATATTTCCCTCCGGGAGGCAAGCCGTTTAGCG
AATTTTTTCCCATATGGGCGGCAAGCCCTGAAGGAGCCAACCCCGGCGTGAGTGA
AGGAAGGGTTTTTCGCTTTGTAAAAGTTCTGTTGTTAAAGAAGAACCACGTATGAGAA
GTAAGTGTTCATACGTTGAACGGTATTTAACCAGAAAAGTCACGGGCTAATTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTA
AAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAG
AAGTGCATCGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCATGT
GTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCCGAAGGCGGCTAC
CTGGTCTGCAACTGACGCTGAAGACTCGAAAGCATGGGGTAGCGAACAGGAATTAA
ATACCCCTGGTAGTCCCATGCCCGTAAACGATGAATTGCTAAGGGGTTGGGAGGG
GTTTCCGCCCTTTTCAGTGGCCGGAAGCTTAACGCCATTTAAGCAACTCCCGCCTTG
GGGAATAACGAACCGGCAAAGGGTTGGAAAACCTCAAAGGGGAAATTGGAACG