



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencia de los Alimentos

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS
PRODUCIDOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE ALIMENTOS
ARTESANALES MEXICANOS.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencia de los Alimentos

Presenta:
Claudia Alvarado Osuna

Dirigido por:
Dr. Carlos Regalado González

SINODALES

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dra. Carmen Wachter Rodarte
Secretario

Dra. Eva María Santos López
Vocal

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Vocal

Dr. Miguel Ángel Duarte Vilazquez
Vocal

Dr. Monaci B. Aguilar Ramirez
Suplente

Dr. Eleazar M. Escamilla Silva
Suplente

Q.B. Miguel E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química

Firma

Mra. del Carmen Wachter

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Luis G. Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2007
México

RESUMEN

Las actuales tendencias en el consumo de alimentos con énfasis en la salud, han originado nuevas necesidades en el área de los alimentos y por tal motivo se realizan investigaciones encaminadas al desarrollo de alternativas de bioconservación. Algunas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de producir compuestos antimicrobianos, por lo que se han utilizado de manera empírica para la conservación de alimentos artesanales elaborados en México. El estudio de cepas BAL presentes en alimentos de origen artesanal, puede conducir a la explotación adecuada de su potencial antimicrobiano, así como a mejorar la conservación de dichos productos. El objetivo de éste trabajo fue identificar y cuantificar los compuestos antimicrobianos producidos por un grupo de cepas BAL aisladas de alimentos tradicionales mexicanos, para evaluar su potencial de utilización en la bioconservación de alimentos. Se trabajó con cuatro cepas BAL aisladas de alimentos tradicionales mexicanos: *Leuconostoc (Lc.) mesenteroides* CH210 (chorizo), *Lc. mesenteroides* PT8 (pulque), *Lactobacillus (Lb.) plantarum* CC10 (madre del vinagre) y *Enterococcus (E.) faecium* QPI1 (queso panela); dichas cepas mostraron tener actividad inhibitoria contra diversos patógenos de origen alimentario. Los extractos de *Le. mesenteroides* CH210 y PT8 redujeron las UFC/mL de *E. coli* enteropatogénica más de 5 log, *Lb. plantarum* CC10 mostró una notable capacidad para inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *V. cholerae*, mientras que *E. faecium* QPI1 tuvo significativa actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *L. monocytogenes*. En el caso de *Le. mesenteroides* CH210 y PT8, así como *Lb. plantarum* CC10, se demostró que la actividad antimicrobiana estuvo asociada a los ácidos acético y láctico producidos. Solamente *E. faecium* QPI1 mostró capacidad para producir bacteriocinas con un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra diversas cepas de *L. monocytogenes*. Utilizando el caldo de fermentación de *E. faecium* QPI1 y precipitándolo con sulfato de amonio (EPS), se obtuvieron 3 fracciones con actividad antimicrobiana. La estrategia de purificación incluyó un proceso de adsorción-desorción en células, extracción en fase sólida, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de fase reversa. La fracción IC45 mostró actividad antimicrobiana por si sola. Se obtuvieron otras dos fracciones, SP40 y FR75, las cuales mostraron un mecanismo de acción típico de bacteriocinas de la clase IIb, con actividad sinérgica que disminuyó notablemente cuando cada fracción se evaluó por separado. Los pesos moleculares de los péptidos activos calculados mediante movilidad electroforética oscilaron entre 2.0 a 3.0 kDa. Se encontró mediante técnicas moleculares que *E. faecium* QPI1 contiene los genes que codifican para las enterocinas A, L50A y L50B. Los ácidos orgánicos producidos por las cepas BAL aisladas de alimentos artesanales mexicanos *Le. mesenteroides* CH210, PT8 y *Lb. plantarum* CC10, tuvieron una importante capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos de origen alimentario. Las bacteriocinas producidas por *E. faecium* QPI1 mostraron actividad en diversos sistemas modelo, por lo cual representan una alternativa con gran potencial antimicrobiano para uso en alimentos. El efecto antimicrobiano se demostró tanto adicionando dicha cepa productora de bacteriocina como utilizando el extracto libre de células lo que diversifica su utilización en alimentos.

Palabras clave: Bacterias ácido-lácticas, bioconservadores, bacteriocinas, *Enterococcus faecium*.

ABSTRACT

The increasing tendencies of consumption of healthy foods are producing a lot of research in the field of food sciences with a focus on new biopreservation technologies. Some lactic acid bacteria (LAB) are capable of producing antimicrobial substances, so they are being used empirically in the artisanal food preservation done in México. The study of food-associated LAB in artisanal Mexican products could lead us to understand the antimicrobial potential and its appropriate use to enhance food safety. The aim of this study was to identify and quantify antimicrobial substances produced by indigenous LAB isolated from traditional Mexican foods, in order to use in food biopreservation. We worked with four LAB strains isolated from unlabeled artisan Mexican products: *Leuconostoc* (*Lc.*) *mesenteroides* CH210 (chorizo), *Lc. mesenteroides* PT8 (pulque), *Lactobacillus* (*Lb.*) *plantarum* CC10 (mother of vinegar) and *Enterococcus* (*E.*) *faecium* QPI1 (panela cheese). These strains showed inhibitory activity against pathogenic bacteria from food origin. The extract produced by *Le. mesenteroides* CH210 and PT8 reduced the UFC/mL of enteropathogenic *E. coli* more than 5 log and *Lb. plantarum* CC10 showed high capability to inhibit the growth of *S. aureus* and *V. cholerae*. *E. faecium* QPI1 had high antimicrobial activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes*. The antimicrobial activity of *Le. mesenteroides* CH210, *Le. mesenteroides* PT8 and *Lb. plantarum* CC10 was attributed to acetic and lactic acids produced. Only *E. faecium* QPI1 showed capability to produce bacteriocins with a wide spectrum of antimicrobial activity against *L. monocytogenes*. Using the fermentation broth produced by *E. faecium* QPI1 and after ammonium sulfate precipitation (EPS), three fractions with antimicrobial activity were obtained. The purification strategy included a step of adsorption-desorption in cells, solid phase extraction, cationic interchange chromatography, and reverse phase chromatography. The IC45 fraction showed antimicrobial activity by itself. Another two fractions SP40 and FR75, that showed the typical mechanism of action of bacteriocins class IIb, with synergistic activity that reduce when each fraction were tested separately. The molecular weight of active peptides calculated by electrophoretic mobility were ranged between 2.0 to 3.0 kDa. The molecular techniques allowed us to find the genes that codify the enterocins A, L50A and L50B into the genetic material of *E. faecium* QPI1 strains. The organic acids produced by LAB isolated from artisanal Mexican foods *Le. mesenteroides* CH210, PT8 and *Lb. plantarum* CC, showed an important inhibitory activity against pathogenic strains from food origin. The bacteriocins produced by *E. faecium* QPI1 showed wide antimicrobial activity in different model systems, representing an alternative with good potential in food preservation. Antimicrobial effect was shown both by using the producing LAB strains or using the free cells extract, diversifying the type of use in food products.

Key words: Lactic acid bacteria, biopreservatives, bacteriocins, *Enterococcus faecium*.

DEDICATORIAS

A DIOS que se manifiesta a pesar de nuestra soberbia y escepticismo.
Gracias, por que me permites ver tras la mesa del laboratorio el resplandor de tu luz.

A ISELA

Sumergida entre nubes y arcoiris
afanada se esmera la princesa noche y día,
sirenas busca para darme sus canciones
ángeles eternos y me da sus bendiciones.

A LUIS

Dulce chispa es tu sonrisa, alegría de disfrutar,
la vida pasa sin prisa, detiene el tiempo tu mirar,
tus sueños disimulan los tropiezos del camino,
tus brazos me cobijan, dan sentido a mi destino.

A MIS PADRES

Mira nuestro árbol creciendo
extiende sus ramas sin cesar
cada rama una familia
cada flor un respirar.

...quien utiliza el conocimiento para buscar riquezas o tener poder sobre sus enemigos, no será más un hijo de la Luz, sino una criatura de las Tinieblas. Pues solamente el agua pura refleja como espejo la luz del sol, más el agua saturada de inmundicia no puede nada reflejar.

Evangelio de los Esenios.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Regalado por permitirme trabajar en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos, DIPA, UAQ.

A mis sinodales por su invaluable consejo y tiempo.

Al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA por la beca 149062.

A la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO a través de la LICENCIATURA EN NUTRICIÓN F.C.N. por apoyarme con descarga horaria.

Al programa USA/AID-México por apoyarme con la estancia estudiantil en la Universidad de Illinois, Urbana-Champaign, USA. Particularmente a la Dra. Elvira de Mejía, a la Dra. Jeffery y al Dr. Scott E. Martin.

A mis cuates y compañeros, por su apoyo incondicional, porque de todos aprendí: Lorenzo, Chuy, Francoise, Omar, Sayn, Basy, Giovanna y Lolis.

Al personal administrativo del PROPAC porque siempre tuvieron una sonrisa para mi: Carmelita, Laurita, Chivis, Benja y Jose.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
DEDICATORIAS	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE	6
ÍNDICE DE CUADROS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
I. INTRODUCCIÓN	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA	13
III. OBJETIVOS	37
IV. METODOLOGÍA	38
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
VI. CONCLUSIONES	112
REFERENCIAS	113
APÉNDICE I	125
APENDICE II	128

Cuadro

ÍNDICE DE CUADROS

Página

2.1	Secuencias sentido y antisentido para los iniciadores de los genes estructurales de enterocinas reportadas.	27
5.1	Espectro de actividad inhibitoria completo de BAL aisladas de alimentos artesanales mexicanos mediante la técnica del botón.	53
5.2	Espectro de inhibición de cepas BAL agrupado por género bacteriano y origen del alimento.	55
5.3	Características bioquímicas de relevancia de las cepas BAL aisladas de alimentos mexicanos de origen animal.	58
5.4	Características bioquímicas de relevancia de las cepas BAL aisladas de alimentos mexicanos de origen vegetal.	59
5.5	Cuantificación de ácidos producidos mediante la fermentación de las cepas BAL seleccionadas durante 18 h, a 30° C, en MRS.	63
5.6	Efecto del ELC producido por BAL en el crecimiento de $6\log_{10}$ UFC/mL de las cepas <i>S. aureus</i> 8943 y <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC), incubadas 5h a 37° C.	65
5.7	Comparación de mM/L de ácidos no disociados para cada uno de los ELC producidos en función del pH y pKa.	68
5.8	Susceptibilidad a antibióticos en placa mediante empleo de sensidiscos de acuerdo a la NCCLS.	73
5.9	Rendimiento de extracción de enterocinas por el método de absorción-desorción con células.	78
5.10	Rendimiento de extracción de enterocinas por el método de precipitación con 80% de sulfato de amonio.	81
5.11	Rendimiento para la extracción en fase sólida de enterocinas utilizando cartuchos SepPak C18 de acuerdo al protocolo de extracción SP5.	84
5.12	Combinaciones posibles para la mezcla de fracciones obtenidas con cartuchos SepPack C18 mediante el protocolo SP7.	87
5.13	Rendimiento para la purificación de enterocinas mediante SepPak C18 estrategia 7 (SP7), evaluando actividad con mezcla de fracciones.	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Representación esquemática de la estructura de bacteriocinas clase IIa y la predicción de dominios.	20
2.2	Modelo propuesto de reconocimiento e interacción electrostática entre bacteriocinas clase IIa y membrana de la célula blanco.	20
2.3	Mecanismo de inserción propuesto para las bacteriocinas clase IIa, sobre la membrana de la célula blanco.	21
2.4	Esquema de inserción de la munditcina, a 45° C con respecto a la membrana celular.	21
2.5	Modelo propuesto para la formación de poros ocasionados por bacteriocinas IIb.	23
2.6	Secuencias de las bacteriocinas PlnE, PlnF, PlnJ y Punk (A) y su representación de barril helicoidal con las regiones que pueden formar α -hélices anfipáticas (B). Las cajas negras representan restos polares y las cajas blancas representan restos no polares.	25
2.7	Modelos propuestos para los complejos de poros formados por termofilina 13. En la parte superior estructuras secundarias de ThmA y ThmB. En la parte inferior modelos de los poros formados por ThmA (A) _n , y ThmA más ThmB (AB) _n .	25
5.1	Actividad antimicrobiana A) técnica del botón; B) difusión en agar utilizando extracto libre de células (ELC) de las BAL aisladas.	56
5.2	pH final en experimentos de fermentación clasificados por género y medio de cultivo.	58
5.3	Reducción de pH en experimentos de fermentación clasificados por género y medio de cultivo.	58
5.4	Efecto del ELC producido por cepas BAL sobre el crecimiento de 10 ⁶ UFC/mL de <i>E. coli</i> EPEC.	66
5.5	Efecto del ELC producido por cepas BAL sobre el crecimiento de 10 ⁶ UFC/mL de <i>S. aureus</i> 8943.	66

5.6	Efecto del extracto libre de células concentrado de QPI1 (ELCC) sobre 5 log ₁₀ UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> Scott A a dos diferentes pH.	70
5.7	Efecto del extracto libre de células concentrado de QPI1 (ELCC) sobre 7 log ₁₀ UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> Scott A, en leche descremada después de 16 h de incubación a 37° C.	71
5.8	Efecto del extracto libre de células concentrado de QPI1 (ELCC) sobre 7 log ₁₀ UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> 7644, en leche descremada después de 16 h de incubación a 37° C.	71
5.9	Curva de actividad antimicrobiana construida con el diámetro de inhibición originada por 5 mL del ELCC QPI1 y utilizando <i>L. monocytogenes</i> 7644 como microorganismo indicador.	75
5.10	SDS-PAGE de la semipurificación por el método de adsorción-desorción.	79
5.11	HPLC del ECel. El pico blanco solo presenta actividad en presencia de la fracción de SepPack Isop80%.	79
5.12	Cromatografía de filtración en gel mediante Sephadex G-25.	81
5.13	SDS-PAGE de la cromatografía de filtración en gel mediante Sephadex G-25.	81
5.14	Cromatograma de la extracción en fase sólida de enterocinas utilizando cartuchos SepPak C18 de acuerdo al protocolo de extracción SP5.	85
5.15	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del cartucho SepPak C18 utilizando el protocolo SP5.	85
5.16	Diferencias de intensidad en la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas por extracción en fase sólida utilizando solamente una fracción.	86
5.17	Evaluación por difusión en agar de la mezcla de fracciones obtenidas con cartuchos SepPack C18 mediante el protocolo SP7.	88
5.18	Evaluación de actividad antimicrobiana mediante mezcla de fracciones.	88
5.19	Cromatografía de intercambio catiónico realizado al ELCC obtenido por precipitación con sulfato de amonio al 80%.	91

5.20	Cromatografía de intercambio catiónico de la fracción I40 extraída mediante SepPak C18.	92
5.21	Cromatografía de intercambio catiónico de la fracción I90 extraída mediante SepPak C18.	93
5.22	SDS-PAGE de la fracción SP I40 después de pasar por cromatografía de intercambio catiónico.	93
5.23	SDS-PAGE del la fracción SP I90 al final de la extracción en fase sólida SepPak C18.	94
5.24	Cromatografía HPLC FR realizada a la fracción SP I40 extraída por SepPak C18.	96
5.25	Cromatografía HPLC FR realizada a IC45 obtenido por FPLC IC.	97
5.26	Comparación de cromatogramas HPLC FR de dos muestras de IC45 obtenidas por FPLC IC.	97
5.27	Comparación de cromatogramas de ExCell y los péptidos FR47 + FR49.	98
5.28	Cromatografía HPLC FR de IC30, el primer pico ancho obtenido por FPLC IC.	99
5.29	Comparación entre los cromatogramas de IC45 (fig. 4.25) y IC30 (fig. 4.28).	99
5.30	HPLC de fracción I50 extraído por SepPak C18 mediante modificación del protocolo convencional.	100
5.31	Comparación de los cromatogramas por HPLC FR de la fracción SP I50 con la IC45.	101
5.32	Protocolo largo de HPLC-FR para la fracción I90 extraída con SepPak C18.	102
5.33	Protocolo corto de HPLC para la fracción I90 extraída con SepPak C18.	103
5.34	Comparación entre cromatogramas de ECell (fig. 4.11), IC45 (fig. 4.25) e IC30 con su péptido FR48.	103
5.35	Gel de agarosa 2%, HyperLadder V Bioline.	105
5.36	Gel de agarosa 3.5%. HyperLadder V Bioline.	105

I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos y bebidas artesanales mexicanos son preparados hoy en día como desde tiempos antiguos, empleando métodos heredados de generación en generación. Debido a que su preparación se lleva a cabo con materiales crudos, se dan las condiciones para el desarrollo de diversos grupos microbianos que sobreviven en ambientes altamente competitivos, lo que permite encontrar bacterias ácido lácticas (BAL) con actividad antimicrobiana. La limitada vida de anaquel en estos productos dificulta su comercialización y una apropiada estrategia de conservación podría mejorar su distribución.

La producción de compuestos antimicrobianos es un mecanismo de sobrevivencia común entre las bacterias y entre los compuestos encontrados están ácidos orgánicos, CO₂, diacetilo, H₂O₂, enzimas bacteriolíticas y bacteriocinas. Por consecuencia, las BAL nativas presentes en estos productos contribuyen a su conservación además de aportar sabores, aromas y texturas característicos (Hoover, 2000; Riley and Wertz, 2002). Las BAL así como los compuestos antimicrobianos que éstas producen son elementos que se han utilizado empíricamente para la conservación de alimentos. El estudio detallado de las cepas BAL involucradas y sus capacidades metabólicas conduciría al conocimiento y utilización para aplicación en alimentos.

El estudio de la microbiota bacteriana asociada a alimentos tradicionales con objeto de buscar propiedades útiles a nivel industrial cuenta con múltiples ejemplos en productos como queso (Callon *et al.*, 2004; Bulut *et al.*, 2005), masa agria o sourdough (Şimşek *et al.*, 2006), embutidos (Ananou *et al.*, 2005; Budde *et al.*, 2003; Ammor *et al.*, 2006) y diferentes alimentos étnicos fermentados (Sanni *et al.*, 2002; Batdorj *et al.*, 2006). A este respecto, los alimentos artesanales mexicanos fermentados y semi-fermentados constituyen una fuente de recursos microbiológicos con potencial utilidad en el terreno de la bioconservación y su utilización como parte de la tecnología de barreras múltiples. El estudio detallado de las características y capacidades de dicho recurso es indispensable en el proceso de optimización de la actividad antimicrobiana, así como selección de los alimentos susceptibles de mejora.

El presente estudio se realizó con la finalidad de evaluar el potencial antimicrobiano de un grupo de cepas de BAL aisladas de diferentes alimentos artesanales y que incluyen en su preparación algún período de fermentación. Así mismo se determinó la naturaleza química de los compuestos implicados en la actividad inhibitoria.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Alimentos artesanales en México

México cuenta con una larga historia y tradición en preparación de alimentos artesanales fermentados o con períodos cortos de fermentación (1-2 días). Diversos estudios han mostrado que dentro de las comunidades microbianas que habitan en ellos, se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL).

Entre los ejemplos de productos tradicionales de denominación prehispánica se encuentra el pulque, cuyo origen es anterior a la era Cristiana (Lappe y Ulloa, 1993). El pulque es una bebida preparada por la fermentación del aguamiel (*Agave atrovirens*, *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. americana*). El producto es una bebida blanca alcohólica, ácida, que ha sido considerada bebida nacional desde los tiempos de los Aztecas. Una variante de ésta se denomina curado de tuna y es preparada mediante la adición de jugo de tuna al pulque blanco. Entre otros microorganismos se han aislado levaduras: *Saccharomyces* y *Zymomonas* y BAL: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc dextranicum* y *Leuconostoc mesenteroides* que son las responsables de la producción de ácidos láctico, acético y dextranos involucrados en las características organolépticas del pulque (Herrera, 1993; Lappe y Ulloa, 1993).

El tepache es una bebida refrescante producida por la fermentación de la pulpa y cáscara de piña, piloncillo y especias, llevada a cabo en barriles de madera, que se consume en el centro del país (Herrera, 1993).

La producción artesanal de vinagre incluye la fermentación de una solución de piloncillo utilizando una masa mucilaginosa flotante denominada “madre del vinagre”. Ésta contiene un consorcio microbiano que incluye BAL y *Acetobacter* spp., que producen un vinagre suavemente ácido y aromático empleado en la cocina mexicana (Moonmangmee *et al.*, 2002; Krystynowicz *et al.*, 2005).

Un grupo de alimentos tradicionales mexicanos de origen animal está representado por los quesos frescos y chorizos mexicanos. Estos alimentos son producto del mestizaje alimentario y cultural que ocurrió a raíz de la conquista española. Éstos productos presentan adaptaciones respecto de sus contrapartes europeas, como la incorporación de chile en el caso del chorizo.

Los quesos frescos como el rancho y el panela, son productos genuinos, elaborados a nivel artesanal con leche sin pasteurizar, donde no se añade cultivo iniciador y no se da un proceso de maduración. Presentan un contenido alto de humedad (48-58%) y una vida de anaquel de entre 1 a 2 semanas en condiciones de refrigeración (Villegas, 2004). Se consumen en crudo en muchos platillos mexicanos tales como las enchiladas, los sopes y las tortas, o bien con procesos térmicos moderados como las quesadillas y gorditas. Este fenómeno es de relevancia sanitaria dado el riesgo de infección por transmisión en alimentos y consecuentemente la importancia de mejorar la protección en este tipo de alimentos.

Por otra parte el chorizo mexicano incluye una variedad de productos embutidos preparados con carne molida de puerco, mezclados con ajo, chile cascabel, vinagre y especias como la pimienta, canela, orégano y clavo. Las principales diferencias observadas respecto de los productos españoles, es que los chorizos mexicanos presentan un porcentaje de humedad (31-45%) superior y un período muy corto de maduración (2-7 días), su consumo incluye siempre un proceso térmico previo.

La limitada vida de anaquel en estos productos dificulta su comercialización y una apropiada estrategia de conservación podría mejorar su distribución. Las BAL así como los compuestos antimicrobianos que éstas producen son elementos que se han utilizado empíricamente para la conservación de alimentos. El estudio detallado de las cepas BAL involucradas y sus capacidades metabólicas conduciría a el desarrollo de métodos adecuados para la explotación de sus propiedades tecnológicas (Leistner, 1999; Devlieghere *et al.*, 2004).

2.2 Bacterias ácido lácticas

Las BAL son un grupo heterogéneo de bacterias que se caracterizan por producir ácido láctico a partir del metabolismo de los azúcares, son Gram (+), anaerobios facultativos, catalasa negativos y que agrupa a los siguientes géneros: *Lactococcus* (*Lc.*), *Lactobacillus* (*Lb.*), *Enterococcus* (*E.*), *Leuconostoc* (*Le.*), *Pediococcus* (*P.*), *Aerococcus*, *Alliococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Streptococcus* (*S.*), *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Axelsson, 1998).

Las BAL participan en la fermentación de alimentos tradicionales en todo el mundo tales como el miso (soya) en Japón, Idli (pan) en la India, tempe (pan) en Indonesia, sourdough (trigo), embutidos (carne roja) y quesos (leche) en Europa, ogi (cereales) y gari (yuca) en Nigeria (Steinkraus, 1992; Herranz *et al.*, 2001; Onda *et al.*, 2002; Messens y De Vuyst, 2002). México cuenta también con ejemplos de alimentos fermentados entre los que las BAL juegan un papel preponderante. El pozol es una bebida fermentada de masa de maíz (*Zea mays*) donde se han reportado BAL principalmente con capacidad amilolítica, indispensables para la obtención de las características organolépticas deseadas. Entre las BAL encontradas están: *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei*, *Lc. lactis*, *E. sulfureus*, *Leuconostoc* sp., *Weissella* sp., *S. bovis* y *S. macedonicus* (Ampe *et al.*, 1999; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003). Por otra parte, diversas BAL han sido señaladas como las responsables de la producción de ácido láctico y acético así como dextranos involucrados en la textura y sabor del pulque anteriormente mencionado. Las BAL reportadas son: *Lb. plantarum*, *Le. dextranicum* y *mesenteroides* (Lappe y Ulloa, 1993). Por tal motivo se espera encontrar BAL en alimentos mexicanos con procesos de fermentación (aunque sean breves) como el pulque, tepache, queso fresco y chorizo.

El estudio de la microflora bacteriana asociada a alimentos tradicionales con objeto de buscar propiedades útiles a nivel industrial y en particular con actividad antimicrobiana cuenta con múltiples ejemplos. La mayoría de los reportes son sobre diversidad microbiológica en quesos artesanales (López-Díaz *et al.*, 2000; Sanni *et al.*, 2002; Callon *et al.*, 2004; Bulut *et al.*, 2005), también se han reportado estudios sobre embutidos y carne empacada al vacío (Ananou *et al.*, 2005; Budde *et al.*, 2003; Huggas *et al.*, 2003) y en

sourdough (Şimşek *et al.*, 2006). A este respecto, los alimentos artesanales mexicanos fermentados y semi-fermentados (alimentos con períodos de 2-4 días de fermentación) constituyen una fuente de recursos microbiológicos con potencial utilidad en el terreno de la bioconservación. El estudio detallado de las características y capacidades de cepas aisladas de productos artesanales es indispensable en el proceso de optimización y homogeneización de la calidad, así como selección de los alimentos susceptibles de mejora (Escalante *et al.*, 2004).

Las actuales tendencias en el consumo de alimentos tales como “alimentos naturales y mínimamente procesados” están propiciando el desarrollo una gran cantidad de investigación hacia la generación de tecnologías alternativas de conservación, para cubrir estas nuevas necesidades. El empleo de cultivos de BAL así como los compuestos antimicrobianos naturales producidos por éstas forman parte de las tecnologías alternativas de bioconservación.

2.3 Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas.

Algunas cepas BAL producen compuestos de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana denominados bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos codificados genéticamente y sintetizados a nivel ribosomal, a diferencia los antibióticos convencionales que son sintetizados mediante condensación enzimática (Cleveland *et al.*, 2001). Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas son péptidos catiónicos a pH neutro o ligeramente ácido, son pequeñas (3-7 kDa), de entre 30 a 60 aminoácidos, estables al calor, son catiónicas a pH neutro o ligeramente ácido y contienen a lo largo de la cadena de aminoácidos tanto porciones hidrofóbicas como regiones anfipáticas (con una cara hidrofílica y otra hidrofóbica). Sus puntos isoeléctricos son altos (8.3-11) lo que les permite interactuar con la superficie aniónica de las membranas celulares (Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001).

El espectro de actividad antimicrobiana está dirigido contra microorganismos filogenéticamente relacionados e incluye algunas cepas BAL, *Staphylococcus (S.) aureus*,

S. pneumoniae, *Listeria (L.) monocytogenes*, *Bacillus (B.) cereus*, *Clostridium sp.*, *Enterococcus sp.* (Eijsink *et al.* 2002; Cotter *et al.*, 2005)

Las bacteriocinas actúan mediante la formación de poros en la membrana de las células blanco o bien bloqueando la síntesis de la pared celular. El resultado final en la célula es disipación de la fuerza protón motriz (PMF) y pérdida de nutrientes. Existen diferencias en la manera en que las bacteriocinas interactúan con la membrana citoplásmica de las células blanco (Martínez *et al.*, 2002; Breukink y de Kruijff 2006; Hasper *et al.*, 2006). La formación del poro en la membrana celular requiere de la interacción electrostática de la bacteriocina con los lípidos u otros compuestos aniónicos de la membrana de la célula blanco; cada clase particular de bacteriocina tiene un mecanismo de interacción con la membrana diferente entre si (Eijsink *et al.* 2002; Breukink y de Kruijff, 2006).

El efecto dañino de las bacteriocinas es nulificado por las células productoras mediante mecanismos de inmunidad que también están codificados genéticamente. Estos sistemas permiten la diferenciación entre propio y extraño, suelen ser diferentes de acuerdo a los diferentes tipos de bacteriocinas e involucran la síntesis de péptidos de inmunidad (Cotter *et al.*, 2005).

La nisina, epidermina y mersacidina utilizan al transportador lípido II, un precursor del peptidoglicano de la pared celular, como sitio de reconocimiento para su anclaje a la célula. Estos estudios sugieren que la diferencia en la sensibilidad de las bacterias a estas bacteriocinas se debe a la concentración de lípido II en la membrana celular o bien a la capacidad de acceso de la bacteriocina al lípido II (Van Heusden *et al.*, 2002; Hasper *et al.*, 2006; Breukink y de Kruijff, 2006). La nisina es el principal exponente de las bacteriocinas y tiene una amplia difusión como conservador de alimentos lácteos y cárnicos (Cleveland *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2002). Su uso está permitido por la legislación mexicana (NOM-121-SSA1-1994), norteamericana y de la comunidad europea (Wessels *et al.*, 1998).

La clasificación general propuesta para de las bacteriocinas de acuerdo a Cotter *et al.*, (2005) es la siguiente:

CLASE I. LANTIBIÓTICOS

Tipo Ia: Moléculas flexibles.

Tipo Ib: Moléculas globulares.

CLASE II. NO LANTIBIÓTICOS

Clase IIa: Familia de la pediocina.

Clase IIb: Bacteriocinas con dos péptidos.

Clase IIc: Otras bacteriocinas que no perteneces a otras subclases.

CLASE III. BACTERIOLISINAS

2.4 Bacteriocinas producidas por *Enterococcus* spp.

En virtud de que el presente estudio se enfocará a bacteriocinas producidas por una cepa de *Enterococcus faecium*, se ejemplificarán bacteriocinas producidas por este género.

2.4.1 Lantibióticos

Los lantibióticos son una familia de péptidos antimicrobianos con un precursor sintetizado a nivel ribosomal que sufre modificaciones postraduccionales que originan restos aminoácidos poco comunes como la lantionina y la serina deshidratada (Breukink y de Kruijff, 2006).

El único ejemplo de bacteriocina clase I (lantibiótico) producida por un *Enterococcus* es la citolisina, que está compuesta por dos péptidos: Cyl_L que contiene 38 aminoácidos, peso molecular (Mr) 3,438 Da y Cyl_S que contiene 21 aminoácidos, Mr= 2,031 Da (Booth *et al.*, 1996). La secuencia de aminoácidos es la siguiente:

Cyl_L : **TTPVCAVAATAAASSAACGWVGGGIFTGVTVVVSLKHC**

Cyl_S : **TTPACFTIGLGVGALFSAKFC**

2.4.2 Bacteriocinas clase II

La mayoría de las enterocinas reportadas pertenecen a la clase II de la clasificación, tienen pesos moleculares que se encuentran en el rango 3.9-5.5 kDa, son estables al calor, catiónicas e hidrofóbicas y con una marcada actividad anti-*Listeria* (Herranz *et al.*, 2001; Balla *et al.*, 2000; Casaus *et al.*, 1997).

De manera general el péptido es sintetizado como prepéptido dentro de la célula y madura durante el proceso de secreción. El proceso incluye remoción enzimática del péptido líder en su extremo N-terminal mediante la vía sec-dependiente o mediante la señal doble glicina (posición -2,-1) en el prepéptido que también origina su secreción por un transportador tipo ABC (transportador que enlaza ATP). A excepción de la formación de puentes disulfuro, prácticamente no existen modificaciones postraduccionales entre bacteriocinas clase II (Garneau *et al.*, 2002).

Esta clase de bacteriocinas maduras son catiónicas, anfipáticas con poca o ninguna cisteína presente. El ambiente en el cual estos péptidos se encuentren determinará su estructura secundaria. Por ejemplo, en solución acuosa se encuentran estructuradas a manera de rizos o lazos al azar. En el caso de soluciones de bacteriocinas clase II en trifluoroetanol o micelas lipofílicas, se producen hojas β plegadas y α -helices (Garneau *et al.*, 2002).

Dentro de la clasificación II se encuentran las bacteriocinas **IIa o tipo Pediocina**: péptidos caracterizados por presentar una secuencia consenso en el extremo amino terminal (N-terminal) que inicialmente se describió como YGNGV. Conforme se ha conocido la secuencia de más bacteriocinas dentro de ésta clasificación, se ha incrementado el número de restos amino ácidos comunes de la secuencia consenso: YGNGVXCXXXXCXVXWXXA en donde X indica cualquier aminoácido (Ennahar *et al.* 2000b; Eijsink *et al.* 2002). Se ha observado por otra parte que el extremo carboxilo posee muy poca similitud entre bacteriocinas pertenecientes a esta clasificación. Las bacteriocinas IIa tienen una pronunciada actividad inhibitoria de *L. monocytogenes* (Ennahar *et al.*, 2000b).

Las bacteriocinas tipo IIa poseen un alto contenido de aminoácidos no polares, así como un elevado contenido de aminoácidos pequeños como la glicina, lo cual se cree que confiere un alto grado de libertad conformacional a las bacteriocinas como se muestra en la Figura 2.1 (Ennahar *et al.*, 2000b). Dentro del mecanismo de acción, el primer paso es el reconocimiento de la bacteriocina por el receptor en la membrana blanco, mismo que se lleva a cabo por la secuencia consenso (YGNGV), que tiene una estructura de lazo β , como se muestra en la Figura 2.2. La secuencia consenso también permite el correcto posicionamiento de la bacteriocina en la membrana como se observa en la Figura 2.3.

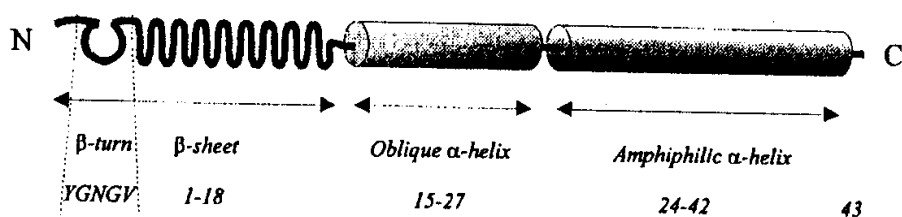


Figura 2.1 Representación esquemática de la estructura de bacteriocinas clase IIa y la predicción de dominios (Ennahar *et al.*, 2000b).

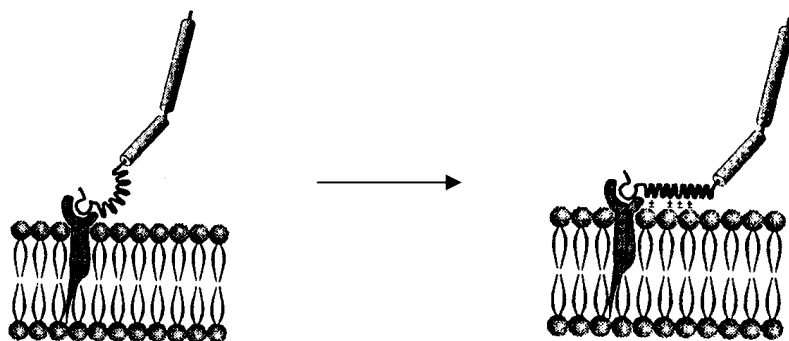


Figura 2.2. Modelo propuesto de reconocimiento e interacción electrostática entre bacteriocina clase IIa y membrana de la célula blanco (Ennahar *et al.*, 2000b).

En el extremo N-terminal también se encuentra una estructura de hoja β plegada que confiere un carácter anfipático a la región, importante para el reconocimiento inicial. Esta estructura se caracteriza por mostrar un área con cargas positivas que intervienen en el

reconocimiento y enlace con la membrana blanco mediante interacciones electrostáticas. Las bacteriocinas clase IIa, también poseen una estructura de α -hélice central de carácter hidrofílica entre los amino ácidos 15-16 a 27-28 como se observa en la Figura 2.1. Esta porción permite insertar la interfase hidrofóbica-hidrofílica del péptido en un ángulo de 30-60° C, con respecto a la membrana celular como aparece en la Figura 2.4.

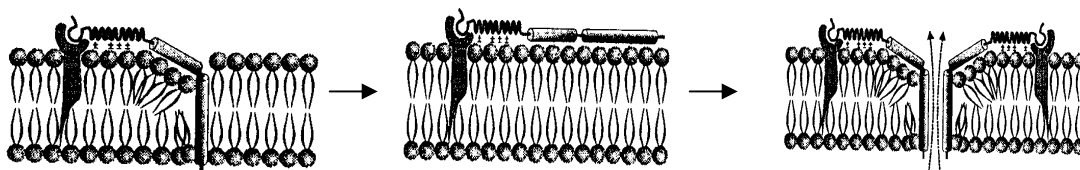


Figura 2.3. Mecanismo de inserción propuesto para las bacteriocinas clase IIa, sobre la membrana de la célula blanco (Ennahar *et al.*, 2000b).

Se considera que la orientación oblicua contribuye a desestabilizar la bicapa lipídica, facilitando por tanto la inserción de la molécula de bacteriocina en la membrana como se ilustra en la Figura 2.3. Finalmente una segunda estructura α -hélice de carácter hidrofóbico, al final del C-terminal puede insertarse con facilidad en la membrana y formar poros.

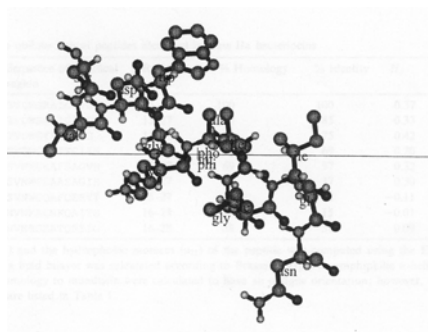


Figura 2.4. Esquema de inserción de la munditcina, a 45° C con respecto a la membrana celular (Bennik *et al.*, 1998).

Todas las clases de bacteriocinas contienen al menos un puente disulfuro y cuando el péptido tiene dos de éstos se observa que el espectro de actividad antimicrobiana se amplia, como es el caso de la pediocina AcH y la enterocina A (Ennahar *et al.*, 2000b).

A continuación se presentan las bacteriocinas sintetizadas por cepas de *Enterococcus* (enterocinas) clase **IIa** o **tipo Pediocina** reportadas. La secuencia consenso que las

caracteriza aparece en negrita y subrayada (YGN**GV**(n)**C**(n)**4C**(n)**V**(n)**4A**), n indica cualquier aminoácido y en subíndice se indica el número de aminoácidos.

- Enterocina A (47 aminoácidos), Mr 4,829 Da (Aymerich *et al.*, 1996; Guyonnet *et al.*, 2000).

TTHSGK**Y****Y****GN****GV****Y****C****T****KN****K****C****T****V****Q****W****A****K****A****T****T****C****I****A****G****M****S****I****G****G****F****L****G****G****A****I****P****G****K****C**

- Enterocina P (44 aminoácidos), Mr 4,493 Da (Cintas *et al.*, 1997; Guyonnet *et al.*, 2000).

A**T****R****S****Y****GN****GV****Y****C****N****N****S****K****C****W****V****N****W****G****E****A****K****E****N****I****A****G****I****V****I****S****G****W****A****S****G****L****A****G****M****G****H**

- Bacteriocina 31 (43 aminoácidos) (Tomita *et al.*, 1996).

A**T****Y****Y****GN****GL****Y****C****N****K****Q****K****C****W****V****D****W****N****K****A****S****R****E****I****G****K****I****V****N****G****W****V****Q****H****P****W****A****P****R**

- Munditcina (43 aminoácidos), Mr 4,287 Da (Bennik *et al.*, 1998).

K**Y****Y****GN****GV****S****C****N****K****K****G****C****S****V****D****W****G****K****A****I****G****I****G****N****N****S****A****A****N****L****A****T****G****G****A****A****G****W****S****K**

- Enterocin SE-K4 (43 aminoácidos), Mr 5,356 Da (Eguchi *et al.*, 2001).

A**T****Y****Y****GN****GV****Y****C****N****K****Q****K****C****W****V****D****W****S****R****A****R****S****E****I****I****D****R****G****V****D****A****Y****V****N****G****F****T****K****V****L****G**

También dentro de la clase II se encuentran las bacteriocinas tipo IIb: que se caracteriza por que su actividad óptima depende de la complementación de dos péptidos diferentes. Los péptidos individuales pueden tener poca actividad o ser completamente inactivos, en todo caso se observa un claro efecto sinérgico cuando se combinan ambos componentes (Hauge *et al.*, 1999). Los dos péptidos están codificados individualmente en genes contiguos ubicados en el mismo operón y poseen la misma proteína encargada de la inmunidad (Nes *et al.*, 1996; Eijsink *et al.* 2002; Nes y Holo, 2000). En el caso de las enterocinas L50A y L50B a diferencia de lo mencionado, no poseen gen de inmunidad (Nes y Holo, 2000).

El efecto bactericida de las bacteriocinas clase IIb se presenta como resultado de la permeabilización de la membrana celular producto de la formación de poros (Garneau *et al.*, 2002). Las bacteriocinas IIb forman poros que disipan el potencial intermembrana ($\Delta\Psi$) con poco efecto sobre el componente químico (ΔpH) de la fuerza protón motriz (FPM) (Nes y Holo 2000; Héchard y Hans-Georg, 2002; Garneau *et al.*, 2002). La

permeabilización de la membrana blanco conduce a inhibición de la captación de aminoácidos, pérdida de iones potasio (K^+) y consumo de ATP. La muerte celular se produce por agotamiento de ATP en la célula ocasionado por la activación del ciclo fútil (de bajo rendimiento) de captación de K^+ que es dependiente de ATP como se muestra en la Figura 2.5 (Garneau *et al.*, 2002).

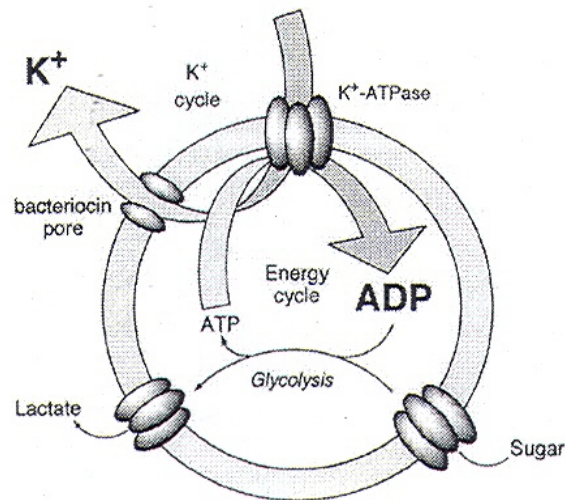


Figura 2.5. Modelo propuesto para la formación de poros ocasionados por bacteriocinas IIb (Garneau *et al.*, 2002).

La relación óptima de los péptidos individuales clase IIb para ejercer la actividad antimicrobiana es 1:1 (Garneau *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2005). Al parecer no se necesita una molécula receptora en la membrana del blanco para ejercer su acción (Marciset *et al.*, 1997). El conocimiento sobre el modo de acción de las bacteriocinas que constan de un péptido como las de clase IIa, ha permitido realizar algunas inferencias sobre el comportamiento de los sistemas de dos péptidos, dada la limitada información a este respecto.

Como se mencionó anteriormente en las bacteriocinas IIa que son de un sólo péptido, la clave para el reconocimiento de la célula blanco es el reordenamiento desde estructura desordenada con rizos al azar a una estructura α -hélice de carácter anfipático,

indispensable para la formación de poros. Esto ocurre en presencia de micelas preparadas con solventes estructurantes como el trifluoroetanol o la dodecilsfosfolina que simulan membranas bacterianas. Las bacterias Gram-positivas poseen un alto contenido de lípidos aniónicos (fosfolípidos) en la membrana mientras que las bacteriocinas tienen carga neta positiva (catiónicas), lo que posibilita el contacto inicial debido a interacciones electrostáticas. Este contacto inicial permite la inserción posterior de regiones hidrofóbicas dentro de la membrana interna a manera de cuña. Una vez asociados los péptidos a la superficie de la membrana, pueden agregarse formando un complejo que la atraviesa completamente (Ennahar *et al.*, 2000b; Garneau *et al.*, 2002).

Existen dos propuestas acerca del tipo de poros que se forman por bacteriocinas clase IIb. Los poros tipo S que se forman con péptidos que actúan de manera sinérgica en presencia del péptido compañero. En donde la presencia del péptido compañero es indispensable para la inducción de la α -hélice anfipática (Marciset *et al.*, 1997). Los pares de bacteriocinas plantaricina E/F y plantaricina J/K ilustran este tipo de poros. En presencia de liposomas de carácter aniónico (dioleil fosfatidilglicerol) muestran un 10% de incremento en la inducción de estructura de α -hélice cuando se mezclan ambos péptidos en comparación con alguno de los péptidos solos. Las regiones capaces de formar α -hélices anfipáticas se ilustran en la Figura 2.6 donde se observa la secuencia de aminoácidos de los péptidos individuales (A) y la representación de círculos de Edmundson (B) donde se aprecia el carácter anfipático de la α -hélice por el sombreado de los residuos aminoácidos polares de negro y residuos no polares de blanco (Hauge *et al.*, 1999).

Por otra parte los poros tipo E (reforzadores) donde uno de los péptidos suele tener actividad y otro no, son ejemplificados por la Termofilina 13. En este par de bacteriocinas mientras uno de los péptidos forma α -hélices, el otro componente forma hojas β -plegadas que finalmente logran la estabilización de la estructura de poro como se plantea en la Figura 2.7. El efecto reforzador o de colaboración se observa por el incremento de 40 veces la actividad inicial del componente ThmA cuando interacciona en cantidad equimolar con el componente ThmB (Marcisett *et al.*, 1997).

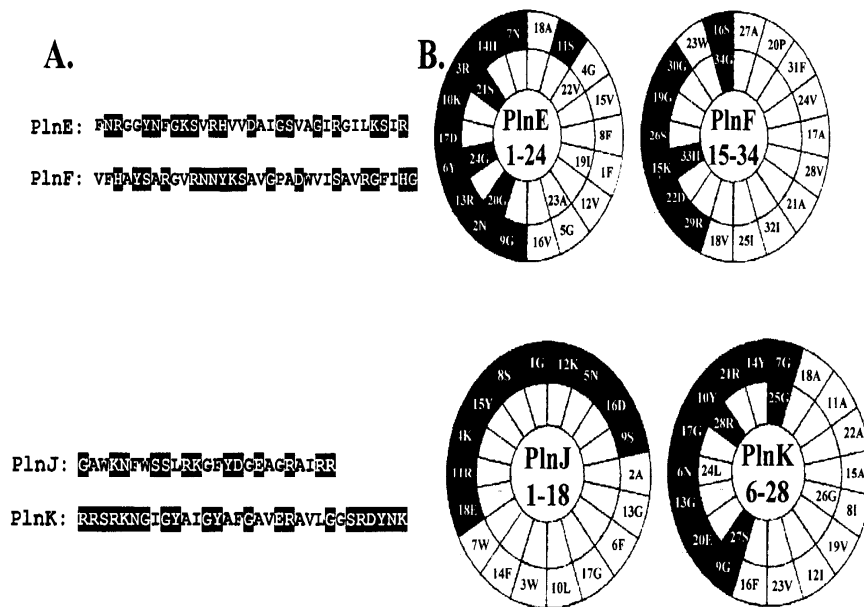


Figura 2.6. Secuencias de las bacteriocinas PlnE, PlnF, PlnJ y Punk (A) y su representación de barril helicoidal con las regiones que pueden formar α -hélices anfipáticas (B). Las cajas negras representan restos polares y las cajas blancas representan restos no polares (Hauge *et al.*, 1999).

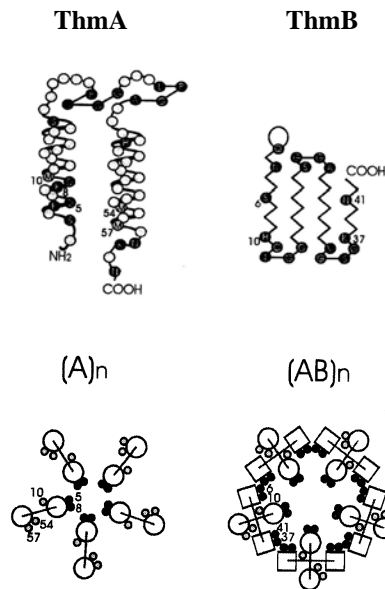


Figura 2.7. Modelos propuestos para los complejos de poración formados por termofilina 13. En la parte superior estructuras secundarias de ThmA y ThmB. En la parte inferior

modelos de los poros formados por ThmA (A)_n, y ThmA más ThmB (AB)_n (Marcisett *et al.*, 1997).

Las enterocinas clasificadas como IIb se muestran a continuación:

Enterocina 1071A (39 aa) y 1071B (35 aa), PM 4,285 y 3,899 Da respectivamente (Balla *et al.*, 2000). Este par de enterocinas son producidas por *E. faecalis* BFE1071.

1071A : ESVFSKIGNAVGPAAYWILKGLGNMSDVTQADRINRKNH

1071B : GPGKWLPLWLPAYDFVTGLFAKGIGKEGNKNKWKWKN

Enterocina L50 (44 Y 43 aa), PM 5,190 Da (Floriano *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 1998). Este par de enterocinas son producidas por *E. faecium* L50.

L50A : MGAIAKLVAKFGWPIVKKYYKQIMQFIGEGWAINKIIE WI KKHI

L50B : MGAIAKLVTKFGWPLIKKFYKQIMQFIGQGWTIDQIEKWLRH

El conjunto de enterocinas L50 son producidas mediante traducción directa sin secuencia líder ni péptido señal, y no poseen gen de inmunidad (Cintas *et al.*, 1998). Ambos péptidos poseen poca actividad por si solos siendo el péptido L50A el más activo, pero tienen un notable efecto sinérgico. Este par de péptidos comparte semejanzas estructurales con el grupo de péptidos citolíticos secretados por cepas de *Staphylococcus*, con la diferencia de que no presentan actividad citolítica (Cintas *et al.*, 1998).

Finalmente dentro de la clase II se encuentran las bacteriocinas tipo **IIc**, una gama de bacteriocinas no lantibióticos que no pertenecen a las clases IIa y IIb. Dentro de esta clasificación se encuentran:

Enterocina B (53 aminoácidos), Mr 5,479 Da (Casaus *et al.*, 1997; Herranz *et al.*, 2001).

ENDHRMPNELNRPNNLSKGGAKCGAAIAGGLFGIPKGPLAWAAGLANVYSKCN

Enterocina AS-48, (70 aminoácidos), cíclica, Mr 7,167 Da (Samyn *et al.*, 1994 ; Martínez-Bueno *et al.*, 1994).

MAKEFGIPAAVAGTVLNVVEAGGWTTTIVSILTAVGSGGLSLLAAAGRESIKAYLK
KEIKKKKGKRAVIAW

2.5 Genes estructurales de enterocinas

Se han reportado las secuencias iniciadoras para genes estructurales de enterocinas (Moreno *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003). Los iniciadores se muestran en el Cuadro 2.1 fueron diseñados en base a la secuencia de aminoácidos del extremo C- y N- terminal de las bacteriocinas maduras, con excepción de Enterocina AS-48 en donde el iniciador de sentido se construyó tomando el extremo N- del péptido líder del precursor de la bacteriocina. Estos iniciadores son de utilidad para la determinación del sitio de codificación para la síntesis de dichas bacteriocinas y su ubicación puede ser en cromosoma o en plásmido.

Cuadro 2.1. Secuencias sentido y antisentido para los iniciadores de los genes estructurales de enterocinas reportadas.

ENTEROCINA	TIPO DE INICIADOR	CODIGO
Enterocin A	SENTIDO	5-GGT ACC ACT CAT AGT GGA AA-3'
	ANTISENTIDO	5'-CCC TGG AAT TGC TCC ACC TAA-3'
Enterocin B	SENTIDO	5'-CAA AAT GTA AAA GAA TTA AGT ACG-3'
	ANTISENTIDO	5'-AGA GTA TAC ATT TGC TAA CCC-3'
Enterocin P	SENTIDO	5'-GCT ACG CGT TCA TAT GGT AAT-3'
	ANTISENTIDO	5'-TCC TGC AAT ATT CTC TTT AGC -3'
Enterocin 31	SENTIDO	5'-CCT ACG TAT TAC GGA AAT GGT-3'
	ANTISENTIDO	5'-GCC ATG TTG TAC CCA ACC ATT-3'
Enterocin AS-48	SENTIDO	5'-GAG GAG TAT CAT GGT TAA AGA-3'
	ANTISENTIDO	5'-ATA TTG TTA AAT TAC CAA-3'
Enterocin L50A	SENTIDO	5'-ATG GGA GCA ATC GCA AAA TTA-3'
	ANTISENTIDO	5'-TTT GTT AAT TGC CCA TCC TTC-3'
Enterocin L50B	SENTIDO	5'- ATG GGA GCA ATC GCA AAA TTA-3'
	ANTISENTIDO	5'-TAG CCA TTT TTC AAT TTG ATC-3'
Cyl	SENTIDO	5'-GGC GGT ATT TTT ACT GGA GTN-3'
	ANTISENTIDO	5'-CCT ACT CCT AAG CCT ATG GTA-3'

2.6 Purificación de bacteriocinas

La purificación de bacteriocinas es indispensable tanto para su caracterización como para la evaluación de su actividad *in vitro*. Los protocolos de purificación para bacteriocinas de bacterias Gram-positivas se basan en las propiedades físicas de su molécula: péptidos catiónicos con altos puntos isoeléctricos, regiones hidrofóbicas y regiones hidrofílicas. Existe una gran diversidad de estrategias de purificación y regularmente es necesaria la combinación de varias para obtener la bacteriocina a homogeneidad. Algunos métodos de purificación para bacteriocinas se mencionan a continuación: adsorción en células productoras (Yang *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2006), la extracción con solventes (Burianek *et al.*, 2000; Foulquié *et al.*, 2003a), el intercambio catiónico (Guyonnet *et al.*, 2000; Ennahar *et al.*, 2001; Uteng *et al.*, 2002; Mareková *et al.*, 2003; Abriouel *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2005), extracción en fase sólida (Eguchi *et al.*, 2001; Yanagida *et al.*, 2005), la cromatografía de fase reversa (Cintas *et al.*, 2000; Mareková *et al.*, 2003; Foulquié *et al.*, 2003a), cromatografía de interacciones hidrofóbicas (Guyonnet *et al.*, 2000; Yanagida *et al.*, 2005) y el isoelectroenfoque (Venema *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 2006).

La técnica de adsorción-liberación en células (Yang *et al.*, 1992) es una técnica relativamente sencilla que está basada en la adsorción de los péptidos catiónicos a la superficie de células y posterior liberación con cambios en el pH del medio. Las bacterias Gram-positivas poseen lípidos aniónicos (fosfolípidos) con carga negativa en la membrana mientras que las bacteriocinas tienen carga neta positiva (catiónicas, ver Cuadro 2.2) lo que posibilita una atracción y posterior interacción electrostática bacteriocina-membrana (Ennahar *et al.*, 2000b; Garneau *et al.*, 2002). En general se ha observado que por arriba de pH 6 las bacteriocinas se adsorben a la membrana celular, mientras que debajo del pH 2 son liberadas quedando en el sobrenadante pudiendo separarse de las células mediante centrifugación. Yang *et al.*, (1992) mostró rendimientos de 40-90% dependiendo de la bacteriocina, lo cual resulta muy prometedor, sin embargo no se encontraban puras a homogeneidad.

Considerando el carácter básico (catiónico) de las bacteriocinas (ver Cuadro 2.2), muchos autores han trabajado con algún paso de cromatografía de intercambio catiónico en su purificación (Guyonnet *et al.*, 2000; Ennahar *et al.*, 2001; Uteng *et al.*, 2002; Mareková *et al.*, 2003; Abriouel *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2005). El fundamento para separar compuestos mediante cromatografía de intercambio iónico esta basado en la diferencia de cargas eléctricas de las especies. El mecanismo primario es la retención en una fase estacionaria cargada debida a la atracción electrostática de iones en solución. La fase estacionaria o intercambiador iónico se denomina catiónico cuando contiene carga negativa. Los intercambiadores iónicos o fases estacionarias estan formadas por un soporte con grupos funcionales que proveen la carga. El soporte suele ser resinas de polímeros sintéticos (Cunico *et al.*, 1998; Weston y Brown, 1997).

Cuadro 2.2. Polaridad de los aminoácidos que constituyen la estructura primaria de enterocinas.

BACTERIOCINA	No. aa	% aa POLARES	% aa NO POLARES	% aa BÁSICOS	% aa ÁCIDOS
Enterocina A	47	42.6	46.8	10.6	0
Enterocina P	44	41.0	47.7	6.8	4.5
Bacteriocina 31	43	41.9	39.5	14	4.6
Munditcina	43	37.2	48.8	11.7	2.3
Enterocina SE-K4	43	37.2	39.5	14.0	9.3
Enterocina B	53	26.4	56.6	11.3	5.7
Enterocina 1071A	39	30.8	48.7	12.8	7.7
Enterocina 1071B	35	25.7	51.4	17.2	5.7
Enterocina L50	44	20.5	56.8	18.2	4.5
Enterocina AS-48	70	17.1	62.9	14.3	5.7
Nisina A	34	53	32	15	0
Pediocina AcH	44	57	25	16	2

Por otra parte, también poseen un extremo carboxilo terminal y cercano se presenta una zona de carácter hidrofóbica, lo cual ha dado lugar a la utilización de la cromatografía

de fase reversa en su purificación (Cintas *et al.*, 2000; Eguchi *et al.*, 2001; Mareková *et al.*, 2003). La cromatografía de fase reversa (FR) consiste en una fase estacionaria no polar y una fase móvil de mayor polaridad con respecto a la fase estacionaria. Debido a la novedad cuando surgió, en utilizar la polaridad de las fases en sentido contrario que la cromatografía de interacciones hidrofóbicas tradicional se denominó fase reversa. El fundamento para separar compuestos mediante cromatografía de FR esta basado en la atracción hidrofóbica hacia la fase estacionaria que es combinada con una fase móvil hidrofílica (Frenz *et al.*, 1990).

El grado de hidrofobicidad de la fase estacionaria es relativamente fuerte en comparación con las resinas empleadas en cromatografía de interacción hidrofóbica. Los soportes (resinas o fases estacionarias) son microparticulas rígidas, porosas, normalmente soportes de sílica con enlaces covalentes de ligandos hidrocarbonados en la superficie. El enlace se denomina silano y el siguiente esquema muestra la reacción entre el dióxido de silicio y un grupo funcional para producir la fase estacionaria para fase reversa (Weston y Brown, 1997).



Los grupos funcionales que suelen emplearse para las resinas de fase reversa son: trimetil (-CH₃), butil (-C₄H₉), octil (-C₈H₁₇), octadecil (ODS, C18), fenil (-C₆H₅), ciano [(-CH₂)₃CN] y amino [(-CH₂)₃NH₂]. Una desventaja de las fases estacionarias en base a sílica es su inestabilidad a pH por abajo de 2 y por arriba de 8. Por abajo de pH 2 ocurre la hidrólisis del enlace entre el grupo funcional y la sílica, y por arriba de pH 8, el sílice se disocia y empieza a disolverse (Weston y Brown, 1997; Cunico *et al.*, 1998). Con respecto a la fase móvil o eluyente, éste debe ser más polar que la fase estacionaria y generalmente está constituido por un amortiguador en una mezcla hidro-orgánica. Específicamente, para cromatografía de proteínas, se utiliza gradiente de elución, en donde el contenido del solvente orgánico es incrementado gradualmente durante la cromatografía. El eluyente debe ser también un solvente de la proteína en estudio (Frenz *et al.*, 1990). Las fases móviles más extensamente empleadas en fase reversa se enumeran en la siguiente tabla (Weston y Brown, 1997). Los agentes de apareamiento-iónico son moléculas pequeñas con un grupo

cargado que además tiene funcionalidad hidrofóbica (Cunico *et al.*, 1998). La utilización de estos agentes tiene el propósito de alterar las características iónicas o hidrofóbicas del soporte o del soluto. En el caso de los péptidos, la hidrofiliidad de los aminoácidos cargados reduce su afinidad a la fase estacionaria.

El primer paso para la purificación de bacteriocinas después de realizar una fermentación o cultivo del microorganismo productor, suele ser la precipitación con sulfato de amonio (Balla *et al.*, 2000; Ennahar *et al.*, 2001; Mareková *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003; Yanagida *et al.*, 2005) o bien la adsorción en resinas de intercambio iónico (Guyonnet *et al.*, 2000; Uteng *et al.*, 2002; Fimland *et al.*, 2002; Abriouel *et al.*, 2003). Escasos reportes recientes utilizan el método de extracción-liberación en células (Yang *et al.*, 1992) y el tipo de bacteriocinas obtenidas han sido clase IIa: enterocina SE-K4 (Eguchi *et al.*, 2001) y pediocina (Schneider *et al.*, 2006) aunque Yang *et al.*, (1992) obtuvo tanto bacteriocinas tipo I (nisina) como IIa (pediocina).

Cuadro 2.3 Polaridad (P') de los solventes más comúnmente utilizados en cromatografía de fase reversa (Weston y Brown, 1997).

SOLVENTE	POLARIDAD P'
Agua	10.2
Dimetil sulfóxido	7.2
Etilenglicol	6.9
Acetonitrilo	5.8
Metanol	5.1
Acetona	5.1
Dioxano	4.8
Etanol	4.3
Tetrahidrofurano	4.0
2-propanol	3.9

Balla *et al.*, (2000) purificó el par de enterocinas 1071A y 1071B (clase IIb) y Bauer *et al.* 2005, la pediocina (clase IIa) mediante SP-Sepharose (resina de intercambio catiónico) después de la precipitación con sulfato de amonio; este producto fue solamente concentrado por liofilización e inyectado en un espectrómetro de masas.

Foulquié *et al.*, (2003a), utilizaron precipitación con sulfato de amonio, y después columnas FPLC de fase reversa C₂/C₁₈ PepRPC HR 5/5 (eluyendo con isopropanol) ó columnas de C₂/C₁₈ Resource RPC (eluyendo con acetonitrilo), con para diferentes tipos de enterocinas incluyendo enterocina A. Generalmente se realizan varios pases de re-cromatografía de las fracciones activas para obtener la homogeneidad.

La secuencia de pasos para al menos el 30% de los protocolos de purificación suelen ser 1) precipitación con sulfato de amonio, 2) intercambio catiónico, 3) fase reversa (Herranz *et al.*, 2001; Mareková *et al.*, 2003). Otro 40% de los protocolos tienen la secuencia 1) resina de intercambio iónico, 2) fase reversa varios pasos (Ghraiiri *et al.*, 2004; Achemchem *et al.*, 2005; Batdorj *et al.*, 2006). Todos ellos reportan la presencia de bacteriocinas tipo IIa.

El resto de los protocolos de purificación utiliza combinación entre precipitación con sulfato de amonio, interacciones hidrofóbicas, filtración en gel, fase reversa e isoelectroenfoco (Yamamoto *et al.*, 2003; Yanagida *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*, 2005).

2.7 Factores de virulencia asociados a *Enterococcus* spp.

Como en el caso de cualquier bacteria, también algunas BAL poseen alguna resistencia a los antibióticos, esta resistencia puede estar relacionada con genes localizados en el cromosoma, en plásmidos o en transposones. Sin embargo no se dispone de información suficiente sobre las circunstancias en que podrían movilizarse estos elementos genéticos, y no se sabe si podrían surgir situaciones en las que ésto se convirtiera en un problema clínico.

La OMS (2001) recomienda que cuando se proceda a la selección de bacterias que se consumirán vivas dentro de alimentos, las cepas no contengan genes transmisibles que codifiquen la resistencia a medicamentos utilizados con fines clínicos.

En particular el género *Enterococcus* fue clasificado hasta 1980 dentro de los estreptococos del grupo D de Lancefield, y se asoció hasta entonces con una deficiente calidad sanitaria de los alimentos. En 1984 los *Streptococcus faecium*, *faecalis*, *avium* y *gallinarum* se transfirieron al genero *Enterococcus* (Holt *et al.*, 1994; Morrison *et al.*, 1997). Actualmente se reconoce al género *Enterococcus* con una amplia distribución dentro de los ambientes como el tracto gastrointestinal de animales y humanos y formando parte de los ambientes de alimentos fermentados, lácticos y cárnicos (Giraffa, 2003; Kühn, 2003; Klein *et al.*, 2003).

El género *Enterococcus* juega un papel importante en el desarrollo de propiedades organolépticas apreciadas de numerosos quesos tradicionales (Suzzi *et al.*, 2000; Andrighetto, *et al.*, 2001; Callon *et al.*, 2004). Este género bacteriano ha despertado recientemente interés por su potencial de aplicación como cepa probiótica por sus propiedades como actividad lipolítica, esterolítica y proteolítica (Saavedra *et al.*, 2003) y cultivo protector en productos lácteos y cárnicos (Giraffa, 2003; Hugas *et al.*, 2003; Ananou *et al.*, 2005).

La consideración del género *Enterococcus* como patógeno emergente dada la creciente incidencia de casos en pacientes hospitalizados inmunocomprometidos ha puesto en duda la pertinencia de considerar dichas cepas dentro de la industria alimentaria (Morrison *et al.*, 1997; Morfin *et al.*, 2002). La barrera entre un enterococo contaminante inofensivo y uno patógeno no es clara, por lo que se sugiere buscar la presencia de factores de virulencia para descartar patogenicidad, en particular en los nuevos cultivos que se desea introducir (De Vuyst *et al.*, 2003; Klein, 2003).

El término virulencia se refiere al grado de patogenicidad de un agente patógeno. El término factor de virulencia (FV) se aplica a aquellos elementos codificados genéticamente que permiten a un microorganismo colonizar un huésped y ocasionar daño a nivel

sistémico. Convencionalmente se consideran FV a toxinas y enzimas, estructuras de cubierta celular como cápsulas de polisacáridos y lipopolisacáridos, que contribuyen de manera directa en el proceso de enfermedad (Chen *et al.*, 2005).

El enterococo no es considerado patógeno primario, sin embargo debido a su capacidad de adquirir material genético y desarrollar resistencia a antibióticos se presenta como un oportunista. Se le ha encontrado en infecciones urinarias, abscesos intrabdominales y endocarditis bacteriana entre los más frecuentes. El 40% de las bacteremias asociadas con *Enterococcus* han sido mixtas, es decir se ha encontrado otra bacteria asociada en los cultivos, lo que dificulta la interpretación (Morrison *et al.*, 1997; Klein, 2003). La resistencia a antibióticos se ha señalado como el FV más importante, sin embargo esta característica por si sola no explica la patogenicidad del enterococo (Franz *et al.*, 2001). Otros FV asociados a *Enterococcus* son adherencia a tejidos del huésped, invasión y formación de abscesos, resistencia y modulación de mecanismos de defensa del huésped, secreción de citolisinas y producción de feromonas (Giraffa, 2003).

El género *Enterococcus* ha mostrado resistencia intrínseca a cefalosporinas, lincosamidas, β -lactámicos y aminoglucósidos. Este espectro puede ampliarse mediante la adquisición de determinantes genéticos que le confieren resistencia a otros antimicrobianos como el cloramfenicol, tetraciclinas y glicopéptidos como la vancomicina. Los genes que codifican esta información pueden ser transferidos a los enterococos desde patógenos como *S. aureus* por medio de plásmidos o transposones (Giraffa, 2003).

La resistencia a glicopéptidos como la vancomicina o la teicoplanina son el factor de evaluación más importante a considerar para aplicar cepas como cultivos iniciadores o prebióticos. Esto porque los glicopéptidos son el último recurso para combatir cepas en infecciones nosocomiales que han mostrado resistencia a penicilinas (Klein, 2003; De Vuyst *et al.*, 2003). Algunas cepas de *Enterococcus* aisladas de alimentos han mostrado muy bajas frecuencias de resistencia a vancomicina (1.0%). Entre las diferentes especies de *Enterococcus* aisladas de productos alimenticios, *E. faecium* ha mostrado menor frecuencia (10.4%) de presentar algún factor de virulencia con respecto a *E. faecalis* (78.7%) (Franz *et al.*, 2001).

Diversos estudios han mostrado que el origen de la cepa de *Enterococcus* y los factores de virulencia podrían estar asociados. Vancaneyt *et al.*, (2002) mostraron que las cepas procedentes de animales, aislados clínicos humanos, con resistencia a vancomicina o β -hemolíticos se asocian en un grupo genómico A1 diferente de aquellas cepas de origen alimentario que se agrupan en diferentes grupos (A2, A3 y A4). Por su parte Kühn *et al.*, (2003), señalaron que de entre una gran diversidad de cepas de *Enterococcus* provenientes de humanos, aquellas aisladas de muestras clínicas implicadas en infecciones tienen una diversidad genética estrecha entre sí. Estas cepas mostraron alta prevalencia de un grupo virulento específico de *E. faecalis*, mediante evaluaciones bioquímicas (PhP).

Los estudios concuerdan en señalar la existencia de diferencias en la distribución de las poblaciones de enterococos, muy probablemente por las diferentes capacidades de sobrevivencia en cada medio ambiente (Kühn *et al.*, 2003).

La OMS (2001) reconoce que algunas cepas de enterococos aunque son BAL e incluso poseen propiedades probióticas, pueden poseer características de virulencia y no los recomienda como probióticos para consumo humano basándose principalmente en el alto grado de resistencia a vancomicina. Sin embargo delega la responsabilidad al productor interesado, en demostrar que una determinada cepa no puede adquirir ni transferir la resistencia a la vancomicina o ser virulenta e inducir infecciones.

2.8 Las BAL como alternativa natural de conservación

La conservación de alimentos es un continuo esfuerzo para evitar el desarrollo de microorganismos deterioradores y patógenos, que hacen inseguros a los alimentos. La industria alimentaria se encuentra estudiando y desarrollando nuevas técnicas de conservación que permitan sustituir a las técnicas tradicionales y que usualmente contienen procesos térmicos intensivos, o bien están basados en adición de compuestos químicos. Esta intención fundamentada en la exigencia de los consumidores por alimentos más naturales, nutritivos y fáciles de transportar sin pérdida de su sabor. Dentro de ésta gama de

nuevas tecnologías de conservación se encuentran los bioconservadores y los antimicrobianos naturales (Devlieghere *et al.*, 2004).

Trabajos preliminares en el laboratorio de Biotecnología del Posgrado en Alimentos (PROPAC) UAQ, han permitido aislar un grupo de cepas BAL a partir de alimentos mexicanos de manufactura artesanal, con capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y deterioradores (Alvarado, 2003). Es imprescindible la identificación de las cepas BAL y los compuestos antimicrobianos involucrados en el efecto inhibitorio, con objeto de evaluar su potencial de utilización como sistemas de bioconservación, o bien como productos antimicrobianos naturales. El presente trabajo es un esfuerzo por entender y aplicar el inagotable recurso microbiológico que ofrecen las BAL de alimentos mexicanos.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar y cuantificar los compuestos antimicrobianos producidos por un grupo de cepas BAL aisladas de alimentos tradicionales mexicanos, para evaluar su potencial de utilización en la conservación de alimentos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las cepas BAL que muestran actividad antimicrobiana, mediante patrón de fermentación de carbohidratos.
- Identificar y clasificar los compuestos antimicrobianos producidos por las cepas que resulten con mayor potencial (QPI1, CH210, PT8 y CC10).
- Cuantificar la producción de ácidos láctico y acético producidos por las cepas QPI1, CH210, PT8 y CC10.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de los ácidos orgánicos producidos por QPI1, CH210, PT8 y CC10 contra microorganismos patógenos de origen alimentario.
- Evaluar la presencia de factores de virulencia de la cepa con capacidad bacteriocinogénica: *E. faecium* QPI1, mediante análisis de resistencia a antibióticos y capacidad hemolítica.
- Diseñar una estrategia de purificación para la identificación de la/las bacteriocinas producidas por la cepa *E. faecium* QPI1.
- Identificar las bacteriocinas producidas por *E. faecium* QPI1.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Cepas indicadoras y condiciones de crecimiento

Los microorganismos indicadores fueron: *S. aureus* 8943, *Vibrio (V.) cholerae* no-O1 5921, *V. parahaemolyticus* 10691, donados por el laboratorio de Salud Pública de Querétaro. *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), *Listeria (L.) monocytogenes* G7, y G19 donados por el Laboratorio de Microbiología Sanitaria del Departamento de Investigación y Estudios de Posgrado (DIPA), UAQ. *L. monocytogenes* Scott A, 19112, 7644, LCDC, 15313, SLCC 5764, 1370 y 10403S suministrados por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos, de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign (UIUC), USA.

Las bacterias patógenas exceptuando a *Listeria* spp. se propagaron en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI; Bioxon, Cuautitlán, Mex.), mientras que todas las cepas de *L. monocytogenes* se cultivaron en caldo soya tripticaseína (CST, Bioxon), o agar soya tripticaseína (AST; Bioxon) a 37° C por 18 h.

Todas las bacterias lácticas evaluadas fueron aisladas a partir de alimentos regionales elaborados artesanalmente como se señala por Alvarado (2003). Se propagaron en medio De Man, Rogosa, Sharpe (MRS; Oxoid, Basingstoke, England) a 30° C por 18 h. Una vez que se verificó su pureza se conservaron mezclando un cultivo fresco en caldo, con una proporción 1:1 (v/v) de glicerol al 20% (v/v) estéril y separando en alícuotas que se almacenaron a -70° C. Los cultivos de trabajo se prepararon sembrando las BAL en MRS semisólido (0.1% de agar) a 30° C por 48 h y manteniéndose en refrigeración hasta por 1 mes.

Las cepas *Leuconostoc (Lc.) mesenteroides* CH210 (chorizo), *Lc. mesenteroides* PT8 (pulque), *Lactobacillus (Lb.) plantarum* CC10 (madre del vinagre) y *Enterococcus (E.) faecium* QP11 (queso panela), que fueron seleccionadas para estudios más profundos sobre inhibición microbiana, también fueron obtenidas a partir del trabajo de Alvarado (2003).

4.2 Identificación de cepas BAL

La identificación para las cepas de bacterias lácticas se realizó mediante el sistema API 50CH (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), basado en el patrón de fermentación de carbohidratos para realizar la identificación de la cepa. Adicionalmente se utilizaron estudios fenotípicos de acuerdo a lo sugerido por Schillinger y Lucke (1987): Gram, producción de catalasa, producción de CO₂ a partir de glucosa, tolerancia a 6.5% NaCl y crecimiento a 8° C y 45° C.

4.3 Producción del extracto libre de células (ELC) y extracto libre de células concentrado (ELCC).

Se realizaron dos resiembras consecutivas de cada una de las cepas BAL, inoculando 100 µL de la cepa almacenada en 5mL de caldo MRS. A partir del segundo cultivo activado, se preparó 2% de inóculo en caldo MRS y se incubó en agitación orbital a 250 rpm. Se inactivaron las células cultivadas mediante calentamiento a 70° C por 25 min y se centrifugó a 8,000 rpm (12,000 g) por 10 min, a 4° C; esto constituyó el llamado ELC. Éste se precipitó con (NH₄)₂SO₄ al 80%, se recuperó la película sobrenadante y se redisolvió en H₂O destilada, desionizada. Se dializó contra agua utilizando una membrana de celulosa regenerada (Spectra/Por 6, Spectrum, CA) con punto de corte 1 kDa. Se liofilizó (liofilizadora Labconco, Kansas, MO, EUA). Para las evaluaciones se reconstituyeron 0.14 g/mL con agua destilada desionizada y se filtró con membrana de 0.45 µm a lo que se le denominó ELCC.

4.4 Actividad antimicrobiana por difusión en agar.

4.4.1 Difusión en agar de doble capa

Los ELC de las cepas que mostraron actividad antimicrobiana por el método de antagonismo directo (agar con microorganismos indicadores sobre colonias BAL) (Alvarado, 2003), se sometieron a evaluación por difusión en agar utilizando a *S. aureus*

8943, *L. monocytogenes* Scott A y *V. cholerae* no 01 cepa 5921. Se prepararon cajas Petri con 9 mL de TSA 1.5% de agar como medio de soporte y encima una sobrecapa de 9 mL del mismo medio con 0.8% de agar previamente inoculado con una suspensión de microorganismos indicadores en fase exponencial que permitieron obtener una concentración de 10^6 UFC/mL. Se prepararon diluciones seriadas de dos en dos del ELC estéril con H₂O. Una vez solidificado el medio se realizaron fosas de 3 mm o 4 mm y se depositaron 20 o 40 μ L del ELC. Se permitió que el líquido se secase en la campana de flujo laminar. Se incubaron las cajas a 37° C 18 h. Se evaluaron 2 tipos de ELC con y sin ajuste a pH de 6.5 (Harris *et al.*, 1989).

4.4.2 Difusión en agar monocapa

Para las evaluaciones de actividad en los pasos de purificación de bacteriocinas se realizaron adaptaciones del método anterior. Se prepararon cajas Petri con 9 mL de CST con 0.8% de agar previamente inoculado con una suspensión de *L. monocytogenes* 7644 en fase exponencial para obtener una concentración de 10^6 UFC/mL. Una vez solidificado, se depositaron sobre el agar, 5 μ L del extracto esterilizado por filtración (ELC ó ELCC) ó bien su dilución. Se permitió que el líquido se secase en la campana de flujo laminar y se incubaron las cajas a 37° C por 18 h. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA)/mL, donde UA se define como el recíproco de la más alta dilución que causa una clara zona de inhibición de 1 mm, sobre la capa del microorganismo indicador.

Se construyó una curva de actividad en función de los diámetros de inhibición de una serie de diluciones, con objeto de extrapolar la actividad antimicrobiana a partir de los diámetros de inhibición. Los datos fueron ajustados a una curva mediante el paquete Sigma Plot 2001 versión 7.0.

4.5 Capacidad Acidificante.

Se prepararon 10 mL de cultivos líquidos en caldo MRS pH 6.2, leche semidescremada pasteurizada por ultra alta temperatura (UHT), pH 6.5 y CST pH 7.1. Los cultivos se incubaron a 30° C por 18 h, y al final de dicho tiempo se midió el pH con

potenciómetro (Corning, UK). En el caso de leche UHT también se midió el pH a las 6 h (Cogan *et al.*, 1997). El pH se comparó con el de una muestra control donde no hubo inoculación del microorganismo, manejados bajo las mismas condiciones del experimento pero sin inóculo.

Los análisis de varianza para variables continuas y el análisis de comparación de medias (Tukey-Kramer) se realizaron con el paquete estadístico JMP versión 5.1 (2003, SAS Institute).

4.6 Cuantificación de acidez y ácidos orgánicos.

Se determinó la acidez como ácido láctico producida por 4 BAL seleccionadas: *E. faecium* QPI1, *Lb. plantarum* CC10, *Ln. mesenteroides* CHII10 y *Ln. mesenteroides* PT8, en el ELC (ver sección 4.3). La evaluación se llevó a cabo de acuerdo al método de la Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994 acidez en leche, empleando como factor 90 para reportar en g/L.

La cuantificación de ácido láctico y acético producido por cepas BAL seleccionadas se realizó por medio de cromatografía de gases. Se prepararon cultivos de BAL, se centrifugaron a 2000 xg durante 10 min a 4° C, se recuperaron los sobrenadantes, se filtraron con membrana de 0.45 y congelaron a -20° C durante no más de 1 semana hasta su análisis. Una muestra (1 µL) de los cultivos se inyectó manualmente en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 6890), en modo splitless, empleando una columna capilar Carbowax 20M (Agilent) de 2500 x 320 µm x 0.3 µm de diámetro interno, con fase estacionaria inmovilizada de polietilenglicol, no ligada. El paquete computacional empleado fue HP Chem, con un programa isotérmico a 130° C. Detector de ionización de flama, la velocidad del acarreador de He fue 2 ml/min.

Para la cuantificación se prepararon curvas de calibración con estándares de las siguientes concentraciones de ácido láctico y ácido acético, respectivamente (mM): 1) 500,

100; 2) 350, 80; 3) 200, 60; 4)100, 40; 5) 50, 20. Los tiempos de retención de los cromatogramas de las muestras se compararon con los de los estándares.

4.7 Actividad inhibitoria en sistema líquido

Se realizaron dos grupos de experimentos de actividad inhibitoria en sistema líquido, uno fue sobre el ELC de las cuatro cepas antes seleccionadas: *E. faecium* QPI1, *Lb. plantarum* CC10, *Ln. mesenteroides* CHII10 y *Ln. mesenteroides* PT8, con objeto de evaluar la actividad de los ácidos orgánicos producidos. Otro experimento fue sobre el ELCC de la cepa *E. faecium* QPI1 que fue la única que mostró capacidad de producir bacteriocinas.

4.7.1 Actividad inhibitoria del ELC

Con respecto a la evaluación de la capacidad inhibitoria de ELC de las 4 mejores cepas, se retaron 10^6 UFC/mL de las bacterias indicadoras *E. coli* y *S. aureus* 8943 durante 5 h a 37° C. El desarrollo bacteriano se comparó contra 3 controles diferentes sin ELC constituidos de la siguiente manera:

- 1) Control de crecimiento: 10^6 UFC/mL en CST
- 2) Control de viabilidad a condiciones experimentales: 10^6 UFC/mL en 0.85% NaCl pH=6.5.
- 3) Control de inhibición por ácidos: 10^6 UFC/mL en 0.85% NaCl adicionado con 80 mM de ácido láctico + 15 mM ácido acético, pH 4.4.

El recuento de UFC/mL al inicio y final del experimento se llevó a cabo por la técnica de recuento en superficie (Madigan *et al.*, 1998).

4.7.2 Actividad inhibitoria del ELCC QPI1

Con respecto a la capacidad de las bacteriocinas semipurificadas de la cepa *E. faecium* QPI1 para actuar en un sistema líquido, se enfrentaron 1600 UA/mL del ELCC de

la cepa mencionada con 10^5 UFC/mL, durante 7 horas con recuentos a los tiempos 0, 1, 3, 5 y 7 h, a dos pH: 5 y 6. La concentración de ELCC QPI1 adicionada se obtuvo de experimentos previos (Alvarado, 2003) y es el doble de la concentración inhibitoria mínima (CIM) obtenida mediante la técnica de difusión en agar.

Una vez que se observó que la capacidad inhibitoria se mantenía durante el período de incubación en CST se decidió evaluarla en el sistema modelo leche descremada (Difco, Detroit, MCH, USA), a pH 6.0, frente a una carga mayor del microorganismo (10^7 UFC/mL) y a tiempos más prolongados (16 h), incubando a 37° C. Las concentraciones de ELCC QPI1 utilizadas correspondían a la CIM así como al doble de la CIM, es decir 100 y 200 UA/mL para la cepa *L. monocytogenes* 7644 y 1,600 y 3,200 UA/mL para la cepa *L. monocytogenes* Scott A, cepas previamente catalogadas como la más susceptible y la más resistente respectivamente (Alvarado, 2003).

4.8 Sensibilidad de cepas QPI1, CC10, CHII10 y PT8 a antimicrobianos

4.8.1 Método utilizando sensidiscos NCCLS M2-A5

El patrón general de susceptibilidad a antibióticos para un grupo selecto de cepas BAL se realizó mediante el empleo de discos de 6.5 mm de diámetro (Bigaux, México D.F.) impregnados del antibiótico de acuerdo a lo recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), norma M2-A5 en agar Muller Hinton y MRS.

Los antimicrobianos así como su contenido se muestran a continuación: amikacina 30 µg, cloranfenicol 30 µg, amoxicilina 30 µg, eritromicina 15 µg, ampicilina 10 µg, gentamicina 10 µg, carbenicilina 100 µg, lincomicina 2 µg, ceftazidima 30 µg, netilmicina 30 µg, cefotaxima 30 µg, nitrofurantoina 300 µg, cefuroxima 30µg, rifampicina 5 µg, cloxacilina 1 µg, tetraciclina 30 µg, trimetoprim-sulfametoxasol 1.25 µg-23.75 µg.

Se preparó caldo CTS con microorganismo puro en fase logarítmica, hasta que presentara una densidad de 0.5 del estándar de MacFarland y que corresponde a 10^8

UFC/mL. Con esta dilución se inocularon cajas de agar Muller Hinton y MRS mediante hisopo estéril de algodón humedecido en la suspensión bacteriana. Se esperó a que se secase el inóculo y se colocaron los discos con pinza estéril, distribuidos de tal manera que evitaran la sobreposición de zonas de inhibición. La distancia entre discos debe ser mayor a 20 mm entre ellos. Se incubó a 37° C por 18 h. Se miden los halos de inhibición y se clasifican en resistentes (R) diámetro ≤ 12 mm, intermedios (I) entre 13-17 mm, o susceptibles (S) ≥ 18 mm.

4.8.2 Resistencia a vancomicina en medio líquido

La determinación de resistencia de la cepa *E. faecium* QPI1 al glicopéptido vancomicina se determinó mediante la técnica de dilución en caldo. Una solución estándar de vancomicina (Sigma, St. Louis MO) se preparó disolviendo 6.4 mg en 100 ml de caldo tripticasa de soya extracto de levadura (TSYE, 0.3% de extracto de levadura). Se prepararon diluciones seriadas al doble del antibiótico, mediante la transferencia de 5 ml de la solución estándar en 5 ml del TSYE estéril y así sucesivamente, resultando en tubos con una concentración final 64, 32, 16, 8, 4 y 2 mg/mL de vancomicina (De Vuyst *et al.*, 2003).

Un μ L de cultivo de 18 h de *E. faecium* QPI1 se inocula en los tubos con las diluciones de antibiótico más un control sin antibiótico. Se incuba 24 h a 37° C y la CIM se determinó como la menor concentración de vancomicina que impidió el crecimiento.

4.9 Determinación de peso molecular de los péptidos antimicrobianos con geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los péptidos de las fracciones activas semipurificadas de la cepa QOI1 se analizaron en geles de poliacrilamida por el sistema discontinuo recomendado por Schagger y Von Jagow (1987). Los geles contenían una parte superior con gel concentrador de 8%T, 3%C (1 cm) y el resto de gel separador de 16.5%T, 6%C. Se utilizó el sistema con Tris-Tricina 0.1 M con SDS 0.1% como amortiguador del cátodo y Tris 0.2 M como amortiguador del ánodo. Se emplearon cámaras de electroforesis Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad, Hercules CA). Previo al cargado en el gel, las muestras se diluyeron al doble con 2

amortiguadores, uno con y otro sin β -mercaptoetanol y se trataron 30 min a 40° C. Los geles se corrieron a voltaje constante, 1 h a 30V y entre 3-4 h a 100V. Se utilizaron marcadores de PM para péptidos Amersham y/o Bio-Rad. La tinción se llevó a cabo con Coomassie Serva blue G (0.025% en 10% de ácido acético).

Para la estimación del PM se extrapoló en la curva derivada del gráfico del log del PM de los estándares (eje y) contra la relación Rf que se calcula dividiendo las distancias de migración para cada uno de los estándares entre la distancia de migración del frente de colorante (eje x).

4.10 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó con Bio-Rad Protein Assay Kit I, basado en el método descrito por Bradford (1976). Se empleó una curva estándar de gamma globulina bovina plasmática (Bio-Rad) a concentraciones 0.05, 0.15, 0.25, 0.4 y 0.5 mg/mL. Las lecturas se llevaron a cabo en un lector para ELISA Microplate reader (Versa max) con un paquete Soft Max Pro. Las muestras se prepararon pipeteando 10 μ L en cada uno de micropozos de placas para ELISA. Se adicionaron 200 μ L del reactivo Bio-Rad diluyendo 1 en 5. Se mezclaron, se incubaron 5 min a temperatura ambiente y antes de 1 h se midió absorbancia a 595 nm. Los resultados se extrapolan en la curva de calibración.

4.11 Isoelectroenfoque

Se utilizó una cámara horizontal Bio-Phoresis (Bio-Rad) para isoelectroenfoque (IEF) de 12.5 cm x 36 cm. Los geles empleados fueron de poliacrilamida 5% T, 3% C con 2% de anfolitos. Se emplearon anfolitos que cubrieron un rango de pH de 3 a 10 (Sigma). El voltaje final de corrida fue de 2000 V a corriente 100 mA y potencia de 8 W. El amortiguador del cátodo fue 1 N de NaOH y el amortiguador del ánodo fue 1 N H₃PO₄. Se realizó isoelectroenfoque a 2 fracciones activas procedentes de intercambio catiónico. El volumen de muestra inyectada 5 μ L con 1 μ g de proteína. Así mismo se corrieron en un

carril estándares para IEF (Bio-Rad). Se preparó un gel para tinción con plata y otro para electrotransferencia a membrana de PVDF (Bio-Rad).

4.12 Purificación de bacteriocinas de la cepa *E. faecium* QPI1

Se utilizaron diversas metodologías de purificación que incluyen adsorción-liberación en células, cromatografía de filtración en gel, extracción en fase sólida (EFS), cromatografía de intercambio catiónico (IC), isoelectroenfoque y cromatografía de fase reversa (FR).

4.12.1 Adsorción liberación en células

Se prepararon cultivos de *E. faecium* UQ31 en caldo MRS, con agitación orbital a 250 rpm. Se inactivaron las células cultivadas mediante calentamiento a 70° C por 20 min. Se centrifugó a 10,000 rpm, 10 min y se recuperaron las células. Se lavaron con NaCl 0.85% amortiguado con 0.1 M fosfatos pH 7.0 y se centrifugó 10,000 rpm, 10 min. Se resuspendieron las células en 1 mL de 0.2 N HCl ajustando pH a 1.0. Se aplicó suave agitación durante 30 min. Se separaron las células del sobrenadante por centrifugación (Yang *et al.*, 1992). El sobrenadante se ajustó a pH 6.0 con NaOH y se esterilizó por filtración (membrana 0.45 µm). Al extracto de células (ECel) se midió actividad antimicrobiana y se cuantificó proteína con Bio-Rad Protein Assay Kit I.

4.12.2 Cromatografía de filtración en gel

Se empleó G-25 Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Sweden) para fraccionamiento de proteínas con PM entre 1000-5000 Da. La resina se montó en una columna de 50 cm de largo con 1.8 cm de diámetro y se equilibró con amortiguador 0.1 M de acetato de sodio (C₂H₃O₂Na) pH 3.6. Se inyectaron 3.5 mL del ELCC redissuelto en H₂O dd. Se permitió la caída por gravedad del amortiguador de acetatos, estableciéndose a un flujo final de 1 mL/min. Muestras de 3 mL fueron recolectadas, se midió actividad antimicrobiana por la

técnica de difusión en agar doble capa, y además proteína midiendo la absorbancia a 280 nm.

4.12.3 Extracción en fase sólida (EFS)

Se emplearon cartuchos SepPak C18 (Waters, Milford, MS) de 6 mL con una resina (soporte) en base sílice con enlaces covalentes hacia ligandos hidrocarbonados de alta hidrofobicidad. Los solventes evaluados para la selección del gradiente de elusión fueron acetonitrilo (ACN, CH₃CN), metanol, etanol e isopropanol y sus combinaciones, en incrementos consecutivos de 20% en la concentración.

Se utilizaron dos protocolos de elusión, SP5 y SP7. Las columnas se activaron de acuerdo con protocolo señalado por el fabricante empleando metanol, se lavaron con H₂O y finalmente se inyectó la muestra diluida en 2 mL de H₂O destilada desionizada.

PROTOCOLO SP5: F1) 2 mL H₂O, F2) 4 mL de isopropanol 30%, F3) 4 mL de isopropanol 30%, F4) 4 mL de isopropanol 30%, F5) 4 mL de isopropanol 40%, F6) 4 mL de isopropanol 50%, F7) 4 mL de isopropanol 60%, F8) 4 mL de isopropanol 60%, F9) 4 mL de isopropanol 70%, F10) 4 mL de isopropanol 80%, F11) 4 mL de isopropanol 100%.

PROTOCOLO SP7: F1) 4 mL regulador de acetato de sodio 0.1 M pH 4.5, F2) 4 mL isopropanol 40%, F3) 4 mL isopropanol 40%, F4) 4 mL isopropanol 90%.

Las fracciones colectadas se liofilizaron y redisolviéron en 500 µL de H₂O, isopropanol 25% o isopropanol 50% dependiendo de la concentración de isopropanol empleada en el protocolo de elusión. Se evaluó actividad antimicrobiana por difusión en agar monocapa y se cuantificó proteína por el método señalado en la sección 4.10.

4.12.4 Cromatografía de intercambio catiónico (IC)

Se utilizó una columna 5 mL HiTrap SP XL (Pharmacia, Uppsala, Sweden), en un sistema de FPLC con unidad de control UV-vis (Amersham). El asa empleado fue de 500

μL , flujo de 2.0 mL/min y se colectaron fracciones de 3 mL. El amortiguador A contenía ácido acético-acetato de sodio 0.1 M pH 4.0, el amortiguador B contenía fosfato monobásico-dibásico de Na 0.05 M en 1 M de NaCl pH 6.4. El desarrollo de la cromatografía se siguió mediante absorbencia a 280 nm y actividad antimicrobiana por difusión en agar monocapa.

El programa de elusión utilizado se muestra a continuación: 1) 0.0 a 25 mL 0% B, 2) 25 a 70 mL 0% - 100% B, 3) 70 a 85 mL 100 %B, 4) 85 a 95 mL 100 % - 0% B, 5) 95 a 105 mL con 100% A para finalizar la corrida.

Las fracciones activas se liofilizaron y reconstituyeron con H₂O destilada desionizada (dd). Para eliminar las altas concentraciones de NaCl con las que fueron eluidas las fracciones se utilizaron columnas comerciales de de-salado basadas en la exclusión por tamaño mediante filtración en gel, EconoPac 10DG (Bio-Rad). El protocolo de elusión fue monitorizado mediante conductividad y actividad antimicrobiana. Las fracciones activas se concentraron por liofilización previa introducción al HPLC.

Las muestras analizadas con IC fueron ELCC (0.14 g polvo/mL de H₂O dd), el extracto de células y cada una de las fracciones activas derivadas de la extracción en fase sólida.

4.12.5 Cromatografía de fase reversa (FR)

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Agilent serie 1100, con bomba cuaternaria (Quat Pump G1311A), detector de arreglo de diodos (DAD G 1315B) y un paquete Chem Station. La columna empleada fue C18 Protein & Peptide (Vydac), el asa de 1 mL y el flujo de 0.5 mL/min. La absorción de las fracciones se registró a 210 nm y se evaluó actividad antimicrobiana por difusión en agar monocapa de los picos. El amortiguador A contenía TFA 0.1% en H₂O, el amortiguador B ACN:isopropanol (10:90) con 0.08% TFA. Se utilizaron tres programas de cromatografía que se muestran a continuación:

CAO-3.M: 1) 0 a 60 min, 0-70 %B, 2) 60 a 65 min, 70-90 %B, 3) 65-70 min, 90 %B, 4) 70-75 min, 90-0 %B, 5) 75-90 min, 0.0 %B.

CAO-5.M: 1) 0 a 60 min, 0-70% B, 2) 60 a 65 min, 70-100 % B, 3) 65 a 80 min, 100% B, 4) 80 a 85 min, 100– 0% B, 5) 85 a 100 min, 0% B.

CAO-7.M: 1) 0 a 15 min, 0–50% B, 2) 15 a 45 min, 50–100% B, 3) 45 a 60 min, 100 % B, 4) 60 a 65 min, 100-0% B, 5) 65 a 80 min, 0% B.

4.13 Identificación de genes estructurales de enterocinas por PCR.

La búsqueda de genes estructurales de enterocinas en el DNA celular de la cepa *E. faecium* QP11 se llevó a cabo utilizando la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Los genes buscados fueron: enterocina A, enterocina B, enterocina P, enterocina L50A/L50B, bacteriocina 31, enterocina AS-48 y citolisina empleando los iniciadores diseñados por De Vuyst *et al.* (2003). Los iniciadores sentido y antisentido utilizados para las reacciones se muestran en la sección 2.5 Cuadro 2.1.

Se aisló DNA total mediante el método de las perlas de vidrio (Stahl *et al.*, 1988) mismo que se usó como plantilla. La PCR se llevó a cabo en un termociclador multiblock (MJ Research, Watertown MA, USA) en un volumen final de 50 μ L. La mezcla de reacción contenía 2.5 unidades de Takara *LA Taq*TM DNA polymerase (Takara Shuzo, Madison, WI), 5 μ L de 10x LA PCR buffer II (Takara Shuzo), 400 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 0.2 μ M de cada primer, 2 μ L de la plantilla de DNA y completar a 50 μ L con H₂O ultrapura.

Las condiciones de reacción para enterocinas A, 31 y citolisina fueron: 1) 5 min de desnaturalización a 95° C, 2) 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y elongación: 30 seg a 95° C, 30 seg a 58° C, 30 seg a 72° C. 3) 5 min a 72° C de terminación de reacción y enfriamiento hasta 4° C. En las condiciones de reacción para enterocina B, P, AS-48 y el conjunto L50A/L50B se utilizó 56° C en lugar de 58° C para el alineamiento.

Los productos obtenidos de la reacción se separaron en geles para electroforesis con 2.5% (w/v) de agarosa. Se trabajó en una cámara para electroforesis Fisher Biotech Mini-Horizontal Unit FB-SB-710 (Fisher Scientific). Se dejó correr alrededor de 3 h, a 90 mV. Los geles se tiñieron con bromuro de etidio 0.1 µg/mL 15 min, se lavaron con H₂O destilada y visualizaron con luz UV. Como estándar para el corrimiento de la electroforesis se utilizó HyperLadder V (Bioline, London, UK) con marcadores de 25 a 500 pb.

La clonación de los productos de PCR obtenidos se realizó utilizando el Kit comercial TOPO TA Cloning® Kit for sequencing (Invitrogen, Carlsbad CA). Este kit utiliza el plásmido pCR 4-TOPO de 3957 pares de bases (pb). Para cada transformación se utiliza un vial de células quimiocompetentes y 2 placas de agar Luria Bertani Ampicilina 100 µg/mL (LB-ampi) .

Se preparan en baño de hielo, 6 µL de la mezcla de clonación por cada transformación con la siguiente composición: producto fresco de PCR 3 µL, solución de sal 1 µL, agua estéril 1 µL, TOPO^R vector 0.5 µL. La mezcla se agita suavemente e incuba 5 min a temperatura ambiente (22-23° C). Se adiciona 2 µL de mezcla de clonación a un vial de One Shot® Chemically Competent *E. coli*, se mezcla cuidadosamente e incuba en hielo por 30 min. Se realiza un choque térmico durante 30 seg a 42° C. De inmediato se transfirió el tubo al hielo. Se adicionó 250 µL de medio SOC y se vació el contenido dentro de un tubo eppendorf con tapa. Se incubó con agitación por 1 h a 37° C para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos. Se sembró por extensión 10 a 50 µL de cada transformación en 2 placas de agar LB-ampicilina y se incubó a 37° C durante toda la noche. Se tomaron 10 colonias aisladas y se colocaron en tubos con 10 mL de medio LB-ampicilina y se cultivaron por 18-24 hrs.

Para el aislamiento del DNA plasmídico se utilizó el sistema de purificación de DNA “Wizard^R Plus Miniprep” (Promega, Madison WI). Se centrifugaron los tubos de cultivo a 1500 xg durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se invertieron los tubos sobre papel secante para remover el exceso de medio. Se resuspendió el paquete celular en 400 µL de solución de resuspensión celular. Se transfirió la suspensión a un tubo de

microcentrífuga de 1.5 mL. Se adicionaron 400 μ L de “solución de lisis” incluida en el kit y se mezcló por inversión 4 veces. La suspensión debe volverse clara. Se adicionaron 400 μ L de la “solución neutralizante” y se mezcló por inversión varias veces. Se centrifugó el lisado a 10 000 g en microcentrífuga por 20 min para recuperar el sobrenadante. Por otra parte se preparó una minicolumna por cada muestra, uniendo en un lado de la minicolumna un barril de jeringa y por el otro lado a una extensión de la unidad de vacío “vacuum manifold Promega’s Vac-Man^R”. Se pipeteó 1 mL de la resina en cada uno de los barriles y se cerraron las válvulas de conexión al vacío. Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante al barril de la jeringa que contiene la resina. Se abre la válvula y se aplicó vacío a 15 pulgadas de Hg para retirar la resina con lisado, mezclados dentro de la minicolumna. Cuando el contenido de la jeringa pasó a través de la columna se rompió el vacío. Se adicionaron 2 mL de solución de lavado de columna al barril de jeringa. Se aplicó el vacío para drenar la solución a través de la minicolumna. Se lavó la resina mediante drenado continuo a vacío hasta que toda la solución limpiadora pasó. Se removió el barril de la jeringa y transfirió la minicolumna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

Se centrifugó la minicolumna a 10,000 g durante 2 min y removió cualquier residuo de la solución de lavado. Se transfirió la minicolumna a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se adicionaron 50 μ L de agua libre de nucleasas a la minicolumna y esperó un min. Se centrifugó el tubo a 10,000 g por 20 s para eluir el DNA. Se removió y descartó la minicolumna. Para almacenar el DNA en buffer Tris-EDTA (TE) a 4° C, se adicionaron 5 μ L de 10X buffer TE a los 50 μ L de DNA eluido.

Los insertos del plásmido fueron analizados mediante tamizaje de PCR. Se utilizó uno de los 4 iniciadores del Kit (M13 Forward, M13 Reverse, T3 o T7) en combinación con un primer del inserto. Una vez confirmada la presencia del clon amplificado en el gel, se envió a secuenciar al W.M. Keck Center for Comparative and Functional Genomics de la Universidad de Illinois, USA.

La secuencia se comparó con la base de datos del GenBank utilizando BLAST ([http: www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Origen e identificación de las cepas

Se partió de 25 cepas con potencial de actividad inhibitoria hacia microorganismos patógenos y deterioradores provenientes de un estudio de aislamiento previo (Alvarado, 2003). Se realizó la identificación de estas cepas y junto con el perfil de inhibición microbiana se presentan en el Cuadro 5.1. De estas 25 cepas, 14 provenían de alimentos de origen animal específicamente queso fresco, cecina y chorizo. Las once cepas restantes se aislaron de alimentos de diferente origen al animal tales como pulque, pulque curado de tuna, tepache y madre de vinagre.

Todas las BAL evaluadas pertenecieron a alguno de los cuatro géneros *Enterococcus* (*E.*), *Lactococcus* (*Lc.*), *Leuconostoc* (*Le.*) y *Lactobacillus* (*Lb.*). Con excepción de *E. faecium* que fue identificado previamente por métodos moleculares mediante la secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal (Alvarado, 2003), todas las demás BAL se identificaron mediante el empleo de API 50CH.

Se observó mayor diversidad entre los géneros BAL provenientes de alimentos de origen animal en comparación con los de origen vegetal. Las cepas encontradas en alimentos de origen animal fueron: *Enterococcus* (*E.*) (QPI1 de queso), *Lactococcus* (*Lc.*) (QPII4, QPIII6, QMIV3, QPI3, QO14 de queso), *Leuconostoc* (*Le.*) (CHII10 de chorizo) y *Lactobacillus* (*Lb.*) (QMIV1, QMIV6, QMIV7 de queso; CS1 de cecina y CHI4, CHO1, CHO10 de chorizo) (Cuadro 4.1). En contraste, 10 de los 11 aislados de alimentos de origen vegetal fueron identificados como *Lactobacillus* (*Lb.*): VN4, VN7, CC9, CC10 (de madre de vinagre), TPI13, TII18, TII19 (tepache), PII2, CTU3, y CTU4 (pulque y curado de tuna) y solamente la cepa PT8 proveniente de pulque, se identificó como *Leuconostoc mesenteroides* sbsp. *mesenteroides* (Cuadro 5.1).

A nivel de especie se obtuvo 1 cepa *E. faecium* (QPI1), 5 *Lc. lactis* subs. *lactis* (QPII4, QPIII6, QMIV3, QPI3, QO14), 14 *Lb. plantarum* (CC9, CC10, TPI13, TII18,

THI19, PII2, CTU3, CTU4, QMIV1, QMIV6, QMIV7, CS1, CHO1, CHO10), un *Lb. delbrueckii* (CHI4), 2 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (VN4, VN7) y 2 *Le. mesenteroides* (CHII10 y PT8). El esquema de inhibición de cada BAL se presenta en el Cuadro 5.1 y un resumen de los patrones de inhibición agrupado por género se muestra en el Cuadro 5.2. El patrón de inhibición bacteriana se caracterizó por la inhibición de los Gram positivos *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *P. acidilactici*, mientras que solamente uno de 4 géneros Gram negativos evaluados mostró ser susceptible (*Vibrio*; Cuadro 5.2).

De un total de 25 cepas BAL evaluadas, 21 mostraron capacidad de inhibir alguna de las cepas de *L. monocytogenes* independientemente del origen del alimento de procedencia. Cuatro de cinco cepas BAL que fueron capaces de inhibir *S. aureus* se aislaron de alimentos de origen animal. Todas las cepas que inhibieron a *B. cereus* (5 cepas BAL) fueron de la especie *Lb. plantarum*. Diez de 13 cepas que inhibieron el crecimiento de *Vibrio* fueron del género *Lactobacillus* como se muestra en el Cuadro 5.1. Estos resultados muestran el potencial de inhibición que las BAL aisladas poseen sobre microorganismos implicados en brotes asociados a alimentos de tipo mexicano (Boogs *et al.*, 2001).

5.2. Evaluación de actividad antimicrobiana por difusión en agar

Después de seleccionar las BAL con mayor potencial antimicrobiano, se evaluó la capacidad de ELC de estas BAL para mantener la actividad antimicrobiana frente a 3 patógenos representativos: *S. aureus* 8943, *L. monocytogenes* Scott A y *V. cholerae* no-O1 5921. Debido a que se asume que los ácidos orgánicos producidos por las BAL poseen actividad antimicrobiana, se realizó un ajuste en el pH de los ELC a 6.5 para determinar el tipo de compuestos involucrados en la actividad.

La Figura 5.1 muestra ejemplos de los experimentos llevados a cabo, donde se observa la actividad antimicrobiana tanto por la técnica del botón (“spot on the lawn test”), como por difusión en agar. Es claro observar que la producción de ácidos por si sola es capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos indicadores ya que con el ajuste

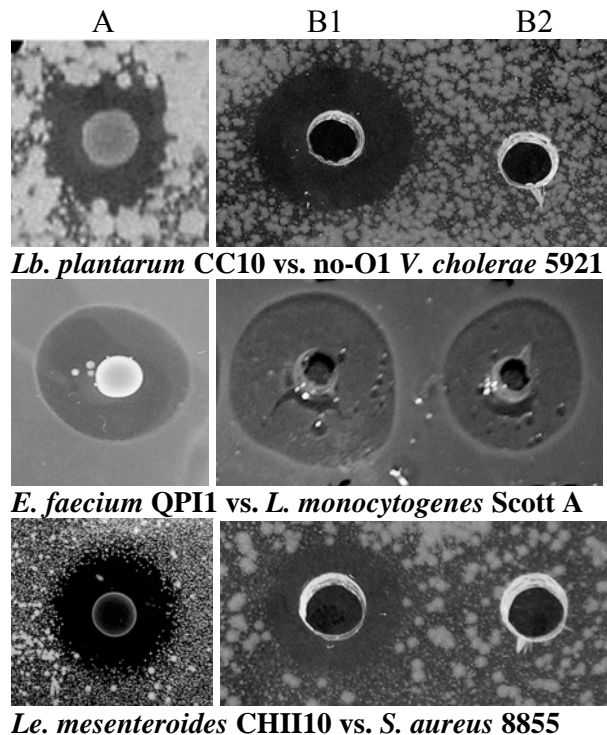


Figura 5.1. Actividad antimicrobiana A) Técnica del botón; B) Difusión en agar utilizando extracto libre de células (ELC) de las BAL aisladas. B1) ELC sin ajuste de pH; B2) ELC con ajuste de pH a 6.0.

de pH a 6.5 desaparece el efecto, como se observa en la Figura 5.1 para *Lb. plantarum* CC10 vs. *V. cholerae* no 01 5921 y en *Le. mesenteroides* CHII10 vs. *S. aureus* 8855. El ELC de *E. faecium* QPI1 aislado de queso panela, fue el único extracto que mantuvo su actividad inhibitoria frente a *L. monocytogenes* Scott A después de ajustar el pH (Figura 5.1). Para el resto de las cepas la actividad inhibitoria se atribuyó a la producción de ácidos orgánicos producidas por las BAL aisladas en virtud de que el ajuste de pH a 6.5 resultó en una pérdida de actividad inhibitoria.

5.3 Capacidad acidificante

Todas las cepas evaluadas lograron disminuir el pH de los medios de cultivo, a lo que se denominó actividad acidificante. Se observaron diferencias en el pH final entre las cepas, observándose tendencias de acuerdo al género bacteriano y el medio de cultivo. El efecto acidificante así como otras características bioquímicas de relevancia en las BAL aisladas se muestran en los Cuadros 5.3 y 5.4. La Figura 5.2 muestra el pH final que lograron las cepas agrupadas por género bacteriano y medio de cultivo. La reducción de unidades de pH tomando en cuenta las diferencias iniciales de cada medio (MRS pH 6.2, TSB pH 7.1 y leche UHT pH 6.5) se observa en la Figura 5.3.

El patrón de pH final de la fermentación en UHT-SM mostrado en la Figura 5.2 y Cuadros 5.3 y 5.4 es similar a lo reportado por Bulut *et al.* (2005), para cepas de *Lactococcus* (pH 4.4-4.5) y de *Lactobacillus* (5.5-6), aunque ligeramente más bajo para el pH de las cepas de *Enterococcus* (5.0-5.5), todos estos aislados de queso tradicional de Turquía. Morea *et al.* (1999) reportaron los mismos hallazgos para cepas de *Lactococcus* (pH 4.1-4.9), *Enterococcus* (pH 5.5-5.7) y de *Leuconostoc* (pH 5.7-6.0), aislados de queso tradicional Mozzarella italiano, ambos bajo las mismas condiciones y medio de cultivo.

Todas las cepas de *Lactobacillus* cultivadas en MRS (pH inicial 6.2) mostraron una reducción significativa del pH ($p < 0.05$) en comparación con los demás géneros de BAL cultivadas en el mismo medio. La reducción promedio en el pH fue de 2.3 ± 0.16 unidades y un pH final de 3.9 ± 0.2 (Figura 5.2). El comportamiento fue similar para las cepas de *Lactobacillus* cultivadas en TSB con una reducción significativa ($p < 0.05$) de pH en 1.8 ± 0.02 unidades para dar un pH final de 5.3 ± 0.07 (Figuras 5.2 y 5.3). Por otra parte, las cepas de *Lactococcus* mostraron una capacidad acidificante importante tanto en leche UHT (reducción de pH = 1.8 ± 0.7) como en MRS (reducción de pH = 1.8 ± 0.2). En el caso de leche UHT la acidificación fue significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto a las cepas de *Lactobacillus* con un pH final de 4.7 ± 0.7 (Figura 5.2). Estos hallazgos coinciden con los reportados por Morea *et al.* (1999) y Bulut *et al.* (2005) para BAL homofermentativas de queso tradicional de Turquía.

Ver anexo

Ver anexo

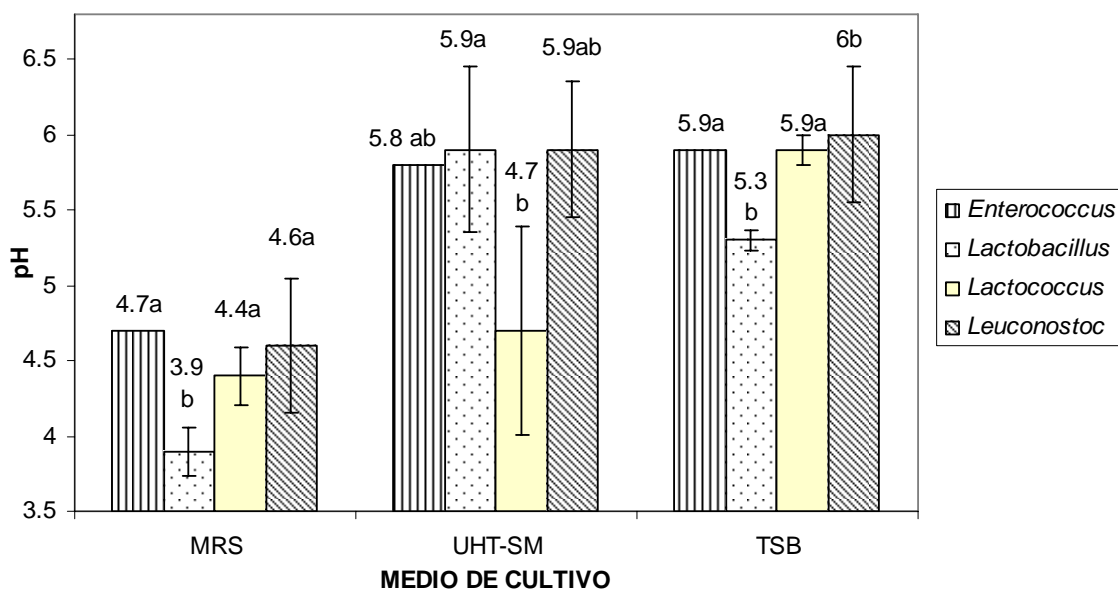


Figura 5.2. pH final en experimentos de fermentación clasificados por género y medio de cultivo. Promedios con letras diferentes son significativamente diferentes.

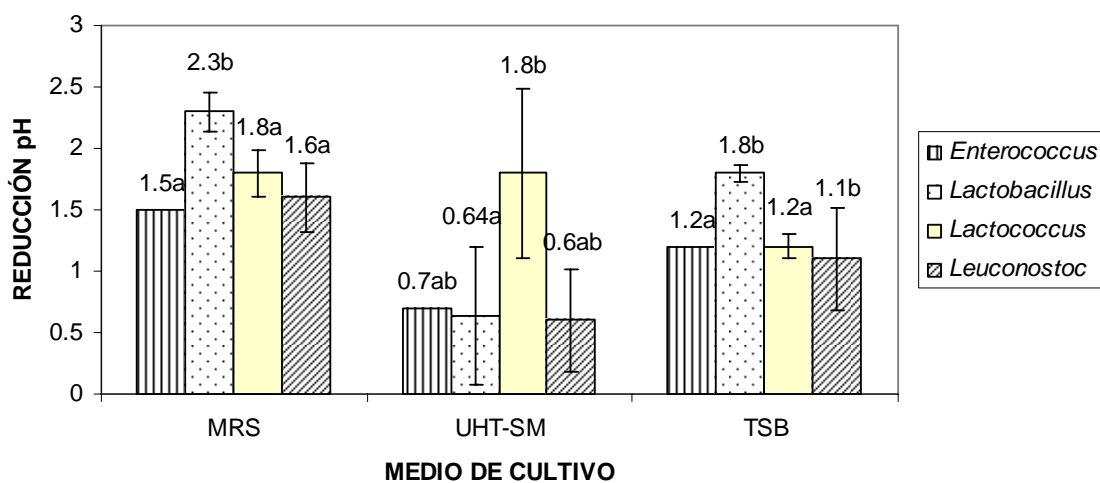


Figura 5.3. Reducción de pH en experimentos de fermentación clasificados por género y medio de cultivo. Promedios con letras diferentes son significativamente diferentes.

Se ha mostrado ampliamente que en leche la producción de ácido láctico por parte de los *Lactotoccus* es dos a tres veces superior a la producida por los *Lactobacillus* (Rosslund *et al.*, 2005). De igual manera, en los estudios de acidificación rápida (6 h de incubación) con leche UHT, las cepas de *Lc. lactis* QPII4, QPIII6 y QO14 redujeron el pH a 5.3 (6 h, 30° C) como se observa en el Cuadro 5.3. Esta propiedad es un criterio de selección para las cepas BAL que se pretenden utilizar como cultivo iniciador en fabricación de queso, de aquí la importancia de su evaluación (Cogan *et al.*, 1997; Bulut *et al.*, 2005).

La fuente de carbono en el medio de fermentación mostró tener influencia sobre la capacidad acidificante. Por ejemplo las cepas de *Lactobacillus* solo disminuyeron 0.64 unidades de pH en leche UHT (lactosa 4.8%) mientras que produjeron una disminución de 2.3 unidades de pH en MRS (glucosa 2%), a pesar de su probada capacidad de fermentar lactosa como se muestra en el Cuadro 5.3. El tipo de fuente de carbono y no solo la cantidad son factores importantes en la producción de acidez. Calderón *et al.* (2003), señalaron notables diferencias en los patrones de producción de metabolitos (etanol, ácidos láctico y acético), dependiendo del tipo de carbohidrato utilizado durante la fermentación. Cuando una bacteria es expuesta a una mezcla de fuentes de carbono, utiliza el sustrato que le proporciona el máximo crecimiento. Para tal efecto las bacterias han desarrollado un sensible sensor ambiental que les permite conocer la situación de nutrientes y ajustar su catabolismo mediante una respuesta regulatoria conocida como represión del catabolismo por fuente de carbono (RCC). Aunque el resultado final de este control es el señalado (máximo crecimiento), existen grandes diferencias en el mecanismo fino de control entre bacterias Gram negativas y Gram positivas de bajo contenido de guanina+citosina como lo son las bacterias lácticas (Leistner, 1999; Titgemeyer y Hillel, 2002).

Por lo anteriormente expuesto se considera que las cepas propuestas como cultivo iniciador deberán seleccionarse cuidadosamente de acuerdo a las fuentes de carbono de cada sistema alimenticio, teniendo en mente que se desea utilizar la producción *in situ* de ácido como parte de los métodos de barrera o bioconservación (Liu, 2003).

5.4 Cuantificación de ácidos orgánicos

La cuantificación de los principales ácidos producidos por la fermentación de las cuatro cepas con mejor actividad antimicrobiana que fueron *E. faecium* QP11, *Lb. plantarum* CC10, *Ln. mesenteroides* CH110 y *Ln. mesenteroides* PT8, se muestra en el Cuadro 5.5.

Los equivalentes de ácido láctico titulados con NaOH y las concentraciones de ácidos orgánicos coinciden en cuanto a magnitud del pH final esperado de la fermentación. Se observaron grandes diferencias en la cantidad de ácidos producidos por las cepas. La producción de acidez titulable expresada como porcentaje de ácido láctico es superior al mínimo estipulado en el Codex Alimentarius (2003) para leches fermentadas (0.3-0.7% dependiendo del tipo de producto) originado por la fermentación de bacterias lácticas. Si bien el medio de fermentación señalado en el Codex es leche y en el presente trabajo se manejó MRS, se tomó como referencia para una comparación aproximada. Las principales diferencias entre los medios son la concentración y tipo de fuente de carbono como se mencionó con anterioridad. Puede observarse que la acidez es apenas el mínimo en el caso de *E. faecium* mientras que *Lb. plantarum* prácticamente lo triplica.

Mientras que la concentración de ácido acético no mostró grandes variaciones entre las cepas, la concentración de ácido láctico sí lo hizo. *E. faecium* fue la cepa con la más baja concentración de ácido láctico mientras *Lb. plantarum* produjo casi 4 veces la concentración del *Enterococcus* y el doble o triple que las cepas de *Leuconostoc*. *Lb. plantarum* CC10 produjo 20.7 g/L de ácido láctico, prácticamente igual a los 20 g/L reportado por Leroy *et al.* (2002), para *Lb. sakei* utilizando MRS con pH controlado a 5.5.

Calderón *et al.* (2003), reportaron para *Lactobacillus fermentum* una producción de ácido láctico de 161 mM y de ácido acético de 10 mM, cuando utilizan mezclas almidón 20 g/glucosa 20 g bajo condiciones de pH controladas a 5.0 y 30°C.

Cuadro 5.5. Cuantificación de ácidos producidos mediante la fermentación de las cepas BAL seleccionadas durante 18 h, a 30° C en MRS.

CEPA	pH final	EQ. AC. LÁCTICO ^a (g/L) (%)	AC. ACÉTICO ^b (mM) (g/L)	AC. LÁCTICO ^b (mM) (g/L)
<i>E. faecium</i> QP11	4.7	6.6±0.26 0.66	70.90 ± 2.50 4.3	59.80 ± 3.65 5.4
<i>Ln. mesenteroides</i> CH110	4.6	9.75 ± 0.26 0.98	67.73 ± 3.69 4.1	114.7 ± 2.85 10.4
<i>Ln. mesenteroides</i> PT8	4.4	11.85 ± 1.1 1.19	78.87 ± 4.01 4.7	162.94 ± 12.15 14.8
<i>Lb. plantarum</i> CC10	3.6	16.7 ± 0.90 1.7	59.88 ± 1.25 3.6	228.05 ± 0.64 20.7

^aAcidez titulable

^bMedido por cromatografía de gases

Puede apreciarse que con el mismo contenido de glucosa del medio de cultivo MRS convencional, pero sin almidón, nuestro *Lb. plantarum* CC10 produjo casi el doble de ácido láctico (228.05 mM) y 5 veces más ácido acético (59.88 mM). Otra combinación de azúcares utilizada por Calderón *et al.* (2003) fue una mezcla de almidón/glucosa/fructosa en concentración final de carbohidratos igual a la anterior, a partir de la cual se obtuvo ácido láctico 125 mM y acético 31 mM, mostrando nuevamente la variación en concentraciones de ácidos orgánicos producidos, dependiendo de la fuente de carbono más que de la concentración, para la misma cepa. Sanni *et al.* (2002) reportaron para *Lb. plantarum* C5 una producción de ácido láctico de 12 g/L, casi la mitad de la producción de *Lb. plantarum* CC10, pero utilizaron 20g/L de almidón en el MRS en lugar de glucosa, para condiciones muy similares a las empleadas en nuestro estudio, sin control de pH (pH final 4.1) a 30° C.

Tanaguchi *et al.* (2004), reportaron una producción de 17 g/L de ácido láctico y menos de 1 g/L de ácido acético para *Enterococcus casseliflavus* IFO12256 a las 24 h utilizando MRS con 50g/L de xilosa como fuente de carbono, a pH controlado de 6.8. Esta cepa produjo mucho más láctico y menos acético que nuestro *E. faecium* QPI1, (5.4 g/L y 4.3 g/L respectivamente); sin embargo, era una cepa con probada capacidad para utilizar xilosa y producir ácido L-láctico, además de que las condiciones de cultivo fueron diferentes.

Diferentes estudios han mostrado que los perfiles de producción de ácidos orgánicos muestran variaciones incluso para la misma cepa cuando se modifican las fuentes de carbono (Calderón *et al.*, 2003; Rosslund *et al.*, 2005), lo que estimula a buscar medios de cultivo óptimo para cada cepa y para necesidades específicas.

5.5 Actividad inhibitoria en medio líquido contra *E. coli* EPEC y *S. aureus* 8943

Para 24 cepas BAL en estudio (restando a *E. faecium* QPI1), se demostró que la actividad antimicrobiana se debe a la producción de ácidos orgánicos (apartado 5.2) en virtud de que la actividad inhibitoria cesa cuando el pH se ajusta a 6.5. Seleccionando las 4 mejores cepas con perfiles inhibitorios se realizaron experimentos para determinar la magnitud de la inhibición de extractos de fermentación ahora en sistema líquido. Las cepas patogénicas seleccionadas han sido implicadas en brotes asociados a alimentos de tipo mexicano (DeWaal y Barlow, 2002), con el fin de comprobar en un sistema líquido su efectividad bactericida o bacteriostática.

Los resultados de la inhibición del crecimiento expresados como logaritmos de reducción a partir de 10^6 UFC/mL de microorganismos patógenos inoculados, se muestran en el Cuadro 5.6 y Figuras 5.4 y 5.5. Se incluyó un control de crecimiento en caldo TSB libre de los extractos evaluados, que representa el crecimiento óptimo del microorganismo indicador. Los números negativos indican crecimiento, es decir, aumento de la cuenta de microorganismo indicador en 1.7 ± 0.14 UFC/mL para *S. aureus* 8943 y 2.55 ± 0.12 UFC/mL para EPEC, durante las 5 h que duró el experimento. El control de viabilidad permitió verificar el comportamiento de los microorganismos indicadores en solución salina

fisiológica así como las condiciones de trabajo. El control de ácidos orgánicos permitió confirmar el efecto bacteriostático de los mismos.

Cuadro 5.6. Efecto del ELC producido por BAL en el crecimiento de 10^6 UFC/mL de *S. aureus* 8943 y *E. coli* enteropatógena (EPEC), incubadas 5 h a 37° C.

TRATAMIENTO	Log UFC REDUCIDOS ^a	
	<i>S. aureus</i> 8943	EPEC
Control de crecimiento (CST)	-1.70 ± 0.14	-2.55 ± 0.12
Control de viabilidad (sol. fisiológica)	0.45 ± 0.2	0.56 ± 0.11
Control inhibición Láctico-Acético	4.25 ± 0.49	4.30 ± 0.14
ELC <i>Lb. plantarum</i> CC10	6.20 ± 0.14	6.63 ± 0.08
ELC <i>Le. mesenteroides</i> PT8	2.85 ± 0.35	5.88 ± 0.34
ELC <i>Le. mesenteroides</i> CHII10	1.95 ± 0.07	1.45 ± 0.21
ELC <i>E. faecium</i> QPI1	3.90 ± 0.14	1.41 ± 0.01

^aLog₁₀ UFC al tiempo=0 menos log₁₀ UFC al tiempo 5 h. Los datos representan la media de tres determinaciones ± desviación estándar.

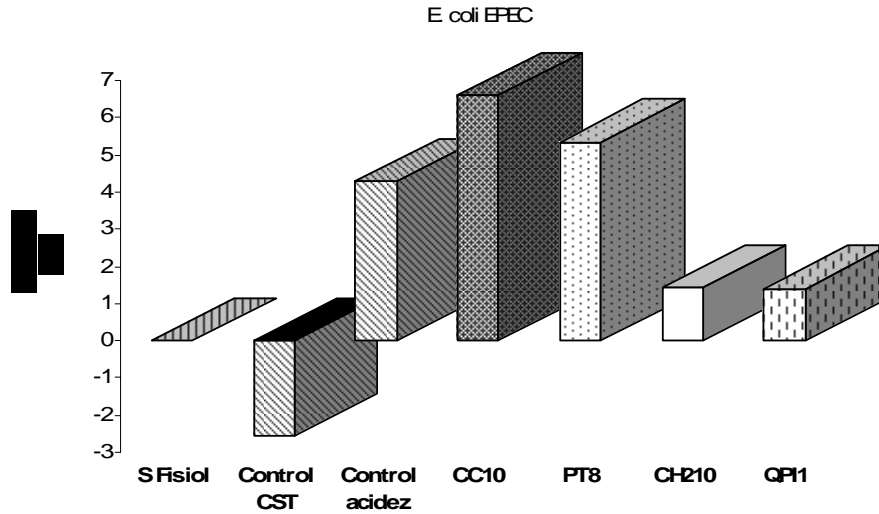


Figura 5.4. Reducción en la población de de *E. coli* EPEC (10^6 UFC/mL expresado en logaritmos) por efecto de la adición del ELC producido por 4 cepas BAL. Las tres primeras columnas representan S Fisiol: control de viabilidad, Control CST: de crecimiento, Control acidez: inhibición láctico-acético.

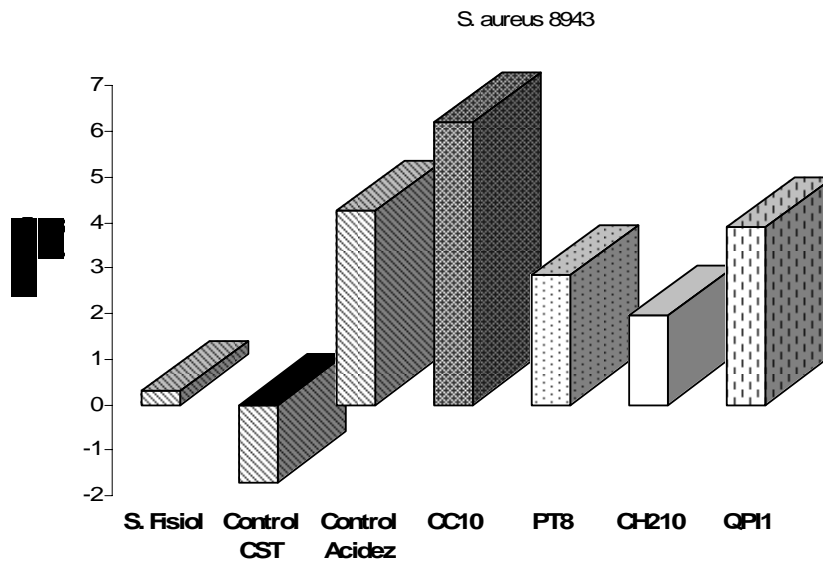


Figura 5.5 Reducción en la población de *S. aureus* 8943 (10^6 UFC/mL expresado en logaritmos) por efecto de la adición del ELC producido por 4 cepas BAL. Las tres primeras columnas representan S Fisiol: control de viabilidad, Control CST: de crecimiento, Control acidez: inhibición láctico-acético.

El ELC de *Lb. plantarum* CC10 mostró la mayor reducción al lograr inhibir al total de las UFC tanto de *S. aureus* 8943 como de *E. coli* enteropatógena. Este efecto se atribuyó tanto al menor pH (3.6) del extracto con elevada concentración de ácidos orgánicos no disociados, como a la mayor producción de ácidos orgánicos (16.7 g/L equivalentes de ácido láctico) (Cuadro 5.5). Los resultados coinciden con los mostrados por Mufandaedza *et al.* (2006) que reportaron completa inhibición de los 7 log₁₀ UFC/mL de *E. coli* 3339 (obtenida de un brote en alimentos), inoculados en leche previamente fermentada con *L. lactis* Lc261 o *L. lactis* C1 (aisladas de productos tradicionales fermentados de leche en Zimbabwe), después de 24 h. El experimento se llevó a cabo a 25° C, hecho de que sea en leche previamente fermentada simula los experimentos aquí presentados, la diferencia en nuestro experimento es que no había células de *Lb. plantarum* CC10 y se utilizaron condiciones de crecimiento óptimas para patógenos (37° C). Aquí se mencionan las diferencias en la susceptibilidad de los microorganismos patógenos comparándose los encontrados como flora asociada con los procedentes de muestras clínicas que resultan más resistentes. En los experimentos realizados durante la presente investigación, se utilizaron algunos patógenos provenientes de brotes ocasionados por alimentos, como fue confirmado por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Querétaro. La actividad inhibitoria representó un logro importante ya que se observó con el extracto libre de células productoras sin modificación del pH; en este punto se considera probable que la presencia de las células BAL mejore la actividad mostrada.

El pH final de los ELC tiene gran influencia en la actividad mostrada, toda vez que es la forma no disociada del ácido orgánico la que posee actividad antimicrobiana. Por tal motivo se requiere que el pH final del medio sea menor que el pKa del ácido para tener mayor proporción en forma no disociada y por tanto activa. El ácido láctico tiene un pKa = 3.1 y el ácido acético tiene un pKa de 4.8, por lo que para alimentos de baja acidez (pH>4.6) el ácido acético tendrá un efecto bactericida mayor que el láctico a la misma concentración. El Cuadro 5.7 ilustra este efecto con la proporción de ácido no disociado para los ELC producidos.

Cuadro 5.7. Comparación de la concentración de ácidos no disociados para cada uno de los ELC producidos, en función del pH y su pKa.

Cepa productora del ELC	pH final	ACIDO ACÉTICO (mM)	Ac. acético no disociado	ACIDO LÁCTICO (mM)	Ac. láctico no disociado	Total de ácidos no disociados (mM)
<i>E. faecium</i> QPI1	4.7	70.90	56% (39.7 mM)	59.80	2% (1.2 mM)	40.9
<i>Ln. mesenteroides</i> CH210	4.6	67.73	61% (41.3 mM)	114.7	3% (3.4 mM)	44.7
<i>Ln mesenteroides</i> PT8	4.4	78.87	72% (56.8 mM)	162.94	5% (8.1 mM)	64.9
<i>Lb. plantarum</i> CC10	3.6	59.88	94 % (56.3 mM)	228.05	24% (54.7 mM)	111.0

Se observó una alta reducción en la cuenta de células tratadas con ELC de la cepa PT8 sobre EPEC ($5.9 \log_{10}$, Cuadro 5.6) incluso muy lejana del comportamiento de la cepa CH210 (reducción de $1.5 \log_{10}$). Los resultados mostrados por CH210 se atribuyeron al porcentaje de ácido no disociado, a los valores indicados de pH (Cuadro 5.7), el cual muestra cómo es superado en 30% por PT8, a pesar de su similar pH.

Llama la atención el gran contraste en el efecto logrado por el ELC de la cepa *E. faecium* QPI1, que redujo casi $4 \log_{10}$ UFC/mL de *S. aureus* 8943 contra solo $1.4 \log_{10}$ UFC/mL de EPEC (Cuadro 5.6, Figura 5.5), rompiendo con el esquema mostrado por los otros extractos cuyo efecto inhibitorio estuvo asociado a la concentración de ácidos orgánicos. Esta cepa fue la que mostró la menor concentración de ácidos orgánicos con solo 130 mM, contra 182.0-287.9 mM de las demás cepas. Incluso el ácido láctico fue solo la cuarta parte del producido por la cepa CC10; asimismo el pH final fue el más alto respecto de los otros extractos (4.7) y por tal motivo la concentración de ácidos no disociados fue la

menor de todas las cepas. Sin embargo, este extracto logró un efecto inhibitorio sobresaliente contra *S. aureus*, el cual solo fue superado por el extracto CC10. Esto se atribuyó al efecto de otros compuestos presente en el extracto, como fueron las bacteriocinas (sección 5.13).

Se ha postulado que algunas cepas BAL producen también H₂O₂ sin embargo Rodríguez *et al.* (1997) demostró que dicho compuesto no es estable en MRS, medio seleccionado para la producción de los extractos empleados en el presente estudio, por lo que en caso de haberse producido no se observó su efecto.

Las diferencias centrales entre los experimentos realizados en medio sólido (método del botón apartado 5.2) y el estudio recién presentado del apartado 5.5 en medio líquido son que en el primero las células BAL productoras de los compuestos antimicrobianos estaban presente, por tal motivo los resultados solo podrían aplicarse en procesos de fermentación activa con iniciador. Por el contrario, en los experimentos en sistema líquido se evaluaron extractos libres de células lo que permitiría prescindir de la cepa BAL y utilizarse en alimentos no fermentados.

5.6 Actividad inhibitoria en medio líquido contra diferentes cepas de *L. monocytogenes*

Los resultados de la actividad de ELCC producido por *E. faecium* QPI1 contra 5 log₁₀ UFC/mL de *L. monocytogenes* Scott A a pH 5.0 y 6.0, a lo largo de 7 h comparada con un control de crecimiento sin ELCC se muestra en la Figura 5.6. El efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* Scott A se observó a ambos valores de pH evaluados, aunque a pH 5.0 la actividad fue notablemente mayor con 4 log₁₀ de reducción contra 2.4 log₁₀ a pH 6.0 al final de las 7 horas. La mayor reducción en la cuenta viable del microorganismo indicador a pH ácido concuerda con lo reportado para enterocina EFS2 (Maisnier *et al.* 1996).

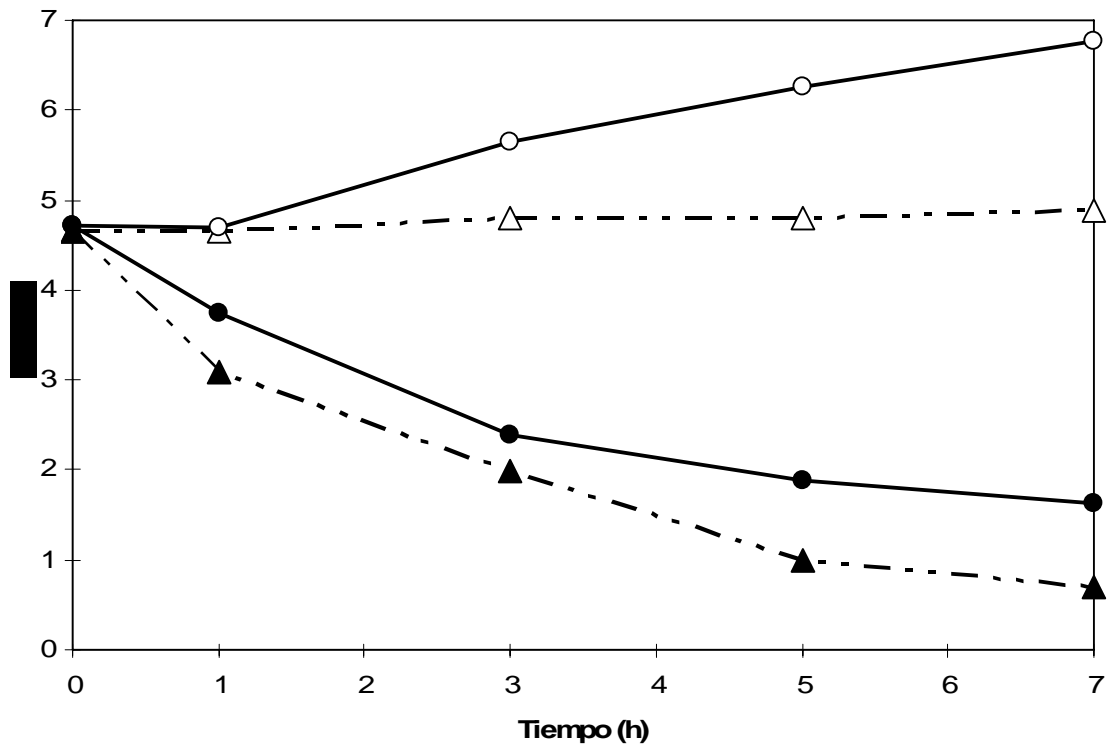


Figura 5.6 Efecto del extracto libre de células concentrado de QPI1 (ELCC) sobre *L. monocytogenes* Scott A (10^5 UFC/mL) a pH 5.0 (▲) y 6.0 (●), durante 7 h. Los controles de crecimiento consistieron en en mismo número de UFC/mL sin adición del ELCC, se muestran con íconos blancos pH 5.0 (△), pH 6.0 (○).

El efecto de dos concentraciones del ELCC producido por *E. faecium* QPI1, frente a $7 \log_{10}$ UFC/mL de la cepa *L. monocytogenes* 7644 y la cepa *L. monocytogenes* Scott A utilizando leche descremada se aprecia en las Figuras 5.7 y 5.8. Para la cepa *L. monocytogenes* Scott A se observó una reducción de $3.0 \log_{10}$ UFC/mL con la adición de 1600 UA/mL del ELCC y de $6.5 \log_{10}$ UFC/mL con la adición de 3200 UA/mL del ELCC. Para *L. monocytogenes* 7644 se observó una reducción de $4.9 \log_{10}$ UFC/mL con la adición

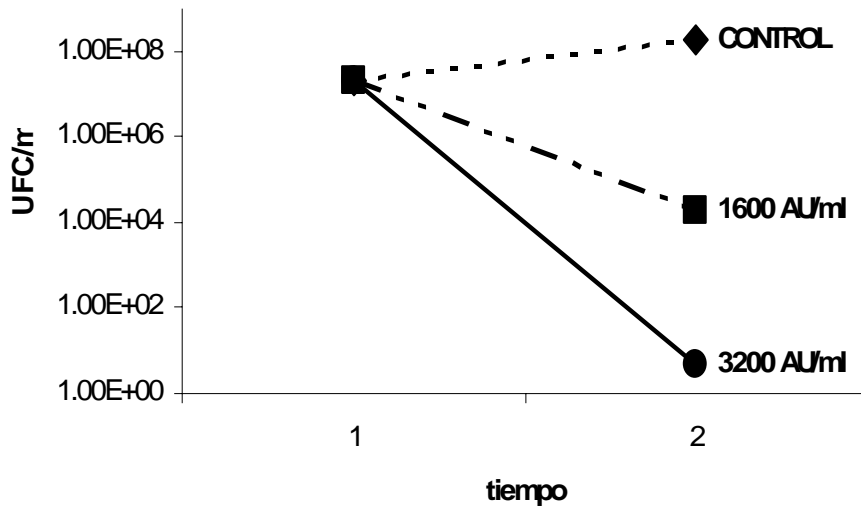


Figura 5.7. Efecto del extracto libre de células concentrado de QPI1 (ELCC) sobre $7 \log_{10}$ UFC/mL de *L. monocytogenes* Scott A, en leche descremada después de 16 h de incubación a 37° C.

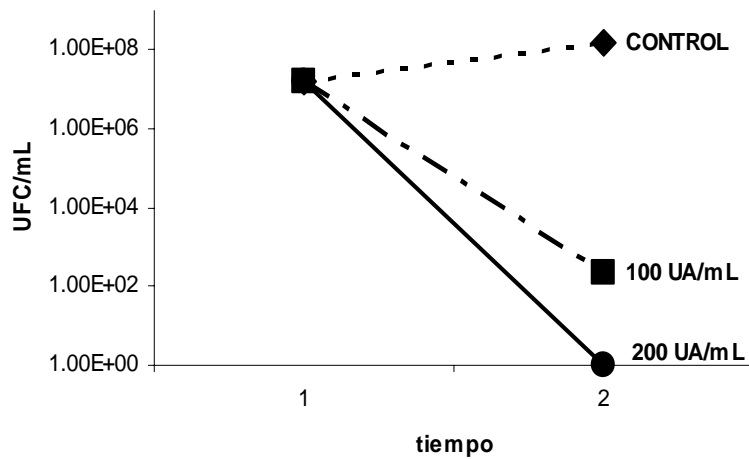


Figura 5.8. Efecto del extracto libre de células concentrado de QPI1 (ELCC) sobre $7 \log_{10}$ UFC/mL de *L. monocytogenes* 7644, en leche descremada después de 16 h de incubación a 37° C.

de 100 UA/mL del ELCC y de 7 log₁₀ UFC/mL con la adición de 200 UA/mL del ELCC.

En este experimento destaca la capacidad del ELCC de *E. faecium* QPI1 por inhibir cepas de *L. monocytogenes* de diverso origen ya que se evaluaron tanto la cepa más susceptible como la más resistente de la colección, por lo que se infiere que cepas de susceptibilidad intermedia quedarían incluidas. La amplia actividad antimicrobiana de enterocinas contra cepas de *L. monocytogenes* ha sido previamente reportada (Kramer, 1977; Ennahar *et al.* 2000a; Elotmani *et al.* 2002). *L. monocytogenes* Scott A fue la cepa más resistente como se aprecia en la Figura 5.7 por la elevada concentración del ELCC QPI1 (3000 UA/mL) que se adicionó para obtener el efecto inhibitorio, concentración 16 veces superior a lo aplicado para la cepa 7644 (60 UA/mL). Esta elevada resistencia de la cepa Scott A coincide con lo observado por McAuliffe *et al.* (1999) y Vignolo *et al.* (2000).

Un hallazgo destacado es la persistencia de actividad en un sistema modelo complejo como la leche, ya que se ha reportado disminución de la actividad inhibitoria en experimentos realizados en alimentos cuando se comparan con medios de cultivo (Saratinopoulos *et al.*, 2002; Foulquié *et al.*, 2003b).

5.7 Sensibilidad de cepas seleccionadas a antimicrobianos

Como se mencionó en el apartado 2.7 y de acuerdo a las recomendaciones internacionales (FAO/OMS, 2001), es imprescindible que aquellas cepas que pretenden ser empleadas en alimentos, no contengan genes transmisibles que le confieran resistencia a antibióticos de uso clínico. Es así que como parte de los estudios de inocuidad de las 4 cepas BAL con mejor capacidad inhibitoria, se incluyeron los perfiles de resistencia antimicrobiana a antibióticos que se muestran en el Cuadro 5.8.

Se evaluaron 19 antibióticos de uso clínico de los cuales se observaron sólo 2 a 3 resistencias por parte de las cepas de *Lb. plantarum* CC10, *Ln. mesenteroides* CH110 y *Ln. mesenteroides* PT8, perfil que es bastante aceptable. En contraste *E. faecium* QPI1 fue resistente a 9 antibióticos, casi el 50% de los evaluados (Cuadro 5.8).

Cuadro 5.8. Susceptibilidad de BAL a antibióticos en placa mediante empleo de sensidiscos de acuerdo a la NCCLS.

ANTIBIÓTICO	<i>E. faecium</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>Lb. plantarum</i>
	QPI1	PT8	CH210	CC10
Amikacina 30 µg	R	S	S	I
Amoxicilina 30 µg	S	S	S	S
Ampicilina 10 µg	S	S	S	S
Carbenicilina 100 µg	S	S	S	S
Cefotaxima 30 µg	S	S	S	S
Ceftazidima 30 µg	R	I	S	S
Cefuroxima 30 µg	R	S	S	S
Cloramfenicol 30 µg	S	S	S	S
Cloxacilina 1 µg	R	R	R	R
Eritromicina 15 µg	R	S	S	S
Gentamicina 10 µg	R	I	S	S
Lincomicina 2 µg	R	S	R	S
Neomicina	I	S	S	I
Netilmicina 30 µg	R	S	I	S
Nitrofurantoina 300 µg	S	R	S	S
Penicilina 10 U/IE	S	S	S	S
Rifampicina 5 µg	S	S	S	S
Tetraciclina 30 µg	S	S	S	S
Trimetoprim 1.25 µg	R	R	R	R
Sulfametoxazol 23.75 µg				

S: susceptibles diámetro de inhibición \leq 12 mm

R: resistentes diámetro \geq 8 mm

I: intermedios diámetro entre 13-17 mm

E. faecium QPI1 mostró resistencia a aminoglucósidos (amikacina, gentamicina y netilmicina) lo cual puede ser normal debido a que dichos antibióticos se prescriben principalmente para Gram negativas. También a algunas cefalosporinas como ceftazidima y cefuroxima pero dichos antimicrobianos no están indicados para enterococos. Lincomicina (familia de la lincosamida) es un antibiótico que no está indicado contra bacterias Gram positivos y específicamente se sabe que no es activa contra cepas de *E. faecalis*.

También debe destacarse que fue sensible a ampicilina (penicilina) y cloramfenicol que son los antibióticos de elección en el caso de enterococos y microorganismos Gram negativos que afectan el tracto gastrointestinal como *Salmonella*, *Shigella sp.* y *H. influenza*. Puede observarse que la cepa si bien muestra un perfil de mayor resistencia que las cepas de *Leuconostoc* y *Lactobacillus* evaluados, es sensible a buen número de antibióticos de elección para su categoría (Mensa *et al.*, 1995).

El *Enterococcus* es un caso particular dado que este microorganismo se ha asociado a enfermedades nosocomiales. Por tal motivo además de la determinación de su perfil de resistencia a antibióticos utilizando sensidiscos, se incluyeron otras evaluaciones tales como: sensibilidad a vancomicina en medio líquido, búsqueda del gen que codifica para citolisinas por métodos moleculares y capacidad de hemólisis en placas de agar de acuerdo a lo sugerido por De Vuyst *et al.* (2003).

La cepa de *E. faecium* QPI1 fue sensible a todas las concentraciones de vancomicina evaluadas: 64, 32, 16, 8, 4 y 2 mg/mL. La búsqueda de citolisina mediante el empleo de los iniciadores reportados por De Vuyst *et al.*, (2003) resultó negativa, como se aprecia en la Figura 5.35 carril Cyl.

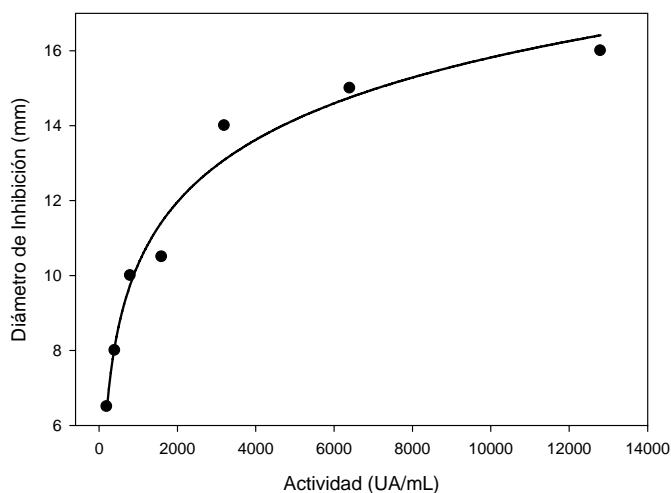
E. faecium QPI1 no produjo hemólisis (γ -hemólisis) cuando se utilizó agar sangre humana, mientras que fue α -hemólisis en agar sangre de cordero. El control de *L. monocytogenes* 10403S mostró β -hemólisis como se esperaba.

E. faecium QPI1 aún cuando mostró un perfil de resistencia relativamente alto, fue susceptible a vancomicina, no mostró β -hemólisis y no contiene codificada la información

para citolisinas, todas éstas características mínimas indispensables para seguirla considerando para utilización en alimentos. Para su selección final deberá comprobarse que no transfiere la información de resistencia a antibióticos como recomienda FAO/OMS (2001).

5.8 Cuantificación de la actividad antimicrobiana por difusión en agar

La Figura 5.9 muestra la curva de actividad antimicrobiana en donde se muestra el efecto de la concentración de bacteriocina en función de los diámetros de inhibición, empleando la técnica de difusión en agar monocapa, empleando *L. monocytogenes* 7644 como microorganismo indicador y adicionando 5 µL de extracto. Esta curva fue empleada para calcular la actividad, a través de la medición del diámetro de inhibición, durante la purificación de bacteriocinas.



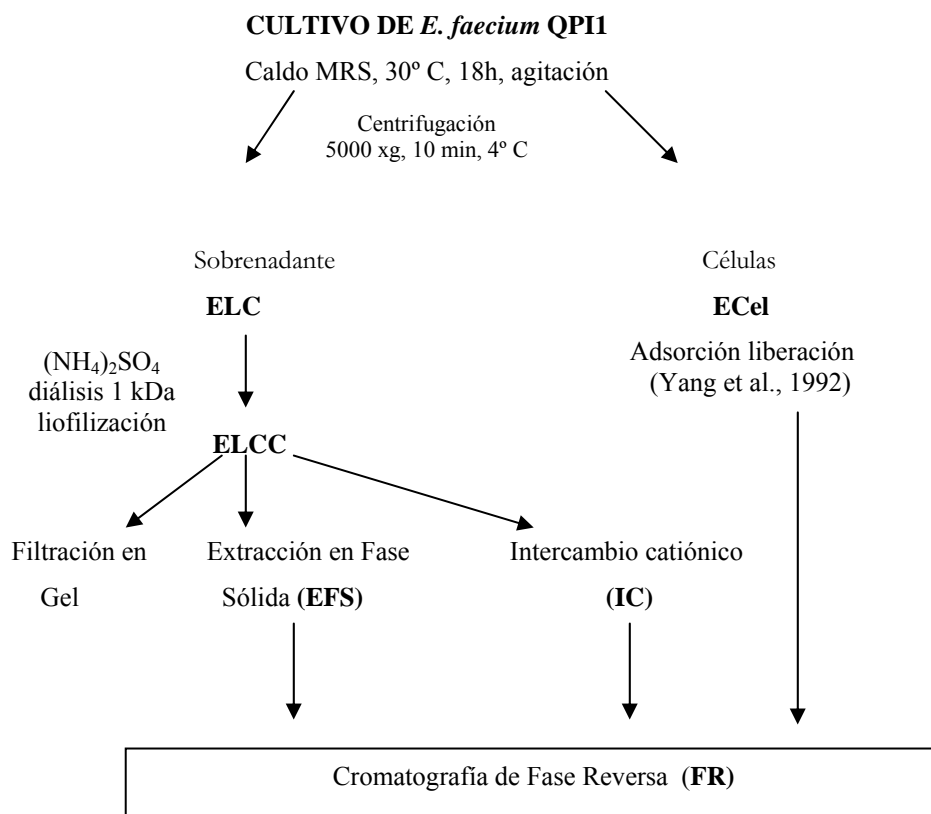
$$\text{Ecuación de mejor ajuste: } D \text{ (mm)} = -6.248 + 2.396 * \ln (\text{UA/mL}); R^2 = 0.9698$$
$$\text{UA/mL} = \exp [(D + 6.248)/2.396]$$

Figura 5.9 Curva de actividad antimicrobiana construida con el diámetro de inhibición originada por 5 µL del ELCC QPI1 y utilizando *L. monocytogenes* 7644 como microorganismo indicador.

5.9 Extracción de bacteriocinas de la cepa *E. faecium* QP11

El ELC producido por *E. faecium* QP11 mostró una gran capacidad de inhibición de microorganismos Gram positivos como se muestra en el Cuadro 5.1 y en la sección 5.7. La actividad antimicrobiana no estuvo asociada a producción de ácidos orgánicos como se demostró en la sección 5.4. La caracterización de los compuestos antimicrobianos inició con los trabajos de Alvarado (2003), donde se demostró que se trataba de compuestos de naturaleza protéica en base a la pérdida de actividad con la adición de enzimas proteolíticas y resistencia a tratamientos térmicos.

A partir de esta información se diseñó un esquema de purificación de bacteriocinas que se muestra simplificado en el siguiente esquema:



5.10 Extracción de bacteriocinas por adsorción-desorción en células

Los resultados del rendimiento de extracción de las bacteriocinas, por el método de absorción-desorción con células medido como la actividad inhibitoria, se muestra en el Cuadro 5.9. Éstos son los resultados de dos ciclos de extracción consecutivos con las mismas células. Se obtuvo menos de 0.5 % de rendimiento sumando ambas extracciones, con un incremento de 3.5 veces la actividad inicial del sobrenadante. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Parente y Riccardi (1999), quienes señalaron que cuando la concentración de bacteriocinas es muy elevada, la capacidad de las células para recuperarlas es limitada.

Yang *et al.* (1992), reportaron la extracción de diferentes bacteriocinas (nisina, pediocina AcH, sakacina A y leuconocina LCM1) mediante el método de adsorción-desorción, señalando rendimientos de entre 93-100%. Eguchi *et al.* (2001), reportaron la extracción de enterocina SE-K4 (clase IIa) mediante este método, reportando un rendimiento de 107% para este paso. Schneider *et al.* (2006), también utilizaron este método como paso inicial de la purificación de pediocina A1 (clase IIa), reportando una actividad 150 veces la del sobrenadante inicial, pero esto se logró realizando la adsorción-desorción en un número no especificado de ciclos repetitivos, sobre el mismo sobrenadante. De acuerdo a nuestros resultados el método de Yang *et al.* (1992) aplicado al presente trabajo no puede considerarse como única etapa de purificación, ya que el extracto semi-purificado mostró 9 bandas de proteínas de diferente peso molecular (Figura 5.10), con un rendimiento muy pobre (Cuadro 5.9).

La Figura 5.11 muestra la cromatografía de fase inversa (HPLC-FR) realizada al extracto obtenido por el método de absorción-desorción con células, en donde se observan tres picos con actividad.

Ver anexo

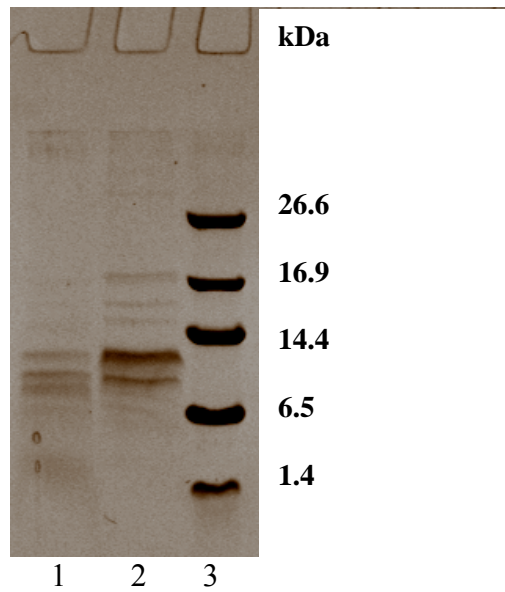


Figura 5.10. SDS-PAGE de la semipurificación por el método de adsorción-desorción (Yang *et al.*, 1992). Carriles: 1) Primer ciclo de extracción; 2) Segundo ciclo de extracción; 3) Marcador de peso molecular BIO-RAD.

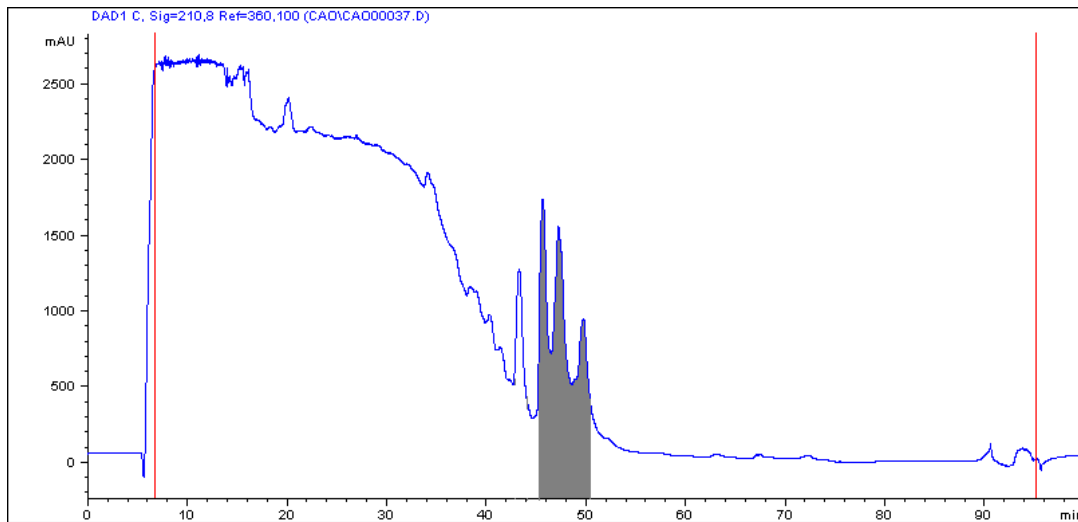


Figura 5.11. HPLC del primer ciclo de extracción de bacteriocinas mediante el método de adsorción-desorción. Los tres picos grises presentan actividad individualmente. Condiciones CAO-5.M: 1) 0 a 60 min, 0-70% B, 2) 60 a 65 min, 70-100 % B, 3) 65 a 80 min, 100% B, 4) 80 a 85 min, 100- 0% B, 5) 85 a 100 min, 0% B.

5.11 Precipitación con sulfato de amonio.

El rendimiento de extracción de bacteriocinas por el método de precipitación con 80% de sulfato de amonio, después de resuspender y dializar el precipitado fue de casi el 80% de la actividad inicial (Cuadro 5.10). Una evaluación de la actividad remanente en el extracto resultante de la precipitación fue negativa. El rendimiento final de actividad después de liofilizar el extracto fue del 75%, y se le denominó extracto libre de células concentrado (ELCC).

Este rendimiento es alto ya que en general se han reportado rendimientos de 10-50% en las precipitaciones con sulfato de amonio para las bacteriocinas (Uteng *et al.*, 2002). El principal problema es la recolección de agregados que después de centrifugar flotan y su colección es complicada.

5.12 Cromatografía de filtración en gel.

El ELCC se sometió a cromatografía de filtración en gel mediante Sephadex G-25, obteniéndose el cromatograma de la Figura 5.12. el cual presentó dos picos, uno pequeño casi al inicio y otro mucho más definido, conteniendo la mayor parte de la actividad inyectada. Las fracciones 16-20 presentaron tanto mayor actividad antimicrobiana como proteína, pero desafortunadamente también son las que presentaron pigmentos cafés a simple vista, ocasionando una pobre separación electroforética (Figura 5.13, carriles 1 y 4). Hasta el momento de obtener el ELCC, y después de la cromatografía de filtración en gel, el principal problema fue la presencia de pigmentos café oscuro en las fracciones con mayor actividad, la cuales ocultaban las bandas de interés después de la electroforesis, por lo que prácticamente no se obtuvo ningún avance relevante con dicha cromatografía.

Yamamoto *et al.* (2003) reportaron una cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-50 usando un extracto con dos bacteriocinas, pero no consiguieron separarlas. Su cromatograma también mostró un pico al inicio de la cromatografía (después de un tiempo de retención de 10 min). Estos autores concluyeron que ambas bacteriocinas sufrían agregación por lo que adicionaron Tween 80 y consiguieron visualizarlas. Sin embargo, la adición de Tween 80 limita purificaciones posteriores por el riesgo de

Ver anexo

interferencias en los equipos de HPLC y masas por lo que se decidió abandonar éste método.

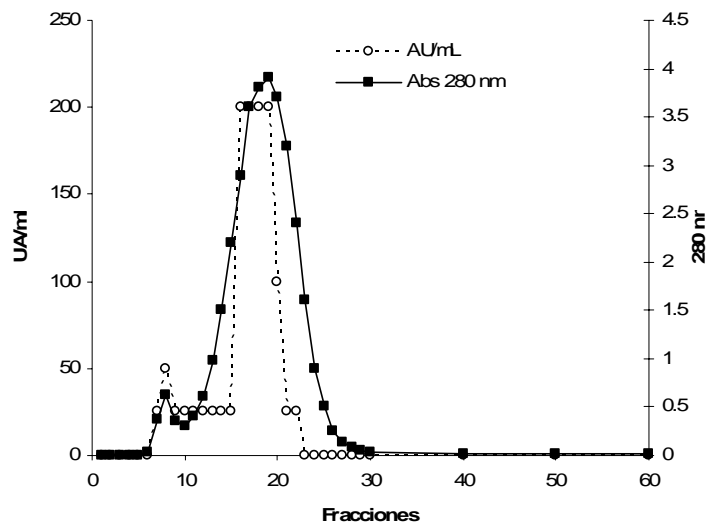


Figura 5.12. Cromatografía de filtración en gel mediante Sephadex G-25. El buffer de elusión fue 0.1 M de acetato de sodio ($C_2H_3O_2Na$) pH 3.6, a flujo de 0.1 mL/min.

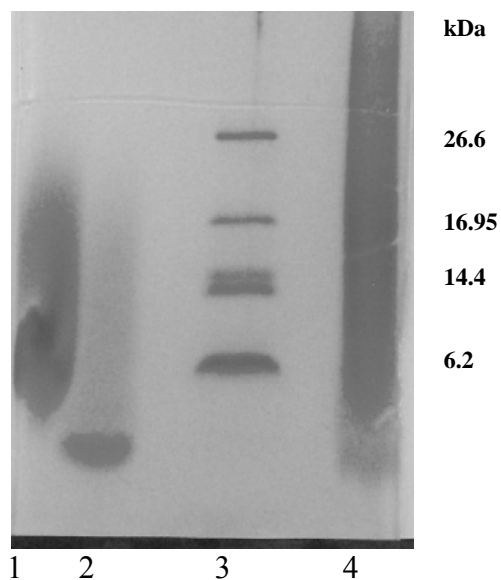


Figura 5.13. SDS-PAGE de la cromatografía de filtración en gel mediante Sephadex G-25. Carriles: 1) Filtración gel fracción 20 ; 2) Extracción en fase sólida con SepPack C18 (elusión 80% isopropanol); 3) Marcadores de peso molecular Amersham; 4) Filtración en gel fracción 16.

5.13 Extracción en fase sólida con cartuchos SepPak C18

La selección del protocolo de elución para las presuntas bacteriocinas (de aquí en adelante denominadas enterocinas) producidas por la cepa QPI1, utilizando cartuchos de SepPak C18, consistió en una secuencia de adición de los siguientes eluyentes iniciando con el de mayor polaridad (P') (Weston y Brown, 1997): acetonitrilo ($P'=5.8$), metanol ($P'=5.1$), etanol ($P'=4.3$), e isopropanol ($P'=3.9$). Se inició con una concentración del 50% (v/v) y después del 100% (v/v), sobre la muestra de ELCC. La cuantificación de la actividad antimicrobiana extraída en cada una de las fracciones permitió establecer el protocolo que se denominó SP5, a partir del cual se obtuvieron diferentes fracciones activas (Cuadro 5.11).

El cromatograma de las fracciones resultantes de la separación del ELCC aplicando el protocolo SP5 se observa en la Figura 5.14 y la correspondiente electroforesis desnaturizante de dichas fracciones se muestra en la Figura 5.15. Se observaron bandas de la proteína inicial inyectada a los cartuchos de extracción (1 mL con 7.65 mg/mL de proteína), que después de una concentración por centrifugación al vacío, se recuperaron 4.9 mg/mL equivalentes a 64% de la proteína. De la actividad inicial total de 12,800 UA, solo 1,035 UA/mL se recuperaron, equivalente al 8% de actividad.

Se consideró que este fraccionamiento condujo a pérdidas elevadas de actividad antimicrobiana, ya que se esperaba que los cartuchos efectuaran una separación de proteína basada en sus características de hidrofobicidad, pero sin afectar la actividad. Se efectuaron pruebas previas para evaluar que el solvente no afectara la actividad biológica. Aún así, la actividad recuperada después del fraccionamiento no mostró la potencia habitual observada en el ELCC, apareciendo como halo de inhibición difuso con inclusión de colonias resistentes dentro del halo de inhibición como se observa en la Figura 5.16. Se observó que utilizando 40% de isopropanol como eluyente, se obtuvo una actividad específica elevada, mientras que al aumentar el porcentaje de isopropanol, se obtenía un descenso en la misma y finalmente elevación de la actividad específica hacia el 70% de isopropanol (Figura 5.14).

Cuadro 5.11. Rendimiento para la extracción en fase sólida de enterocinas utilizando cartuchos SepPak C18 de acuerdo al protocolo de extracción SP5.

ETAPA DE PURIFICACIÓN	VOLUMEN (mL)	ACTIVIDAD (AU/ml)	ACTIVIDAD TOTAL (AU)	PROTEINA (mg/mL)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA UA/mg
ELCC	1.0	12,800	12,800	7.65	1673
SepPak					
Fracción 1, Acuosa	0.5	0	0	1.40	0
Fracción 2, 30% isopropanol	0.5	0	0	0.02	0
Fracción 3, 30% Isopropanol	0.5	0	0	0.82	0
Fracción 4, 30% isopropanol	0.5	0	0	0.85	0
Fracción 5, 40% isopropanol	0.5	200	100	0.56	360
Fracción 6, 50% isopropanol	0.5	200	100	1.78	113
Fracción 7, 60% isopropanol	0.5	200	100	2.13	94
Fracción 8, 60% isopropanol	0.5	200	100	1.08	185
Fracción 9, 70% Isopropanol	0.5	535	568	0.61	877
Fracción 10, 80% Isopropanol	0.5	133	67	1.26	106
Fracción 11, 100% isopropanol	0.5	0	0	0.30	0

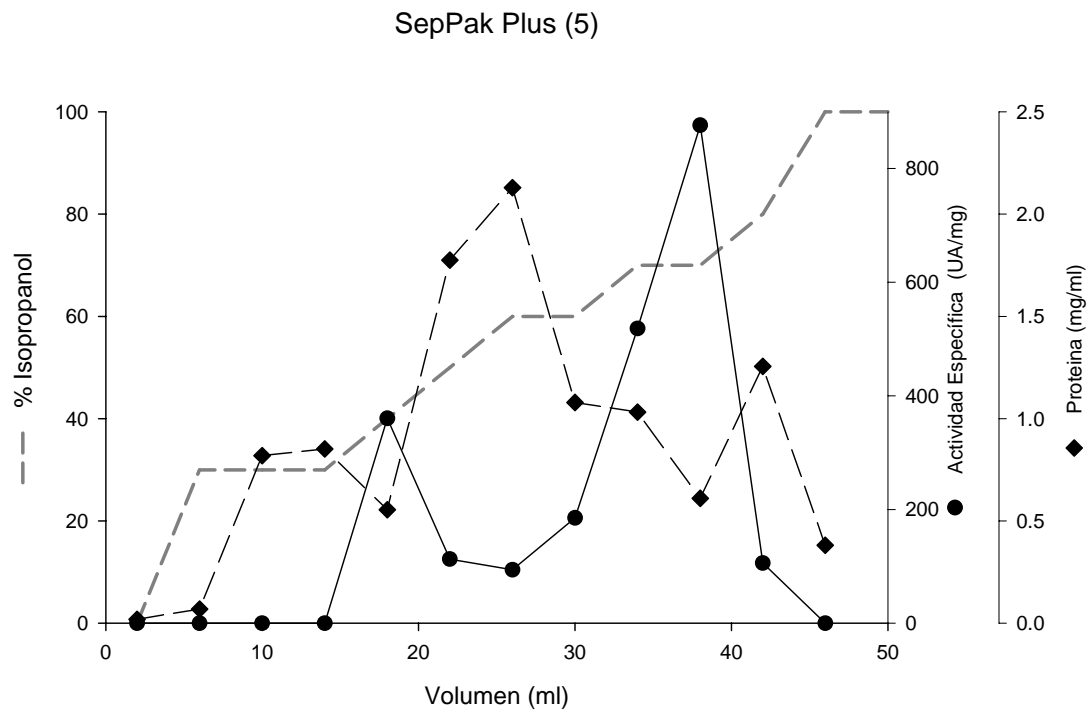


Figura 5.14 Cromatograma de la extracción en fase sólida de enterocinas utilizando cartuchos SepPak C18 de acuerdo al protocolo de extracción SP5.

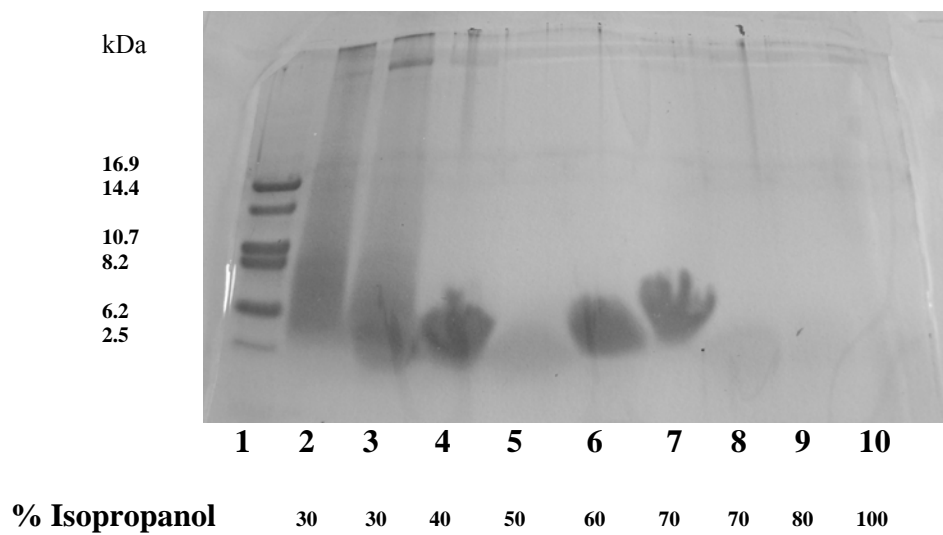
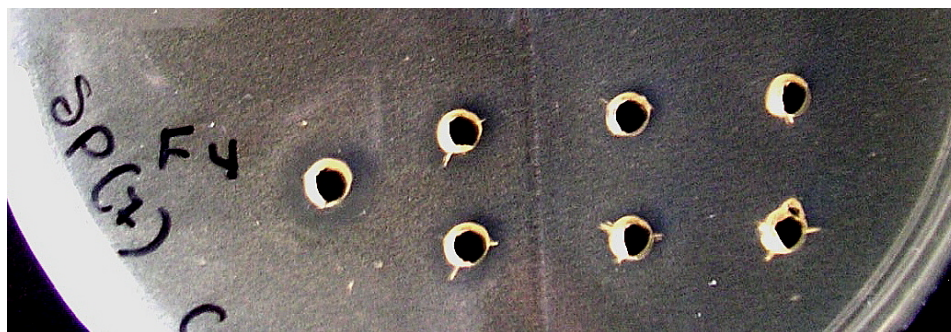


Figura 5.15. Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del cartucho SepPak C18 utilizando el protocolo SP5. Carril 1 marcador de peso molecular (Amersham).

a)



b)

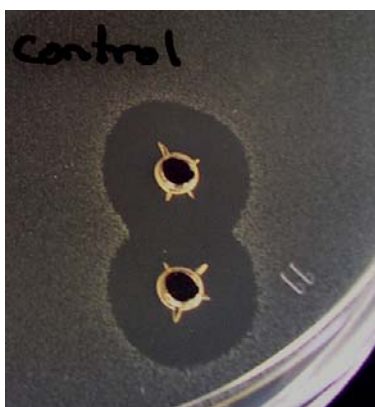


Figura 5.16. Diferencias en la intensidad de resultados para la cuantificación de actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas por extracción en fase sólida utilizando solo una fracción. a) SepPak C18 fracción 4 sola, b) ELCC como control.

De manera paralela, la electroforesis desnaturalizante de la Figura 5.15 muestra la presencia de una banda asociada a proteína en la fracción de isopropanol al 40% y otra entre el 60-70%. En base a los resultados del Cuadro 5.11, se simplificó el protocolo de extracción y se denominó SP7 al nuevo protocolo. La secuencia de la extracción se llevó a

cabo en cuatro etapas: F1) lavado con H₂O, F2) primer lavado con isopropanol 40%, F3) segundo lavado con isopropanol 40% y F4) isopropanol 90%.

Una vez simplificado el protocolo de extracción, se realizaron experimentos de mezcla de fracciones obtenidas con el protocolo SP7. El objetivo de esta mezcla consistió en evaluar la posibilidad de sinergismo en la actividad de algunas de las fracciones, que permitiera explicar la pérdida del 70% de actividad total, además de la baja definición en la evaluación de su potencia. El Cuadro 5.12 muestra las combinaciones realizadas y los resultados obtenidos, mientras que la Figura 5.17 muestra los halos de inhibición observados con dichas mezclas.

La mezcla de fracciones permitió confirmar lo que se sospechaba, la actividad antimicrobiana aparece cuando dos de las fracciones se mezclaron (Figura 5.17). Debido a que la extracción en fase sólida separó las fracciones de interés con efecto sinérgico en su actividad no se observaba actividad en las fracciones individuales. Las fracciones potencialmente activas fueron la (F2) primer lavado con isopropanol al 40% (v/v) (I40), y la (F4) isopropanol 90% (v/v) (I90). Por tal motivo, en la estrategia de purificación subsiguiente las evaluaciones de actividad se realizaron tanto de los extractos solos, como en presencia de la fracción complementaria, como se muestra en la Figura 5.18. El rendimiento de actividad cuando se considera mezcla de fracciones se muestra en el Cuadro 5.13. De la proteína inicial se logró la recuperación del 70% de la inicial, tomando en cuenta todas las fracciones, mientras que de actividad se recuperó el 64%, lo cual contrasta favorablemente con el 8% recuperado cuando no se mezclaron fracciones en la evaluación de actividad.

Cuadro 5.12. Halo de inhibición resultante de la mezcla de fracciones obtenidas de la separación del ELCC con cartuchos SepPack C18, mediante el protocolo SP7.

	F2 1 ^{er} lavado isopropanol 40%	F3 2 ^o lavado isopropanol 40%	F4 isopropanol 90%
F1 H ₂ O	NEGATIVO ^a	NEGATIVO	NEGATIVO
F2 1 ^{er} lavado isopropanol 40%		NEGATIVO	POSITIVO ^b
F3 2 ^o lavado isopropanol 40%			NEGATIVO

^ahalo de inhibición negativo

^bhalo de inhibición positivo

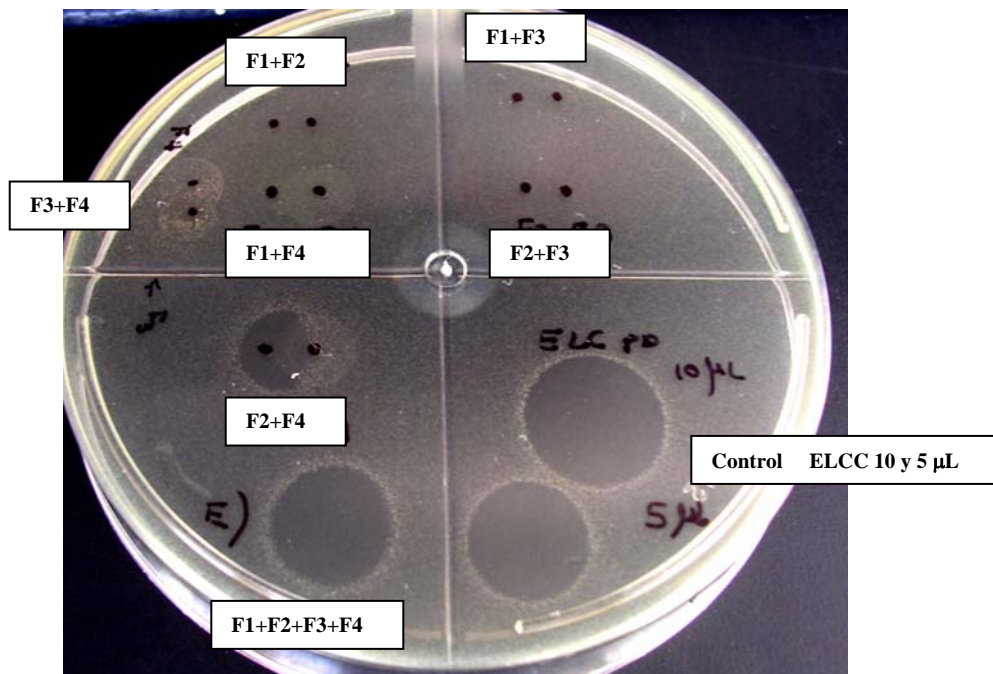


Figura 5.17. Evaluación por difusión en agar de la mezcla de fracciones obtenidas con cartuchos SepPack C18 mediante el protocolo SP7. Dentro de los marcos se indica las fracciones mezcladas.

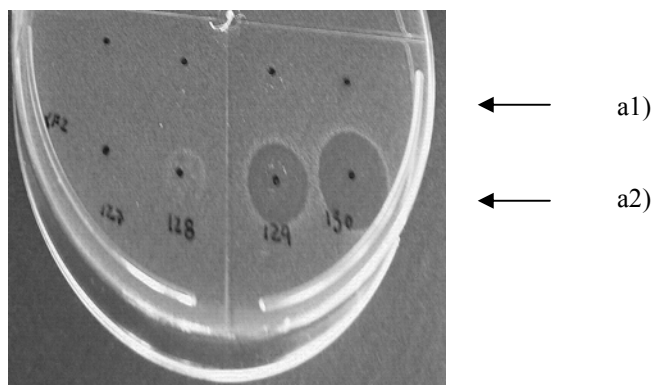


Figura 5.18. Evaluación de actividad antimicrobiana mediante mezcla de fracciones, las fracciones a evaluar se colocan en el punto marcado. a1) fracción sola, a2) fracción adicionando SP I40.

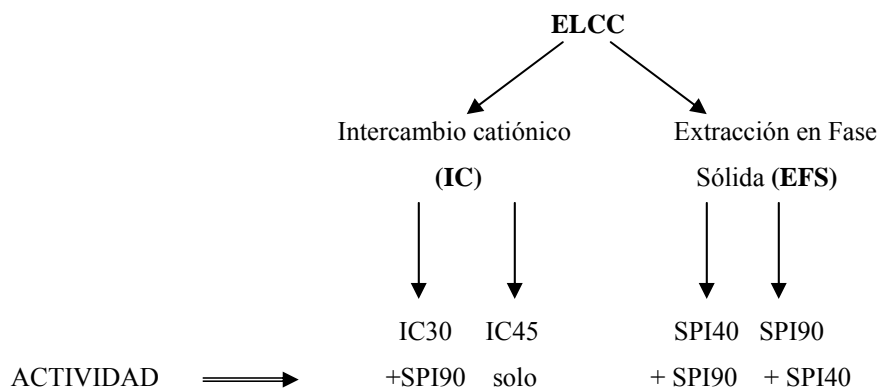
Ver anexo

Cintas *et al.* (2000), Eguchi *et al.* (2001) y Wilaipun *et al.* (2004) han reportado buenos resultados en el empleo de extracción en fase sólida utilizando matrices con ligandos no polares que poseen 18 átomos de carbono (C18) en las etapas iniciales de purificación de bacteriocinas. Ennahar *et al.* (2000b) y Yanagida *et al.* (2005) han purificado enterocinas empleado este método como estrategia en etapas avanzadas de la purificación a manera de fase reversa.

5.14 Cromatografía de intercambio catiónico (IC).

Los resultados para la cromatografía de intercambio catiónico realizada al ELCC se observan en la Figura 5.19, donde aparecen tres picos. El pico entre 30-40 mL (10-33% buffer B) denominado IC30 mostró actividad muy discreta cuando se evaluó solo, sin embargo debido al antecedente de actividad dependiente de dos fracciones, se repitió la actividad adicionando la fracción de SepPak C18 denominada SPI90, resultando actividad positiva. El pico pequeño entre los 45-50 ml (40-50% amortiguador B) denominado IC45 presentó actividad por sí solo sin necesidad de adición de otras fracciones.

Un esquema de los resultados para el seguimiento de la purificación de bacteriocinas se muestra a continuación:



Como se observa también en el esquema, también se realizó la cromatografía de IC por separado de cada una de las dos fracciones detectadas con actividad inhibitoria en la extracción por fase sólida, es decir SPI40 y SPI90, se muestran en las Figuras 5.20 y 5.21, respectivamente. El pico IC30, obtenido en la cromatografía del ELCC, parece corresponder al único pico que se observa en la cromatografía IC de la fracción denominada SPI40, ya que eluye en las mismas condiciones y no presentó actividad individualmente, hasta que se adiciona SPI90 como se observa en la Figura 5.18.

La cromatografía de la fracción denominada SPI90 obtenida por el fraccionamiento usando el SepPak C18 se muestra en la Figura 5.21, en donde se observa que toda la actividad aparece en dos picos que eluyen al inicio de la cromatografía de FPLC como proteína no retenida. La falta de retención de proteína se debió a las características iónicas de la muestra inyectada ya que considerando la capacidad de retención de la matriz

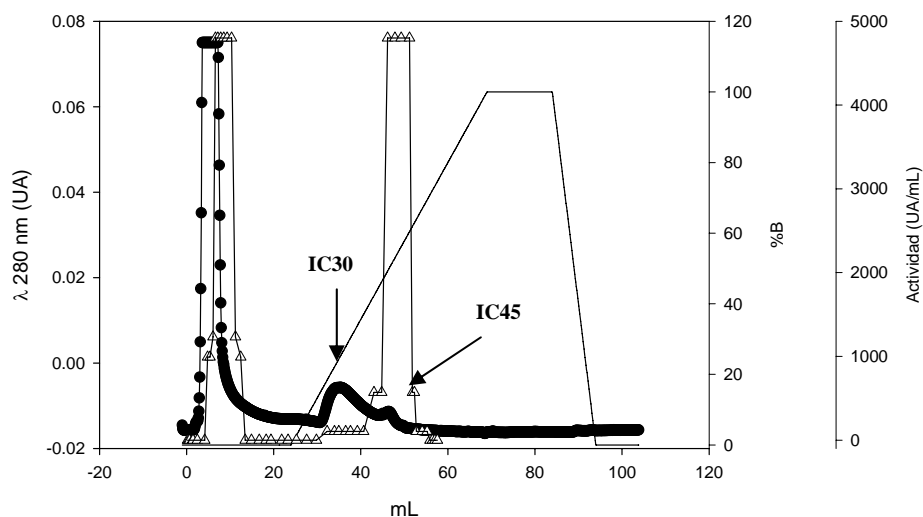


Figura 5.19. Cromatografía de intercambio catiónico realizado al ELCC precipitado con sulfato de amonio 80%. Se muestra la actividad de los extractos solos. Condiciones: 1) 0.0 a 25 mL 0% B, 2) 25 a 70 mL 0% - 100% B, 3) 70 a 85 mL 100 %B, 4) 85 a 95 mL 100 % - 0% B, 5) 95 a 105 mL con 100% A. Amortiguador B fosfato 0.05 M en 1 M de NaCl pH 6.4. El gradiente se indicaca con línea continua sin símbolos, Δ) indican actividad y ●) indican absorbencia.

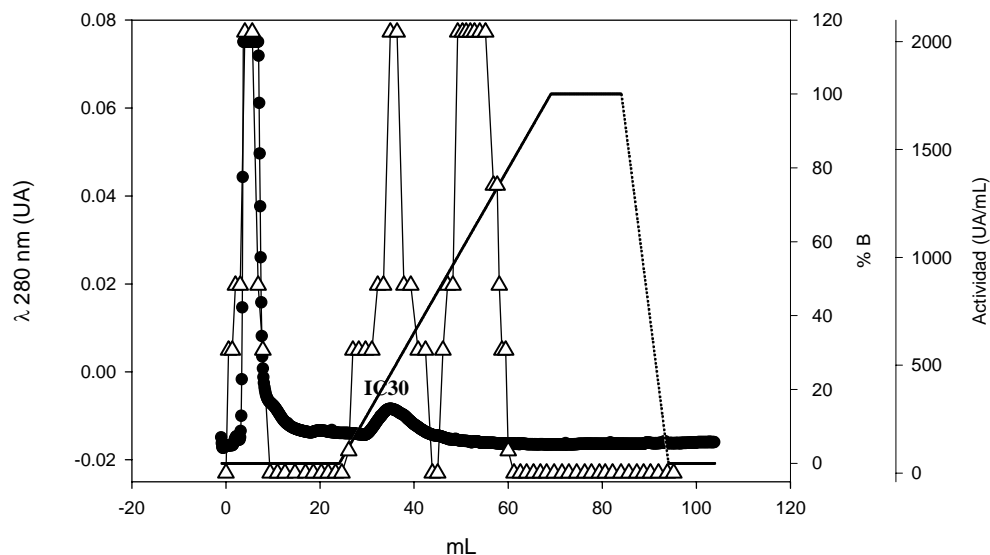


Figura 5.20. Cromatografía de intercambio catiónico de la fracción SP I40 extraída mediante SepPak C18. La actividad se dá solamente cuando se adiciona SPI90. Condiciones: 1) 0.0 a 25 mL 0% B, 2) 25 a 70 mL 0% - 100% B, 3) 70 a 85 mL 100 %B, 4) 85 a 95 mL 100 % - 0% B, 5) 95 a 105 mL con 100% A. Amortiguador B fosfatos 0.05 M en 1 M de NaCl pH 6.4. El gradiente se indicaca con línea continua sin símbolos, Δ) indican actividad y \bullet) indican absorbencia.

de intercambio catiónico usada (>160 mg lisozima/mL de medio en una columna de 5 mL Hi Trap XPXL, según el instructivo del fabricante), la proteína en las muestras quedan muy por debajo de la capacidad de retención de proteína . La concentración de proteína de las muestras fueron ELCC= 7.65 mg/mL, SPI40= 0.93 mg/mL y SPI90= 5.5 mg/mL y se inyectaron 500 μ L por muestra.

El SDS-PAGE de la fracción IC30 se observa en la Figura 5.22. A este pico se le realizó isoelectroforesis y se obtuvo un pI de 9.7. La estimación del peso molecular mediante los cálculos de la movilidad relativa resultó en PM=2.5 kDa como se observa en la Figura 5.22.

La Figura 5.23 muestra la electroforesis SDS-PAGE realizada a la fracción SPI90. La estimación del peso molecular mediante los cálculos de la movilidad relativa resultó en PM=2.2 kDa.

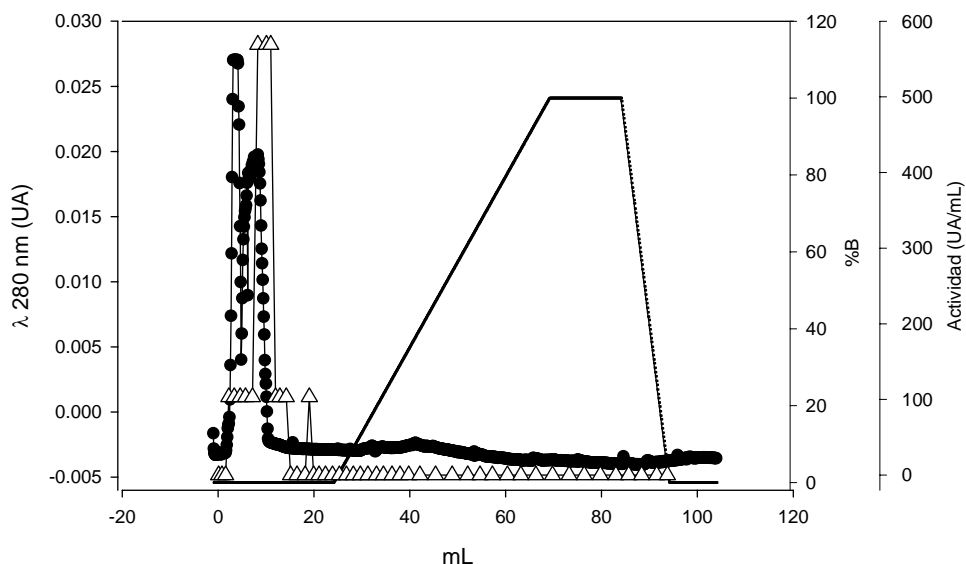


Figura 5.21. Cromatografía de intercambio catiónico de la fracción SP I90 extraída mediante SepPak C18. Condiciones: 1) 0.0 a 25 mL 0% B, 2) 25 a 70 mL 0% - 100% B, 3) 70 a 85 mL 100 %B, 4) 85 a 95 mL 100 % - 0% B, 5) 95 a 105 mL con 100% A. Amortiguador B fosfato 0.05 M en 1 M de NaCl pH 6.4. El gradiente se indicaca con línea continua sin símbolos, Δ) indican actividad y ●) indican absorbencia.

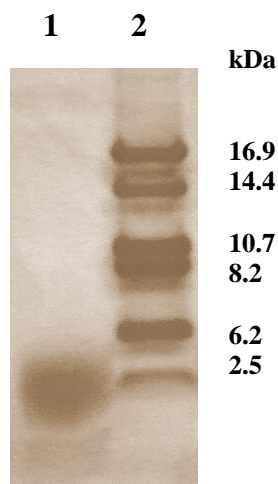


Figura 5.22. Electroforesis en geles de poliacrilamida 1) fracción SPI40 después de pasar por cromatografía de intercambio catiónico, 2) Marcador de peso molecular Amersham.

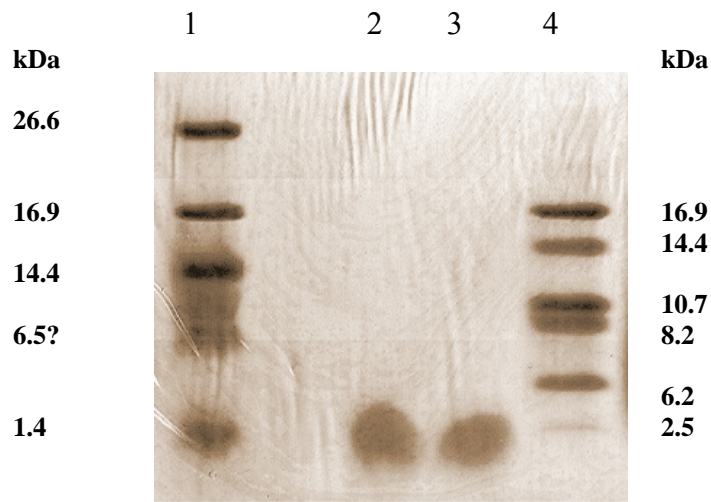


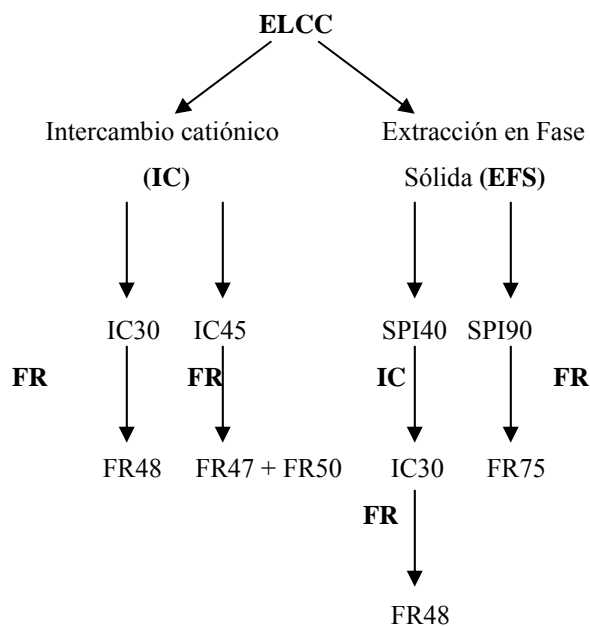
Figura 5.23. SDS-PAGE del la fracción SPI90 al final de la extracción en fase sólida SepPak C18. 1) Marcador de peso molecular BioRad, 2 y 3) Fracción SPI90, 4) marcador de Peso molecular Amersham.

La secuencia de aminoácidos que se ha reportado para bacteriocinas producidas por *Enterococcus spp.* muestra la presencia de aminoácidos polares con carga positiva hacia el extremo amino, lo que permite proponer algún paso de intercambio iónico en su purificación (Balla *et al.* 2000; Uteng *et al.* 2002; Mareková *et al.* 2003). Callewaert y De Vuyst (1999), Guyonnet *et al.* (2000), Uteng *et al.* (2002) y Abriouel *et al.* (2003) han reportado el empleo exclusivo de resinas de intercambio catiónico inyectando directamente el caldo de fermentación, para suplir los pasos iniciales de precipitación con sulfato de amonio y centrifugación, mostrando mejores rendimientos. Estos últimos autores han reportado la extracción de bacteriocinas tipo IIa en el caso de los 3 primeros, o enterocina AS-48 con estructura cíclica en el caso de Abriouel *et al.* (2003). La columna de IC empleada en el presente estudio fue la HiTrap, que de acuerdo con el instructivo del fabricante, contiene una fase estacionaria de SP Sefarosa cuyo grupo cargado sulfopropil (SP) ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$) se encuentra unido a una matriz de sefarosa. Este tipo de matriz es

el mismo señalado en los reportes de Callewaert y De Vuyst (1999), Guyonnet *et al.* (2000), Uteng *et al.* (2002) y Abriouel *et al.* (2003), lo que permite realizar una comparación. En el presente estudio se observó que el péptido denominado I90 no se retuvo en la resina de intercambio catiónico utilizada o por lo menos no en cantidad apreciable en el cromatograma, por lo que es probable que se pierda si se decide utilizar este método sin previa precipitación con sulfato de amonio. Esta fracción no se logró retener en la columna incluso bajando el pH a 3.6. Un detalle importante es que la fracción SPI90 debido a que solo tiene actividad en presencia de la fracción SPI40, la bacteriocina contenida en ella se clasificaría como del tipo IIb y quienes han trabajado con intercambio catiónico como paso inicial, muy probablemente no han purificado este tipo de bacteriocinas.

5.15 Cromatografía de fase reversa (FR)

El esquema de las cromatografías de FR realizadas se muestra de manera simplificada y es la continuación del mostrado en la página 74:



Los cromatogramas derivados de la separación por cromatografía de alta resolución usando fase inversa (HPLC FR), resultando de la inyección directa de la fracción activa I40

provenientes de SepPack C18 sin previo paso por FPLC IC, se observaron muy sucios como se muestra en la Figura 5.24.

La Figura 5.25 muestra el cromatograma de HPLC FR cuando se analiza el segundo de los dos picos proveniente de FPLC IC denominado IC45 (Figura 5.19) después de dializar y concentrar por liofilización. Este pico presenta actividad sin necesidad de requerir alguna fracción adicional al igual que se presentó después del IC. En la Figura 5.25 el primer pico activo se encuentra a 46.5-48 mins (53.9-55.9 %B) y se denominó FR47 y el segundo a los 49.1-50 mins (57-58 %B) y se denominó FR50.

La Figura 5.26 presenta una comparación entre la muestra de la Figura 5.25 y otra similar pero con diferencias en la extracción en fase sólida y la diálisis, de acuerdo con el protocolo SP5 y SP7 (sección 4.11.3). En la Figura 5.26A los picos activos coinciden con el primero y tercer picos del cromatograma de la Figura 5.26B, además de que el cromatograma de la Figura 5.26A se observa más limpio. En resumen, se tiene que IC45 proveniente de FPLC IC, contiene dos péptidos con actividad individual que no requieren de un segundo factor para actuar.

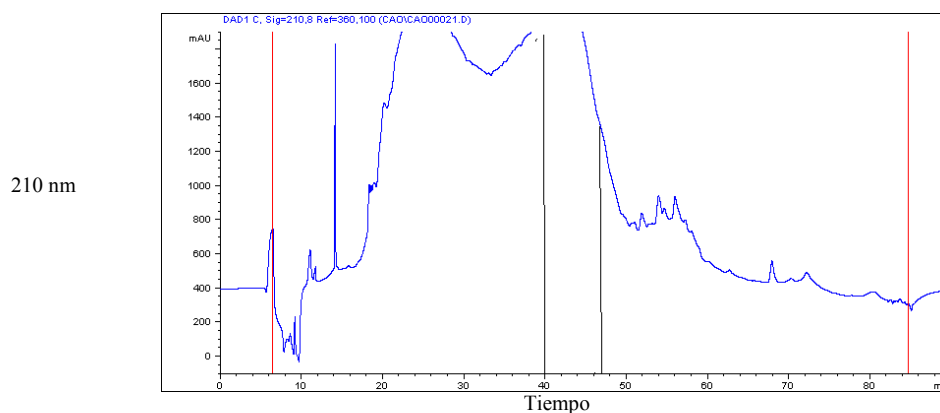


Figura 5.24. Cromatografía HPLC FR realizada a la fracción SP I40 extraída por SepPak C18. La zona delimitada por las líneas negras mostró actividad solo en presencia de la fracción SP I90. Condiciones CAO-3.M: 1) 0 a 60 min, 0-70 %B, 2) 60 a 65 min, 70-90 %B, 3) 65-70 min, 90 %B, 4) 70-75 min, 90-0 %B, 5) 75-90 min, 0.0 %B.

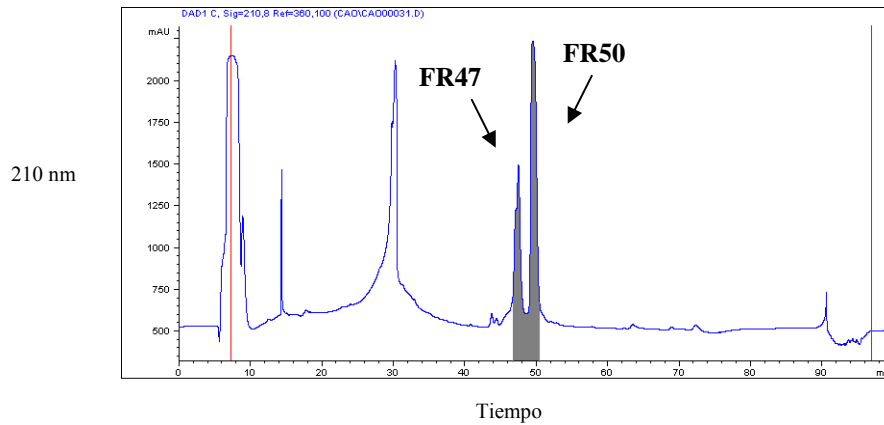


Figura 5.25. Cromatografía HPLC FR, realizada a IC45 obtenido por FPLC IC. Las fracciones en gris muestran actividad por si solas. Condiciones CAO-5.M: 1) 0 a 60 min, 0-70% B, 2) 60 a 65 min, 70-100 % B, 3) 65 a 80 min, 100% B, 4) 80 a 85 min, 100- 0% B, 5) 85 a 100 min, 0% B.

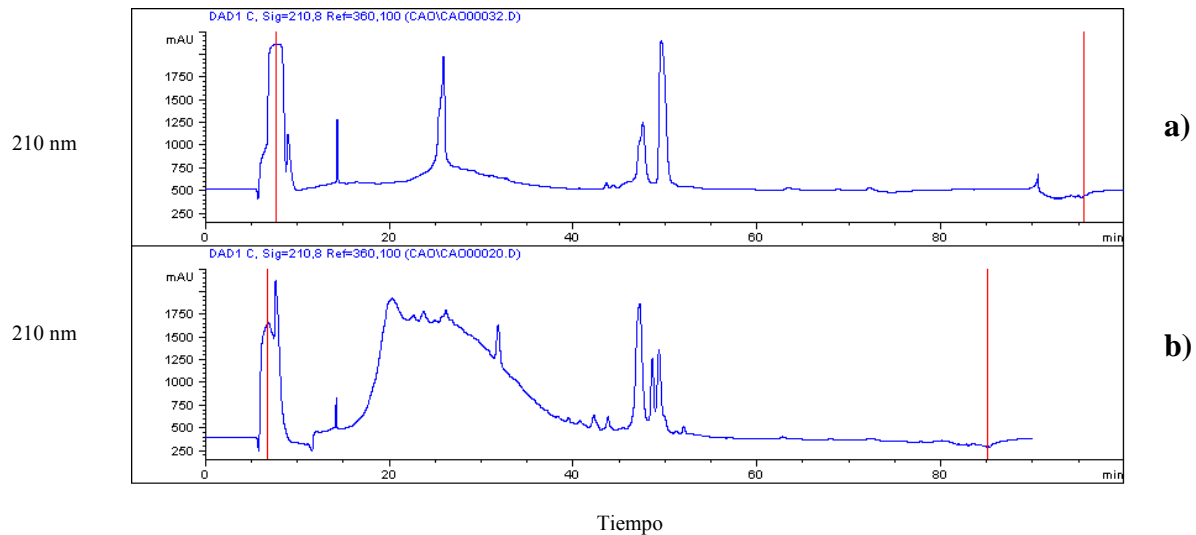


Figura 5.26. Comparación de cromatogramas HPLC FR realizados a dos muestras de IC45 obtenidas por FPLC IC. a) CAO-5.M: : 1) 0 a 60 min, 0-70% B, 2) 60 a 65 min, 70-100 % B, 3) 65 a 80 min, 100% B, 4) 80 a 85 min, 100- 0% B, 5) 85 a 100 min, 0% B. b) CAO-3.M 1) 0 a 60 min, 0-70 %B, 2) 60 a 65 min, 70-90 %B, 3) 65-70 min, 90 %B, 4) 70-75 min, 90-0 %B, 5) 75-90 min, 0.0 %B. Los gradientes de elusión son idénticos hasta el minuto 60.

Los picos FR47 y FR50 se visualizan cuando las estrategias de purificación son: 1) ELCC, FPLC IC y tomar el segundo pico para HPLC FR (Figura 5.25) y 2) Adsorción-desorción, seguido de HPLC FR (Figura 5.27), que muestra una comparación de las Figuras 5.11 y 5.25. Cuando se parte de SP I40 inicialmente no se aprecia si están presentes los picos FR47 y FR50 (Figura 5.24), pero su ausencia se probará a continuación.

La Figura 5.28 es la muestra que proviene del primer pico ancho del FPLC IC denominada IC30 (Figura 5.25) con actividad solo en presencia de la fracción SepPak I90. El HPLC FR de IC30 contiene un pico activo solo en presencia de SPI90, que aparece a los 47.6-49 mins y eluye con 55.6-57 %B. Este pico se denominará FR48.

La Figura 5.29 muestra una comparación entre los cromatogramas de IC45 (Figura 5.25) e IC30 (Figura 5.28) donde se demuestra con claridad que los picos activos FR47 y FR50 son diferentes de FR48. Esto era de esperarse ya que son fracciones que eluyen a diferente concentración salina, en el FPLC de IC. Por tal motivo aunque el pico FR48 no se aprecia en el cromatograma HPLC FR de la fracción I40 (Figura 5.24) es probable que sí esté, pero la muestra en este paso no se encuentra suficientemente limpia.

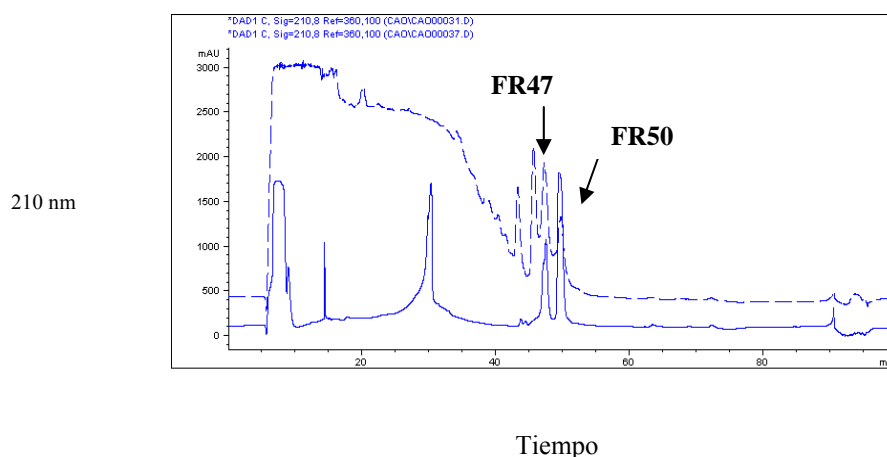


Figura 5.27. Comparación de cromatogramas de Extracción de células (adsorción-desorción) y el cromatograma de IC45 con los péptidos FR47 + FR50. Condiciones CAO-5.M: 1) 0 a 60 min, 0-70% B, 2) 60 a 65 min, 70-100 % B, 3) 65 a 80 min, 100% B, 4) 80 a 85 min, 100- 0% B, 5) 85 a 100 min, 0% B. Los picos FR47 y FR50 eluyen al mismo tiempo.

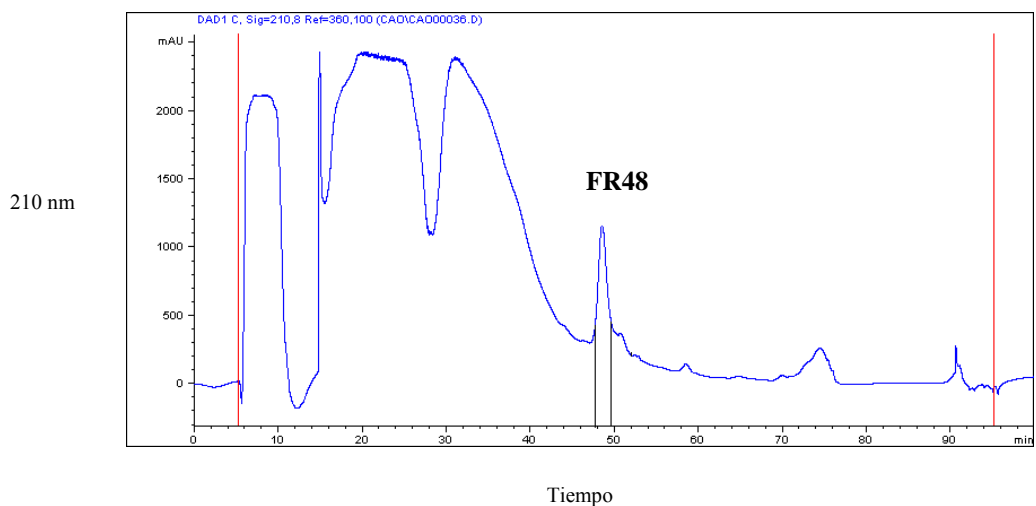


Figura 5.28 Cromatografía HPLC FR de IC30 (obtenido por FPLC IC). La fracción FR48 muestra actividad solamente cuando se le adiciona la fracción SepPak I90. Condiciones CAO-5.M: 1) 0 a 60 min, 0-70% B, 2) 60 a 65 min, 70-100 % B, 3) 65 a 80 min, 100% B, 4) 80 a 85 min, 100- 0% B, 5) 85 a 100 min, 0% B.

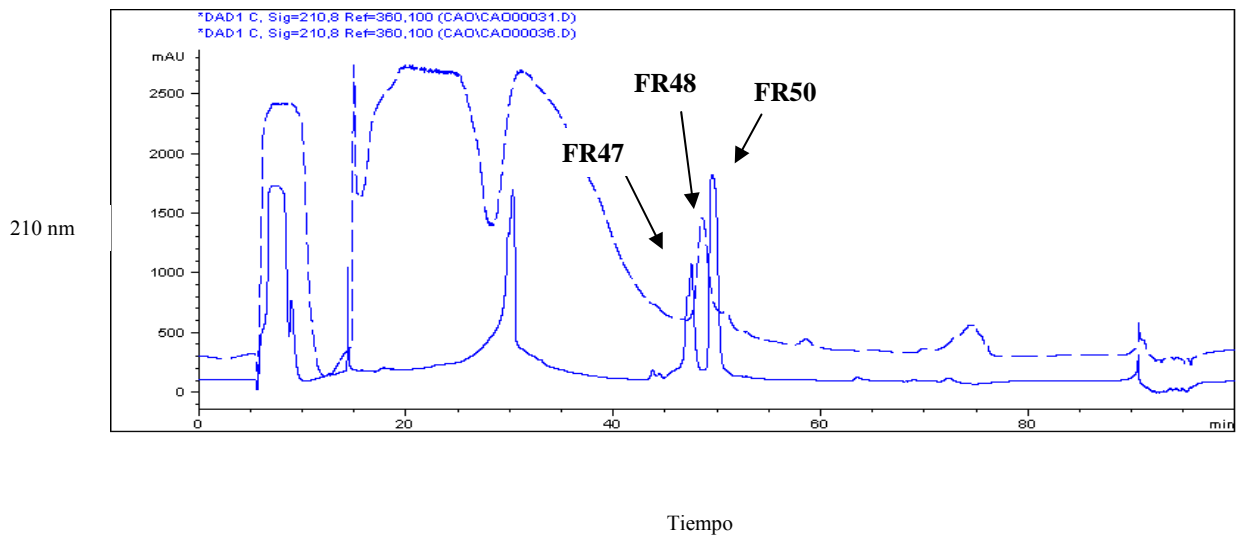


Figura 5.29. Comparación entre los cromatogramas de IC45 (Figura 5.25) y IC30 (Figura 5.28). Se aprecia con claridad que los picos activos FR47 y FR50 son diferentes de FR48. Condiciones CAO-5.M: 1) 0 a 60 min, 0-70% B, 2) 60 a 65 min, 70-100 % B, 3) 65 a 80 min, 100% B, 4) 80 a 85 min, 100- 0% B, 5) 85 a 100 min, 0% B. Los dos picos con actividad en IC poseen picos que eluyen a diferente tiempo en FR.

Se puede concluir que la cromatografía de IC es indispensable en la separación entre las fracciones activas FR47 y FR50 de la FR48, que de otra manera no se lograría. Aunque todas las fracciones mencionadas deben estar presentes en SP I40, no es recomendable inyectar la fracción directamente en HPLC FR, porque como se aprecia en la Figura 5.24, no está suficientemente limpia. Dado lo anterior, es recomendable que SP I40 pase primero a intercambio catiónico.

La Figura 5.30 muestra el cromatograma de HPLC FR de la fracción I50 extraída por SepPak C18 mediante modificación del protocolo SP7 que incluye un lavado con isopropanol 40% seguido de otro con isopropanol 50%. Las fracciones en gris intenso muestran actividad por si solas, la zona gris clara muestra actividad discreta y la fracción delimitada por dos líneas muestra actividad solamente cuando se le adiciona la fracción SepPak I40. La comparación mostrada en la Figura 5.31 demuestra la presencia de los picos FR47 y FR50 así como el péptido denominado FR75 (que se discutirá más adelante), estos picos forman parte de SP I50, pero no el péptido FR48 que debió quedar en la fracción SP I40. Esto indica que ligeras variaciones en la concentración de isopropanol para la elusión en SepPak C18 resultan en alteraciones del patrón de péptidos contenidos en las diferentes fracciones.

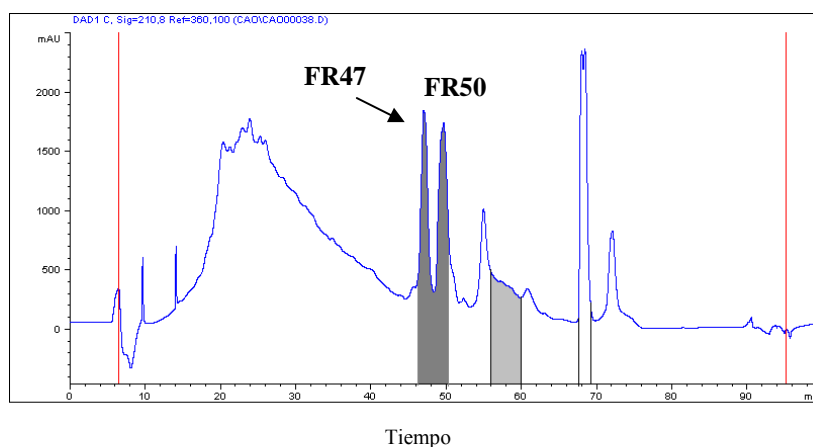


Figura 5.30. HPLC de fracción I50 extraído por SepPak C18. Las fracciones en gris intenso muestran actividad por si solas, la zona gris clara muestra actividad discreta y la fracción delimitada por dos líneas muestra actividad solamente cuando se le adiciona la fracción SepPak I40. Condiciones CAO-5.M: 1) 0 a 60 min, 0-70% B, 2) 60 a 65 min, 70-100 % B, 3) 65 a 80 min, 100% B, 4) 80 a 85 min, 100- 0% B, 5) 85 a 100 min, 0% B.

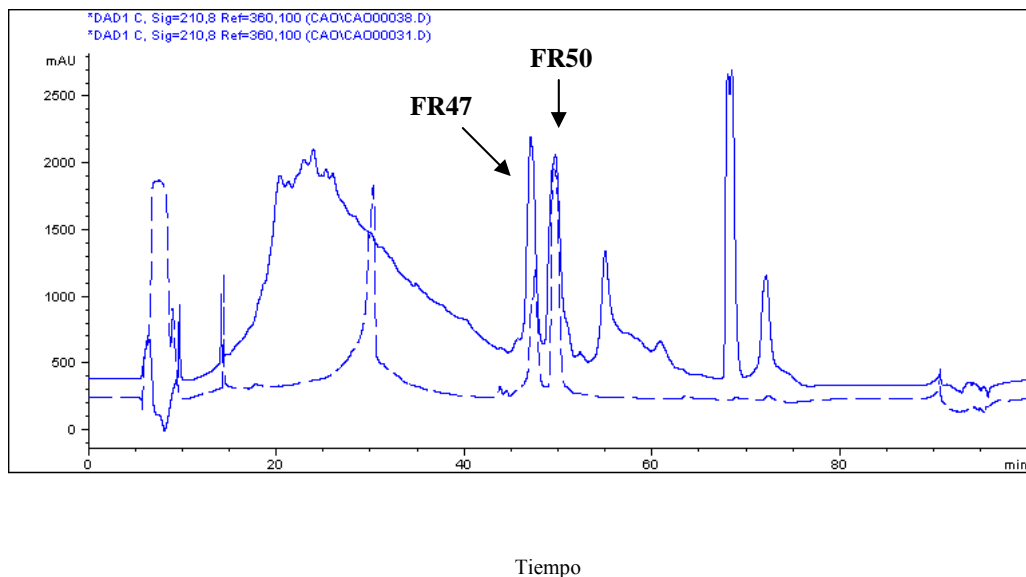


Figura 5.31. Comparación de los cromatogramas por HPLC FR de la fracción SP I50 (Figura 5.30) con la IC45 (Figura 5.25). Condiciones CAO-5.M: 1) 0 a 60 min, 0-70% B, 2) 60 a 65 min, 70-100 % B, 3) 65 a 80 min, 100% B, 4) 80 a 85 min, 100- 0% B, 5) 85 a 100 min, 0% B.

La Figura 5.32 muestra la cromatografía HPLC FR protocolo CAO-5.M (sección 4.11.5), y la Figura 5.33 protocolo CAO-2.M (misma sección), realizadas sobre la fracción I90 extraída con SepPak C18. La actividad se muestra entre un par de líneas negras y se presenta exclusivamente cuando se adiciona la fracción de SepPak C18 I40. La fracción activa eluye entre 74 y 77% de isopropanol y se denominó FR75. La fracción I90 sin previo paso por FPLC IC, mostró cromatogramas más limpios como se muestra en las Figuras 5.33 y 5.34.

El péptido FR75 solo aparece cuando se realiza HPLC FR de la fracción SP I90; sin embargo, el cromatograma de la Figura 5.21 muestra que la actividad inhibitoria y la proteína no fueron retenidas por la columna. Este pico tampoco pudo observarse después de la cromatografía HPLC FR del extracto de células (5.11), ya que al 75% de isopropanol no se observó ningún pico. Tampoco se observó dicho pico (FR 75) dentro de la cromatografía HPLC FR efectuada inyectando los picos retenidos por FPLC IC (Figura 5.34).

Un escrutinio de la Figura 5.34 permite apreciar que los péptidos FR48 y FR75 no se encuentran presentes en los extractos de células (Figura 5.11) ni en la fracción IC45 (Figura 5.25). Como se ha demostrado, dichos péptidos tienen actividad únicamente cuando se mezclan y no es posible recuperarlos ni mediante extracción a partir de las células (Yang *et al* 1992), ni con resinas de intercambio catiónico. En el presente estudio se observa la presencia de alguno de éstos dos péptidos solamente cuando se extrae (Sep-Pack) y purifica (HPLC) mediante fase reversa y solamente si se utiliza isopropanol como eluyente.

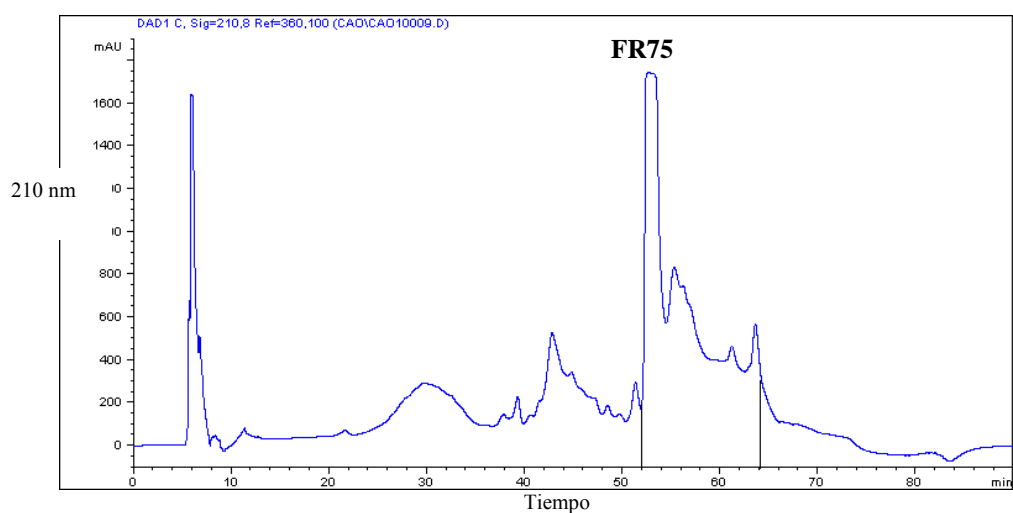


Figura 5.32. HPLC-FR para la fracción I90 extraída con SepPak C18. La actividad se presenta entre un par de líneas negras y requiere la fracción de SepPak I40. Condiciones CAO-2.M: 1) 0 a 60 min, 0–90% B, 2) 60-65 min, 90% B, 3) 65 a 75 min, 90-0 % B, 4) 75-85 min, 0% B.

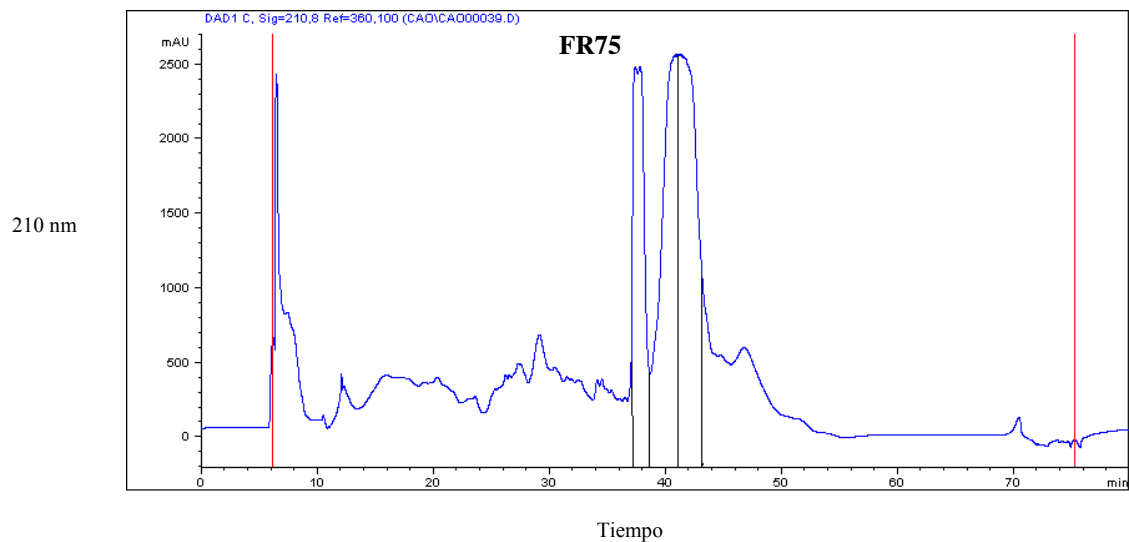


Figura 5.33. HPLC para la fracción I90 extraída con SepPak C18. El pico FR75 muestra actividad solamente frente a la fracción de SepPak C18 I40. CAO-7.M: 1) 0 a 15 min, 0–50% B, 2) 15 a 45 min, 50–100% B, 3) 45 a 60 min, 100 % B, 4) 60 a 65 min, 100-0% B, 5) 65 a 80 min, 0% B.

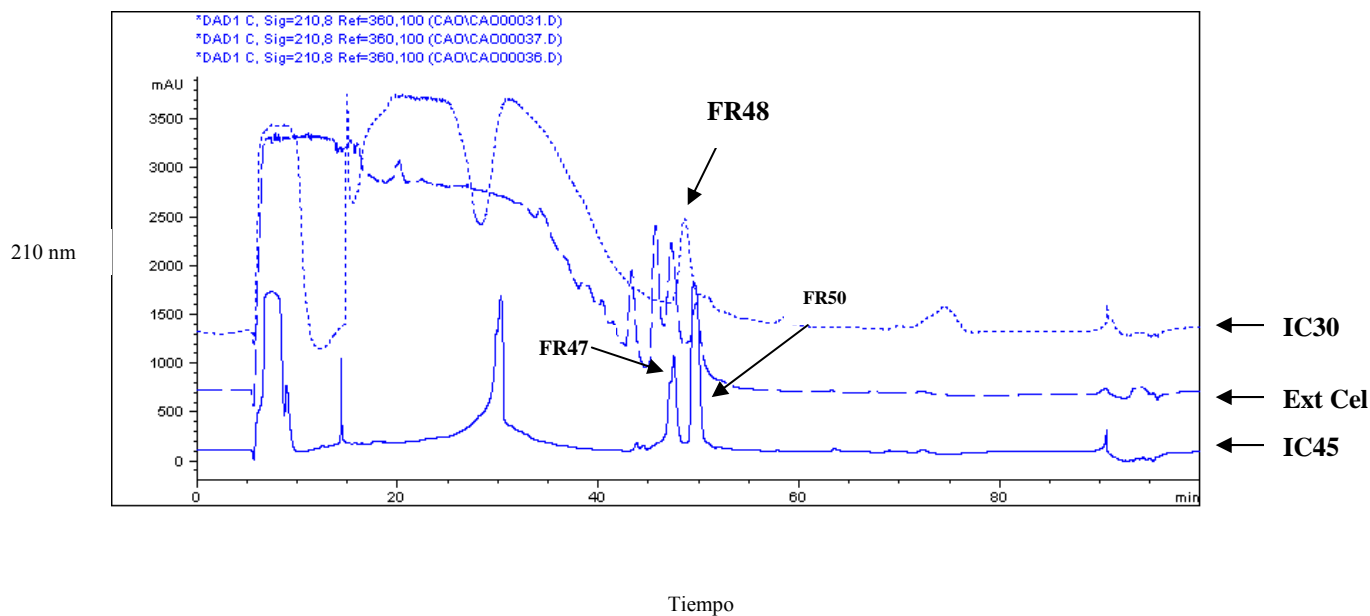


Figura 5.34. Comparación entre cromatogramas de Extracto de células (Figura 5.11), IC45 (Figura 5.25) e IC30 (Figura 5.28). Se puede observar que no aparece el péptido FR75. Condiciones CAO-5.M: 1) 0 a 60 min, 0-70% B, 2) 60 a 65 min, 70-100 % B, 3) 65 a 80 min, 100% B, 4) 80 a 85 min, 100– 0% B, 5) 85 a 100 min, 0% B.

5.15 Identificación de genes estructurales para enterocinas mediante biología molecular.

Una estrategia diferente para identificación de bacteriocinas es la búsqueda de genes estructurales que codifican las enterocinas, dentro del DNA bacteriano. En este trabajo se utilizaron los iniciadores diseñados por De Vuyst *et al.* (2003), que son los más extensamente empleados y están diseñados en base a las secuencias de los péptidos maduros de las enterocinas: A, B, P, AS-48, el conjunto L50A/L50B, bacteriocina 31 y citolisina, por medio de la reacción de PCR. La Figura 5.35 muestra un gel de agarosa con todas las reacciones de PCR efectuadas. En la Figura 5.36 se aprecian exclusivamente los productos de PCR que corresponden a las enterocinas A, bacteriocina 31, y el conjunto de enterocinas L50A/L50B. Los productos obtenidos fueron clonados, secuenciados y traducidos a aminoácidos. La secuencia nucleotídica se muestra a continuación, donde las bases sombreadas de gris indican las secuencias complementarias del iniciador hacia adelante “forward” o hacia atrás “reverse” correspondiente, es decir el sitio de reconocimiento del iniciador.

Producto de 36 bp: CCTACGTATTACGGAAATGGTTGGGTACAACATGGC, usando los iniciadores recomendados para la bacteriocina 31, ésta secuencia presentó una hibridación no planeada de un iniciador, traslapándose con una parte de la secuencia del otro iniciador, de tal manera que sólo se obtuvo un producto de PCR de 36 nucleótidos, que fue descartado. Cabe aclarar que no se han obtenido nuevos datos acerca de la bacteriocina 31, desde que fue reportada por Tomita *et al.* (1996).

Producto de PCR de 138bp:

**GGTACCACTCATAGTGGAAAATATTATGGAAATGGAGTGTATTGCACTAAAAA
TAAATGTACGGTTCGATTGGGCCAAGGCAACTACTTGTATTGCAGGAATGTCTA
TAGGTGGTTTTTAGGTGGAGCAATTCCAGGG**

ggtaccactcatagtggaataatattatggaaatggagtggtattgcactaaaaataaatgt
G T T H S G K Y Y G N G V Y C T K N K C
acggtcgattggccaaggcaactacttgtattgcaggaatgtctataggtggTTTTTTA
T V D W A K A T T C I A G M S I G G F L
ggtggagcaattccaggg
G G A I P G

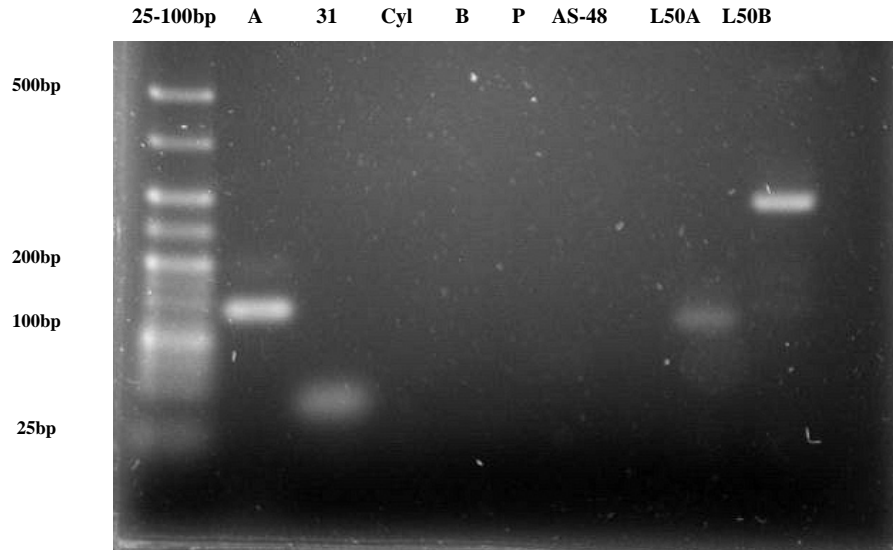


Figura 5.35. Gel de agarosa 2%. Carril 1: marcador de peso molecular (HyperLadder V Bioline), Carriles A, 31, L50A y L50B muestran producto de PCR. Carriles Cyl, B, P y AS-48 no se observa producto de PCR.

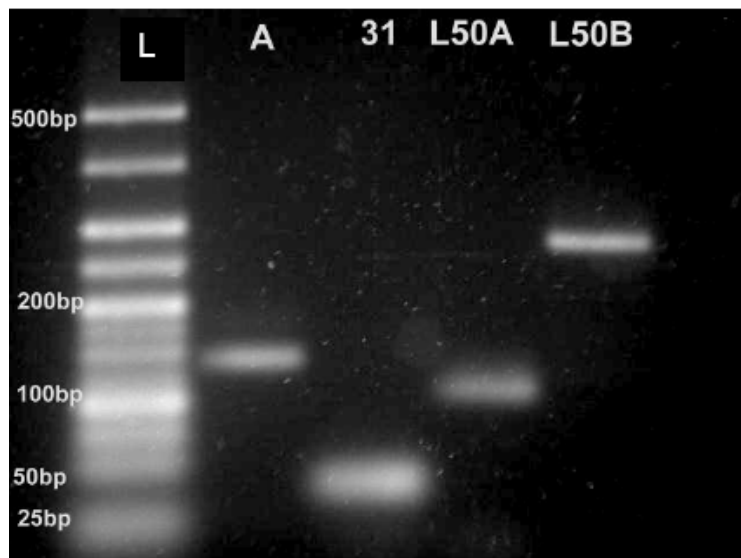


Figura 5.36. Gel de agarosa 3.5%. Carril 1: marcador de peso molecular (HyperLadder V Bioline), Carriles A, 31, L50A y L50B corresponden al producto de PCR obtenido.

Esta secuencia presentó 100% de similitud con la secuencia AF240561 del GenBank y que corresponde al gen que codifica la enterocina A, producida por *E. faecium*. La traducción de esta secuencia de nucleótidos corresponde a 46 aminoácidos.

Esta secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de enterocina A reportada por Aymerich *et al.* (1996) que se muestra a continuación (parte superior), mientras que la secuencia encontrada se colocó en la parte inferior para una mejor comparación:

_TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAIPGKC 47aa
GTTTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGFLGGAIPG__ 46aa

La traducción del péptido correspondiente al producto de PCR posee una glicina adicional hacia el extremo amino terminal y carece de los dos últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal con respecto a la secuencia reportada por Aymerich *et al.* (1996). El análisis de las secuencias de los iniciadores indica que fueron diseñados para identificar solo éstos 46 aminoácidos de la secuencia original reportada para la enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996). Por tal motivo, no se puede determinar si la cepa *E. faecium* QPI1 contiene o no el gen completo, aunque dados los hallazgos y la elevada actividad antimicrobiana se consideró que una de las bacteriocinas encontradas es enterocina A.

Producto de PCR de 105 pb:

**ATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGCAAAGTTTGGGTGGCCTATTGTTAAAAA
ATATTACAAACAAATTATGCAGTTTATTGGAGAAGGATGGGCAATTAACAAA**

atgggagcaatcgcaaaattagtagcaaagtttgggtggcctattgttaaaaaatattac
M G A I A K L V A K F G W P I V K K Y Y
aaacaaattatgcagtttattggagaaggatgggcaattaacaaa
K Q I M Q F I G E G W A I N K

Esta secuencia presentó 100% de similitud con la secuencia AJ223633 del GenBank y que corresponde a los genes que codifican para las enterocinas L50A y L50B producidas por *E. faecium*. La traducción de esta secuencia de nucleótidos corresponde a 35 aminoácidos, la cual se muestra alineada con la secuencia de aminoácidos (44 aa)

correspondiente a la enterocina L50A reportada por Cintas *et al.*, 1998, mostrándose ambas secuencias a continuación:

MGAIAKLVAKFGWPIVKKYYKQIMQFIGEGWAINK 35aa

MGAIAKLVAKFGWPIVKKYYKQIMQFIGEGWAINKIIEWIKKHI 44aa

La traducción del péptido correspondiente al producto de PCR carece de 9 aminoácidos del extremo carboxilo terminal con respecto a la secuencia de Cintas *et al.*, (1998). En el análisis de las secuencias de los iniciadores se observa que fue diseñada para identificar solo éstos 35 aminoácidos de la secuencia completa original reportada para enterocina L50A por Cintas *et al.*, (1998).

Producto de PCR de 274 pb:

ATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGCAAAGTTTGGGTGGCCTATTGTAAAAA
ATATTACAAACAAATTATGCAGTTTATTGGAGAAGGATGGGCAATTAACAAAA
TCATTGAGTGGATTAACAAACATATTTAAAATAAGGATGTGTTAGTACATGGG
AGCAATCGCAAAACTAGTGACAAAGTTTGGGTGGCCACTAATCAAAAAATTCT
ACAAACAAATCATGCAATTTATTGGACAAGGATGGACAATAGATCAAATTGAA
AAATGGCTA

atgggagcaatcgcaaaattagtagcaaagtttgggtggcctattgttaaaaaatattaca
W E Q S Q N - - Q S L G G L L L K N I T
aacaattatgcagtttattggagaaggatgggcaattaacaaaatcattgagtggtatta
N K L C S L L E K D G Q L T K S L S G L
aaaaacatatTTAAAATAAGGATGTGTTAGTACATGGGAGCAATCGCAAAACTAGTGACA
K N I F K I R M C - Y M G A I A K L V T
aagtttgggtggccactaatcaaaaaattctacaaacaaatcatgcaatttattggacaa
K F G W P L I K K F Y K Q I M Q F I G Q
ggatggacaatagatcaaattgaaaaatggcta
G W T I D Q I E K W L

Esta secuencia presentó 100% de similitud con la secuencia AJ223633 del GenBank y que corresponde a los genes que codifican para las enterocina L50A y L50B producida por *E. faecium*. La traducción de esta secuencia de nucleótidos corresponde a 88 aminoácidos de los cuales los 39 finales después de las tres señales de paro, hacia el extremo carboxilo, corresponden a la secuencia reportada para enterocina L50B por Cintas *et al.*, (1998). Las identidades consistieron en 40 de 43 aminoácidos comparados con la

secuencia original y que aparecen sombreados. La secuencia que se obtuvo posee una tirosina adicional en el extremo amino y carece de los tres últimos aminoácidos hacia el extremo carboxilo en comparación con la secuencia ya reportada pero esto se debe a que el iniciador fue construido de esta manera:

WEQSQN--QSLGGLLLKNITNKLCSLLEKDGOLTKSLSGLKNIFKIRMC-
 YMGAIAKLVTKFGWPLIKKFYKQIMQFIGQGWTIDQIEKWL 41aa

Producto de PCR de 274 pb obtenido en este trabajo

MGAIAKLVTKFGWPLIKKFYKQIMQFIGQGWTIDQIEKWLKRH 43aa

Enterocina L50B, 43 aminoácidos (Cintas *et al.*, 1998).

Como puede observarse en la secuencia de aminoácidos de L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1998) que se muestran a continuación, son péptidos que poseen entre sí un 75% de homología. Se sombreadaron los aminoácidos diferentes entre sí:

L50A : MGAIAKLVAKFGWPVKKYKQIMQFIGEGWAINKIIE WI KKHI 44 aa
 L50B : MGAIAKLVTKFGWPLIKKFYKQIMQFIGQGWTIDQIEKWLKRH 43 aa

El extremo amino de ambos péptidos tiene 8 aminoácidos idénticos, por lo que el iniciador hacia delante “forward” coincide para ambos.

Enterocina L50A **FORWARD PRIMER** 5'-ATG GGA GCA ATC GCA AAA TTA-3'
REVERSE PRIMER 5'-TTT GTT AAT TGC CCA TCC TTC-3'
 Enterocina L50B **FORWARD PRIMER** 5'- ATG GGA GCA ATC GCA AAA TTA-3'
REVERSE PRIMER 5'-TAG CCA TTT TTC AAT TTG ATC-3'

Los análisis de biología molecular revelan que el DNA de *E. faecium* QPI1 contiene la información para la codificación de al menos 3 enterocinas: Enterocina A clase IIa y el par de enterocinas IIb enterocina L50A y L50B.

La purificación de enterocinas a partir de su producción en un medio líquido permitió recuperarlas utilizando diferentes estrategias. Se encontraron dos péptidos denominados FR47 y FR50 con actividad individual que es posible extraer ya sea por adsorción-desorción, con muy bajos rendimientos. También se puede purificar mediante intercambio iónico, seguido de fase reversa.

En virtud a que se identificó el gen que codifica para la síntesis de enterocina A, una de las fracciones FR47 o FR50 podría corresponder a ésta, ya que posee actividad sin requerir de ninguna fracción adicional. Aymerich *et al.* (1996) purificó la enterocina A (PM 4,829 Da), utilizando una columna de intercambio catiónico después de precipitar con sulfato de amonio, mientras que el paso final fue una elusión de una columna de fase reversa con isopropanol a una concentración del 30%. Las condiciones utilizadas por Aymerich *et al.* (1996) fueron similares a las que se utilizaron en el presente trabajo, donde los péptidos FR47 y FR50 eluyeron de la columna de fase reversa a una concentración de isopropanol del 48% y 51%, aunque nosotros mezclamos con 10% acetonitrilo para obtener el amortiguador B, lo cual debe influir en la elusión. Otros reportes donde se han purificado bacteriocinas clase IIa entre ellas enterocina A, utilizan en su estrategia el inicio con precipitación con sulfato de amonio seguida de intercambio iónico o bien inicio con una resina de intercambio catiónico directamente sobre el caldo de fermentación (Callewaert *et al.*, 1999; Guyonnet *et al.*, 2000; Uteng *et al.*, 2002; Mareková *et al.*, 2003). Esto apoyaría el hecho de que no se haya podido purificar el conjunto de enterocinas L50 por esta vía, pero sí los péptidos de actúan solos FR47 y FR50.

Por otra parte el PM estimado mediante movilidad relativa en el SDS-PAGE para la fracción que contenía a ambos péptidos FR47 y FR50, fue de 4.5, y el observado por Aymerich *et al.* (1996) con SDS-PAGE fue de 5,000 Da, con un PM determinado por espectrometría de 4,828 Da, concluyéndose que es similar, aunque en el presente trabajo la banda es muy ancha y es necesaria mayor pureza para determinarlo con mayor precisión.

Con respecto a la identificación de los genes que codifican las enterocina L50A y L50B, coinciden con los péptidos FR48 y FR75 que muestran actividad sinérgica, típica de bacteriocinas de la clase IIb. La fracción SPI90 que produjo el péptido FR75 tuvo un PM

estimado por movilidad relativa en el SDS-PAGE de 2.3 kDa. La fracción SPI40 que produjo el péptido FR48 mostró, como se señaló en la sección 5.14, un PM estimado de 2.5 y pI de 9.7. Los puntos isoeléctricos estimados con la secuencia de aminoácidos para las enterocinas L50A y L50B son 10.0 y 10.2 respectivamente, y sus pesos moleculares teóricos son 5 190 y 5178 Da respectivamente (Cintas *et al.*, 2000). El pI encontrado en el presente trabajo es muy cercano a los reportes para este par de enterocinas, y las diferencias podrían atribuirse al método de estimación, que en el presente estudio fue isoelectroenfoque. Mientras que los pesos moleculares son muy diferentes, también existen diferencias apreciables entre los métodos de estimación. Cintas *et al.*, (1995) y Balla *et al.*, (2000) señalan que las bacteriocinas ensayadas en SDS-PAGE migran con PM aparente mucho menor que el calculado por espectrometría. Por ejemplo la enterocina L50 (Cintas *et al.*, 1995) migró con PM de 3600 Da, mientras que el PM arrojado por la espectrometría fue de 5250 Da. En el caso de las enterocinas 1071A y 1071B migraron con un PM de 2.5 kDa y el arrojado por la espectrometría de masas fue de entre 3800-4000 Da. Por tal motivo deben tomarse con reserva los pesos moleculares estimados por SDS-PAGE, ya que probablemente estén por abajo del valor real.

Acerca de estas fracciones, se observó que para su purificación es indispensable que la extracción esté basada en la hidrofobicidad de la molécula, es decir en la extracción en fase sólida (SepPak C18) o bien HPLC FR. Estos péptidos no se encontraron en la extracción mediada por células (Figura 5.11) y en el caso de FR75 se demostró que no se retiene por la columna de intercambio catiónico (Figura 5.21).

El primer reporte para la enterocina L50 fue realizado por Cintas *et al.* (1995) quien utilizó intercambio catiónico después de precipitación con sulfato de amonio, pero solamente reportó un péptido que eluye de la columna final de fase reversa, a una concentración de 40% de isopropanol. La completa elucidación de las enterocinas L50A y L50B se logró cuando Cintas *et al.* (2000) cambiaron la estrategia y utilizaron extracción en fase sólida (Amberlita XAD-16) de la cual eluyen la actividad utilizando isopropanol al 70%. Este procedimiento coincide con la concentración de isopropanol empleada en el presente trabajo para eluir la fracción denominada FR75 que es del 74%. Existen muy pocos reportes de elusión de alguna bacteriocina con elevadas concentraciones de isopropanol,

solamente ha sido Cintas *et al.* (2000) que purificó L50A y L50B, y Wilaipun *et al.* (2004) quienes también purificaron un grupo de enterocinas del grupo IIb. Éstos últimos purificaron las bacteriocinas denominadas NKR3A y NKR3B, producidas por *Enterococcus faecium* aislado de productos fermentados tradicionales de Tailandia y lograron la elusión del péptido NKR3B con 60% de isopropanol. Esta concentración es cercana a la utilizada en el presente trabajo.

Hasta el momento solo éstos dos conjuntos de bacteriocinas tipo IIb han sido reportadas producto de cepas de *E. faecium*: enterocina L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1995, 1998) y NKR3A y NKR3B (Wilaipun *et al.*, 2004). El otro conjunto de enterocinas reportado 1071A y 1071B son producidas por *E. faecalis* BFE 1071 (Balla *et al.*, 2000), y para su purificación se utilizó intercambio catiónico (gradiente de acetato de amonio sobre una matriz de SP-sefarosa).

La producción de más de una enterocina producida por cepas de *E. faecium* ha sido previamente reportado (Casaus *et al.* 1997, enterocina B y enterocina A) (De Vuyst *et al.* 2003). También se ha reportado un incremento de la efectividad con el empleo de una combinación de bacteriocinas, sugiriéndose la conveniencia de utilización de cepas con producción múltiple de bacteriocinas en la conservación de alimentos (Vignolo *et al.* 2000).

VI. CONCLUSIONES

Los alimentos artesanales mexicanos son fuente de bacterias ácido lácticas con capacidad inhibitoria. Los ácidos orgánicos producidos por las cepas BAL aisladas de alimentos artesanales Mexicanos *Le. mesenteroides* CH210, PT8 y *Lb. plantarum* CC, tuvieron una importante capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos de origen alimentario.

E. faecium UQ31 produce al menos 3 tipos diferentes de péptidos con amplio espectro antimicrobiano contra *L. monocytogenes*. Mediante técnicas moleculares que *E. faecium* QPI1 contiene los genes que codifican para las enterocinas A, L50A y L50B. Las bacteriocinas producidas por *E. faecium* QPI1 mostraron actividad en diversos sistemas modelo, por lo cual representan una alternativa con gran potencial antimicrobiano para uso en alimentos. El efecto antimicrobiano se demostró tanto adicionando dicha cepa productora de bacteriocina como utilizando el extracto libre de células lo que diversifica su utilización en alimentos.

Las bacteriocinas producidas por la cepa de representan una alternativa viable como conservador natural de alimentos.

REFERENCIAS

- Abriouel, H., E. Valdivia, M. Martínez Bueno, M. Maqueda, and A. Gálvez. 2003. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J. Microbiol. Methods* 55:599-605.
- Achemchem, F., M. Martínez-Bueno, J. Abrini, E. Valdivia, and M. Maqueda. 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. Appl. Microbiol.* 99:141-150.
- Alvarado, C. 2003. Potencial antimicrobiano de los compuestos producidos por bacterias lácticas aisladas de alimentos mexicanos. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Ammor, S., G. Tauveron, E. Dufour, and I. Chevallier. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1- Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17:454-461.
- Ampe, F., N. Ben Omar, C. Moizan, C. Wachter, and J. Guyot. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environm. Microbiol.* 65:5464-5473.
- Ananou, S., M. Garriga, M. Hugas, M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, A. Galvez, and E. Valdivia. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausage by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 103:179-190.
- Andrighetto, C., E. Knijff, A. Lombardi, S. Torriani, M. Vancanneyt, K. Kersters, J. Swings, and F. Dellaglio. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* 68:303-316.
- Axelsson L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: S. Salminen, and A. von Wright (Ed.). *Lactic acid bacteria*, pp 1-61. Marcel Dekker, New York.
- Aymerich, T., H. Holo, L. S. Havarstein, M. Hugas, M. Garriga, and I. Nes. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A form *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environm. Microbiol.* 62:1676-1682.
- Balla, E., L. M. T. Dicks, M. Du Toit, M. J. Van der Merwe, and W.H. Holzapfel. 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:298-1304.

- Batdorj, B., M. Dalgarrondo, Y. Choiset, J. Pedroche, F. Metro, H. Prevost, J. M. Chobert, and T. Haertle. 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria from Mongolian airag. *J. Appl. Microbiol.* 101:837-848.
- Bauer, R., M. L. Chikindas and L. M. T. Dicks. 2005. Purification, partial aminoacid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Int. J. Food Microbiol.* 101:17-27.
- Bennik, M. H. J, B. Vanloo, R. Brasseur, L. G. M. Gorris, and Smid EJ. 1998. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1373:47-58.
- Boogs, J. D., R. E. Whitwam, L. M. Hale, R. P. Briscoe, S. E. Kahn, J. N. MacCormack, J-M. Maillard, S. C. Grayson, K. S. Sigmon, J. W. Reardon, and J. R. Saah. 2001. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese: North Carolina, October 2000 to January 2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 50:560-562.
- Booth, M. C., C. P. Bogie, H. Sahl, R. J. Siezen, K. L. Hatter, and M. S. Gilmore. 1996. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Molec. Microbiol.* 21:1175-1184.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Breukink, E., and B. de Kruijff. 2006. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1-12. Advance online publication www.nature.com/reviews/drugdisc.
- Budde, B. B., T. Hornbaek, T. Jacobsen, V. Barkholt, and A. G. Koch. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-package meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *Int. J. Food Microbiol.* 83:171-184.
- Bulut, C., H. Gunes, B. Okuklu, S. Harsa, S. Kilic, H. S. Coban, and A. F. Yenidunya. 2005. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. *J. Dairy Res.* 72:19-24.
- Burianek, L. L., and A. E. Yousef. 2000. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Lett. Appl. Microbiol.* 31:193-197.
- Calderon, M., G. Loiseau, and J. P. Guyot. 2003. Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals:

- consequences on growth energetics and α -amylase production. *Int. J. Food Microbiol.* 80:161-169.
- Callewaert, R., and De Vuyst L. 1999. Expanded bed adsorption as unique unit operation for the isolation of bacteriocins from fermentation media. *Bioseparation* 8:159-168.
- Callon, C., L. Millet, and M. Montel. 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.* 71:231-244.
- Casaus, P, T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiol.* 143:2287-2294.
- Chen, L., J. Yang, J. Yu, Z. Yao, L. Sun, Y. Shen, and Q. Jin. 2005. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucl. Acids Res.* 33:D325-D328.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Ness, P. E. Hernández, and H. Holo. 1995. Isolation and characterization of Pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environm. Microbiol.* 61:2643-2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. Nes, and P. Hernández. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 7:281-305.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Havarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182:23.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernandez, I. F. Nes, and L. S. Havarstein. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180:1988-1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havarstein, P. Hernández, and I. Nes. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4321-4330.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 2001.71:1-20.
- Codex Alimentarius 2003. Norma del codex para leches fermentadas. Codex Standard 243-2003. FAO/WHO Food Standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations. www.codexalimentarius.net junio/2007.

- Cogan, T. M., M. Barbosa, E. Beuvier, B. Bianchi-Salvadori, P. S. Cocconcelli, I. Fernandez, J. Gomez, R. Gomez, G. Calantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M. Rea, and E. Rodríguez. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64:409-421.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev.* 3:777-788.
- Cunico, R. L., K. M. Gooding, and T. Wehr. 1998. Basic HPLC en CE of biomolecules. Bay Bioanalytical Laboratory, Richmond CA, pp. 104-114, 145-179.
- De Vuyst, L., M. R. Foulquié Moreno, and H. Revets. 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 84:299-318.
- Devlieghere, F., L. Vermeiren, and J. Debevere. 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* 14:273-285.
- DeWaal, C. S., and K. Barlow. 2002. Outbreak alert. CSPI. Washington D.C.: 34-37.
- Díaz-Ruiz, G., J. P. Guyot, F. Ruiz-Teran, J. Morlon-Guyot, and C. Wachter. 2003. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4367-4374.
- Eguchi, T., K. Kaminaka, J. Shima, S. Kawamoto, K. Mori, S. Choi, K. Dot, S. Ohmomo, and S. Ogata. 2001. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 247-253.
- Eijsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Havarsetein, H. Holo, and I. F. Nes. 2002. Production of II class bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:639-654.
- Elotmani, F., A. Revol-Junelles, O. Assobhei, and J. Milliere. 2002. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* strains isolated from raib, a Moroccan traditional fermented milk. *Curr. Microbiol.* 44:10-17.
- Ennahar, S., N. Deschamps, and J. Richard. 2000a. Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41:1-4.
- Ennahar, S., S. Toshihiro, K. Sonomoto, and A. Ishizaki. 2000b. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microb. Rev.* 24:85-106.

- Ennahar, S., Y. Asou, T. Zendo, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2001. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int. J. Food. Microbiol.* 70:291-301.
- Escalante, A., C. Wachter, and A. Farrés. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 64:21-31.
- Escalante, A., M. E. Rodríguez, A. Martínez, A. López-Munguía, F. Bolívar, and G. Gosset. 2004. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 235:273-279.
- FAO/OMS. 2001. Consulta de expertos sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Córdoba, Arg, pp 15-16.
- Fimland, G., K. Sletten, and J. Nissen. 2002. The complete amino acid sequence of the pediocin-like antimicrobial peptide leucocin C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295:826-827.
- Floriano, B., J. L. Ruiz-Barba, and R. Jiménez-Díaz. 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4883-4890.
- Foulquié Moreno, M. R., R. Callewaert, B. Devreese, J. Van Beeumen, and L. De Vuyst. 2003a. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* 94:214-229.
- Foulquié Moreno, M. R., M.C. Rea, T. M. Cogan, and L. De Vuyst. 2003b. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International J. Food Microbiol.* 81:73-84.
- Franz, C. M. A., A. B. Muscholl, N. M. K. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings, and W. H. Holzapfel. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4385-4389.
- Frenz, J., W. S. Hancock, and W. J. Henzel. 1990. Reversed phase chromatography in analytical biotechnology of proteins in: Gooding K. M., and Regnier F.E. Editors. *HPLC of Biological Macromolecules*. Marcel Dekker, NewYork.
- Garneau, S., N. I. Martin, and J. C. Vederas. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84:577-592.

- Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88:215-222.
- Ghraiiri, T., M. Manai, J. M. Berjeaud and J. Frere. 2004. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a tradicional Tunisian cheese. *J. Appl. Microbiol.* 97:621-628.
- Guyonnet, D., C. Fremaux, Y. Cenatiempo, and J. M. Berjeaud. 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1744-1748.
- Harris, L. J., M. A. Daeschel, M. E. Stiles, and T. R. Klaenhammer. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 52:384-387.
- Hasper, H. E., N. E. Kramer, J. L. Smith, J. D. Hillman, C. Zachariah, O. P. Kuipers, B. de Kruijff, and E. Breukink. 2006. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science* 313:1636-1637.
- Hauge, H. H., D. Mantzilas, V. G. H. Eijsink, and J. Nissen-Meyer. 1999. Membrane-mimicking entities induce structuring of the two-peptide bacteriocins plantaricin E/F and plantaricin J/K. *J. Bacteriol.* 181:740-747.
- Hécharard, Y., and S. Hans-Georg. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84:545-557.
- Herranz, C., P. Casaus, S. Mukhopadhyay, J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, I. F. Nes, P. E. Hernández, and L. M. Cintas. 2001. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiol.* 18:115-131.
- Herrera, T. 1993. Semblanza del estudio de las bebidas y de los alimentos fermentados mexicanos. In: M. C. Wachter, and P. Lappe (Eds.). *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. pp. 21-27. UNAM, México.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*. p 528. 9th ed. Williams & Wilkins. Baltimore, MD.
- Hoover, D. G. 2000. Microorganisms and their products in the preservation of foods. p. 251-276. In: B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, and G. W. Gould (Eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Baltimore, MD.
- Hugas, M., M. Garriga, and M. T. Aymerich. 2003. Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88:223-233.
- JMP (statistical software) version 3.0 Cary, NC. SAS Institute, 1995.

- Jorgensen, J. H., R. Cleeland, W. A. Craig, G. Doern, M. J. Ferraro, S. Finegold, S. Hansen, S. G. Jenkins, W. J. Novick, M. A. Pfaller, and D. A. Preston. 1993. NCCLS M2-A5. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Fifth edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Vol. 13, No. 24.
- Klein, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88:123-131.
- Kramer, J. 1977. Inhibition of different serotypes of *Listeria monocytogenes* by enterocins in solid and liquid media. *J. Med. Microbiol.* 10:367-372.
- Krystynowicz A., M. Koziolkiewicz, A. Wiktorowska, S. Bielecki, E. Klemenska, A. Masny, and A. Plucienniczak. 2005. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*. *Acta Biochim. Pol.* 52:691-698.
- Kühn, I., A. Iversen, L. Burman, B. Olsson-Liljequis, A. Franklin, M. Finn, F. Aarestrup, *et al.* 2003. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study. *Int. J. Food Microbiol.* 88:133-145.
- Lappe, P, and M. Ulloa. Microbiología del pulque. 1993. In: Wachter MC, Lappe P. (Editoras) Alimentos fermentados indígenas de México. pp. 75-79. UNAM, México D.F.
- Leistner, L. 1999. Combined methods for food preservation. In: M.S. Rahman (Ed.). *Handbook of Food Preservation*. pp. 457-485. Marcel Decker, New York.
- Leroy, F., B. Degeest, and L. De Vuyst. 2002. A novel area of predictive modeling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 73:251-259.
- Liu, S-Q. 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83:115-131.
- López-Díaz, T. M., C. Alonso, C. Román, M. L. García-López, and B. Moreno. 2000. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol.* 17:23-32.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 1998. *Brock biología de los microorganismos*. 8ª. Edición. Prentice Hall, Madrid.
- Maisnier-Patin, S., E. Forni, and J. Fichard. 1996. Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a

- strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 30:255-270.
- Marciset, O., M. C. Jeronimus, B. Mollet, and B. Poolman. 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.* 272:14277-14284.
- Mareková, M., A. Lauková, L. De Vuyst, M. Skaugen, and I. F. Nes. 2003. Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *J. Appl. Microbiol.* 94:523-530.
- Martínez-Bueno M, M. Maqueda, A. Gálvez, B. Samyn, J. Van Beeumen, J. Coyette, and E. Valdivia. 1994. Determination of the gene séquence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* 176:6334-6339.
- Martínez, C., T. Requena, and C. Peláez. 2002. Effect of bacteriocin-induced cell damage on the branched-chain amino acid transamination by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 217:109-113.
- Mensa, J., J. M. Gatell, G. Prats, and M. T. Jimenez. 1995. Guía de terapia antimicrobiana. 5a. edición, editorial Salvat, Barcelona.
- McAuliffe, O., C. Hill, and R. Ross. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. *J. Appl. Microbiol.* 86:251-256
- Moonmangmee, S., H. Toyama, O. Adachi, G. Theeragool, N. Lotong, and K. Matsushita. 2002. Purification and characterization of a novel polysaccharide involved in the pellicle produced by a thermotolerant *Acetobacter* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:777-783.
- Moreno F. M., R. Callewaert, B. Devreese, J. Van Beeumen, and L. De Vuyst. 2003. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* 94:214-229.
- Morea, M., F. Baruzzi, and P. S. Coconcelli. 1999. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *J. Appl. Microbiol.* 87:574-582.
- Morfin, R., S. Rangel, adn E. Rodríguez. 2002. Infecciones producidas por bacterias grampositivas. Controversias relacionadas al desarrollo de resistencia. *Enf. Inf. Microb.* 22:46-50.
- Morgan, S. M., P. M. O'Connor, P. D. Cotter, R. P. Ross, and C. Hill. 2005. Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic Lacticin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentrations. *Antimicrobial Agents Chemother.* 49:2606-2611.

- Morrison, D., N. Woodford, and B. Cookson. 1997. Enterococci as emerging pathogens of human. *J. Appl. Microbiol.* 83:89S-99S.
- Mufandaedza, J., B. C. Viljoen, S. B. Feresu, and T. H. Gadaga. 2006. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 108:147-152.
- Nes, I. F., and H. Holo. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55:50-61.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havarstein, and M.B. Brurberg. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:113-128.
- NOM-091-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. México D.F.
- NOM-121-SSA1-1994, Norma Oficial Mexicana bienes y servicios. Quesos frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. México D.F.
- O'Sullivan, L., R. P. Ross, and C. Hill. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84:593-604.
- Onda, T., F. Yanagida, T. Uchimura, M. Tsuji, S. Ogino, T. Shinohara, and K. Yokotsuka. 2002. Widespread distribution of the bacteriocin-producing lactic acid cocci in *Miso*-paste products. *J. Appl. Microbiol.* 92:695-705.
- Parente, E., and A. Ricciardi. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:628-638.
- Park, S. H., K. Itoh, and R. Fujisawa. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM5804. *J. Appl. Microbiol.* 95:294-300.
- Riley, M. A., and J. E. Wertz. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84:357-364.
- Rodríguez, J. M., M. I. Martínez, A. M. Suárez, J. M. Martínez, and P. E. Hernández. 1997. Research note: unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 25:73-74.
- Rosslund, E., T. Langsrud, and T. Sorhaug. 2005. Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 103:69-77.

- Saavedra, L., M. P. Taranto, F. Sesma, and G. F. de Valdez. 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 88:241-245.
- Samyn, B., M. Martinz-Bueno, B. Devreese, M. Maqueda, A. Gálvez, E. Valdivia, J. Coyette, and J. Van Beeuman. 1994. The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* 352:87-90.
- Sanni, A. I., J. Morlon-Guyot, and J. P. Guyot. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* 72:53-62.
- Sarantinopoulos, P., F. Leroy, E. Lentopoulou, M. Gerogalaki, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst. 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIRE-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *Int. J. Food Microbiol.* 72:125-136.
- Schägger, H., and G. Von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
- Schillinger, U., and F. K. Lücke. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* 4:199-208.
- Şimşek, O., A. H. Çon, and S. Tulumoğlu. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control* 17:263-270.
- Schneider, R., F. J. Fernández, M. B. Aguilar, I. Guerrero-Legarreta, A. Alpuche-Solíz, and E. Ponce-Alquicira. 2006. Partial characterization of a class II pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican “chorizo”). *Food Control* 17:909-915.
- Stahl, D. A., B. Flesher, H. R. Mansfield, and L. Montgomery. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1079-1084.
- Steinkraus, K. H. 1992. Lactic Acid Fermentations In: Applications of biotechnology to traditional fermented foods. pp 43-66. National Academy Press, Washington, D. C.
- Suzzi, G., M. Caruso, F. Gardini, A. Lombardi, L. Vannini, M. E. Guerzoni, C. Andrighetto, and M. T. Lanorte. 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *J. App. Microbiol.* 89:267-274.
- Taniguchi, M., T. Tokunaga, K. Horiuchi, K. Hoshino, K. Sakai, and T. Tanaka. 2004. Production of L-lactic acid from a mixture of xylose and glucose by co-cultivation of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:160-165.

- Titgemeyer, F., and W. Hillel. 2002. Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:59-71.
- Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, and Y. Ike. 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* 178:3585-3593.
- Uteng, M., H. Hildeng, I. Brondz, J. Nievesen, and G. Fimland. 2002. Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocina-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:952-956.
- Vancanneyt, M., A. Lombardi, C. Andrighetto, E. Knijff, S. Torriani, K. J. Bjorkroth, and C. M. A. P. Franz. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1381-1391.
- Van Heusden, H. E., B. de Kruijff, and E. Breukink. 2002. Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry* 41:12171-12178.
- Venema, K., M. L. Chikindas, J. F. S. Seegers, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, G. Venema, and J. Kok. 1997. Rapid and efficient purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:305-309.
- Vignolo, G., J. Palacios, M. E. Farías, F. Sesma, U. Schillinger, W. Holzappel, and G. Oliver. 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* 41:410-416.
- Villegas, A. 2004. *Tecnología Quesera*. pp 242-268, 283, 338. Trillas, México.
- Wessels, S., B. Jelle, and I. Ness. 1998. Bacteriocins of the lactic acid bacteria: an overlooked benefit for food. pp 2-3. Danish Toxicology Centre, Denmark.
- Weston, A., and P. R. Brown. 1997. Separations in High-Performance Liquid Chromatography. In: *HPLC principles and practice*. Academic Press; San Diego. pp. 24-70.
- Wilapun, P., T. Zendo, M. Sangjindavong, S. Nitisinprasert, V. Leelawatcharamas, J. Nakayama, and K. Sonomoto. 2004. The two synergistic-peptide bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 isolated from Thai fermented fish (pla-ra). *Sci. Asia* 30:115-122.

- Yamamoto, Y., Y. Togawa, M. Shimosaka, and M. Okazaki. 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5746-5753.
- Yamazaki, K., M. Suzuki, Y. Kawai, N. Inoue, and T.J. Montville. 2005. Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, piscocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:554-557.
- Yanagida, F., Y. Chen, T. Onda, and T. Shinohara. 2005. Duracin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans*, L28-1 isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:430-435.
- Yang, R., M. C. Johnson, and B. Ray. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3355-3359.

APENDICE

Resultados para la fermentación de carbohidratos de las 25 cepas BAL aisladas para el presente trabajo, utilizando el sistema API 50CH (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Se utilizaron dos lecturas a las 24 y otra a las 48 h. La posición de los carbohidratos dentro de la galería se muestra a continuación:

0	Control negativo	26	Ac. Salicílico
1	Glicerol	27	Celobiosa
2	Eritrosa	28	Maltosa
3	D-Arabinosa	29	Lactosa
4	L-Arabinosa	30	Melobiosa
5	Ribosa	31	Sacarosa
6	D-Xilosa	32	Trehalosa
7	L-Xilosa	33	Inulina
8	Adonitol	34	Melezitosa
9	Maltodextrina	35	Rafinosa
10	Galactosa	36	Almidón
11	Glucosa	37	Glicógeno
12	Fructosa	38	Xilitol
13	Mannosa	39	Gentobiosa
14	Sorbosa	40	Turanosa
15	Ramnosa	41	Lixitol
16	Dulcitol	42	Tagatosa
17	Inositol	43	D-Fucosa
18	Manitol	44	L-Fucosa
19	Sorbitol	45	D-Arabinol
20	α -Metil-D-manósido	46	L-Arabinol
21	α -Metil-D-glucósido	47	Gentobiosa
22	N-acetilglucosamina	48	2-Cetogluconato
23	Amilosa	49	5-Cetogluconato
24	Arabinosa		
25	Esculina		

ANEXOS

Cuadro 5.1. Espectro de actividad inhibitoria completo de BAL aisladas de alimentos artesanales mexicanos mediante técnica del botón.

	BAL	Cepas indicadoras														
		<i>S. aureus</i> 8943	<i>S. aureus</i> 8855	<i>L. monocy</i> 7644	<i>L. monocy</i> Scott A	<i>L. monocy</i> G19	<i>B. cereus</i> 11778	<i>Lc.</i> <i>lactis</i> 496	<i>Le.</i> <i>mesent</i> 523	<i>Lb.</i> <i>plant</i> 5T	<i>Pedioc</i> 8092	EPEC	<i>Salmonella</i> 02	<i>Enterobacter</i> 9476	<i>V. cholerae</i> 5921	<i>V.</i> <i>parahem</i> 10691
Alimentos de origen animal																
<i>E. faecium</i>	QPI1	++	++	+++	+++	+++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	
<i>Lc. Lactis</i>	QPII4	-	-	++	++	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	
	QPIII6	-	-	++	++	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	
	QMIV3	-	-	++	++	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	
	QPI3	-	-	++	++	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	QO14	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Lb. plantarum</i>	QMIV1	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	QMIV6	-	-	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
	QMIV7	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	CS1	-	-	++	++	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	CHO1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	++
	CHO10	-	-	++	+++	++	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Lb. delbruekii</i>	CHI4	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>Ln. mesenteroides</i>	CH210	++	+++	++	++	++	-	-	++	-	-	-	+	++	++	
Alimentos de origen vegetal																
<i>Lb. paracasei</i>	VN4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	
	VN7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	++	
<i>Lb. plantarum</i>	CC9	-	-	++	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	++	
	CC10	-	-	++	++	++	++	-	++	-	-	-	-	++	++	
	TPI13	-	-	++	++	++	-	-	-	-	++	-	-	++	++	
	TH18	-	-	++	-	++	-	-	-	-	++	-	-	++	-	
	TH19	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	++	
	PII2	-	-	++	++	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	
	CTU3	-	-	++	++	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	
	CTU4	-	+	++	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	++
	<i>Ln. mesenteroides</i>	PT8	+	++	+	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	++	++

(-) No inhibición, (+) 0.5-2.0 mm diámetro de inhibición, (++) 2.1-8.0 mm diámetro de inhibición, (+++) > 8.0 mm diámetro de inhibición.

Cuadro 5.2. Espectro de inhibición de cepas BAL agrupado por género bacteriano y origen del alimento: Número de cepas con actividad/ Número de cepas evaluadas .

Microorganismo indicador	Alimentos de origen animal (14 cepas)				Alimentos de origen vegetal (11 cepas)		
	<i>Enterococcus faecium</i> (una cepa)	<i>Lactococcus lactis</i> (5 cepas)	<i>Lactobacillus spp.</i> (7 cepas)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (una cepa)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (8 cepas)	<i>Lactobacillus paracasei</i> (2 cepas)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (una cepa)
<i>S. aureus</i> 8943	1/1	1/5	1/7	1/1	0/8	0/2	1/1
<i>S. aureus</i> 8855	1/1	1/5	1/7	1/1	0/8	0/2	1/1
<i>S. aureus</i> 9993	0/1	1/5	1/7	1/1	0/8	0/2	1/1
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	1/1	4/5	6/7	1/1	6/8	0/2	1/1
<i>L. monocytogenes</i> G19	1/1	4/5	6/7	1/1	6/8	0/2	1/1
<i>L. monocytogenes</i> 7644	1/1	4/5	5/7	1/1	8/8	0/2	1/1
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	0/1	0/5	1/7	0/1	4/8	0/2	0/1
<i>Lc. lactis</i> NCDO 496	0/1	0/5	0/7	0/1	0/8	0/2	0/1
<i>Le. mesenteroides</i> NCDO 523	0/1	0/5	0/7	1/1	1/8	0/2	0/1
<i>Lb. plantarum</i> 5T	0/1	0/5	0/7	0/1	0/8	0/2	0/1
<i>P. acidilactici</i> ATCC8092	1/1	4/5	4/7	0/1	4/8	1/2	0/1
<i>E. coli</i> EPEC	0/1	0/5	0/7	0/1	0/8	0/2	0/1
<i>Salmonella</i> sp. 02	0/1	0/5	0/7	0/1	0/8	0/2	0/1
<i>Enterobacter</i> sp. 9476	0/1	0/5	0/7	1/1	0/8	0/2	0/1
<i>Citrobacter freundii</i> 9473	1/1	0/5	2/7	1/1	3/8	0/2	1/1
<i>V. cholerae</i> no01 5921	0/1	1/5	2/7	1/1	5/8	2/2	1/1
<i>V. parahaemolyticus</i> 10691	0/1	1/5	2/7	1/1	5/8	1/2	1/1

Cuadro 5.3. Características bioquímicas de relevancia de las cepas BAL aisladas de alimentos mexicanos de origen animal.

	<i>Enterococcus faecium</i> QPI1	<i>Lactococcus lactis</i> QPII4	<i>Lactococcus lactis</i> QPIII6	<i>Lactococcus lactis</i> QMIV3	<i>Lactococcus lactis</i> QPI3	<i>Lactococcus lactis</i> QO14	<i>Lactobacillus plantarum</i> QMIV1	<i>Lactobacillus plantarum</i> QMIV6	<i>Lactobacillus plantarum</i> QMIV7	<i>Lactobacillus plantarum</i> CS1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CHI4	<i>Lactobacillus plantarum</i> CHO1	<i>Lactobacillus plantarum</i> CHO10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CHII10
pH MRS	4.7	4.5	4.5	4.4	4.6	4.1	3.8	3.9	3.9	3.8	4.1	4.1	3.9	4.6
pH TSB	5.8	5.8	6.0	5.8	5.8	5.8	5.3	5.3	5.2	5.1	5.3	5.7	5.8	5.7
pH (6 h) UHT-SM	6.2	5.2	5.2	5.5	5.9	5.3	6.3	6.3	6.3	6.4	6.5	6.3	6.4	6.4
pH (18 h) UHT-SM	5.8	4.2	4.2	4.2	5.3	4.2	5.3	5.0	5.7	6.4	4.4	6.0	6.3	6.2
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CO ₂ a partir de glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación gluconato	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
Fermentación fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación sacarosa	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Fermentación galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción acetoína	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Crecimiento 10° C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento 45° C	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

Cuadro 5.4. Características bioquímicas de relevancia de las cepas BAL aisladas de alimentos mexicanos de origen vegetal.

	<i>Lactobacillus paracasei</i> VN4	<i>Lactobacillus paracasei</i> VN7	<i>Lactobacillus plantarum</i> CC9	<i>Lactobacillus plantarum</i> CC10	<i>Lactobacillus plantarum</i> TPI13	<i>Lactobacillus plantarum</i> TII18	<i>Lactobacillus plantarum</i> TII19	<i>Lactobacillus plantarum</i> PII2	<i>Lactobacillus plantarum</i> CTU3	<i>Lactobacillus plantarum</i> CTU4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PT8
pH MRS	3.8	3.9	4.4	3.6	3.8	3.8	3.8	3.9	3.8	3.8	4.4
pH TSB	5.2	5.3	5.1	5.2	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	6.3
pH (6 h) UHT-SM	6.4	6.5	6.5	6.3	6.4	6.4	6.5	6.4	6.3	6.3	6.4
pH (18 h) UHT-SM	6.4	6.6	6.5	5.4	6.0	6.2	6.0	6.0	5.9	6.0	5.6
Fermentación glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CO ₂ de glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fermentación gluconato	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Fermentación fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación lactosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fermentación galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Producción acetoina	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Crecimiento 10° C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento 45° C	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Cuadro 5.9. Rendimiento de extracción de enterocinas por el método de absorción-desorción con células.

PASO DE PURIFICACIÓN	VOLUMEN (mL)	ACTIVIDAD (UA/mL)	ACTIVIDAD TOTAL (UA)	CONC. PROTEINA (mg/mL)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (AU/mg)	FACTOR DE PURIFICACIÓN	RENDIMIENTO (%)
ELC	3800	800	3,040,000	0.464 ± 0.045	1,763	1,724		100
Adsorción- Liberación 1 ^{er}	3	3200	9,600	0.53 ± 0.016	1.59	6,038	3.5	0.315
Adsorción- Liberación 2 ^o	2.5	1600	4,000	0.612 ± 0.075	1.53	2,623	1.5	0.132

Cuadro 5.10. Rendimiento de extracción de enterocinas por el método de precipitación con 80% de sulfato de amonio.

PASO DE PURIFICACIÓN	VOLUMEN (mL)	ACTIVIDAD (UA/mL)	ACTIVIDAD TOTAL UA	CONC. PROTEÍNA (mg/mL)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (UA/mg)	FACTOR DE PURIFICACIÓN	RENDIMIENTO (%)
EXTRACTO	3800	800	3,040,000	0.464	1763.2	1724		100
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	505	4800	2,424,000	0.985	497.4	6497.5	3.77	79.7
Precipitado dializado	750	3200	2,400,000	0.798	598.5	4010	2.325	78.9
Precipitado dializado, polvo	24.8 g	0.14g/mL	2,267,429	7.65	540.96	1673.2	0.97	74.6
Liofilizado	177.1 ml	12,800						

Cuadro 5.13 . Rendimiento de purificación para enterocinas de *E. faecium* QPI1, mediante SepPak C18 estrategia SP7, evaluando actividad con mezcla de fracciones.

PASO DE PURIFICACIÓN	VOLUMEN (mL)	ACTIVIDAD (UA/mL)	ACTIVIDAD TOTAL (2 fracciones) (UA/mL)	ACTIVIDAD TOTAL	CONC. PROTEÍNA (mg/mL)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (UA/mg)	FACTOR DE PURIFICACIÓN	RENDIMIENTO (%)
ELCC SepPak (7)	1	12,800		12,800	7.65	7.6	1,673	1	100
Fracción 1 Acuosa	1	neg	0	0	1.36	1.36			
Fracción 2 40%	1.6	320	5,565	8,181	0.93	1.4	6,010	3.6	64
Fracción 3 40%	0.7	neg	0	0	0.59	0.4			
Fracción 4 100%	0.4	160	4,452	1,780	5.54	2.2	804	0.5	14