

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO



FACULTAD DE QUIMICA

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPUBLICA (PROPAC)**

**PURIFICACION POR METODOS TRADICIONALES, POR
ADSORCION ESPECIFICA Y ESTABILIDAD DE LA
BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *Enterococcus faecium* UQ1**

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

Presenta:

L.A.Q.B. IRMA ARACELI RIVERA BARBOSA

Dirigen:

**DR. CARLOS REGALADO GONZALEZ
M.C. BLANCA ESTELA GARCIA ALMENDAREZ**

Santiago de Querétaro, Qro., México 2000



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

“PURIFICACION POR METODOS TRADICIONALES, POR ADSORCION ESPECIFICA Y ESTABILIDAD DE LA BACTERIOCINA PRODUCIDA POR *Enterococcus faecium* UQ1”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Presenta:

L.A.Q.B. IRMA ARACELI RIVERA BARBOSA

Dirigida por:

DR. CARLOS REGALADO GONZALEZ

SINODALES

DR. CARLOS REGALADO GONZALEZ

Presidente

M.C. BLANCA E. GARCIA ALMENDAREZ

Secretario

DRA. BLANCA ESCUDERO ABARCA

Vocal

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

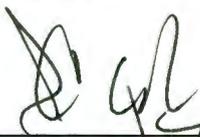
Suplente

M.C. JORGE ALVAREZ DOMINGUEZ

Suplente

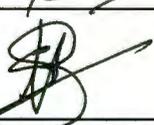
M.C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES

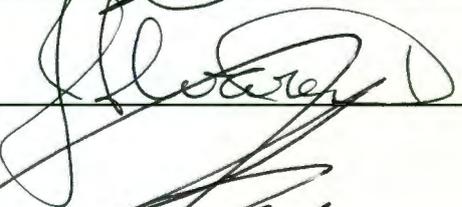
Director de la Facultad de Química













DR. SERGIO QUESADA ALDANA
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro
México

*Lo sublime y lo ínfimo
están en cada persona.*

H.A.

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo la asesoría del Dr. Carlos Regalado González y M.C. Blanca Estela García Almendárez

Resumen

Las bacteriocinas son agentes antimicrobianos de origen natural, de naturaleza proteica que se consideran como una posible alternativa para la conservación de alimentos. El objetivo de este trabajo fue purificar mediante métodos tradicionales y de adsorción específica la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* UQ1, así como caracterizarla parcialmente. La actividad se cuantificó por el método de difusión en agar, usando como microorganismo indicador *Micrococcus luteus* NCIB 8166 mediante el método de dilución crítica y expresándose como unidades arbitrarias (UA). Para la purificación tradicional se emplearon precipitaciones con sulfato de amonio y acetona, cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel. De la purificación tradicional se obtuvieron dos picos con actividad (A y B) representado el 19% de la actividad inicial y el 1% de la proteína total inicial. El pico A tuvo una actividad específica de 780 UA/mg, mientras que el B tuvo una actividad de 670 UA/mg, con un peso molecular estimado por filtración en gel de ~2400 Da. Mediante electroforesis en condiciones reductoras, la fracción A presentó dos bandas de pesos moleculares de 60 y 66 KDa. La actividad antimicrobiana en este intervalo de pesos moleculares se comprobó por un zimograma, y las bacteriocinas de alto y bajo peso molecular no presentaron efecto sinergista. Se logró purificar una de las bacteriocinas a homogeneidad mediante el método de adsorción específica, seguido de cromatografía de intercambio catiónico. Su peso molecular determinado por electroforesis en el sistema Tris-tricina fue de 4500 Da. Probablemente esta bacteriocina corresponde a la fracción B. La actividad específica obtenida fue de 2.5×10^5 UA/mg, con un factor de purificación de 1070, recuperándose el 1.8% de la actividad inicial. El extracto libre de células concentrado (ELCC) resultó ser estable en un amplio rango de pH (2-12), conservando el total de su actividad por 5 h a 4°C. El ELCC a pH 6.5 mantuvo su actividad durante 10 semanas en congelación (-20°C) y 5 días en refrigeración (4°C). Las bacteriocinas producidas por *E. faecium* UQ1 perdieron el 50% de su actividad por calentamiento a 121°C por 15 min (esterilización húmeda). El ELCC presentó actividad contra células en crecimiento de *Listeria monocytogenes* Scott A, presentando una reducción de 6 log comparado con el control, después de 17 h de haberse adicionado. Las bacteriocinas producidas por *E. faecium* UQ1 pueden ser de interés para su aplicación como barrera adicional de origen natural, en la conservación de los alimentos.

Palabras clave: bacteriocinas, *Enterococcus faecium*, purificación.

Summary

Bacteriocins are antimicrobial agents of natural origin and of proteinaceous nature. They are considered as a possible alternative for food preservation. The objective of this work was to purify the bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* UQ1, using traditional and novel purification methods. We also aimed to partially characterize the bacteriocin. Activity was evaluated by the agar diffusion method, using *Micrococcus luteus* NCIB 8166 as indicator microorganism; the following critical dilution technique and was expressed as arbitrary units (UA). For traditional purification, the first step was ammonium sulfate and acetone precipitation, followed by anion exchange and gel filtration chromatographies. From this purification scheme two activity peaks were obtained (A and B), representing 19% initial activity and 1% initial protein. Peak A specific activity of 780 UA/mg, while peak B had 670 UA/mg, with a molecular weight of ~2400 Da, estimated by gel filtration. Using electrophoresis under reducing conditions, fraction A showed two bands: 60 and 66 kDa. The antimicrobial activity in this molecular weight range was observed using a zymogram. The high and low molecular weight bacteriocins did not show a synergistic effect. One bacteriocin was purified to homogeneity, using the specific adsorption method, followed by cation exchange chromatography. Its molecular weight was 4500 Da, determined by the tris-tricine electrophoresis buffer system. Probably this bacteriocin corresponds to fraction B. The specific activity was 2.5×10^5 UA/mg with a purification factor of 1070, and 1.8% initial activity recovery. The concentrated cell free extract (CCFE) was stable over a wide pH range (2-12), keeping full activity when held for 5 h at 4°C, at those pHs. The CCFE to pH 6.5 was fully active after 10 weeks storage at -20°C, and after 5 days refrigerated storage (4°C). The bacteriocins from *E. faecium* UQ1 lost 50% activity upon heating at 121°C for 15 min (steam sterilization). The CCFE showed activity against growing cells of *Listeria monocytogenes* Scott A a 6 log reduction, compared with the control sample, after 17 h contact time. Bacteriocins produced by *E. faecium* UQ1 may be of commercial interest as an additional hurdle of natural origin, in food biopreservation.

Key words: bacteriocins, *Enterococcus faecium*, purification.

DEDICATORIAS

A mi Mamá:

Guadalupe, por tu gran amor, paciencia, fortaleza y apoyo. Te amo.

A mi Papá:

Por tantas cosas Gordo, pero más que nada por haber estado siempre conmigo, por tu fortaleza hasta el último momento, por haber sido como fuiste; tan original y carismático, como dijo Lupita. Sabes todo estuvo perfecto. Te amo. ¡Hasta SIEMPRE!

A mis hermanos; Maricela, Martha, Rubén, Guadalupe y Genaro por su gran cariño, comprensión, apoyo, ayuda y por todos los momentos vividos.

A mis sobrinos, Bebalitos (Anayeli), Chuyín, Rubencito I; Ricardito, Huguito, Rubencito II y los que están en camino, ya que son la alegría de mi familia y la fuerza para continuar.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Regalado González y M.C. Blanca Estela García Almendárez; por su paciencia, apoyo, tiempo dedicado y por presionarme a finalizar. Mil gracias.

Al Dr. Sergio Huerta Ochoa, Dra. Blanca Escudero Abarca y M.C. Jorge Alvarez Domínguez por la revisión y observaciones en el escrito de la Tesis.

Al todo el personal del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, de una forma muy especial a Carmelita por organizar el relajo; Don Toño, Benjamín, Emiliano y Roberto por sus atenciones, pero más que nada por las tazas de café.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A mis cuñados (as); Ricardo Campos, Gabriela Delgadillo, Deisy, Sacramento Ramírez y Jesús Villalobos por incrementar la familia.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología de alimentos; Ulises Mora, Miguel Duarte, Karla Martínez Gómez, Erika Córdova, Sandra Rodríguez, Juanita Ibarra, Lidia Mayorga, Sandra García, Silvia Amaya, Verónica Santiago, Luis Vázquez, Pedro Vázquez, Violeta García, Ignacio Lagunes, Luz María Medina (Cachis), Beneranda Murúa, Mónica Ortega y Brisia Villalón; por la ayuda prestada y todos los momentos amenos vividos.

A Sandra Rodríguez, Isidro Reséndiz, Leticia Morones y Anastacio Marmolejo, por las pláticas y reuniones. Y claro a Mariela Camacho por su espontaneidad y alegría.

A Erika B. Córdova y Miguel A. Duarte, por haberme dado la oportunidad de conocerlos.

A mis amigos Leticia Rangel, José A. Macías, Rosa Ma. Ramírez y Verónica Jaime, por su amistad de tantos años.

A mis amigos Ulises Mora Alvarez y Sofía Arvizu Medrano; por su amistad, por abrirme las puertas de su hogar y por tantas otras cosas.

A Martha Aguilar Medrano, por las charlas filosóficas.

A Rogelio Seañez Reyes, por haberte conocido durante tanto tiempo, por ser tan diferente a todas las personas.

A ti mi gran amigo Francisco Alvarez, realmente eres el más cierto en horas inciertas.

A Victor M. Martínez Suárez por haberme acompañado cuando más lo necesitaba y por los ánimos que me brindas.

A Gloria Elena Soto Zamora, Sara Nilda Chávez Sánchez, Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, simplemente por estar *SIEMPRE* a mi lado. Las quiero mucho. Agradezco a la vida por haberlas conocido.

Y por supuesto a mis amigas y hermanas: Magalli Quijada, Saraí Guerrero, Claudia Huante, Kruskaia Calzontzin, Arlette Longoria; por ser mi familia en Querétaro, por su apoyo, compañía, consuelo y aceptación.

A ti Fátima por ser como una hermana; tan diferente, pero a mi lado.

A mi Tierra, Aguascalientes.

Indice

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Indice	vi
Indice de tablas	x
Indice de figuras	xi
1. Introducción	1
2. Antecedentes bibliográficos	3
2.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)	3
2.1.1 Clasificación de BAL	3
2.2 Antimicrobianos de BAL	4
2.2.1 Ácidos orgánicos	4
2.2.2 Peróxido de hidrógeno	5
2.2.3 Diacetilo (2-3 butanodiona)	5
2.2.4 Reuterina (B-hidroxiacetaldehído)	6
2.2.5 Bacteriocinas	6
2.2.5.1 Clasificación de bacteriocinas	8
2.2.5.2 Mecanismos de acción de las bacteriocinas de la clase II	8
2.2.5.3 Aplicaciones	9
2.3 Género <i>Enterococcus</i>	10
2.3.1 Taxonomía	10
2.3.2 Características del género <i>Enterococcus</i>	11
2.3.3 Bacteriocinas del género <i>Enterococcus</i>	12
2.3.3.1. Espectro de actividad	12
2.4 Purificación de bacteriocinas	12

2.4.1 Interferencia de componentes de medio de cultivo en la purificación	17
2.4.2 Adsorción y liberación	18
2.4.3 Isoelectroenfoque	18
2.4.4 Métodos tradicionales	19
2.4.4.1 Precipitación	19
2.4.5 Purificación por técnicas cromatográficas	22
2.4.5.1 Intercambio iónico	22
2.4.5.2 Filtración en gel	23
2.4.5.3 Interacción Hidrofóbica	24
2.5 Electroforesis	24
3. Justificación	26
4. Objetivos	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27
5. Materiales y métodos	28
5.1 Fuente y conservación de la cepa productora de bacteriocina <i>E. faecium</i> UQ1	28
5.2 Ensayo de la actividad bacteriocina	28
5.3 Preparación del inóculo	29
5.4 Producción de la bacteriocina	29
5.4.1 Obtención del extracto libre de células concentrado (ELCC)	31
5.5 Métodos alternativos de purificación (adsorción y desorción)	31
5.6 Purificación por métodos tradicionales	32
5.6.1 Precipitación con sulfato de amonio	32
5.6.2 Precipitación con acetona	32

5.6.3 Técnicas cromatográficas	32
5.6.3.1 Intercambio catiónico	32
5.6.3.2 Intercambio aniónico	33
5.6.3.3 Filtración en gel con Superdex 30	33
5.6.3.4 Filtración en gel con Sephadex G-100	33
5.7 Estudios electroforéticos	34
5.7.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en el sistema Tris-tricina	34
5.7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en el sistema Tris-glicina	34
5.7.3 Zimograma	35
5.8 Estabilidad de la bacteriocina	35
5.8.1 Efectos del pH en la actividad de la bacteriocina	35
5.8.2 Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento	35
5.8.3 Efecto de condiciones de esterilización húmeda	36
5.9 Diálisis	36
5.10 Cuantificación de proteínas	36
6. Resultados y discusión	37
6.1 Producción de la bacteriocina de <i>E. faecium</i> UQ1	37
6.2 Purificación mediante adsorción específica	38
6.3 Purificación por métodos tradicionales	41
6.3.1 Precipitación con sulfato de amonio	44
6.3.2 Precipitación con acetona	49
6.3.3 Cromatografía de intercambio catiónico	52
6.3.4 Cromatografía de intercambio aniónico	54
6.3.5 Filtración en gel	58
6.4 Estabilidad de la bacteriocina	67
7. Conclusiones	70

8. Bibliografía	72
9. Apéndices	84
A1 Curva de calibración para la cuantificación de proteína soluble, usando el método de ácido bicinconínico a 37°C	85
A2 Curva de calibración de la filtración en gel con Superdex 30	86
A3 Curva de calibración para determinación de pesos moleculares de la cromatografía de filtración en gel con Superdex 30	87
A4 Curva de calibración de pesos moleculares, con Sephadex G-100	88
A5 Efecto de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> UQ1 en el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> Scott A en fase exponencial	89

Indice de tablas

Tabla 2.1	Diferencias entre antibióticos y bacteriocinas	7
Tabla 2.2	Características del género <i>Enterococcus</i>	11
Tabla 2.3	Espectro de actividad de bacteriocinas producidas por BAL	13
Tabla 2.4	Características de bacteriocinas producidas por <i>Enterococcus faecium</i>	14
Tabla 2.5	Espectro de inhibición de <i>Enterococcus faecium</i> UQ1	16
Tabla 2.6	Diferentes bacteriocinas purificadas por métodos tradicionales	20
Tabla 5.1	Diversas condiciones para la producción de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> UQ1	30
Tabla 6.1	Resumen global de las etapas de purificación por adsorción específica	39
Tabla 6.2	Resumen de las primeras etapas de la purificación tradicional (precipitación con sulfato de amonio)	49
Tabla 6.3	Resumen de la etapa de purificación con cromatografía de intercambio aniónico (Tris-acril M DEAE)	56
Tabla 6.4	Resumen de la etapa de purificación con la cromatografía de filtración en gel con Superdex 30	58
Tabla 6.5	Resumen global de las etapas de la purificación tradicional de las bacteriocinas producidas por <i>E. faecium</i> UQ1	66

Indice de figuras

Figura 6.1	Cromatograma de intercambio catiónico (FLPC) de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> UQ1	40
Figura 6.2	Electroforesis desnaturalizante de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> UQ1 a) zimograma y b) tinción con Coomassie.	40
Figura 6.3	Determinación de velocidad de flujo en la unidad Minitan II.	42
Figura 6.4	Actividad por el método de difusión en agar de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> UQ1 en el ELCC, como microorganismo indicador <i>M. luteus</i> NCIB 8166	43
Figura 6.5	Actividades específicas de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> UQ1, obtenidas por precipitación diferencial con sulfato de amonio	45
Figura 6.6	Actividades recuperadas de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> UQ1, obtenidas por precipitación diferencial con sulfato de amonio	46
Figura 6.7	Actividad por el método de difusión en agar de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> UQ1 en el precipitado con sulfato de amonio al 80% de saturación como microorganismo indicador <i>M. luteus</i> NCIB 8166	47
Figura 6.8	Actividades específicas de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> UQ1 obtenidas por precipitación diferencial con acetona	50
Figura 6.9	Actividades recuperadas de la bacteriocina producida por <i>E. faecium</i> UQ1, obtenidas por precipitación diferencial con acetona	51

Figura 6.10	Cromatograma de intercambio catiónico (SP Tris-acril plus M) del ELCC precipitado con 80% de saturación con sulfato de amonio	53
Figura 6.11	Cromatograma de intercambio aniónico (Tris-acril M DEAE) del ELCC precipitado con 80% de saturación de sulfato de amonio	55
Figura 6.12	Electroforesis en el sistema Tris-tricina (16.5% T) de la cromatografía de intercambio aniónico (Tris-acril M DEAE).	57
Figura 6.13	Zimograma de la fracción 17 de la cromatografía de intercambio aniónico (Tris-acril M DEAE), como microorganismo indicador <i>M. luteus</i> NCIB 8166	57
Figura 6.14	Filtración en gel con Superdex 30. Fracciones con actividad recolectadas de la cromatografía de intercambio anónico (Tris-acril M DEAE)	59
Figura 6.15	Filtración en gel con Sephadex G-100. Fracciones con actividad recolectadas de la cromatografía de intercambio anónico (Tris-acril M DEAE).	62
Figura 6.16	Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) 10%T en condiciones reductoras de la cromatografía de filtración en gel con Superdex 30	64
Figura 6.17	Zimograma de las fracciones 9 y 11 de la cromatografía de filtración en gel con Superdex 30	64
Figura 6.18	Efecto del almacenamiento en refrigeración (4°C) en la estabilidad de la bacteriocina presente en el ELCC de <i>E. faecium</i> UQ1	68
Figura 6.19	Efecto del almacenamiento en congelación (-20°C), en la estabilidad de la bacteriocina presente en el ELCC de <i>E. faecium</i> UQ1	69

1. Introducción

El uso de aditivos antimicrobianos tradicionales ha asegurado la inocuidad de los alimentos almacenados, pero ha traído consigo efectos colaterales en la salud como son problemas en asmáticos por el uso de sulfitos, o la existencia de nitrosaminas en los alimentos derivados de los nitritos que son agentes mutagénicos y muchos de los cuales también son cancerígenos. Esto ha llevado al consumidor a un mayor interés en los alimentos de origen natural. Por otro lado el uso de temperaturas de refrigeración para la conservación de los alimentos, ha tenido como consecuencia que deterioradores, los cuales causan pérdidas en los alimentos y patógenos que dañan la salud como *Listeria monocytogenes* puedan desarrollarse. Recientemente se ha incrementado el control de estos microorganismos a través del uso de las bacterias ácido lácticas (BAL) ó algunos de sus metabolitos como las bacteriocinas, las cuales son clasificadas como bioconservadores. Estas pueden adicionarse para asegurar y proveer calidad a los alimentos que no son generalmente considerados como fermentados (Montville y Winkowski, 1997).

El efecto antimicrobiano de las BAL ha sido reconocido por miles de años, y se ha observado con ello la extensión de la vida de anaquel de muchos productos fermentados, principalmente por la producción de ácidos acético y láctico, aunque también por la producción de otras sustancias antimicrobianas como el peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Aunado a esto las BAL producen efectos positivos sobre el sabor y textura de los alimentos fermentados.

Actualmente existe una tendencia por consumir alimentos frescos libres de aditivos químicos en donde las etapas de procesamiento sean reducidas al mínimo, originando lo que se conoce como alimentos mínimamente procesados. Estos son una alternativa para satisfacer las necesidades del consumidor de obtener alimentos frescos y de buena calidad, necesitándose por lo tanto estrategias para asegurar su inocuidad y prolongar su vida de anaquel; tales como el uso de barreras múltiples. Dichas barreras pueden ser baja temperatura, bajo pH, alta concentración de sal, así como la adición de agentes antimicrobianos como bacteriocinas (CAST, 1998 y Olhson, 1994). Un estudio donde se involucran múltiples métodos tales como presiones hidrostáticas ultraltas (UHP), campos con impulso eléctricos de alto voltaje

y corta duración (PEF) en combinación con bacteriocinas (nisina y pediocina PA-1), mostrando un mayor efecto antimicrobiano que cada uno por separado (Kalchayanand et al., 1994). En Estados Unidos de América la asociación nacional de alimentos procesados (NFPA), ha recomendado la adición de barreras múltiples en alimentos refrigerados, para evitar el crecimiento de patógenos como *Listeria monocytogenes*. Las bacteriocinas pueden adicionarse a este tipo de alimentos presentando ventajas sobre otros conservadores de origen químico. Dada su naturaleza proteica pueden ser degradadas por proteasas digestivas; además no alteran las características sensoriales del alimento.

Es necesario conocer el comportamiento de las bacteriocinas así como sus interacciones con compuestos existentes en el medio de producción (carbohidratos, lípidos, etc.) ya que al interaccionar con éstos compuestos pueden ver afectada su actividad, estabilidad o formar agregados (Nes et al., 1996). Por otra parte, la purificación de las bacteriocinas es necesaria para conocer sus propiedades bioquímicas, estructura molecular, así como su organización genética. Se han reportado varios protocolos para la purificación de bacteriocinas; sin embargo no existe una metodología generalizada, dada la heterogeneidad que presentan estas sustancias. En este trabajo se pretende comparar un método tradicional de purificación con otro recientemente reportado, basado en la adsorción específica de las bacteriocinas a las células productoras (Yang et al., 1992).

2. Antecedentes

2.1 Bacterias ácido lácticas

Las BAL son un grupo de bacterias unidas por características morfológicas, metabólicas y fisiológicas, gram positivas, no esporulan, son cocos, bacilos o cocobacilos, homofermentativos (producen ácido láctico como el principal producto de la fermentación de carbohidratos) ó heterofermentativos (producen ácido láctico, CO₂ y algunas ácido acético), catalasa negativos (Pot et al., 1994).

2.1.1 Clasificación de las BAL

Investigaciones recientes sugieren que los géneros pertenecientes a las BAL comprenden a: *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Globicatella* y *Vagococcus* (Axelsson, 1993; Devriese et al., 1993). La clasificación de las BAL, está principalmente basada en la morfología, fermentación de carbohidratos, crecimiento a diferentes temperaturas, habilidad para crecer a altas concentraciones de sal, tolerancia ácida y básica así como vías de la producción de ácido láctico; para algunos géneros se toman en cuenta características adicionales como composición de ácidos grasos y motilidad.

Existen varias técnicas que han sido utilizadas para clasificar a las BAL, como las fracciones de rARN, en particular 16S rARN y 23S rARN que contienen regiones de secuencias relativamente conservadas, están presentes en las células varias copias y son más sensibles que el uso del ADN cromosomal o de plásmidos.

El patrón de proteínas solubles también se ha utilizado para la clasificación. Aquí las proteínas totales son liberadas de las células y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta clasificación se basa en las similitudes de bandas patrón y homología de DNA-DNA, y sirve para clasificación a nivel especie (Pot et al., 1994).

Las bacterias ácido lácticas pueden ser utilizadas como probióticos, especialmente el género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium bifidum* y *Enterococcus faecium*, ya que pueden colonizar el tracto gastrointestinal, creando condiciones adversas a especies patógenas, debido principalmente a la producción de sus metabolitos; además las BAL son reconocidas como GRAS (De Vuyst y Vandame, 1994).

2.2 Antimicrobianos producidos por BAL

Las BAL producen una gran variedad de metabolitos con carácter antimicrobiano. La producción de ácidos *in situ* por parte de esta familia de bacterias es la forma más importante de conservación de un alimento, aunque existe la producción de otros antimicrobianos como son; peróxido de hidrógeno, diacetilo, así como reuterina para el caso de *Lactobacillus reuteri* y bacteriocinas (Montville y Winkowsky, 1997).

2.2.1 Ácidos orgánicos

Las BAL fermentan los carbohidratos por diferentes vías metabólicas y durante este proceso se obtienen ácidos orgánicos (principalmente láctico y acético), que no son utilizados por las células y se excretan; el efecto de estos ácidos como antimicrobiano se ve regulado por factores como su pKa, pH del medio ambiente, concentración, tiempo y temperatura de exposición así como el tipo de microorganismo inhibido. Estos ácidos contribuyen al desarrollo de sabor y aroma, así como a la estabilidad mediante la inhibición de microorganismos deterioradores o patógenos. La eficiencia de los ácidos orgánicos como antimicrobianos se explica en base a la teoría quimiostática y homeostática del pH; en la cual los ácidos orgánicos sin disociar pueden atravesar fácilmente la membrana citoplasmática de las células sensibles, estos ácidos son altamente solubles en el medio acuoso interno ligeramente alcalino y se disocian produciendo protones y aniones; cuando los protones excedan la capacidad amortiguadora del medio interno; los protones se transportan al exterior a través de la bomba de protones, disminuyendo así las reservas energéticas hasta detener la bomba de protones y causando así una baja en el pH interno provocando la desnaturalización de proteínas y desestabilizando a otras estructuras esenciales para el metabolismo celular.

Además para la generación de energía y transporte activo de nutrientes en las células microbianas se mantiene un gradiente transmembranal de pH de cerca de 0.5 a 1.0 unidades, para el interior y exterior de la células respectivamente y un gradiente de protones de cerca de 200 mV para la respiración. Estos dos gradientes forman la Fuerza Protón Motriz (PMF); la cual maneja el transporte de protones y nutrientes y provee la energía necesaria a la célula. Para estabilizar el gradiente normal, las

células no productoras de ácidos tienden a mover los protones al interior a través de la bomba de protones (PMF), ya que una alta concentración de protones afuera reducirá el pH del medio exterior quedando expuestas algunas estructuras celulares como la pared, membrana celular y espacio periplasmático. Un bajo pH puede causar desnaturalización de enzimas presentes en estas estructuras y causar la desestabilización de la permeabilidad de la membrana, inhibiendo el crecimiento y la viabilidad celular (Ray y Sandine, 1992).

2.2.2 Peróxido de hidrógeno

Las BAL producen peróxido de hidrógeno como mecanismo de protección frente al oxígeno. El peróxido de hidrógeno es un efectivo antimicrobiano en virtud de su potencial de oxidación, por parte del radical hidroxilo el cual reacciona rápidamente con lípidos de las membranas celulares y ADN. Las células productoras de peróxido de hidrógeno se protegen de éste, mediante la acción de oxidasas o NADH peroxidasa, catalasa o por la secreción al medio ambiente en bajas cantidades. Las células sensibles al no tener estos sistemas de protección y acumularse el peróxido de hidrógeno en el medio de crecimiento quedan expuestas a sus efectos (Daescheal y Penner, 1992).

2.2.3 Diacetilo (2-3 butanodiona)

Es un compuesto producido por BAL fermentadoras del citrato; poseen un efecto antimicrobiano a elevadas concentraciones, a bajas concentraciones puede ser metabolizado por algunos microorganismos y es más efectivo contra microorganismos Gram (-), levaduras y hongos. El grupo α,α -dicarbonilo de la molécula reacciona con la porción guanido del aminoácido arginina en enzimas microbianas (alcohol deshidrogenasa, adenilato ciclasa, glutamato deshidrogenasa, transcetolasa), desactivándolas por bloqueo ó por modificación de la zona catalítica. Este compuesto se considera GRAS, pero requieren grandes cantidades para ejercer su efecto antimicrobiano por lo cual no es conveniente su uso ya que posee un aroma intenso (Requena y Peláez, 1995).

2.2.4 Reuterina (β -hidroxipropionaldehido)

Es una sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus reuteri*, microorganismo presente en el intestino humano, así como en productos cárnicos, es un metabolito neutro asociado directamente con el metabolismo anaeróbico del glicerol, es activa contra bacterias Gram (-), Gram (+) y algunos protozoarios como *Trypanosoma*. La reuterina actúa inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa que cataliza el primer paso en la síntesis de ADN, esto explica su amplio espectro (Requena y Peláez, 1995).

2.2.5 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas sintetizadas a nivel ribosomal con actividad antimicrobiana contra grupos relacionados taxonómicamente de carácter deteriorador o patógeno pero no contra la cepa productora (Lewus y Montville 1991; y Klaenhammer, 1988).

La primera bacteriocina de BAL reconocida fue la nisina, que es un polipéptido producido por *Lactococcus lactis subsp. lactis*, que se inactiva por proteasas como α -quimiotripsina o ficina y es resistente a pepsina, elastasa, erepsina y carboxipeptidasa y es la bacteriocina más estudiada.

No obstante que las diferencias entre antibiótico y bacteriocinas siguen siendo motivo de controversia es necesario establecerlas, debido a que el uso de antibióticos como conservadores en alimentos no es permitido ya que pueden comprometer la eficacia clínica de los antibióticos (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Diferencias entre antibióticos y bacteriocinas

Antibióticos	Bacteriocinas
Espectro de actividad amplio (Gram negativa, Gram positiva, hongos, levaduras, etc.)	Espectro de actividad estrecho (contra cepas relacionadas taxonómicamente)
Mayor complejidad química	Naturaleza proteica
Son producidas por microorganismo procarionte o eucariote, no grado alimenticio	Son producidas por microorganismo procarionte grado alimenticio
Empaquetamiento enzimático de aminoácidos libres	Sintetizadas a nivel ribosomal
No son degradadas por enzimas gastrointestinales	Son degradadas por enzimas gastrointestinales
Para inhibir o tratar enfermedades infecciosas	Se utiliza como conservador alimentario

Montville y Kaiser, 1993

2.2.5.1 Clasificación de las bacteriocinas

Nes et al., (1996) clasificaron a las bacteriocinas en función a sus propiedades bioquímicas, peso molecular, espectro de actividad, mecanismo de acción, sistemas de producción y secreción, así como la organización genética de los operones que codifican estos compuestos en los siguientes grupos:

- I) Lantibióticos, péptidos pequeños (<5 kDa), que contienen en su estructura aminoácidos atípicos como, dehidroalanina (Dha), dehidrobutirina (Dhb) lantionina y β -metil lantionina, estos aminoácidos son producidos por modificaciones postraduccionales de la serina y la treonina a sus formas dehidro; los dehidro aminoácidos reactivos forman con la cisteína un enlace sulfhídrido (anillo de lantionina). Entre ellas esta la nisina, lactacina 481 y lactacina S.
- II) Péptidos pequeños termoestables (<10 kDa). La molécula precursora es procesada después de dos residuos de glicina, esta clase se divide en cuatro subgrupos:
 - a.- Bacteriocinas parecidas a la pediocina; activas contra *L. monocytogenes* y tienen una secuencia consenso amino terminal Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys a este pertenecen la pediocina PA-1, sakacina A y P, leucocina A, bavaricina MN y curvacina A.
 - b.- Estas requieren dos diferentes péptidos para su actividad; a él pertenecen lactococcina M, lactacina F, lactococcina G.
 - c.- Estos requieren una secuencia consenso para ser transportadas al exterior.
 - d.- No pertenecen a ningún de los otros tres subgrupos
- III) Proteínas termolábiles (> 30 kDa) como la helveticina J, helveticina V-1829, ácidofilucina A, caseicina 80 y lactacinas A y B.

2.2.5.2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas de la clase II

La lactococcina A producida por *Lactococcus lactis* incrementa la permeabilidad de la membrana citoplasmática de manera independiente del voltaje. La especificidad de Lcn A para *Lactococcus* puede resultar de la interacción con receptores proteicos específicos de la membrana de las células blanco.

La hidrofobicidad del segmento extendido hipotético de la membrana es de 0.52 mientras que una molécula completa de Lcn A, tiene una hidrofobicidad media de 0.18. Esto sugiere que LcnA podría ser enganchada a la membrana citoplasmática de las células sensibles por este segmento transmembrana hipotético, e inducir la pérdida de iones, ATP, y aminoácidos por la formación de un poro de una manera análoga a otras péptidos formadores de poro (Abee, 1995).

Los pediococci son ampliamente aplicados en la fermentación de carne y vegetales; la bacteriocina mejor estudiada es la pediocina PA-1, producida por *Pediococcus acidilactici*, la cual recientemente se demostró que era idéntica a la pediocina AcH. Esta bacteriocina muestra secuencias similares con varias otras bacteriocinas antilisteriales de amplio espectro como la curvacina A, leucocina A, sakacina A y P, y la carnobacteriocina BM1 y B2, producidas por BAL asociadas con carne.

La pediocina madura PA-1, es un péptido altamente hidrofóbico, cargado positivamente a pH neutro y tiene 44 aminoácidos. La proteína contiene dos residuos de cisteína los cuales están en posición 24 y 44 y son esenciales para la actividad. Actúa sobre la membrana citoplasmática, provocando una disipación del gradiente de iones e inhibiendo el transporte de aminoácidos en la célula sensible y en vesículas membranales derivadas de éstas; mientras los liposomas formados con la membrana lipídica no son afectados. Probablemente la pediocina PA-1 y otras bacteriocinas pertenecientes al grupo II forman poros hidrofílicos en la membrana citoplasmática de la célula sensible con una proteína receptora de manera independiente al voltaje (Abee, 1995).

2.2.5.3 Aplicaciones

Las bacteriocinas pueden ser utilizadas como una barrera más para retardar el crecimiento de microorganismos patógenos o deterioradores de los alimentos. En Estados Unidos se presentó un brote de *L. monocytogenes* reportando 15 muertos, por lo que el control de microorganismos patógenos en alimentos aún en países desarrollados es de primordial importancia (CDC, 1999). Las bacteriocinas con gran actividad antilisterial pueden ser una alternativa para ello, éstas se pueden aplicar de forma purificada o *in situ*. La nisina se comercializó inicialmente en 1954 por la

compañía inglesa Aplin y Barrett con el nombre de "Nisaplin". Se ha permitido su uso en más de 50 países (Delves-Broughton et al., 1996) y ha sido recomendada en Europa para utilizarse como conservador en productos vegetales y enlatados para prevenir el crecimiento de *Clostridium botulinum*, cuando las condiciones de esterilización son menos drásticas a las deseadas; fue aprobada por la FDA en 1988. Actualmente la compañía Chr. Hansen comercializa también la nisina con el nombre de "Crispacina", mientras que la compañía estadounidense Ambi lo hace con el nombre de "Ambicina". La pureza deseada de las bacteriocinas esta en función a su aplicación, por ejemplo si se usa como ingrediente no se necesita una alta pureza; pero para realizar estudios de caracterización o mecanismos de acción es necesario que estén puras (Muriana y Luchansky, 1993).

La pediocina PA-1 es otra bacteriocina que está disponible en forma de ingrediente de un producto fermentado; se usa para el control de patógenos en carnes o para extender la vida de anaquel de los alimentos; tal es el caso de "Alta" y "Perlac", producidas por Quest Internacional (Wessels et al., 1999).

Las cepas productoras de bacteriocinas se han comercializado como cultivos que se añaden a productos alimenticios, tal es el caso de *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus bavaricus* que se comercializan como una mezcla de ambos con el nombre de "Bactofer F-LC" para usarse en carnes secas fermentadas y *Lactobacillus plantarum* se comercializa con el nombre "ALCO1" y se utiliza en quesos para untar (Wessels et al., 1999).

2.3 Género *Enterococcus*

2.3.1. Taxonomía

El género *Streptococcus* se ha dividido en tres géneros, el *Lactococcus* que es de importancia en la industria láctea, el *Enterococcus* que sirvió para clasificar en primer lugar los de origen fecal y *Streptococcus sensu stricto* (Devriese et al., 1993).

Las especies de *Enterococcus* están ampliamente distribuida en mucosas de hombres y animales, aunque el papel de éstas en infecciones de animales no es muy claro (Hardie y Whiley, 1997), por lo que no está considerado como patógeno estricto. Los *Enterococcus* pueden recuperarse de una gran variedad de alimentos,

de origen vegetal y animal como la cepa *E. faecium* NA01 aislada de “wara”, un alimento fermentado de origen africano (Olasupo et al; 1994), y *E. faecium* UQ1 del kefir entre otros (Ibarra et al., 1999).

Análisis de secuencia de 16S rARN mostraron que Lactococci y Enterococci están separados en la posición taxonómica ya que no tienen mucha homología; mientras que los Enterococci presentan estrecha relación con cepas de *Listeria* y *Bacillus* incluso en mayor grado que con Streptococci o Lactococci (Pot et al., 1994).

2.3.2 Características del género de *Enterococcus*

Son células esféricas u ovoides, forman cadenas cortas o pares, no forman endoesporas, Gram (+), algunas presentan motilidad, sin cápsula, anaerobios facultativos, quimioorganotrofos con metabolismo fermentativo produciendo principalmente L(+) ácido láctico, pH final 4.5–4.6 en la fermentación, no producen gas, requerimiento nutricionales complejos, catalasa negativa, temperatura óptima 37°C, fermenta lactosa, hidrolizan arginina e hipurato, forman ácidos a partir de lactosa, glicerol, manitol, crecen en presencia de 6.5% de NaCl (Williams y Wilkins, 1994). La tabla 2.2. muestra algunas de sus características más importantes.

Tabla 2.2. Características del género *Enterococcus*

Grupo	Grupos antigénico Lancefield	Especies representativas	Hemólisis sobre agar sangre	Crecimiento		Sobrevivencia a 60°C durante 30 min	Crecimiento		Habitat
				10°C	45°C		Leche 0.1% azul de metilo	Caldo 40% bilis	
Enterococos	D	<i>E. faecalis</i> y <i>faecium</i>	Lisis α , β o nada	+	+	+	+	+	Intestino vagina y plantas

Adaptado de Sharpe y Fryer, 1972.

2.3.3 Bacteriocinas del género *Enterococcus*

La primera bacteriocina de enterococci fue reportada en 1955 describiéndose 5 tipos de bacteriocinas (enterococcinas) sobre la base de su actividad contra varios microorganismos, susceptibilidad a enzimas proteolíticas y reacciones a la temperatura, siendo producidas por enterococci no hemolítico y hemolítico (Brock et al., 1963).

2.3.3.1. Espectro de actividad

La mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL son activas únicamente frente a especies bacterianas relacionadas taxonómicamente. La tabla 2.3 nos muestra el espectro de actividad de algunas bacteriocinas, aunque también se ha observado la capacidad inhibitoria hacia bacterias Gram (-) como es el caso de la bacteriocina producida por diferentes cepas de *Enterococcus faecium* que presentaron actividad contra *Vibrio cholerae* O1 y *V. cholerae* no O1 (Simonetta et al., 1997) y la inhibición de *Shigella sp*, *Salmonella sp* y *Enterobacter cloacae* por parte de la bacteriocina producida *Enterococcus faecalis* V24 (Lauková et al., 1998).

La habilidad del género enterocococi para inhibir *Listeria monocytogenes* puede ser relativamente extensa como se muestra en la Tabla 2.4. En estudios previos en este laboratorio se determinó el espectro de actividad del efecto antagónico de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* UQ1 (Mayorga, 1999) y resalta la actividad bacteriocinogénica que presenta contra *Listeria monocytogenes* como se muestra en la Tabla 2.5

2.4 Purificación de bacteriocinas

Después de detectar cepas productoras de bacteriocinas, así como encontrar las condiciones para potenciar su producción, es necesario investigar la metodología mas adecuada para purificarlas. Para ello se han utilizado varias técnicas con el fin de obtenerlas puras o parcialmente puras; las variaciones en la metodología empleada pueden ser debido a la naturaleza extremadamente heterogénea de las bacteriocinas como se reporta en revisiones de literatura hechas Klaenhammer, 1993.

Tabla 2.3 Espectro de actividad de bacteriocinas producidas por BAL

Bacteriocina	Cepa productora	Espectro de inhibición	Referencia
Leuconocina J	<i>Leuconostoc</i> sp J2	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Le</i>	Choi et al., 1999
Crispacina A	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Tahara y Kanatani, 1997
Brevicina 27	<i>Lactococcus brevis</i> SB27	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Pediococcus paramensenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> sp. <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactococcus herveticus</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Micrococcus stearrowthermophilus</i>	Benoit et al., 1994.
Lactocina 705	<i>Lactobacillus casei</i> CRL 705	<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL	Vignolo et al., 1994
	<i>Lactobacillus gasseri</i> JCM 2124	<i>Lactobacillus amylovorus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> .	Tahara et al., 1997
Diplococcina	<i>Streptococcus cremoris</i> 346	<i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus lactis</i>	Davey y Richardson, 1981

Tabla 2. 4 Características de Bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium*

Cepa productora	Espectro de inhibición	Estabilidad	Peso molecular (Da)	Referencia
JBL 1061 JBL 1083 JBL 1351	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>Lb. sake</i> , <i>Lc. lactis ssp cremoris</i> , <i>L. monocytogenes</i>	pH 3-10; calor (121° C, 20 min)	n.d. ^a	Arihara et al., (1993)
DPC 1146	<i>E. faecalis</i> , <i>Lb. Sake</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. tyrobutanicum</i> , <i>Lc. lactis spp. lactis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Calor y condiciones ácidas (>120° C, pH 5)	Parcialmente Purificada: 3000	Parente y Hill, (1992)
NCIB 2699 NCIB 2702	<i>L. monocytogenes</i> y otras <i>Listera spp</i>	n.d.	n.d.	Mc Kay, (1990)
E1	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Clostridium spp</i> ,	Calor (ebullición por 10 min)	9000	Kramer et al., (1983)
100	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lc. lactis spp lactis</i> , <i>Leuconostoc spp</i> , <i>Pediococcus spp</i> , <i>Lactobacillus spp</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i>	pH<5; calor (ebullición por 5 min)	Estimado > 200 000	Kato et al., (1992)
7C5 ^b	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Lactobacillus spp</i> , <i>C. tyrobutanicum</i>	Calor (72° C por 1 min a pH 5.5)	n.d.	Torri et al., (1994)

RZS C5 RZC C13	<i>L. monocytogenes</i> y otras <i>Listeria</i> spp	pH 4.5-6.5; calor (121° C, 15 min a pH 4.5)	Estimado 2500-3000	Vlaemynck et al., (1994)
CTC 492	<i>L. monocytogenes</i>	Calor ^c	n.d.	Garriga et al., (1993)
CCM 4231	<i>E. faecium</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> .	60°C por 30 min	n.d.	Lauková et al., (1993)
NA01 ^b	<i>Lactobacillus</i> spp, <i>Enterococcus</i> spp, <i>Listeria</i> spp	Calor (100°C por 5 min, pH 2-6	n.d.	Olasupo et al., (1994)
108	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. welshimeri</i> , <i>L. murray</i> , <i>L. Ivanovvi</i> , <i>L. graxi</i> , <i>L. seeligeri</i>	Estable al calor	45 000 (pico A) y 10 000 (pico B)	Dallas et al., (1996)
101	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L.</i>	pH 5	2 000	Kato et al., (1994)
102	<i>monocytogenes</i> <i>E. faecalis</i> , <i>Lc. diacetyllactis</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>L.</i> <i>mesenteroides</i>	pH 7	2 500	
T136	<i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. sake</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Cl. sporogenes</i> , <i>Cl. tyrobutiricum</i> , <i>Propionibacterium</i> spp, <i>S. aureus</i>	Estable al calor	5479	Casaus et al., (1997)
WHE 81	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. Innocua</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>Enterococcus</i> spp, <i>Lactobacillus</i> spp	n.d	n.d.	Ennahar et al., (1998)

^a No determinado

^b Aislado de productos lácteos

^c Condiciones no reportadas

Tabla 2.5 Espectro de inhibición de *Enterococcus faecium* UQ1

Microorganismo Indicador	Sensibilidad
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 1778	-
<i>Bacillus circulans</i> NCIMB 11844	-
<i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 08565	-
<i>Escheria coli</i> (EPEC)	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5T	+
<i>L. plantarum</i> 6L	+
<i>L. plantarum</i> 15L	-
<i>L. plantarum</i> 14L	+
<i>L. plantarum</i> 9L	+
<i>L. plantarum</i> 18L	+
<i>L. plantarum</i> 20L	-
<i>L. plantarum</i> 34L	-
<i>L. plantarum</i> 35L	-
<i>Lactococcus lactis</i> NCDO 496	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NCDO523	+
<i>Listeria innocua</i>	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	+++
<i>Micrococcus luteus</i> NCIB 8166	+++
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8092	+++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> NCDO 990	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-
(+++) muy sensible, (+)sensible, (-) no sensible Pruebas realizadas con el método de botón.	

(Mayorga, 1999).

El protocolo de purificación utilizado va encaminado a la aplicación del producto final, como puede ser para la secuenciación de proteínas donde se necesita una alta pureza, mientras que para el uso en sistemas biológicos es de mayor importancia una alta actividad (Venema et al., 1997). Los costos, reproducibilidad, así como facilidad de aplicación de técnicas pueden también afectar esta decisión.

2.4.1 Interferencia de componentes del medio de cultivo en la purificación

Dos de los más importantes aspectos en el estudio de las bacteriocinas son su producción y purificación. Los medios de crecimiento complejos comúnmente usados por las BAL, generalmente pueden interferir con los procesos de purificación de la bacteriocina. Parente y Hill en 1992, realizaron un estudio de comparación de los factores que afectan la producción de dos bacteriocinas de BAL, sugiriendo que la lactocina D puede obtenerse con bajos niveles de triptona y aumentando el pH y la concentración de extracto de levadura. Esto es una ventaja en la purificación, ya que el nitrógeno orgánico proviene del extracto de levadura, los cuales son péptidos pequeños de menos de 1000 Da y pueden ser fácilmente eliminados cuando se dializa el medio de cultivo, caso contrario con la triptona.

Un medio de cultivo semidefinido podría facilitar la purificación de la bacteriocina, pero esto puede reducir la producción de bacteriocina en algunos casos, aunque en otros puede resultar una concentración de bacteriocina en el sobrenadante equivalente a la producida en los medio más complejos (Klaenhammer y Barefoot, 1984).

Un factor muy importante es el Tween 80 el cual es crítico para la producción de lactocina 705 producida *Lactococcus casei* CRL 705; aún cuando la peptona sea omitida es capaz de excretar grandes cantidades de sustancias en el medio y se encontró que esto facilita las etapas de purificación por la disminución de péptidos de mayor peso molecular (Vignolo et al., 1994). El Tween 80 incrementa la producción de la bacteriocina, tal vez por el efecto surfactante sobre la permeabilidad de la membrana de las células. El Tween 80 acelera la difusión de lactocina 705, pero existen reportes donde la adición de Tween 80 puede afectar la purificación debido a que forma complejos con las bacteriocinas (Kabuki et al., 1997; Montville y Kaiser,

1996). Por su parte Bogovic et al. (1998), observaron la agregación de péptidos durante la ultrafiltración aún en ausencia de Tween 80 en el medio de cultivo; este fenómeno de agregación puede guiar a la determinación errónea de pesos moleculares mayores.

2.4.2 Adsorción y liberación

Se han empleado diferentes metodologías para la purificación de bacteriocinas con el fin de recuperar un alto rendimiento, así como alta actividad; entre los métodos podemos citar el de adsorción y liberación.

Esta técnica reportada por Yang et al. (1992); mientras estudiaban el modo de acción de la pediocina AcH producida por *Pediococcus acidilacti* H sobre células sensibles, observaron que la adsorción de pediocina AcH a las células era dependiente del pH, y una mayor adsorción se observaba a pH entre 6.0 y 6.5, pero cuando el pH de las células en suspensión fue reducido a 2.0 o menor, la pediocina AcH no fue adsorbida. Ellos sugirieron que después de la fermentación, las células productoras podían ser ajustadas al pH de máxima adsorción. Las bacteriocinas en la superficie de la célula son fácilmente recuperadas por centrifugación, posteriormente pueden separarse de las células ajustando al pH de máxima liberación. Jack et al. (1995), indicaron que la pared celular puede ser considerada como un intercambiador de cationes cuando se encuentra en condiciones ácidas. Estas observaciones dieron lugar a esta nueva alternativa de purificación. Algunas bacteriocinas han sido purificadas por este método tales como pediocina M (Elegado et al., 1997) y nisina, sakacina A y leucocina Lcm 1 (Yang et al., 1992)

2.4.3 Isoelectroenfoque

Las bacteriocinas son generalmente de naturaleza hidrofóbica y presentan complicaciones para su purificación, ya que tienden a formar agregados de proteínas de alto peso molecular, así como adherirse con otras moléculas copurificadas y no específicas de proteínas. Es por ello que se han utilizado características biofísicas de las bacteriocinas para separarlas, como es el punto isoeléctrico. La bacteriocina 1289, se purificó con mayor recuperación de actividad (58%) en comparación con

los métodos tradicionales (12 %; Crupper e Iandolo, 1997). La lactocina B y la pediocina PA-1 se purificaron por este método, donde ésta última aumentó su rendimiento hasta en un 40% comparado con el método tradicional, que fue de 0.6% (Venema et al., 1997). Esta forma de purificación es una alternativa para bacteriocinas pequeñas, hidrofóbicas y cargadas positivamente.

2.4.4 Métodos Tradicionales

Por ser las bacteriocinas metabolitos que se secretan al medio, puede iniciarse como una primera etapa con la concentración, como con ultrafiltración, precipitación con sales o con solventes, aquí pueden eliminarse algunos contaminantes. Posteriormente se utilizan técnicas cromatográficas como filtración en gel, intercambio iónico, hidrofobicidad, HPLC; para finalizar evaluando mediante geles de poliacrilamida la pureza, (Muriana y Luchansky, 1993). Las técnicas de purificación más efectivas son aquellas donde se explotan diferentes propiedades de las proteínas; por ejemplo técnicas basadas en la separación por tamaño son más efectivas si se combina con técnicas basadas en la carga de las moléculas que se desea separar (Voet y Voet, 1996). La tabla 2.6 nos muestra algunas de las técnicas empleadas para la purificación de algunas bacteriocinas y el rendimientos y factores de purificación alcanzados.

2.4.4.1 Precipitación

La concentración de proteínas por medio de precipitaciones resulta en un máximo del doble o triple de la actividad específica, pero es recomendable para disminuir el volumen de material y hacerlo más manejable para etapas posteriores.

La precipitación se basa en que las proteínas se consideran como coloides con cargas eléctricas en la superficie que pueden manipularse a favor de su dispersión o para causar su precipitación.

La perturbación puede ser realizada por la adición de grandes cantidades de sales tales como NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, o de un solvente orgánico miscible en agua como etanol o acetona.

Tabla 2.6 Resumen de diferentes bacteriocinas purificadas por métodos tradicionales

Cepa productora	Etapas de purificación	Factor de purificación y rendimiento	Observación electrorética	Referencia
<i>Lactobacillus sake</i>	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ Intercambio aniónico Intercambio catiónico	137 10.7%	1 banda	Montville y Kaiser, 1996
<i>Streptococcus cremoris</i>	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ Intercambio aniónico	952 54%	1 banda	Davey y Richardson, 1981
<i>Staphylococcus aureus</i>	Precipitación Filtración en gel HPLC (hidrofóbica)	114 0.12%	1 banda	Crupper y landolo, 1996
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ Intercambio aniónico Filtración en gel	96 3%	Varias bandas	Aktypis et al., 1998
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ Intercambio catiónico Hidrofóbico FPLC (dos picos con actividad a y b)	Pico a) 0.020% Pico b) 0.060%	Bandas difusas	Bogovic et al., 1998
<i>Carnobacterium psicicola</i> (dos bacteriocinas)	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ HPLC (Fase reversa dos picos a y b)	a) 1.6 x 10 ⁶ 18,700% b) 1.6 x 10 ⁴ 125%		Bhugaloo et al., 1996

<i>Lactobacillus amylovarus</i>	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ Ext, solventes orgánicos Pep RPC HR s/s	220 0.069%		Contreras et al., 1997
<i>Pediococcus acidilactic</i>	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ Intercambio catiónico Hidrofóbica HPLC (fase reversa)	114 80%	1 sola banda	Cintas et al., 1998
<i>Pediococcus acidilactici M</i>	Adsorción y desorción HPLC	2540 40%	1 sola banda	Elegado, et al., 1997
<i>Enterococcus faecium 108</i> (dos bacteriocinas)	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ Intercambio aniónico Filtración en gel (dos picos con actividad a y b)	a) 5.95 1.58% b) 27.17 0.56%	1 banda	Dallas et al., 1996
<i>Enterococcus faecium</i>	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ Intercambio catiónico Hidrofóbico HPLC (Fase reversa)			Cintas et al., 1998
<i>Enterococcus faecium</i>	Ultrafiltración HPLC (intercambio iónico)		Varias bandas Actividad en todo el gel	Kato et al., 1992
<i>Streptococcus faecium</i> (dos bacteriocinas)	a) Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ Filtración en gel Intercambio aniónico b) ultrafiltración Sepharosa	a) 417 y 23% b) 106 y 70%		Kramer y Brandis, 1975

El efecto no específico de las sales es el de incrementar la fuerza iónica de la solución y por lo tanto aumentar la solubilidad, y se denomina "salting in"; provocando una menor interacción entre los grupos cargados de las proteínas.

La presencia de sales en muy altas concentraciones con una gran fuerza iónica causa la precipitación de muchas proteínas, la precipitación ocurre por neutralización de las cargas superficiales por la sal, por la reducción de las interacciones fisicoquímicas de las proteínas y por disminución de la concentración efectiva del agua necesaria para su disolución y se conoce como "salting out" de las proteínas.

La adición de una sal concentrada necesariamente causará la precipitación de una proteína en particular; esto se relaciona con el número y distribución de cargas y grupos polares en la superficie de la proteína; y el número y distribución de residuos hidrófobos expuesto. Por supuesto la forma y tamaño de las proteínas contribuyen a la relativa facilidad de precipitación. Todos estos factores forman las bases del fraccionamiento salino de una mezcla de proteínas (England y Seifter, 1990).

Los solventes orgánicos, causan la precipitación de proteínas principalmente por la eliminación del agua que se reemplaza con solvente orgánico, disminuyendo la constante dieléctrica y ocurriendo una reestructuración del agua alrededor de la proteína. Los solventes orgánicos usados son acetona, etanol, metanol y butanol. Todos son miscibles en agua y tienen tendencia a desnaturalizar proteínas, especialmente a temperaturas arriba de 0°C (Singh y Singh, 1996).

2.4.5 Purificación por técnicas cromatográficas

La cromatografía es una técnica de separación de multicomponentes basadas en la migración diferencial como resultado de una adsorción o partición de solutos sobre una fase estacionaria. Entre las cromatografías líquidas existentes tenemos distribución, adsorción, intercambio iónico, permeación en gel y cromatografías por afinidad (Singh y Singh, 1996).

2.4.5.1 Intercambio iónico

Esta cromatografía fue diseñada para compuestos iónicos o ionizables, aquí la fase estacionaria lleva grupos funcionales ionizables, fijados por enlaces químicos a un

soporte estacionario. En la cromatografía de intercambio aniónico se fijan cargas que son positivas y en la de intercambio catiónico se fijan cargas que son negativas.

En este tipo de cromatografía intervienen dos tipos de eventos: el enlace de la proteína a las cargas fijas y la elución o desplazamiento de la proteína desde las cargas fijadas.

La retención de las proteínas envuelve una atracción electrostática entre las cargas fijas de la columna y las cargas de la proteína. La elución por su parte es un intercambio de la proteína unida a las cargas de la columna por un compuesto con mayor afinidad a las cargas de la columna que a las de la proteínas. Las cargas que presentan las proteínas así como la solución de elución se ven afectadas por diversos factores como son la magnitud de la carga neta, la concentración de la misma y el tipo de sal usada en la elución (Rossomando, 1990).

2.4.5.2 Filtración en gel

Aquí se utilizan como soporte cromatográfico pequeñas esferas con poros, las columnas construidas con este tipo de soporte tiene dos medidas de volumen líquido; el volumen externo que es el líquido que pasa a través de las pequeñas esferas y el volumen interno que es el que atraviesa por los poros de las mismas. Las moléculas más grandes se equilibran con el volumen externo y las más pequeñas pueden equilibrarse con ambos volúmenes. Las proteínas más grandes serán eliminadas mas rápidamente que las de menor tamaño.

En la elección de un soporte se debe tener en cuenta el diámetro de los poros, el acceso al volumen interno, y el diámetro hidrodinámico de las moléculas de proteína. En la elución de las proteínas el diámetro hidrodinámico tiene una relación inversa al promedio del poro de las esferas, por lo que las de mayor diámetro saldrán con el volumen externo y las de menor diámetro con el volumen interno.

El volumen eluido del componente excluido se designa V_0 para el (volumen muerto), el cual representa el volumen externo de las esferas del soporte. V_t es el volumen total, el cual representa la suma de los volúmenes externos e interno de las esferas. La elución de los volúmenes intermedios entre los valores anteriores es designado

como V_c , y coeficiente de partición o reparto K_{av} , relaciona estos valores con la fórmula (1)

$$K_{av} = (V_c - V_o) / (V_t - V_o) \quad (1)$$

El coeficiente de partición tiene una relación semilogarítmica con el peso molecular (Wagen, 1990).

2.4.5.3 Interacción Hidrofóbica

Las interacciones hidrofóbicas son un fenómeno de gran importancia biológica; éstas estabilizan la estructura terciaria de las proteínas, envuelven reacciones antígeno-anticuerpo, enzima-sustrato y también ayudan a mantener la bicapa lipídica de las membranas celulares.

La hidrofobicidad es la repulsión entre un compuesto no polar y un medio polar como es el agua; si dos o más compuestos no polares son puestos en agua, ellos se agregan espontáneamente; esta agregación es por las interacciones hidrofóbicas, estas atracciones son energéticamente más favorables porque ganan entropía, esto es que incrementan el desorden cuando hay menos sitios hidrofóbicos expuestos al medio polar (Kennedy, 1990).

2.5 Electroforesis

En la electroforesis una diferencia de potencial eléctrico es la fuerza guiadora del transporte de proteínas hacia el cátodo, la proporción de migración depende de la carga neta de las moléculas y del tamaño de las mismas.

En los geles de poliacrilamida se ha usado un gel de alineamiento. La idea básica de ello es incrementar la resolución en el gel por la compresión inicial de la mezcla de proteína en una zona muy pequeña.

Un método utilizado para determinar pesos moleculares es SDS-PAGE, donde las mezcla de proteínas son desnaturalizadas con la adición del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) y sometida a calentamiento. También puede adicionarse

mercaptoetanol, para promover condiciones reductoras que rompen enlaces disulfuro en proteínas con subunidades. La desnaturalización de las proteínas consiste en la interacción de la parte apolar del SDS con los grupos hidrofóbicos de la proteína (reaccionando aproximadamente 1.4 g de SDS por g de proteína (Voet y Voet, 1996).

3. Justificación

La tendencia a disminuir el uso de aditivos químicos en productos alimenticios, ha incrementado la atención de los grupos de investigación, sobre el uso en alimentos de metabolitos de origen natural como aditivos; pueden usarse metabolitos antimicrobianos para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseable (patógenos o deterioradores). Los inhibidores naturales puedan reemplazar o disminuir el uso de conservadores químicos; tales como las bacteriocinas de BAL; las cuales pueden ser una alternativa para usarse como conservadores naturales en alimentos, ya que varias de estas son activas contra microorganismos, patógenos y deterioradores de alimentos (*B. cereus*, *Cl. botulinum*, *Cl. perfringes*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, etc.) y la mayoría son estables a los tratamientos térmicos y tienen un modo de acción irreversible y bactericida, presentado además una alta especificidad hacia ciertas especies bacterianas de importancia industrial. Además la calidad GRAS (Generalmente reconocida como seguras) de las BAL, el uso de nisina durante más de 30 años y aceptación de ésta por parte de la FDA como sustancia GRAS en 1988, soportan la investigación para obtener bacteriocinas altamente purificadas y que puedan aplicarse como aditivo en alimentos (Davidson y Branen, 1993).

Debido a lo antes mencionado es de primordial importancia purificar las bacteriocinas para poder conocer más sobre sus mecanismos de acción, condiciones de estabilidad, y poder aplicarlas en los alimentos. También es importante conocer y llegar a manipular su información genética con el fin de potenciar su productividad, lo cual se consigue solamente cuando se tiene en una forma pura.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Purificar mediante métodos tradicionales y de adsorción específica la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* UQ1, así como caracterizarla bioquímicamente y realizar pruebas de estabilidad a la temperatura y pH.

4.2 Objetivos específicos

- 1.- Purificar la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1 por métodos tradicionales.
- 2.- Purificar mediante el método de adsorción específica la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1 y comparar ambos métodos.
- 3.- Determinar el peso molecular de la bacteriocina purificada.
- 4.- Determinar la estabilidad a la temperatura de la bacteriocina presente en los extractos crudos libres de células.
- 5.- Investigar la estabilidad al pH de la bacteriocina presente en los extractos crudos libres de células.

5. Materiales y métodos

5.1 Fuente y conservación de la cepa de bacteriocina

La bacteria ácido láctica con actividad bacteriocinogénica fue aislada de una muestra de Kefir en el laboratorio de Microbiología Sanitaria y de los Alimentos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de esta Universidad.

Todas las cepas se conservaron a -70°C (ultracongelador REVCO, EUA), en una solución de leche descremada al 10% (Sveltes, Nestlé, México) y de glicerol al 10%, en relación 1:1, para su uso se reactivó la cepa con dos resiembras de 15 h en medio TGE modificado (tripticaseína, glucosa, extracto de levadura) con los siguientes ingredientes (g/L): peptona 10.0 (Bioxon, Edo. México., México); extracto de levadura 4.0 (Difco, Detroit, EUA); extracto de carne 6.0 (Bioxon, Edo. México., México); sulfato de manganeso 0.05 (Sigma, St. Louis MO., EUA); sulfato de magnesio 0.1 (Sigma); Tween 80 0.2% v/v (Sigma) y se ajustó pH de 7.0 a 30°C (Elegado et al., 1997).

La bacteria BAL, fue identificada como *Lactobacillus plantarum* con estudios de API 50CHL previamente realizados en este laboratorio (Ibarra, 1999) y posteriormente como *Enterococcus faecium* con 16S rARN (Midilab, EUA).

El microorganismo indicador utilizado fue *Micrococcus luteus* NCIB 8166, el cual se conservó de la manera descrita anteriormente, pero para su reactivación se utilizó caldo assay, reactivándose con dos resiembras de 48 h cada una. Este medio contenía (g/L): peptona 10.0; extracto de carne 3.0, extracto de levadura 1.5; cloruro de sodio 3.0 (Sigma); azúcar mascabado 1.0 (Dillis, México) y se ajustó pH de 7.5.

5.2 Ensayo de la actividad de bacteriocina

La actividad de la bacteriocina fue medida usando el método de difusión en agar (Bhunja et al., 1988a; BSI 4020, 1974). Se utilizaron 10 mL de Medio Assay (1.5% de agar) como soporte y se colocó una sobrecapa de 8 mL del mismo medio (0.8% de agar) inoculado con $20\ \mu\text{L}$ ($10^6 - 10^7$ ufc/mL). Se hicieron fosas con horador N° 2,

con un diámetro de 5 mm; el agar fue removido y en cada pozo se colocaron 25 μ L o fracción a medir actividad, se realizaron diluciones seriales con un factor de dos (Mayr Harting et al., 1972). Se incubó a 30°C durante 12 h y se midió la zona de inhibición con un vernier (Scala, México) expresando la actividad como Unidades Arbitrarias por mL (UA/mL). Una unidad arbitraria se definió como el inverso de la última dilución que presentó una clara zona de inhibición, multiplicada por la dilución (Tagg y Mac Given, 1971).

5.3 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo de *E. faecium* UQ1, se realizaron fermentaciones en TGE modificado (Elegado et al., 1997) monitoreando la absorbencia a 600 nm y se pudo determinar de este modo el tiempo necesario para alcanzar la fase logarítmica. Antes de efectuar cualquier experimento se activó la cepa mediante el uso de dos resiembras.

5.4 Producción de la bacteriocina

La optimización de la producción de la bacteriocina se efectuó en un trabajo previo (Ibarra, 1999). Se evaluaron diferentes condiciones de tratamiento previo a la purificación (Tabla 5.1).

La cepa productora de bacteriocina previamente reactivada se inoculó al 3% (v/v); obteniéndose lecturas iniciales de la A_{600} de aproximadamente 0.05. Se incubó a 30°C en cultivo estático por 18 h, posteriormente se sometió a tratamiento térmico a 70°C durante 30 min, para inactivar las proteasas presentes. Este proceso térmico no influyó en el rendimiento de la bacteriocina.

Tabla 5.1 Diversas condiciones para producción de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1

Tratamientos	A	B	C	D
Peptona (g/L)	10	10	10	10
Ext. Levadura (g/L)	4	5.0	5.0	3
Ext.carne (g/L)	6	6	6	6
Glucosa (g/L)	10	0	0	0
Sulfato de manganeso (g/L)	0.05	0.05	0.05	0.01
Sulfato de magnesio (g/L)	0.1	0.4	0.2	0.3
pH	7.0	7.0	5.5	6.5
Temperatura (°C)	30	25	25	30
Tiempo (h)	18	5	5	25

A) Condiciones iniciales, cultivo estático (Elegado et al., 1997)

B) y C) Agitación a 150 rpm con agitador orbital (Labline, IL., EUA., Ibarra, 1999)

D) Anaerobiosis (Sobre Oxoid, Basingstoke., Inglaterra. Ibarra, 1999)

5.4.1 Obtención del extracto libre de células concentrado (ELCC)

Una vez efectuado el tratamiento térmico, se llevó el caldo fermentado a temperatura ambiente, se ajustó el pH a 2.0, con ácido clorhídrico concentrado, y se dejó en agitación suave durante 2 h a 4°C. La acidificación se efectuó con el fin de obtener la mayor cantidad de bacteriocina posible de las células productoras (desorción de la bacteriocina) y después se centrifugó a 13000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante libre de células (ELC) fue ajustado a pH de 6.5 y concentrado con una unidad de ultrafiltración Minitan II (Millipore, Bedford, MA; USA) utilizando siete membranas de punto de corte de 1000 Da (Millipore), a 50° C hasta alcanzar la décima parte del volumen inicial; obteniéndose el extracto libre de células concentrado (ELCC); el cual se utilizó para posteriores estudios.

5.5 Métodos alternativos de purificación (adsorción y desorción)

La separación y purificación de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1 se llevó a cabo efectuando cambios de pH de acuerdo al método recientemente desarrollado por Yang et al. (1992).

Un litro del medio se ajustó a un intervalo de pH de 5 a 7 mediante un amortiguador de fosfatos; en una relación de 9 mL de caldo y 1 mL de amortiguador de fosfatos 1M. Con agitación moderada se mantuvo 4°C por 2 h, para permitir la máxima adsorción de la bacteriocina a la superficie de las células, las cuales se separaron mediante la centrifugación (13000 x g) por 15 min a 4°C. Posteriormente la bacteriocina se liberó de las células resuspendidas en una solución de NaCl 100 mM, ajustando el pH en un rango de 2-4 con ácido fosfórico; nuevamente se mantuvo en agitación a 4°C por 12 h.

Finalmente mediante centrifugación (13000 x g) a 4°C por 15 minutos se obtuvo la bacteriocina en forma concentrada. Se dializó en membranas de celulosa (Spectrum, CA, EUA) de 3500 Da de punto de corte y posteriormente se liofilizó en un equipo Virtis (New York, EUA).

La fracción liofilizada después de la liberación se sometió a cromatografía de intercambio catiónico. Esta cromatografía se llevó a cabo en un equipo de cromatografía de líquidos FPLC (Pharmacia, Uppsala, Suecia), usando una columna

Mono-S (Pharmacia) previamente equilibrada con una solución de 90% de amortiguador de citratos 20 mM, pH 3.0 y 10% etanol.

La muestra se disolvió en esta solución y 500 μ L fueron inyectados a la columna, usando un flujo de 0.5 mL/min. La elución se realizó mediante un gradiente lineal del mismo amortiguador adicionado con NaCl 1 M y se colectaron fracciones de 1 mL.

5.6 Purificación por métodos tradicionales

5.6.1 Precipitación con sulfato de amonio

Alicuotas de 20 mL del ELCC se sometieron a precipitación diferencial con sulfato de amonio desde el 30% al 90% de saturación (p/v), a 4°C, con agitación lenta manteniendo el pH a 6.5, ajustado con la adición de hidróxido de amonio al 0.1 M. Se dejó reposar 5 h en las mismas condiciones para luego centrifugar a 13000 x g a 4°C por 30 min; el precipitado se disolvió en un amortiguador de fosfato 50 mM, pH 6.5.

5.6.2 Precipitación con acetona

Alicuotas de 20 mL del ELCC se precipitaron con acetona a -10°C, a diferentes relaciones volumétricas ELCC:acetona (2:1, 1:1, 1:2 y 1:3 v/v), el sistema se dejó equilibrar 1 h y se centrifugó en las mismas condiciones que con la precipitación anterior, el precipitado fue disuelto en el mismo amortiguador.

5.6.3 Técnicas cromatográficas

5.6.3.1 Intercambio catiónico

El dialisado se inyectó a una columna de 1.5 cm de diámetro empacada con SP Tris-acril Plus M catiónica (Sigma) se adaptó a un sistema Gradifrac (Pharmacia). La columna se equilibró a pH de 3.0, con amortiguador de citratos 20 mM con 10% (v/v) de etanol y como amortiguador de elución se utilizó el mismo pero con NaCl 1 M bajo las siguientes condiciones: un flujo de 0.2 mL/min; recolectándose 37 fracciones de 4 mL cada una y un gradiente que empezó de la fracción 9 a la 25

alcanzando un 35% de amortiguador de elución y manteniéndose constante dicho porcentaje hasta la fracción 30, donde se empezó a aumentar linealmente el gradiente salino hasta alcanzar el 100% del amortiguador de elución en la fracción 35.

5.6.3.2 Intercambio aniónico

Alternativamente se realizó una cromatografía de intercambio aniónico en una columna empacada con resina de Tris-acril M DEAE (Sigma) y adaptada a un Gradifrac. Se equilibró la columna con amortiguador de boratos 20 mM conteniendo 10% de etanol, pH10 y como amortiguador de elución el mismo pero conteniendo NaCl 1M, se recolectaron 37 fracciones de 4 mL cada una, y se utilizó un gradiente lineal a partir de la fracción 9 a la fracción 16 alcanzando una concentración del 30% de amortiguador de elución, manteniéndose hasta la fracción 20, donde aumentó hasta alcanzar un 75% del amortiguador de elución en la fracción 26 y permaneció constante hasta la fracción 30, a partir de la cual se llevó al 100% del amortiguador de elución, en la fracción 35.

5.6.3.3 Filtración en gel Superdex 30

Las fracciones con actividad de la cromatografía intercambio aniónico fueron recolectadas, liofilizadas, dializadas en las condiciones antes descritas y se inyectaron en una columna 1.5 cm por 75 cm de diámetro y longitud respectivamente; empacada con una resina de Superdex 30 (agarosa, para moléculas menores de 10000 Da, Pharmacia); y se adaptó al sistema Gradifrac. La columna se calibró con bacitracina (1450 Da) y aprotinina (6500 Da) como estándares de bajo peso molecular y azul de dextrano para determinar el volumen muerto. Se utilizó amortiguador de fosfatos 20 mM, NaCl 0.5M y urea 6M y un flujo de 0.2 mL/min. Se recolectaron 95 fracciones de 4 mL cada una.

5.6.3.4 Filtración en gel Sephadex G-100

Alternativamente las fracciones con actividad de la cromatografía de intercambio aniónico fueron recolectadas, dializadas en las condiciones antes descritas y

lío-filizadas posteriormente se inyectaron en una columna de filtración en gel con 2.5 cm de diámetro y 50 cm de altura y se empacó con sephadex G-100 (Pharmacia). La columna se calibró con seroalbúmina bovina (66000 Da), ovalbumina de huevo (45000 Da), anhidrasa carbónica (29,000 Da), α -lactoalbúmina (14200 Da) y aprotinina (6500 Da) como estándares de bajo peso molecular y azul de dextrano para determinar el volumen muerto. Se utilizó amortiguador de fosfatos al 20 mM, NaCl 0.5M y urea 6M, el flujo fue de 0.1 mL/min. Se recolectaron 95 fracciones de 4 mL cada una (Apéndice A4)

5.7 Estudios electroforéticos

5.7.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida sistema tris-tricina

El procedimiento de electroforesis utilizando fue el sistema tris-tricina para separación de péptidos de menos de 10 kDa (Schäggger y Von Jagow, 1987). Se utilizaron geles con 16.5 %T y 6%C; para gel de separación 10%T con 3%C para alineamiento; en solución de acrilamida. Se utilizó una cámara de electroforesis vertical Mighty small SE 25 (Hoeffer, CA., USA). El volumen en cada carril fue de 15 μ L. La muestra fue colocada en el amortiguador para muestra 2x, el cual contenía SDS 4%, glicerol 12% (w/v), 0.01% Coomassie G-250 ajustado a pH 6.8 con HCl; la muestra se calentó 30 min a 50°C. Los marcadores fueron una mezcla de polipéptidos (Biorad N°Cat. 161-0326): Triosafosfato isomerasa (26,625 Da); mioglobina (16,950 Da); α -lactoalbúmina (14,437 Da); aprotinina (6,512 Da); insulina cadena B, oxidada (3,496 Da) y bacitracina (1,423 Da). Se uso un voltaje constante de 30 V al inicio hasta la alineación de las proteínas y 133 V para la separación a 25°C. Una vez concluida la corrida; la mitad del gel se fijó, con una mezcla de metanol al 80% y ácido acético al 20%, durante 30 minutos; se lavó con agua grado HPLC, se tiñó con azul de Coomassie G-250 por 1 h y se eliminó el colorante; el gel se decoloró con ácido acético al 20% con 3 lavados de 15 min cada uno.

5.7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida sistema tris-glicina

La electroforesis en condiciones nativas se efectuó con la técnica de Gersten (1996), 10%T para el gel de separación y 4%T para el gel alineamiento. La muestra

inyectada fue de 15 μ L con una concentración de proteína de 20 μ g por carril mg/mL. Los marcadores fueron de bajo peso molecular (Sigma) aprotonina (6,500 Da), α -lactoalbúmina (14200 Da), inhibidor de tripsina (20,000 Da), tripsinógeno (24,000 Da), anhidrasa carbónica (29,000 Da), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (36,000 Da), albúmina de huevo (45,000 Da) y albúmina bovina de (66,000 Da). Se usó un voltaje constante de 100 V. Al igual que el sistema tris-tricina, una parte del gel se tiñó con azul de Commassie y la otra se utilizó para zimograma. La electroforesis desnaturizante se prepara en presencia de SDS.

5.7.3 Zimograma

Para los zimogramas se utilizó la mitad de los geles sin teñir. Inmediatamente después de terminar una corrida electroforética, los carriles donde se encontraban las muestra o fracción deseada se cortaban; esta sección del gel se lavó agua grado HPLC estéril, se colocó sobre una capa de Assay 0.8% agar inoculado con 20 μ L de *M. luteus* con una lectura $A_{650} = 0.210$; sobre el gel de electroforesis se colocó una capa de Assay agar de las mismas condiciones. Se incubó a 30°C, durante 12 h y posteriormente se analizaron zonas de inhibición (Bhunja et al., 1988b y 1992)

5.8 Estabilidad de la bacteriocina

5.8.1 Efecto del pH en la actividad de la bacteriocina

Se tomaron alícuotas del ELCC y se ajustó en un rango de pH de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, con NaOH 0.1 M y HCl 0.1 M. Se dejaron reposar 6 h a 4°C y se ajustaron todos a pH a 6.5, se esterilizó por filtración con membranas de 0.22 μ m (Millipore) y se les midió la actividad de bacteriocina (sección 5.2)

5.8.2 Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento

Se tomaron alícuotas del ELCC a pH 6.5 y se almacenaron a temperaturas de 4°C, se monitoreó actividad diariamente durante 10 días, mientras que a -20°C fue cada semana durante 10 semanas.

5.8.3 Efecto de condiciones de esterilización húmeda

Una muestra de ELCC de actividad inhibitoria conocida fue sometida a un tratamiento térmico mediante calor húmedo a 121°C por 15 min, posteriormente se evaluó su actividad residual.

5.9 Diálisis

Las fracciones a dializar (en precipitaciones con sulfato de amonio, así como de cromatografías); se esterilizaron por filtración con membrana de 0.22 μ (Millipore). Se utilizaron bolsas para diálisis con un punto de corte (MWCO) de 1000 (Spectrum N°6,Ca, EUA), previamente lavadas con agua HPLC estéril. Se dializó contra un amortiguador de formiatos a pH de 3.7 50 mM, durante 16 h con cambios del mismo amortiguador cada 4 h. Los dializados se calentaron en baño de agua a 50°C durante 30 min para eliminar el amortiguador. Esto se realizó para evitar la agregación de las bacteriocinas por disminución de la fuerza iónica como lo sugiere Elegado et al. (1997) y tratar de disminuir la pérdida de bacteriocina ya que se ha reportado que ésta es una de las etapas donde hay una mayor pérdida de actividad durante la purificación de las bacteriocinas (Hasting y Stiles, 1991).

5.10 Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína en cada etapa de la purificación se determinó con el ensayo del ácido bicinconínico (Smith et al., 1985). Se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) para la curva patrón en un rango de 0.1 mg/mL a 1 mg/mL a 37°C (Apéndice A1).

El ensayo se realizó en las siguientes condiciones: se tomaron 100 μ L de la muestra a estudiar y se agregaron 2 mL de la solución de trabajo (BCA y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.4% en una relación volumétrica 100:2 respectivamente). Se calentó a 37°C durante 30 min. La absorbencia se leyó a 562 nm.

6. Resultados y Discusión

6.1 Producción de la bacteriocina de *E. faecium* UQ1

De los tres tratamientos que presentaron mayor actividad en estudios anteriores para obtener una mayor producción de bacteriocina (Ibarra, 1999), sólo uno de ellos presentó actividad en el extracto libre de células que fue de 80 UA/mL (tabla 5.1), el cual se efectuó con agitación y sin glucosa, de acuerdo con Ibarra (1999). También se utilizaron las condiciones propuestas por Elegado et al., en 1997, el cual también presentó 80UA/mL de actividad de bacteriocina. Se trabajó con las condiciones propuestas por Elegado et al. (1997) debido a que se podían manejar mayores volúmenes con el cultivo estático. La variabilidad que se presenta en la producción de la bacteriocina en los cuatro tratamientos experimentados depende en parte de los factores que están relacionados con la composición del medio. En el estudio de la producción de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1 la glucosa no resultó ser importante para una buena producción de bacteriocina, ni tampoco un alto contenido de biomasa (Ibarra 1999). La disminución de actividad que se presenta en éste estudio en comparación con la optimización realizada previamente (80 y 320 UA/mL respectivamente), puede ser debido a que las cepas eran almacenadas en chaquiras en las condiciones descritas en la sección 5.1, a -70°C y de allí se tomaba la muestra en condiciones de esterilidad. Aunque la estabilidad genética en este método de conservación de cepas permanece sin cambio hasta por 50 años a esta temperatura (Gherna, 1994). La muestra se manipuló de manera inconveniente; pues se extraía todo el cultivo almacenado para sacar solamente una chaquiras. Esto condujo a ciclos de congelación-descongelación que afectaron probablemente de forma gradual el mecanismo de producción de bacteriocina ó bien incluso ocasionando una ruptura celular; por lo cual en los subsiguientes experimentos se debió concentrar el ELC para poder observar la actividad de bacteriocina.

La cepa fue activada mediante 2 resiembras consecutivas y el inóculo se obtuvo después de 15 h de fermentación.

El porcentaje de inóculo en las fermentaciones fue de 3% (v/v), con el fin de alcanzar una $A_{600} = 0.06$ y estandarizar las condiciones de producción. La fermentación a las

18 h de incubación alcanzó una densidad óptica de 1.4 y pH final del caldo de fermentación de 4.3 aproximadamente. En la fermentación con cepas productoras de varias bacteriocinas como lactocina A, enterocina E1A, diplococcina 346 se inocula el 1% (v/v), (Kramer y Brandis, 1975; Davey y Richardson, 1981; Contreras et al., 1997), mientras que Elegado et al. (1997) utilizaron 3% (v/v) de inóculo.

Los ELC se utilizaron para efectuar la purificación de la bacteriocina por liberación selectiva mediante un ajuste de pH a 2.0, según Yang et al. (1992). Con la liberación de la bacteriocina adsorbida, se logró aumentar la cantidad de bacteriocina en el sobrenadante libre de células. La mayoría de las purificaciones tradicionales de las bacteriocinas desde el sobrenadante de un cultivo libre de células involucran varias etapas de purificación, pero no toman en cuenta las fracciones de bacteriocina adsorbidas en las células por lo que ésta probablemente se pierde (Daba et al., 1994).

6.2 Purificación mediante adsorción específica

Se probaron intervalos de pHs para la adsorción y desorción. La desorción de la bacteriocina no se vio afectada por el calentamiento previo del medio; sin embargo este calentamiento puede detener la posible actividad proteolítica. La mayor recuperación de la actividad en el paso de desorción, se obtuvo al ponerla en contacto con una solución de pH 2.0 a 4°C, por 2 h en agitación moderada. Una etapa subsiguiente de cromatografía de intercambio catiónico usando una columna Mono S (Pharmacia) acoplada a un FPLC (Pharmacia), fue suficiente para separar en un solo pico a la bacteriocina, se utilizó un pH de 3.0, de acuerdo al procedimiento que se detalla en la sección 5.5. (figura 6.1). Se mezclaron las fracciones que presentaron actividad inhibitoria de *M. luteus*, se liofilizaron y se sometieron a una electroforesis usando el sistema Tris-Tricina. Se obtuvo una sola banda con peso molecular aproximado de 4500 Da, indicando purificación a homogeneidad. Previa a la tinción, una mitad del gel se cortó y se evaluó la actividad inhibitoria presente. La zona de inhibición se observó a la misma altura que la banda teñida, lo cual se confirmó la naturaleza antimicrobiana del péptido aislado (figura 6.2). Aunque el método de Yang et al. (1992) resulta en una bacteriocina con pocos contaminantes,

para la cepa en estudio y se logró purificar 1070 veces se tuvo bajos rendimientos : 1.8% de la actividad total. En la tabla 6.1 se muestra el resumen global de las etapas de purificación por adsorción selectiva. Por lo tanto, se decidió estudiar la purificación de ésta bacteriocina utilizando métodos tradicionales.

Tabla 6.1 Resumen global de las etapas de purificación por adsorción específica de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1

	PROTEINA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (UA)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (UA/mg)	FACTOR DE PURIFICACION	RENDIMIENTO %
ELC	1.7	3.5×10^5	187	1	100
Mediada por pH	0.025	4×10^4	3.2×10^4	171	11.4
Purificación FPLC	0.008	6.4×10^3	2.5×10^5	1070	1.8

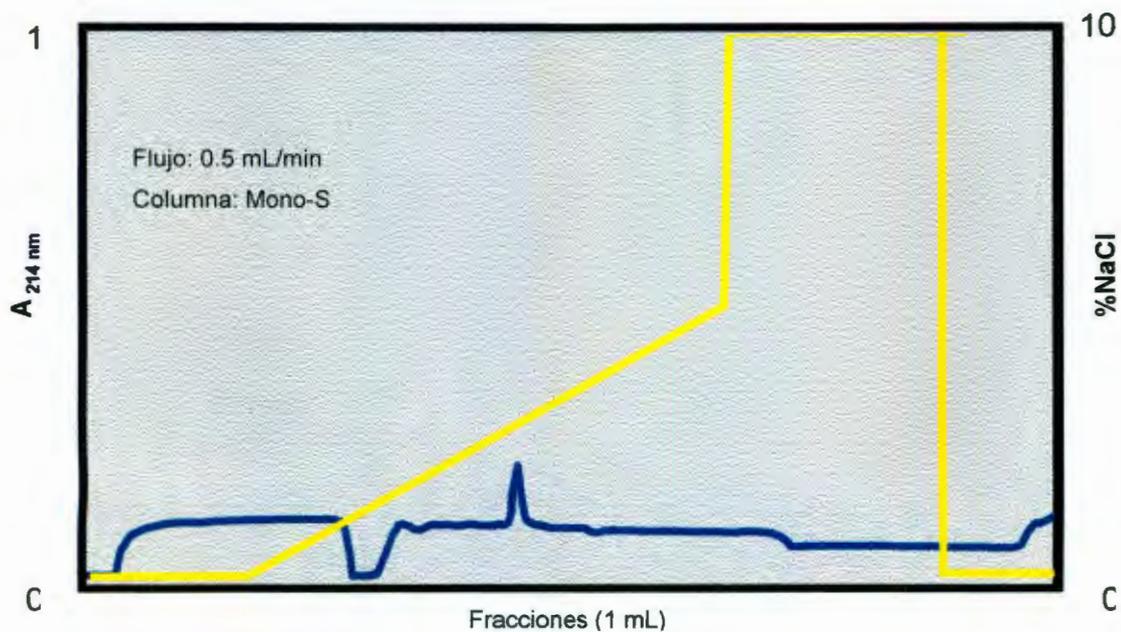


Figura 6.1 Cromatograma de intercambio catiónico (FPLC) de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1 .

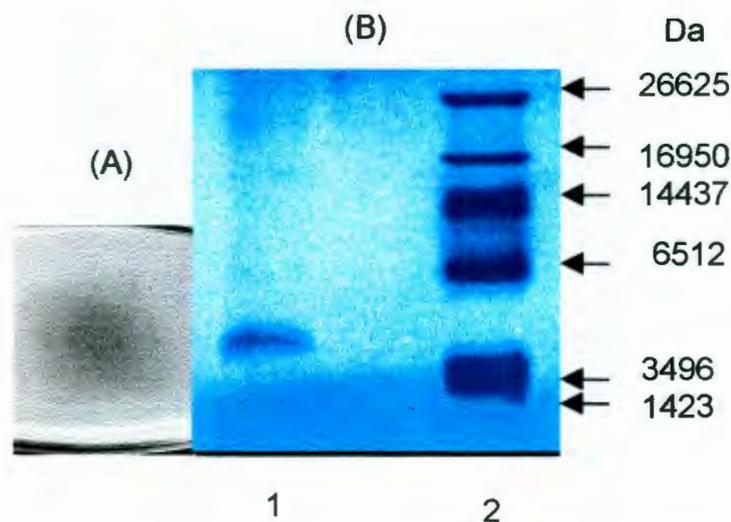


Figura 6.2 Electroforesis desnaturalizante de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1. (A) mitad del gel usado para el ensayo de actividad antimicrobiana con *M. luteus* NCIB 8166 como indicador. (B) Mitad del gel teñida con Coomassie G-250. Carril 1: bacteriocina; Carril 2: Marcadores para péptidos (Biorad).

6.3 Purificación por métodos tradicionales

El ELC se concentró hasta 10 veces, utilizando siete membranas de 1 kDa de punto de corte (área total de filtración = 420 cm²) en la unidad Minitan II (Millipore), previamente calibrada para trabajar con la presión transmembrana promedio (ATP) permitida (75 - 90% de la máxima) y evitar los fenómenos de polarización o ensuciamiento (figura 6.3). La polarización consiste en la formación de una capa de solutos en la superficie de las membranas mientras que el ensuciamiento está dado por la penetración de solutos en los poros de la membrana. Este último fenómeno no es reversible, dañando por lo tanto de forma permanente las membranas. La actividad de la bacteriocina fue medida en el retenido obteniéndose 320 UA/mL (figura 6.4).

Lo anterior nos indica que la actividad inicial en el ELC era de alrededor de 32 UA/mL, la cual no es detectable con el método de medición de actividad. Por otro lado, la ultrafiltración pudo servir como medio de eliminación de moléculas de pequeño tamaño (menores a 1 kDa) capaces de atravesar los poros de la membrana de diálisis utilizada. Algunas otras bacteriocinas han sido sometidas a ultrafiltración con el fin de concentrarlas tal es el caso de las producidas por *Lactobacillus acidophilus* LF221 (Bogovic et al., 1998); donde utilizaron membranas con punto de corte de 10 kDa y 100 kDa y sin embargo toda la actividad fue retenida en ambos casos. Esto indica que la acidocina LF221 tiene un peso molecular mayor a 100 kDa ó que está presente en agregados. Por su parte Kato et al., (1992) en la purificación de enterocina 100, utilizó membranas de punto de corte de 200 kDa para concentrar la actividad y sugieren que esta bacteriocina está presente en fracciones de alto peso molecular o bien está en agregados, debido a que en la electroforesis aparecen bandas de bajo peso molecular y con actividad antimicrobiana. La lactacina B fue concentrada con una membrana de punto de corte de 50 kDa y se observó que aumentaba 10 veces el factor de purificación debido a la agregación de los péptidos estudiados, que aparecieron como proteínas de peso molecular mayor de 50 kDa; siendo que su peso molecular determinado con SDS-page fue de 6000 Da (Klaenhammer y Barefoot, 1984). Debido al punto de corte de las membranas utilizadas para la purificación de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1, no

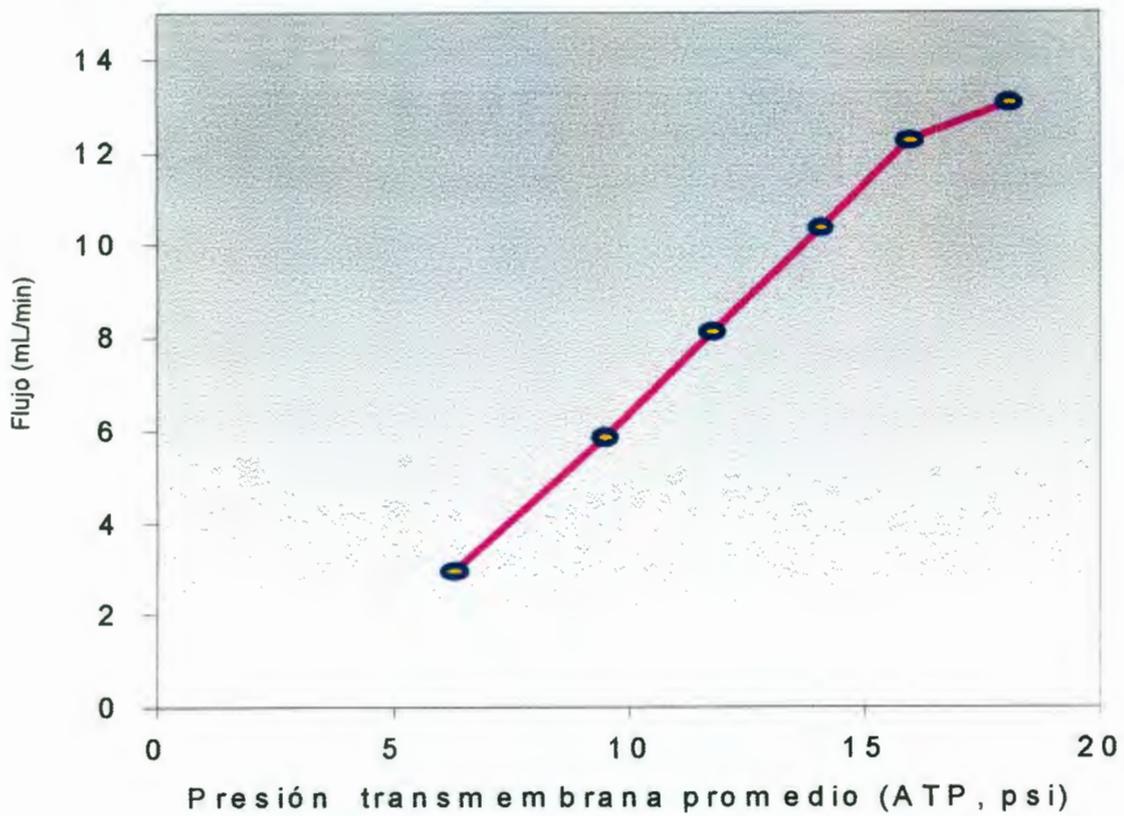


Figura 6.3 Determinación de la velocidad de flujo en la unidad Minitan II (área de filtrado 420 cm²).



Figura 6.4 Actividad por el método de difusión en agar de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1 en el ELCC, como microorganismo indicador *M. luteos* NCIB 8166 en el medio assay. Dilución crítica 1:8 (320UA/mL).

se pudo conocer si ésta se encuentra en estado agregado, ya que hasta moléculas de muy bajo peso molecular fueron retenidas .

6.3.1 Precipitación con sulfato de amonio

El extracto libre de células y concentrado por ultrafiltración (ELCC) se sometió a una precipitación diferencial con sulfato de amonio a 4°C (figura 6.5). Las mayores actividades específicas en los precipitados redissueltos en amortiguador de fosfato de pH 6.5, se obtuvieron a partir del 40% de saturación hasta el 90%. La máxima actividad recuperada fue del 40% de la total (figura 6.6). En este estudio se eligió el 80% de saturación debido a que alcanzaba una buena actividad específica (70 UA/mg) y con menor variabilidad ($\delta=32$) que a otras concentraciones. La figura 6.7 muestra la actividad alcanzada en el ensayo de difusión por agar, del precipitado obtenido usando 80% de saturación de sulfato de amonio, cabe mencionar que al aumentar el volumen de ELCC para precipitar con 80% de saturación de sulfato de amonio se recuperó una mayor actividad comparando con los ensayos preliminares. La variabilidad presentada puede deberse a lo difícil que resulta recuperar el precipitado el cual no sedimenta (Benoit et al., 1994), aunado a la naturaleza arbitraria del método de medición de actividad utilizado, ya que proporciona un valor discreto por lo que es insensible para actividades localizadas entre dos valores puntuales de la dilución. De acuerdo con la cantidad de muestra utilizada en los pozos, aquí se trabajó con un umbral de detección de 40 UA/mL. Por otro lado, la linealidad de éste método no es verificable en algunos casos como lo expresan Montville y Winkowsky, (1997). Se ha observado que otras bacteriocinas han precipitado cuando se utiliza sulfato de amonio entre el 40 y 60% de saturación. La termofilina T, precipitó con un 55% de saturación de sulfato de amonio y una vez resuspendida su actividad específica aumentó 12 veces, pero hubo una pérdida considerable (78%), de la actividad total (Aktipys et al. 1998); Por su parte Nieto et al. (1992), trabajando en la purificación de una bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* precipitaron el ELC con un 40% de saturación de sulfato de amonio y obtuvieron una pérdida del 62% de la actividad total en esta etapa y un

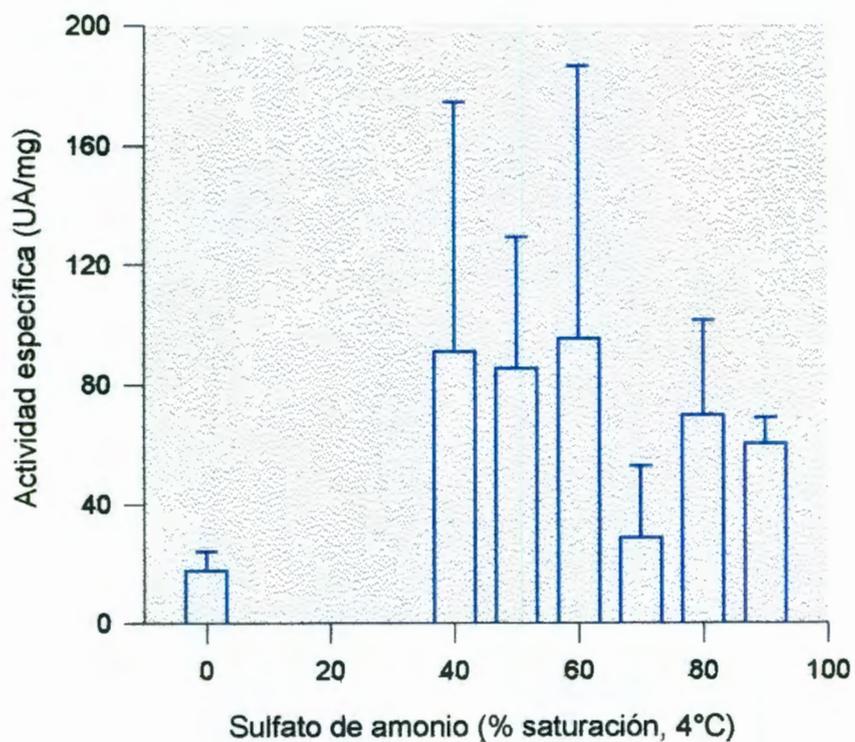


Figura 6.5 Actividades específicas de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1, obtenida por precipitación diferencial con sulfato de amonio en el ELCC; pH constante de 6.5.

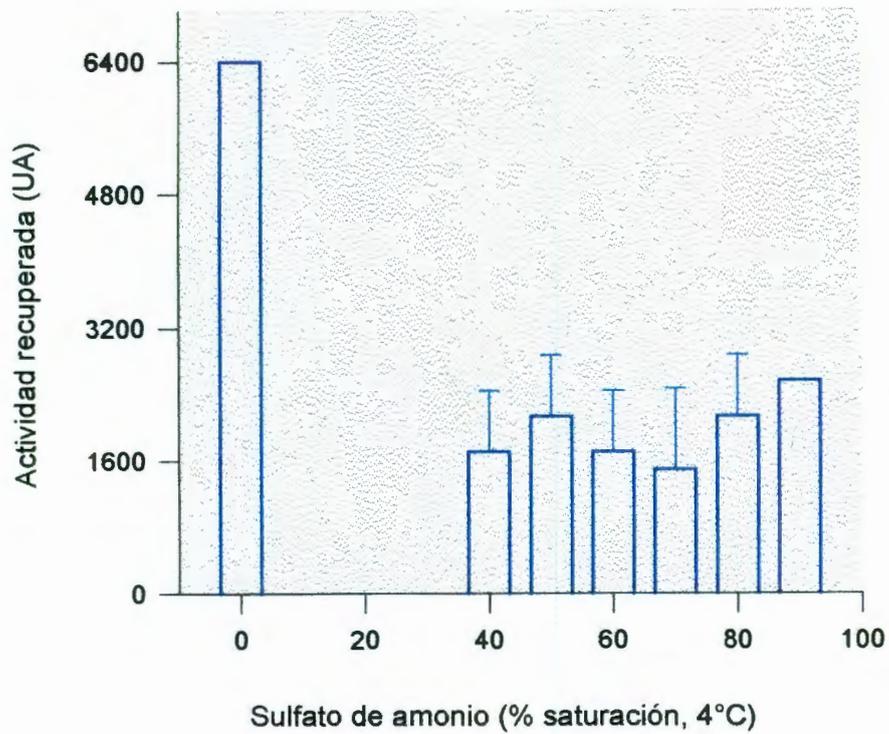


Figura 6.6 Actividades recuperadas de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1, obtenida por precipitación diferencial con sulfato de amonio en el ELCC; pH constante de 6.5.



Figura 6.7 Actividad por el método de difusión en agar de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1 en el precipitado con sulfato de amonio al 80% de saturación, como microorganismo indicador *M. luteus* NCIB 8166 en medio assay. Dilución crítica 1:32 (1280 UA/mL).

incremento de 4 veces en la actividad específica. En contraste para la purificación de Bac1829, una bacteriocina producida por *Staphylococcus aureus* KSI1829, donde se utilizó un 70% de saturación del ELC obteniéndose un 96% de la actividad inicial aunque únicamente aumentó 1.2 veces la actividad específica (Crupper e Iandolo, 1996).

Después de centrifugar el precipitado de la saturación con sulfato de amonio, se pudieron observar dos fases. El sobrenadante y un agregado en la superficie y en las paredes del tubo. No se pudo distinguir un claro precipitado, probablemente porque durante la ultrafiltración el Tween 80 (polioxietilén-sorbitán monooleato; PM= 1250 g/mol) se repartió entre el retenido y el filtrado en cantidades similares (considerando una distribución homogénea) por lo que al concentrar diez veces el extracto, aumentó la concentración del Tween del 0.2% (v/v) al 1% (v/v) en el retenido aproximadamente. Se recolectó la parte flotante así como el agregado en las paredes y se trabajó con ellos. Dallas et al. (1996) y Contreras et al. (1997) obtuvieron resultados similares y reportaron la recolección de éstos agregados para su posterior purificación y obteniendo bajas actividades, 22 y 6.7% de la total respectivamente. Existen otros estudios donde se reportó la aparición de un precipitado sin la presencia de éstos agregados, por lo que este paso de purificación mostró una mejor recuperación de actividad tal es el caso de Bac1829, en el que se recuperó el 96% de la actividad total, otros reportes como el de plantaricina S y T (Jiménez-Díaz et al., 1993) y piscicocinas VI (Bhugalloo et al., 1996) se ve incrementada la actividad total hasta 200 y 800% en esta etapa de purificación.

Los medios preparados con Tween 80 dificultan los pasos de purificación debido a que éste surfactante forma micelas, por lo que las moléculas hidrofóbicas como pueden ser algunas bacteriocinas, se ven atrapadas dentro de ellas. Dada la presencia de Tween 80 en el retenido de la ultrafiltración y la naturaleza hidrofóbica de la bacteriocina en particular, en este trabajo no se obtuvo precipitado ni con el 90% de saturación de sulfato de amonio, aún cuando se mantuvo el pH constante de 6.5 (ajustado con hidróxido de amonio 0.1 M); que es la región de mayor estabilidad. En la precipitación de plantaricina S, se probaron diferentes valores de pH en el intervalo 3-7, y se obtuvo el 100% de recuperación de la actividad total cuando se

trabajó pH de 6.0 (Jiménez-Díaz et al., 1993). Un resumen de los resultados de la purificación después de la precipitación se muestra en la tabla 6.2.

Tabla 6.2 Resumen de las primeras etapas de la purificación tradicional (precipitación con sulfato de amonio)

	PROTEINA TOTAL (mg)	VOL. TOTAL	ACTIVIDAD TOTAL (UA)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (UA/mg)	FACTOR	RENDIMIENTO %
ELCC	1493.6	100	64000	42.84	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	543.9	20	51200	94.13	2.19	80
DIALISIS	335.5	33.7	21580	64.29	1.51	34

6.3.2 Precipitación con acetona

Alternativamente el ELCC se sometió a una precipitación diferencial con acetona en frío, observándose que la mayor actividad específica obtenida (43.7 UA/mg proteína) fue cuando la relación acetona: ELCC se mantuvo en 3:1 (figura 6.8) y la actividad recuperada fue del 10% en comparación con la inicial (figura 6.9). Por lo tanto no se logró alcanzar una actividad específica satisfactoria. La pérdida de la bacteriocina se debió probablemente a su solubilización en el solvente utilizado, lo cual indica una elevada hidrofobicidad del péptido en estudio. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Benoit et al. (1994), para la purificación de brevicina 27, ya que la actividad específica que alcanzó no es satisfactoria; aunque en este caso un 67% de la actividad total era recuperada. En muchas purificaciones se ha utilizado la

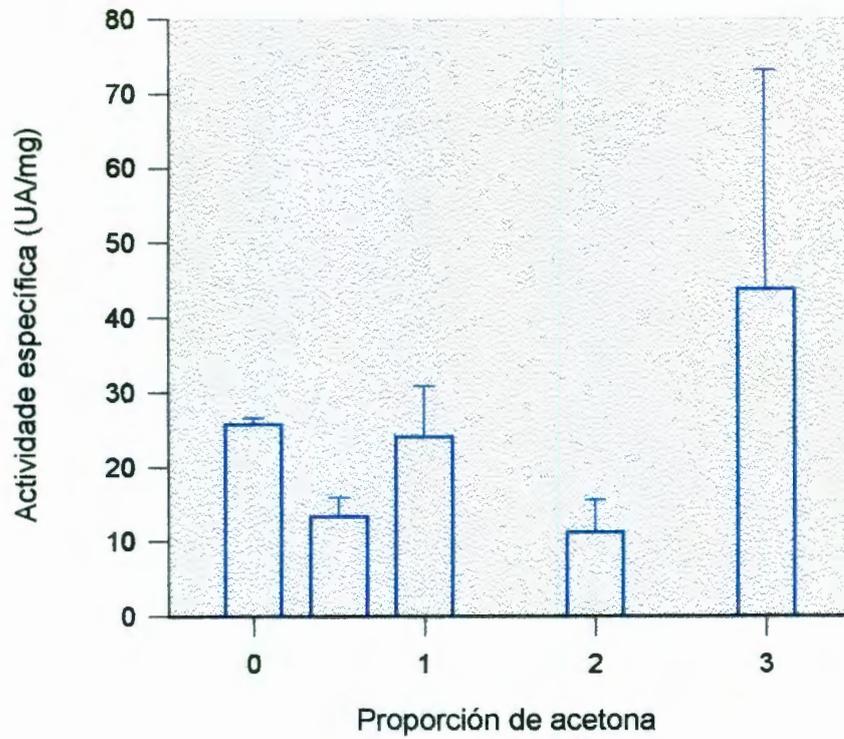


Figura 6.8 Actividades específicas de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1 obtenida por precipitación diferencial con acetona en el ELCC; pH constante de 6.5.

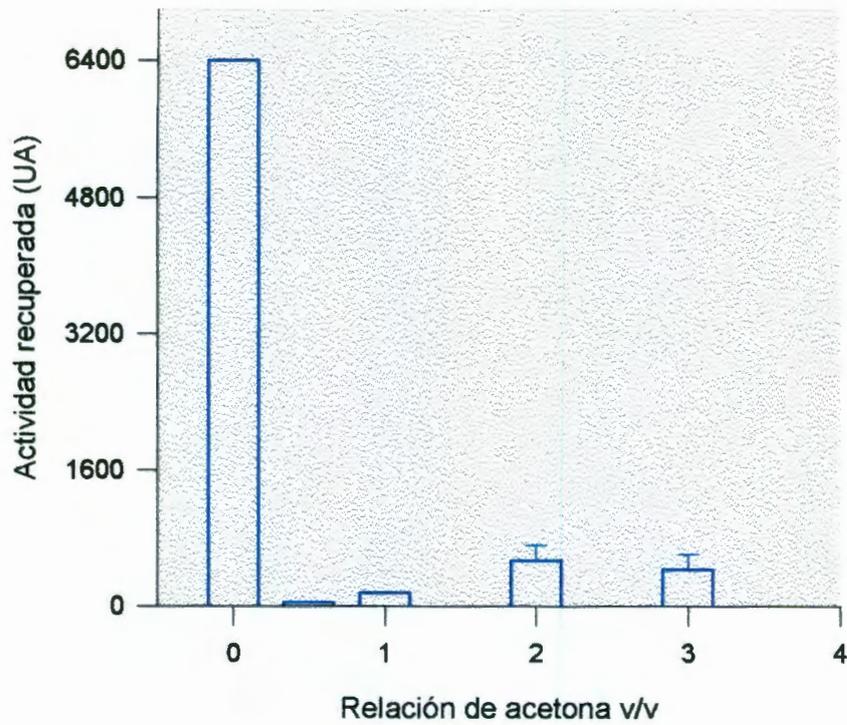


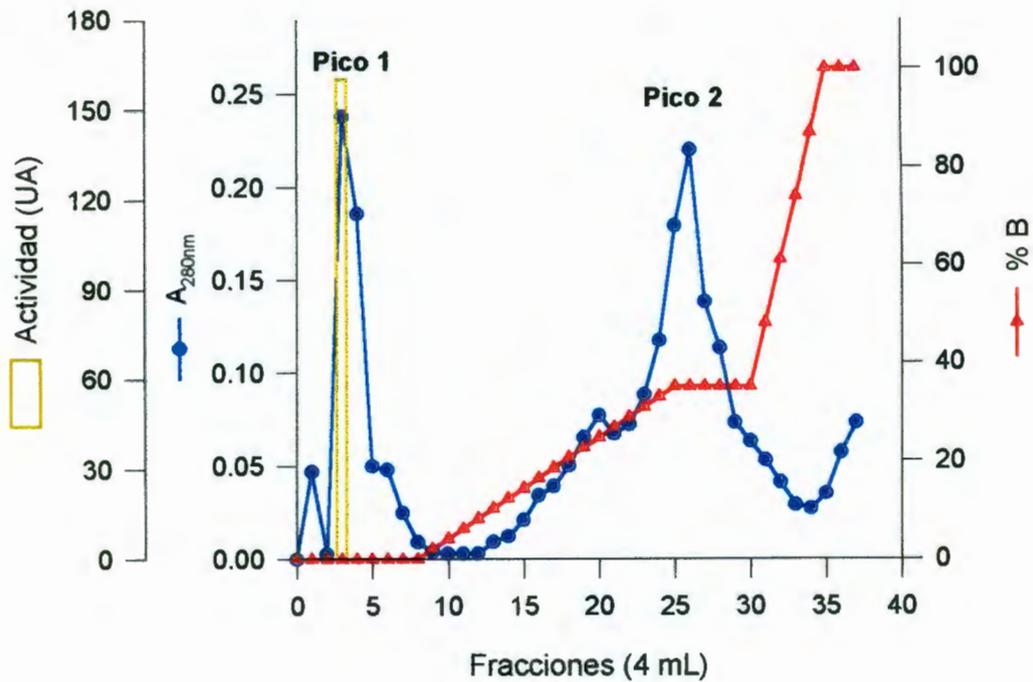
Figura 6.9 Actividades recuperadas de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1, obtenidas por precipitación diferencial con acetona en ELCC; pH constante de 6.5.

precipitación con sulfato de amonio; aunque algunos investigadores han reportado el uso de solventes orgánicos para este fin (Carrollissen-Mackay et al., 1997).

Al igual que con la precipitación con sulfato de amonio se observaron dos fases, debido probablemente a la presencia del Tween 80. De acuerdo con los resultados, se decidió utilizar el precipitado obtenido por tratamiento con sulfato de amonio, el cual fue separado por centrifugación, y se dializó contra amortiguador de ácido fórmico 20 mM, pH 3.7. utilizando este pH para evitar la agregación de las bacteriocinas por disminución de la fuerza iónica como lo sugieren Elegado et al., (1997).

6.3.3 Cromatografía de intercambio catiónico

El dializado obtenido de la precipitación con sulfato de amonio se cambió de amortiguador por diálisis contra amortiguador de citrato 20 mM, pH 3.0. Se sometió la muestra a cromatografía de intercambio catiónico, equilibrando una columna con SP Tris-acril Plus M (Sigma,) usando el mismo amortiguador, y se inyectaron 2 mL del dializado. En el cromatograma (figura 6.10) se observan dos picos principales de proteína (A_{280}); en el primer pico (1) se eluyeron las proteínas aparentemente ácidas (no retenidas) que representan el 75% de la actividad inyectada; alcanzando una actividad específica de 469 UA/mg proteína. El segundo pico de proteína (2); se retuvo en la columna y se eluyó con el gradiente salino a 45% de NaCl 1M; sin embargo no presentó actividad antimicrobiana con microorganismo indicador *M. luteus* NCIB 8166. Las fracciones se colectaron y se dializaron contra ácido fórmico 20 mM, pH 3.7, el cual se evaporó antes de liofilizar las fracciones. Posteriormente se resuspendieron en 0.5 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.5 para determinar la actividad remanente. Sin embargo, no se pudo detectar el 25% actividad faltante, probablemente porque se repartió en varias fracciones de la cromatografía diluyéndose a una concentración fuera del límite de detección del método de difusión en agar.



gura 6.10 Cromatograma de intercambio catiónico (SP Trisacril Plus M) del ELCC precipitado con 80% de saturación con sulfato de amonio. Reconstituido con amortiguador A. Velocidad de flujo 0.2 mL/min. Amortiguador A: citrato 20 mM, 10% etanol, pH3. Amortiguador B: citrato 20 mM, 10% etanol, 1.0 M NaCl y pH3.

6.3.4 Cromatografía de intercambio aniónico

Al igual que la cromatografía de intercambio catiónico el precipitado obtenido con sulfato de amonio, se dializó contra el mismo amortiguador, el cual después se evaporó. Una columna cromatográfica con resina de Tris-acril M DEAE se equilibró con amortiguador de 90% borato 20 mM, pH 10 + 10% etanol posteriormente, se inyectaron 2 mL de la muestra dializada contra el mismo amortiguador. Aquí se observaron varios de proteína, el 75% de la actividad se encontró en las fracciones no retenidas (4 y 5), aparentemente básicas (figura 6.11). El 25% de la actividad se encontró en la fracción retenida (17), la cual eluyó con 32% del amortiguador B, presentó una actividad específica de 298 UA/mg, con un factor de purificación de 6.95 (tabla 6.3). En la purificación de bavaricina MN se observa este mismo comportamiento donde la proteína no retenida en la resina Q-Sepharosa presentaba 50% de la actividad total inyectada, aumentando el factor de purificación 3 veces, (Montville y Kaiser, 1996). Por otro lado, Dallas et al., en 1996, utilizaron cromatografía de intercambio aniónico para purificar la enterocina Ef108 donde obtuvieron dos picos con actividad, uno no se retuvo en la columna y el otro sí, pero la mayor actividad específica se obtuvo en la fracción no retenida obteniendo un factor de purificación de 51 mientras que la retenida tuvo un factor de purificación de 1.48.

Alternativamente se realizaron corridas cromatográficas con la resina aniónica DEAE Celulosa (Sigma) estas presentaron picos mas definidos de proteínas, uno antes del gradiente salino y otro dentro pero la actividad se distribuyó en ochos fracciones al iniciar el gradiente sin presentar halos de inhibición bien definidos, recuperándose únicamente del 18% de la actividad total inicial por lo que esta columna se desechó. Además en la electroforesis usando el sistema tris-tricina 16.5 %T donde se corrieron fracciones con actividad colectadas no se pudieron observar bandas definidas después de realizar la tinción de proteínas con azul de Coomassie, ni con plata. Las fracciones 4 y 5 (no retenidas) de la cromatografía de intercambio aniónico no corrieron en este gel ya que incluso se desviaron de los carriles donde se aplicaron.

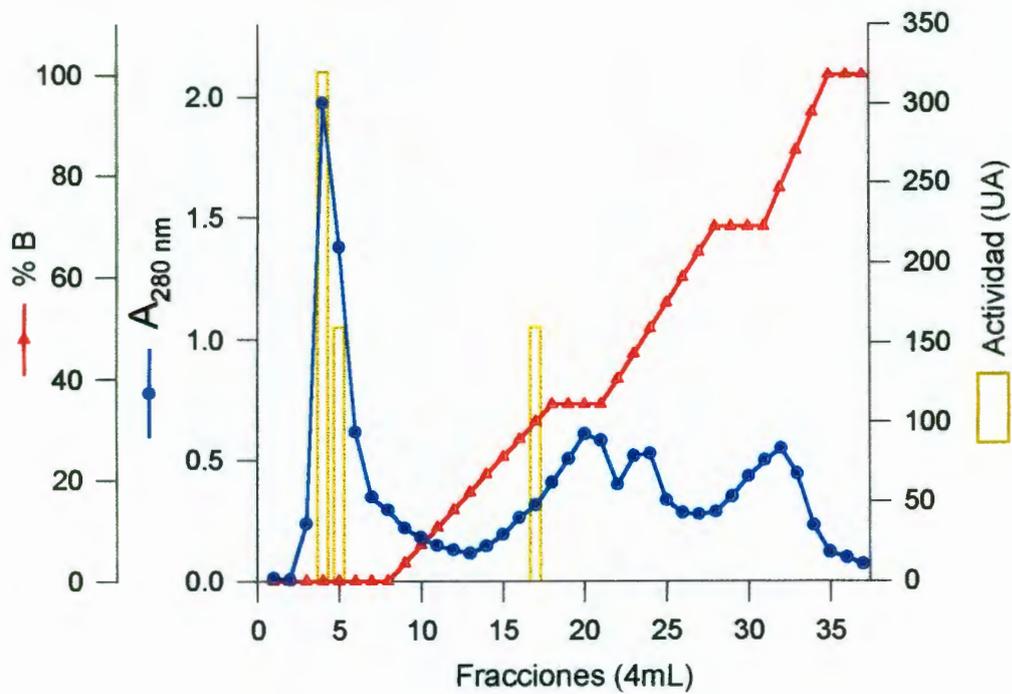


Figura 6.11 Cromatograma de intercambio aniónico (Trisacril M DEAE) del ELCC precipitado con 80% de saturación con sulfato de amonio. Reconstituido con amortiguador A. Velocidad de flujo 0.4 mL/min. Amortiguador A: borato 20 mM, 10% etanol, pH10. Amortiguador B: borato 20 mM, 10% etanol, 1.0 M NaCl y pH10.

La electroforesis de la fracción 17 (retenida) presentó dos probables bandas, una de ellas definida, mientras que la otra fue muy amplia (figura 6.12). Esta fracción presentó actividad a lo largo de todo el carril del gel cuando se probó en un zimograma con *M. luteus* NCIB 8166 como indicador (figura 6.13). En la purificación de lactocina A, se observó en la electroforesis la presencia de una amplia banda en un intervalo de 4.5 kDa a 6.5 kDa, sugiriendo que la lactocina A está presente en agregados unidos con interacciones hidrofóbicas con ácidos grasos; en estudios que realizaron de los extractos de precipitación con sulfato de amonio observaron que las cadenas de ácidos grasos presentaban homología con la composición de Tween 80 (Contreras et al., 1997). El resumen de los resultados de la purificación por cromatografía de intercambio aniónico se muestra en la tabla 6.3.

Tabla 6.3 Resumen de la etapa de purificación con cromatografía de intercambio aniónico (Tris-acril M DEAE)

	PROTEINA TOTAL (mg)	VOL. TOTAL	ACTIVIDAD TOTAL (UA)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (UA/mg)	FACTOR	RENDIMIENTO %
ELCC	1490	100	64000	42.8	1	100
Fracción 4	58.0	135	10800	186	4.38	16.9
Fracción 5	99.2	135	5390	54.0	1.26	8.42
Fracción 17	18.1	135	5390	298	6.95	8.42

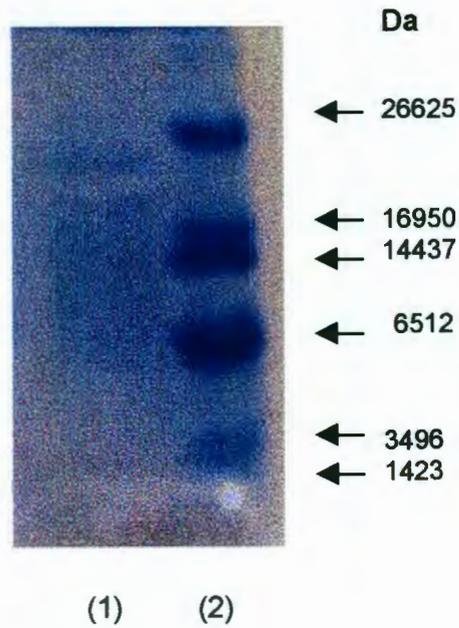


Figura 6.12 Electroforesis en el sistema Tris-tricina (16.5% T) de la cromatografía de intercambio aniónico (Tris-acril M DEAE). Carril 1: fracción 17 y carril 2: marcadores para péptidos (Bio-rad).

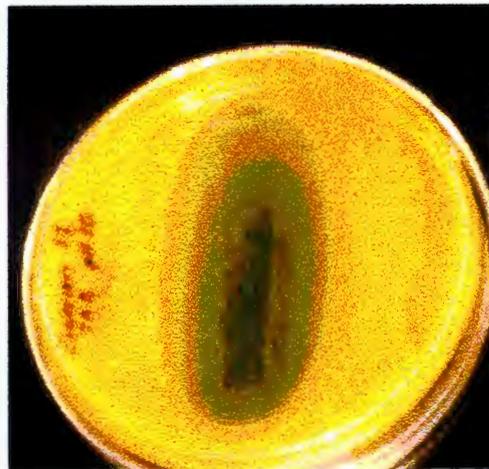


Figura 6.13 Zimograma de la fracción 17 de la cromatografía de intercambio aniónico (Tris-acril M DEAE), como microorganismo indicador *M. luteus* NCIB 8166.

6.3.5 Filtración en gel

Las fracciones con actividad obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico, fueron recolectadas, mezcladas, dializadas y posteriormente inyectadas en una columna empacada con Superdex 30. La separación se efectuó a pH 6.5 con amortiguador de fosfatos 20 mM, en presencia de urea 6 M (figura 6.14). Se observó la presencia de un pico de proteína comprendiendo tres fracciones, que se eluyeron en el volumen vacío (fracción 11). Es muy probable que la proteína no retenida tenga un peso molecular mayor al que se puede manejar en esta columna (10 kDa) debido a que no se esperaba una agregación de la proteína por separar, por la alta concentración de urea utilizada. Las tres fracciones separadas en el volumen vacío presentaron actividad antimicrobiana; la segunda fracción (11), mostró la mayor actividad específica (1100 UA/mg), y representó el 11.6% de la actividad total inicial. Las otras dos fracciones (9 y 12), en conjunto representan el 5.8% de la actividad total inicial, con actividades específicas de 452 y 544 UA/mg, respectivamente (tabla 6.4). Por otro lado, el péptido separado en la fracción 65 también mostró actividad (690 UA/mg), equivalente al 1.44% de la actividad inicial (Tabla 6.4). De acuerdo con la curva de calibración previamente realizada de ésta columna (Apéndices A2 y A3), el peso molecular estimado de ésta fracción fue de 2.4 kDa.

Tabla 6.4 Resumen de la etapa de purificación con la cromatografía de filtración en gel con Superdex 30

	PROTEINA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (UA)	ACTIVIDAD ESP. (UA/mg)	FACTOR	RENDIMIENTO %
ELCC	1493.6	64000	42.84	1	100
Fracción 9	4.1	1850	452	10.6	2.89
Fracción 11	6.74	7410	1100	25.7	11.6
Fracción 12	3.4	1850	544	12.7	2.89
Fracción 65	1.39	926	690	16.1	1.44

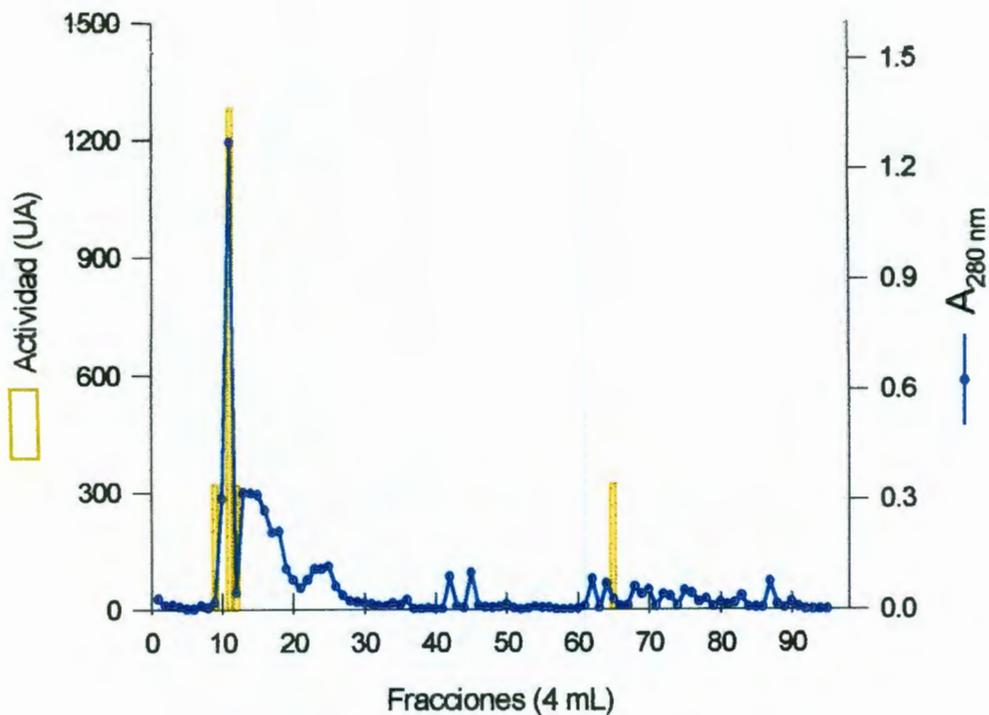


Figura 6.14 Filtración en gel con Superdex 30 de las fracciones con actividad recolectadas en la cromatografía de intercambio aniónico ((Tris-acril M DEAE). Velocidad de flujo 0.2 mL/min. Amortiguador: fosfatos 20 mM, NaCl 0.5 M, Urea 6 M y pH 6.5.

Los agregados de bacteriocinas pueden llevar a la determinación errónea de un peso molecular elevado (Klaenhammer y Barefoot, 1984; Crupper e landolo., 1996). En la purificación de bavaricina MN los experimentos iniciales arrojaron pesos moleculares mayores a 250 kDa, ocasionado por la presencia de agregados; sin embargo, al realizar la separación en presencia de urea 5 M, se observó una disgregación de la bacteriocina, obteniéndose un peso molecular de 22.6 kDa (Montville y Kaiser, 1996). Una situación similar se observó para la enterocina Ef108, separada resina Superosa 12, ya que de dos picos con actividad solamente se observó uno (el de menor peso molecular) cuando se agregó a la mezcla de elución urea 5 M (Dallas et al., 1996). La bacteriocina de *E. faecium* UQ1 objeto de éste estudio no presentó los comportamientos arriba descritos, ya que desde el inicio se eluyó la muestra con urea 6 M. Por lo tanto, es posible que se tenga la existencia de dos bacteriocinas producidas por *E. faecium* UQ1, ya que la agregación es muy poco probable por la elevada concentración de urea utilizada.

Mayorga en 1999 donde comprobó la actividad antilisterial de la bacteriocina producida *E. faecium* UQ1, al adicionar 19 y 64 UA/mL a células en crecimiento de *L. monocytogenes*, observándose a las 3h la reducción de 2 log en las UFC para ambas concentraciones con respecto al control; mientras que a las 17 h había una disminución 3 log en las UFC para la concentración de 19UA/mL y 6 log en las UFC para la concentración de 64 UA/mL (Apéndice A5), se concluyó que existe un efecto bactericida dependiente de la dosis. En base a los resultados aquí obtenidos y a los reportados por Mayorga en 1999, podemos clasificar a una de las bacteriocinas producidas por *E. faecium* UQ1 en la clase IIa ya que es un péptido termoestable debido a que no pierde actividad por calentamiento a los 70°C por 30 min y conserva el 50% de actividad después de un tratamiento térmico severo (121°C/15 min), tiene un bajo peso molecular (~2400 Da) y así como actividad antilisterial.

Debido a que se obtuvo una recuperación de solamente el 80% de la actividad inyectada, se decidió determinar si existía algún efecto sinérgico entre las fracciones con actividad. Se mezclaron volúmenes iguales de cada una de las cuatro fracciones que resultaron tener actividad (9, 11, 12 y 65), esperándose obtener una actividad mayor a la del promedio de la mezcla (130 UA/mL); sin embargo sólo se obtuvo una

actividad de 40UA/mL. Este valor es el esperado al considerar que no hubo efecto sinérgico, pero sí una pérdida del 60% de la actividad de debió al proceso de diálisis, como ocurrió en los inicios de la purificación (tabla 6.2). Esto ocurrió a pesar de haberse utilizado un amortiguador de ácido fórmico, que controlaba la fuerza iónica y el pH, el cual se volatilizaba posteriormente para evitar alguna interferencia. Por otro lado, se realizó otra mezcla con volúmenes iguales de las fracciones 11 y 65, la cual mostró resultados similares a los ya mencionados. Se concluye que no existe efecto sinérgico en la acción de las bacteriocinas provenientes de *E. faecium* UQ1.

Existen varias bacteriocinas donde se ha demostrado la presencia de dos péptidos cuya mezcla causaba un efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana medida por separado. Tal es el caso de las enterocinas A y B y las L50A y L50B producidas por *Ent. faecium* T136, y L50, respectivamente (Casaus et al., 1997; Cintas et al., 1998), *Lactobacillus plantarum* C11 produce 4 péptidos (PIn E, F, J, y K) con actividad bacteriocinogénica los cuales presentan en combinaciones de dos (PIn E y F, y PIn J y K) ; una mayor actividad que de forma individual (Anderssen et al., 1998). Por su parte Bogovic et al. (1998), no observaron efecto sinergista para la dos bacteriocinas producidas por *Lactobacillus acidophilus* LF221 y lo mismo es reportado para menseterocinas 52 A y 52 B (Revol-Junelles et al., 1996).

Alternativamente las fracciones con actividad provenientes del intercambio iónico, se trataron de separar usando una columna con Sephadex G-100. El cromatograma muestra baja actividad en la fracción 81 (figura 6.15), con una concentración de proteína <10 µg/mL. El peso molecular estimado fue de 2.7 kDa (Apéndice A4), con una actividad específica 95 veces superior a la inicial, aunque solamente se logró recuperar el 3% de la actividad inyectada Este método fue desechado por la poca recuperación de actividad, además de que la bacteriocina separada corresponde probablemente a la obtenida en la fracción 65 de la filtración en gel usando la resina Superdex 30, ya que tomando en cuenta el error experimental, sus masas moleculares son iguales.

Se observan dos picos de proteína los cuales no presentan actividad, por lo que se sospecha que algún componente de la resina ocasionó la inactivación de ésta

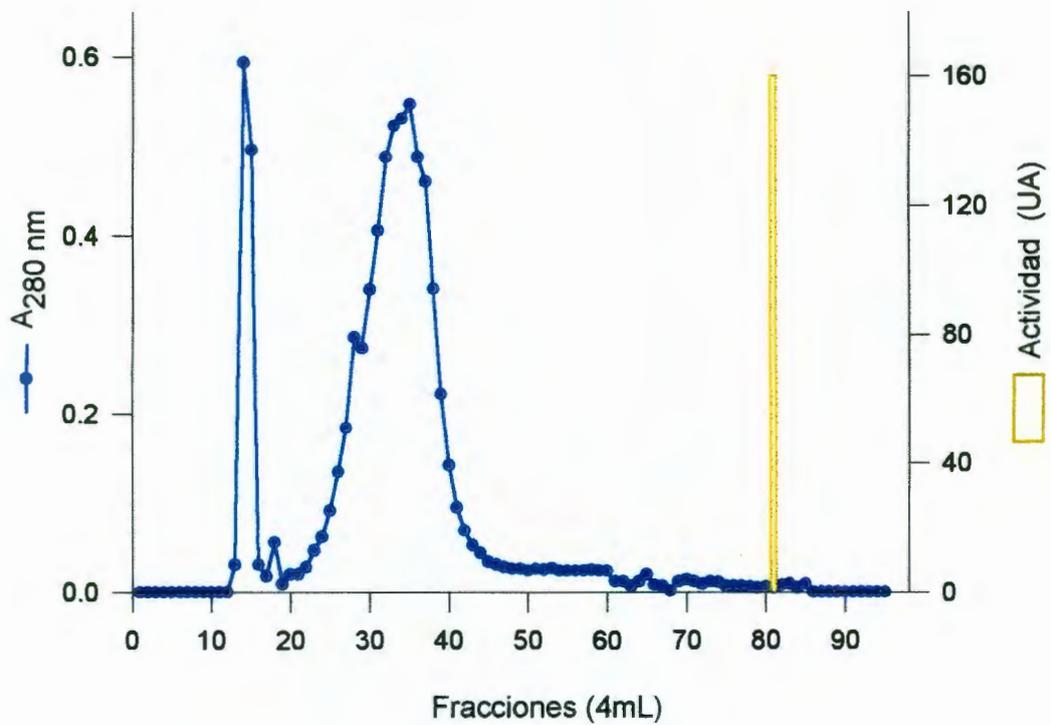


Figura 6.15 Filtración en gel con Sephadex G-100 de las fracciones con actividad recolectadas de la cromatografía de intercambio anónico (Tris-acril M DEAE). Velocidad de flujo 0.1 mL/min. Amortiguador: fosfatos 20 mM, NaCl 0.5 M, Urea 6 M y pH 6.5.

bacteriocina, ya que se usó el mismo eluyente. En el volumen muerto, pudo haberse eluido una de las bacteriocinas, la cual perdió su actividad al interaccionar de manera desconocida con la resina de Sephadex. Esto no ocurrió en la columna Superdex 30. Indicando que Sephadex G-100 no es compatible con la naturaleza fisicoquímica de la bacteriocina.

Al igual que en la fracción 65 de la filtración en gel Superdex 30, la fracción 81 de Sephadex G-100 no presentó bandas en la electroforesis en el sistema Tris-tricina. Esto sugiere que la bacteriocina, esta presente en estas fracciones en muy poca concentración (aproximadamente menor de 0.1 ng/mL), ya que no puede ser detectado por la tinción con plata. La ausencia de bandas sugiere que la preparación está libre de contaminantes como lo expresa Klaenhammer y Barefoot (1984), para la purificación de lactacina B.

Por otro lado la tinción con azul de Coomassie puede no ser adecuada para teñir estos péptidos de bajo peso molecular debido a que el tiempo empleado tanto en fijación como en tinción son muy prolongados y los péptidos pueden eluir completamente (Schägger y Von-Jagow, 1987).

Las fracciones no retenidas (9 y 11) en filtración en gel con Superdex 30 presentaron dos bandas de pesos moleculares entre 60,000 y 66,000 Da cuando se corrieron en condiciones desnaturizantes y reductoras en un gel de 10%T (figura 6.16). En condiciones nativas se observó en el zimograma halos de inhibición a esta misma altura del gel (figura 6.17). La presencia de estas bandas así como los picos de actividad en la filtración en gel con Superdex 30 y la cromatografía de intercambio aniónico nos indican la posible producción de dos bacteriocinas de diferentes pesos moleculares por parte de *E. faecium* UQ1.

La fracción 65 con Superdex 30, (a la cual se llamó fracción B, figura 6.14) así como la fracción 81 de Sephadex G-100 no presentó bandas de proteína; pero los zimogramas realizados con el microorganismo indicador *M. luteus* NCIB 8166 presentaron actividad a lo largo de todo el gel, problemas parecidos se han reportado con otras bacteriocinas. (Kato et al., 1992, Bogovic et al., 1998).

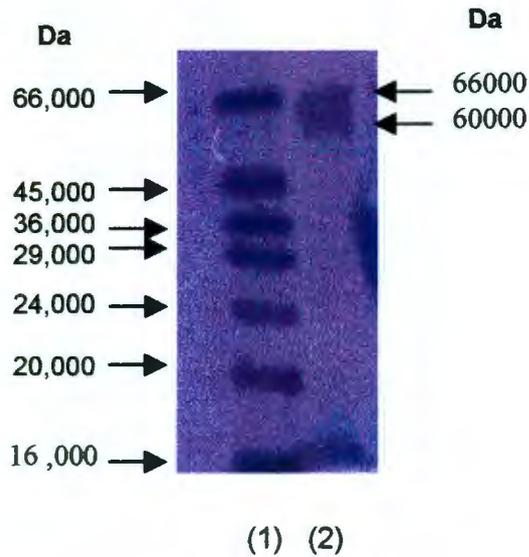


Figura 6.16 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) 10%T en condiciones reductoras de la cromatografía de filtración en gel con Superdex 30. Carril 1: marcadores de bajo peso molecular (Sigma) y carril 2: fracción 9.

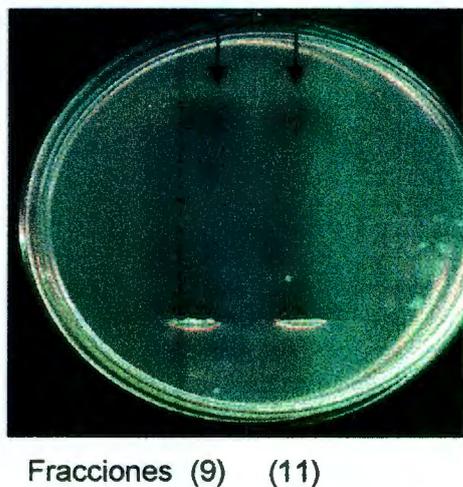


Figura 6.17 Zimograma de las fracciones 9 y 11 de la cromatografía de filtración en gel con Superdex 30; después de la electroforesis (10T%) en condiciones nativas, como microorganismo indicador *M. luteus* NCIB 8166.

En la tabla 6.5 se muestra un resumen de la purificación de las bacteriocinas producidas por *E. faecium* UQ1 de forma global. Se puede observar que las etapas de diálisis constituyen un paso determinante en la purificación debido a la gran pérdida de actividad.

A partir de 1 L de caldo fermentado y posteriormente concentrado, se obtuvieron 64000 UA de actividad de bacteriocina y 1493.6 mg de proteína. Al término de la purificación por métodos tradicionales se pudieron obtener dos fracciones parcialmente purificadas. La fracción A contenía 14.2 mg de proteína con una actividad de 11110 UA y la fracción B solo 1.39 mg de proteína y únicamente 926 UA actividad.

Cuando se usaron los métodos de adsorción específica, a partir del 1 L de caldo fermentado se pudo obtener una sola bacteriocina purificada a homogeneidad representado 8 µg de proteína, con una actividad de 6400 UA.

Tabla 6.5 Resumen global de las etapas de la purificación tradicional de las bacteriocinas producidas por *E. faecium* UQ1

	PROTEINA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (UA)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (UA/mg)	FACTOR DE PURIFICACION	RENDIMIENTO %
ELCC	1493.6	64000	42.84	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	543.9	51200	94.13	2.19	80
Diálisis	335.5	21580	64.29	1.51	34
Intercambio Iónico	175.3	21578	123.09	2.90	33.80
Filtración en gel Superdex 30 (Pico A)	14.24	11110	780	18	17.35
Filtración en gel Superdex 30 (Pico B)	1.39	926	670	15	1.4

6.4 Estabilidad de la bacteriocina

En ensayos por duplicado la bacteriocina fue estable en un amplio rango de pH (1 a 12). La actividad remanente para cada valor de pH fue del 100% en comparación con el control (160 UA/mL; Figura 6.18). Sin embargo, los halos de inhibición de mayor longitud se observaron a pH de 4.0. Un estudio con las mismas condiciones sobre la estabilidad al pH de la bacteriocina producida por *Lactobacillus curvatus*, mostró que la actividad no se veía afectada en rangos de pH de 5-7, mientras que a pHs de 2-4 y de 8 se observó una pérdida del 50% de la actividad y a pHs de 1 y 9, una pérdida del 75%. (Casla et al., 1996). Por su parte Ehrmann et al., en 1996 encontraron que la plantaricina 1.25 después de someterse a un tratamiento similar al que aquí se detalla no presentó pérdida de la actividad; tal vez un mayor tiempo de incubación a los pHs trabajados sería necesario para ver con mayor claridad el efecto de este factor. Algunas bacteriocinas son muy sensibles a este factor tal es el caso de nisina A donde el pH óptimo de actividad es de 2, pero decrece cuando aumenta éste. La enterocina 1146 por su parte, presenta una mayor estabilidad a pH relativamente ácido a 21°C (Parente y Hill, 1991). La lactocina 705 es estable a pHs neutros y ácidos (Vignolo et al., 1994). Las bacteriocinas de BAL son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando que estas sustancias están bien adaptadas al medio ambiente de la bacteria productora

Se estudió la estabilidad en almacenamiento a 4 °C de la bacteriocina, resultando en una pérdida del 50% de actividad a partir del sexto día de almacenamiento (figura 6.18). Por otro lado, en congelación a -20°C, se mantuvo la misma actividad aún después de dos meses (figura 6.19). En pruebas realizadas por duplicado, para determinar su estabilidad a las condiciones de esterilización por calor húmedo (121° C/15 min.), ambos extractos presentaron una pérdida del 50% de actividad

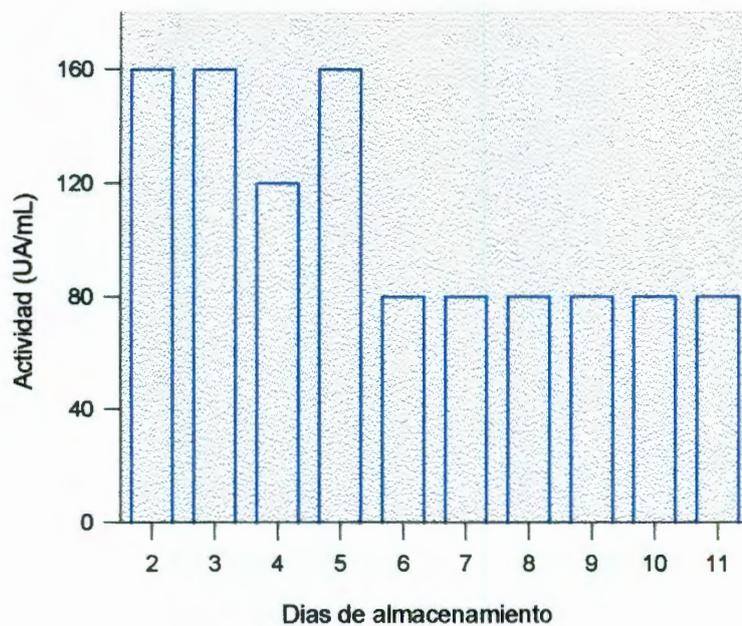


Figura 6.18 Efecto del almacenamiento en refrigeración (4°C) en la estabilidad de la bacteriocina presente en el ELCC de *E. faecium* UQ1.

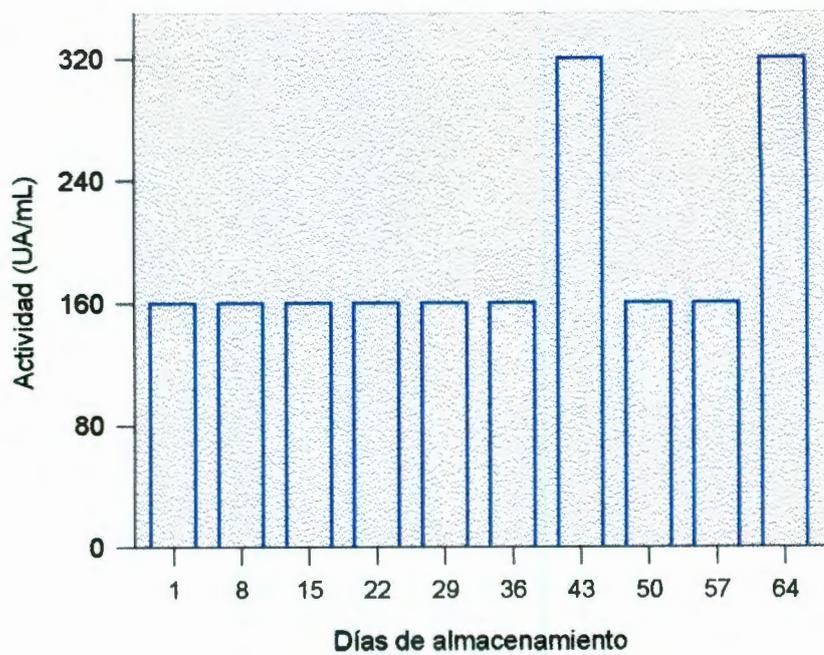


Figura 6.19 Efecto del almacenamiento en congelación (-20°C) en la estabilidad de la bacteriocina presente en el ELCC de *E. faecium* UQ1.

7. Conclusiones

Utilizando el método de adsorción específica seguido de cromatografía de intercambio catiónico, se logró purificar a homogeneidad una bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1. El factor de purificación fue de 1070, con una actividad recuperada del 1.8% y un peso molecular de 4500Da. Mediante métodos bioquímicos tradicionales de purificación, se obtuvieron dos picos (A y B) con actividad de bacteriocina. El pico A tuvo un factor de purificación de 18 representando el 17% de actividad inicial. Esta fracción presentó dos bandas con pesos moleculares de 60 y 66 Da presentando en esta zona del gel actividad antimicrobiana. El pico B tuvo un factor de purificación de 15, pero solo representó el 1.4% de la actividad inicial. Su peso molecular estimado fue de 2400 Da y probablemente se trate de la misma bacteriocina purificada a homogeneidad por el método de adsorción específica. Las fracciones A y B no presentaron sinergismo en su actividad antimicrobiana.

La purificación tradicional mostró que *E. faecium* UQ1 produce dos tipos de bacteriocina; pudiéndose clasificar una de ellas dentro del grupo del grupo IIa, ya que presenta un bajo peso molecular, gran estabilidad térmica y además fue activa contra *L. monocytogenes*. Por otro lado, la metodología tradicional resultó más laboriosa, y como resultado de la manipulación requerida, se perdían cantidades importantes de bacteriocina (y proteína) en cada etapa de purificación, obteniéndose finalmente bajos factores de purificación y recuperación de actividad.

El proceso de diálisis fue un factor limitante en la purificación tradicional, pues aunque se usó un amortiguador volátil, se perdía cerca de la mitad de la actividad y de proteína. Esto se atribuyó a la alta hidrofobicidad de la bacteriocina, la cual probablemente se adhería a la membrana de diálisis.

La bacteriocina en el ELCC presenta características muy importantes de interés para su aplicación industrial, como son su gran estabilidad a elevadas temperaturas, así como en condiciones de congelamiento. Es de destacar su estabilidad en un amplio rango de pH (1-12), lo que le permitiría ser aplicada en diversos alimentos

(ensaladas, carnes frías entre otras) en forma de ingrediente ó tolerar los tratamientos del proceso como son la pasteurización, escaldado y cocimiento.

Las bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1 puede ser una alternativa para la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), en el caso particular del control de la listeriosis, ya que presenta un fuerte antagonismo hacia este microorganismo.

De un litro del cultivo de *E. faecium* UQ1 por la purificación con adsorción específica se obtuvieron 6400 UA de actividad, mientras que por métodos tradicionales se obtuvieron 12036 UA (fracciones A y B), teniendo en cuenta la pureza de la bacteriocina obtenida por cada método se puede utilizar el método de adsorción específica como una buena alternativa de purificación para estudio bioquímicos de la bacteriocina pura.

8. Bibliografía

- Abee, T. (1995). Pore forming bacteriocins of gram positive bacteria and self protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 129: 1-10.
- Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis int't Veld, J.H.J., y Brink, B. (1998). Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *J. Appl. Microbiol.* 84: 568-576.
- Anderssen, E. L., Diep D.G.B., Nes, I.F. Eijsink, V.G.H. y Nissen-Meyer, J. (1998). Antoganonistic Activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new-peptide bacteriocins, Plantaricins EF and JK, and the Induction factor Plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2260-2272.
- Arihara, K., Cassens, R.B. y Lachansky, J.B. (1993). Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. *Int. Food Microbiol.* 19: 123-134.
- Axelsson, L. T. (1993). Classification and physiology. En: Lactic Acid Bacteria. Salminen, S. y Wright A.V. (Eds). New York. Marcel Dekker, Inc: 1-20.
- Benoit, V., Mathis, R., y Lefebvre, G. (1994). Characterization of brevicin 27 a bacteriocin synthetized by *Lactobacillus brevis* SB27. *Curr. Microbiol.* 28: 53-61.
- Bhugaloo, V.P., Dousset, C., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval P., y Marion D. (1996). Purification and aminoacid sequences of psicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium psycicola* V1 that display significantly differente levels of specific inhibitory activity. *Applied and Environ. Microbiol.* 62: 1410-1416.

- Bhunja A.K., Johnson M.C. y Ray, B. (1988a). Purification characterization an antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 261-268.
- Bhunja A.K., Johnson M.C. y Ray, B. (1988b). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electroforesis. *J. Ind. Microbial.* 2: 319-322.
- Bhunja A.K., Johnson M.C. y Ray, B. (1992). A modified method to directly detect in SDS-PAGE the bacteriocin of *Pediococcus acidilactici*. *Lett. Appl. Microbio.* 15: 5-7.
- Bogovic, B., Rogelj, I. y Holo, H. (1998). Isolation and characterizacion of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 606-612.
- Brock, T. D, Peacher B. Y Pierson, D. (1963). Survey of the bacteriocins of enterococci. *J. Bacteriol.* 86:703-707.
- BSI. (1974). British Standards Methods for the estimation an diferentation of nisin in processed cheese. BS 4020.
- Carrolissen-Mackay, V., Arendse, G. y Hastings, J. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria. Problems and pointers. *J. Food Microbiol.* 34: 1-16.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L, M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. y Holo, H. (1997). Enterocina B a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically whit enterocin A. *Microbiol.* 143: 2287-2294.

- Casla, D., Requena, T. y Gómez, R. (1996). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL 105. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 35-41.
- CAST (1998). Council for Agricultural Science and Technology. Bahia de Lincon. http://www.cast-science.org/anti_sum-htm
- CDC (1999). Multistate outbreak of Listeriosis. Center for disease control and prevention . Atlanta. <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm>
- Choi, H.J., Lee, H.S., Her, S., Oh, D.H., y Yoon S.S. (1999). Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the korean fermented vegetable kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 86: 175-181.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P., Nes, I.F., y Havarstein, L.S. (1998). Enterocins L50A y L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to Staphylococcal Hemolysins. *J. Bacteriol.*: 1988-1994.
- Contreras, B.G.L., De Vuyst, L. y Devreese, B. (1997). Isolation, purification and amino acid sequence of lactobin A, on of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 13-20.
- Crupper, S.S. y Iandolo, J.J. (1996). Purification and partial caracterizacion of a novel antibacterial agent (Bac 1829) produced by *Staphylococcus aureus* KSI1829. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3171-3175.

- Crupper, S.S. y landolo, J.J. (1997). Exploiting the unique biophysical properties of bacteriocins to purify bac 1829 from *Staphylococcus aureus* KSI1829. *Protein Expression Purific.* 9: 228-232.
- Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R.E. y Lemieux, L. (1994). Simple methodo of purification and sequencing of a bactericon produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 682-688.
- Daeschael, M.A. y Penner, M.H. (1992). Hidrogen peroxide, Lactoperoxidasa Systems, and Reuterin. En: Food biopreservatives of microbial origin. CRC Press. Florida. pp. 56-161.
- Dallas, S.L.H., Sathymmorthy, V. y Hitchins, A. (1996). Purification of the antilisterial bacteriocin inhibition substance produced by *Enterococcus faecium* 108. *J. Food Safety* 16: 183-199.
- Davey, G.P. y Richardson, B.C. (1981). Purification and some propertier of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 84-89.
- Davidson, P.M y Branen, A.L. (1993). Bacteriocins with potential for use in foods. En: Antimicrobial in foods. Hoover, D.G. (Ed.). Marcel. Dekker. New York. 409-439.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. y Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin. *Antonie van Leeuwenhoek.* 69:193-202.
- Devriese, L.A., Pot, B. y Collins, M.D. (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399-408.

- De Vuyst, L. y Vandame, E. J. (1994). Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. En: Bacteriocins of lactic acid bacteria. De Vuyst, L. y Vandame, E. J. (Eds.). Blackie Academic professional. Inglaterra. p.p. 1-11.
- Ehrman, M.A.; Heidenreich, B., Remiger, A., Klostermaier, P. y Vogel, R.F. (1996). Identification and characterization of plataricin 1.25, a bacteriocin, produced by *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25. *Adv. Food. Sci.* 18: 96-102.
- Elegado, F.B., June, K. W y Young, K.W. D. (1997). Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *Int. J. Food Microbiol.* 31:1-11.
- Englard, S. y Seifter, S. (1990). Purification Procedures: Bulk Methods. En: *Guide to protein purification*. Deustcher M.P (Ed.). Academic Press Inc. San Diego. pp. 285-298.
- Ennahar, S., Aouder-Werner, d., Asoobhei, O., y Hasselmann, C. (1998). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J.Appl. Microbiol.* 85: 521-526.
- Garriga, D., Hugas, M., Gisper, M.J. y Sarraga. C. (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecium* CTC 492 isolated from fermented sausages. *FEMS Microbiol.* 12: 131.
- Gersten, D.M. (1996). Gel Electrophoresis Proteins. Essential Techniques. John Wiley and Sons. Chichester.pp.60
- Gherna, R.L. (1994). Culture Preservation. En: *Methods for general and molecular bacterology*. Gerhardt P; Murray, R.G.E., Wood W.A y Krieg, N.R. (Eds.). American Society for Microbiology. Washington. pp.278-292

- Hardie, J.M. y Whiley, R.A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Appl. Microbiol.* Simposium Supplement. 83: 1s-11s.
- Hasting, J.V. y Stiles, M. E. (1991). Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolates from meat. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 127-134.
- Ibarra, S.J. (1999). Influencias de las condiciones de crecimiento en la producción de la bacteriocina generada por *Lactobacillus plantarum* Bal-1. Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Jack, R., Tagg, N. L. y Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol.* 59. 171-200.
- Jimenez-Diaz, R., Rios, S.R.M., Desmazeaud, M., Ruiz, B.J.L. y Piard, J.C. (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1416-1224.
- Kabuki, T., Saito, T., Kawai, Y., Uemura, J. y Itoh, T. (1997). Production and characterization of reuterin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 145-156.
- Kalchayanand, N., Sikes T., Dunne, C.P. y Ray, B. (1994). Hydrostatic Pressure and Electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4174-4177.

- Kato, T., Mutsuda, T. y Yoneyama, Y., Kato H, Nakamura, R. (1992). Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and characterization of bacteriocin. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 551-556.
- Kato, T., Matsuda T., Yoneyama, Y., Kato, H., y Nakamura, R. (1994). Antibacterial substances produce by *Enterococcus faecium*. *Biosci. Biotec. Biochem.* 58: 411-412.
- Klaenhammer, T.R. y Barefoot, S.F. (1984) Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lactacin B. *Ant. Agentes Chemoth.* 26: 328-334.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.* 70: 337-349.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86.
- Kennedy, R.M. (1990). Purification Procedures: Cromatographic methods. Hydrophobic chomatography. En: Guide to protein purification. Deutscher M.P (Ed.). Academic Press Inc. San Diego.pp. 339-342.
- Kramer, J. y Brandis, H. (1975). Purification and Characterization of two bacteriocins from *Streptococcus faecium*. *J. Gen. Microbiol.* 88: 93-100.
- Kramer, J., Keness, J. Brandis, H. (1983). Transfer of a mini-plasmid determining bacteriocins productionn and bacteriocin inmunity in *Streptococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 20: 385-389.

- Lauková, A; Mareková, M. y Javorský, P. (1993). Detection and antimicrobial spectrum of bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM4231. *Letf. Appl. Microbiol.* 16: 257-260.
- Lauková, A; Czikkova S; Vasilkova Z; Juris P; y Marekova, M. (1998). Ocurrence of bacteriocin production among environmental enterococci. *Letf. Appl. Microbiol.* 27: 178-182.
- Lewus, C.B. y Montville, T.J. (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 13: 145-150.
- Mayorga, M.L. (1999). Estudio antagónico y potencial bacteriocinogenico de una cepa de bacteria lactica aislada de kefir. Tesis de Licenciatura de Química Farmacobióloga. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., y Berkley, R.C.W. (1972). Methodos for studying bacteriocins. En: "Methodos in Microbiol." Norris J. R. y Ribbons D.W. (Eds). Academic Press. Inc., New York. pp.315-422.
- McKay, A.M. (1990). Antimicrobial actividty of enterococcus faecium agains *Listeria* sp. *Letf. Appl. Microbiol.* 11: 15-17.
- Montville, T. J. y Kaiser, A. (1993). Antimicrobial proteins: Clasification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins En: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Hoover D.G. Steenson L.R. (Eds). Academic Press. p.p. 1-14.
- Montville, J.T. y Kaiser, A. (1996). Purification of the bacteriocin bavaricin MN and caracterizacion on its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4529-4535.

- Montville, J.T. y Winkowski, K. (1997). Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. *Food Microbiol. Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville. (Eds). ASM Press. Whashington D.C. pp. 557-577.
- Muriana P.M. y Luchansky, J.B. (1993). Biochemical methods for purification of bacteriocins. En: *Bacteriocins of lactic Acid Bacteria*. Hoover D.G. y Steenson (Eds). L.R. Academic Press. pp.42-57.
- Nes I.F., Diep, D.B., Haverstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. y Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 113-128.
- Nieto, L. J.C., Nissen, M.J., Sletten, K., Pelaez, C. y Nes, I.F. (1992). Purification and aminoacid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. General Microbiol.* 138: 1985-1990.
- Olasupo, N.A., Schilliger, U., Franz, C.M.A.P. y Holzapfel W.H. (1994). Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from "wara" a fermented skimmed cow milk product from West Africa. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 438-441.
- Olhsson, T. (1994). Minimal processing-preservation methods of the future: an overview. *Trends food Sci. Technol.* 5: 341-344.
- Parente, E. y Hill, C. (1991). Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* Inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protec.* 55: 497-502.
- Parente, E. y Hill, C. (1992). A comparison of factores affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 290-298.

- Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K. y Schleifer, K.H. (1994). Taxonomy of lactic acid bacteria. En: Bacteriocins of lactic acid bacteria. De Vuyst, L. y Vandame, E. J. (Eds.). Blackie Academic professional. Inglaterra: p.13.
- Ray, B. y Sandine, W.E. (1992). Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives. En: Food biopreservatives of microbial origin. Ray, B. y Sandine, W.E. (Eds). CRC Press. Florida. pp. 109-114.
- Requena T. y Peláez C. (1995). Revisión. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de Bacteriocinas. Rev. Esp. Ciencia Tecnol. Alim. 19-44.
- Revol-Junelles, A.M., Mathis, R., Krier, F., Fleury y., Delfour, A. y Lefebvre, G. (1996). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesiza two distinct bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 120-124.
- Rossomando, E.F. (1990). Purification Procedures: Chromatographic methods. En: Guide to protein purification. Deutscher M.P (Ed.). Academic Press. San Diego. pp. 309-316.
- Schägger, H. y Von-Jagow, G.V. (1987). Tricine-sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-3679.
- Sharpe, M. E. y Fryer, T.F. (1972). Identification of the lactic acid bacteria. En: Methods in Microbiology. Berganls, R., Morris. Academic. Londres. pp.66-79.
- Simonetta, A.C., Morague, L.G. y Frison, L.N. (1997). Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 139-146.
- Singh, P.C. y Singh, R.K. (1996). Choosing an appropriate bioseparation technique. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 49-58.

- Smith, P.K., Krohn R.I., Hermanson, G.T., Mallia A.K., Gartner, F.H., Provenzano M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985). Measurement of Protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Tahara, T., y Kanatani, K. (1997). Isolation and partial characterization of crispacin a. A cell-associated bacteriocin produced by *Lactobacillus crispatus* JCM 2009. *FEMS Microbiol. Lett.* 147: 287-290.
- Tahara, T., Yoshioka, S., Utsumi, R. y Kanatani, K. (1997). Isolation and partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus gasserii* JCM 2124. *FEMS Microbiol. Lett.* 148: 97-100.
- Tagg, J.R. y Mac Given, A.R. (1971). Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21:943.
- Torri, T.G., Carminati, D. y Giraffa, G. (1994) Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* from dairy enterococci. *Food Microbiol.* 11: 243-252.
- Venema, K., Chikindas, M.L., Seeger, F.M.L., Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J., Venema, G. y Kok, J. (1997). Rapid and efficient Purification Method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: Purification of Lactococcin B and Pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 305-309.
- Vignolo, G. M., Kairuz M. N; Ruiz Holgado A.P. y Oliver G. (1994). Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 5-10.
- Vlaemynk, G., Herman, L. y Coudijzer., K. (1994). Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 211-225.

Voet, D. y Voet J. (1996). Biomolecules. En: Biochemistry. Toronto. John Wiley and Sons. pp. 89-96.

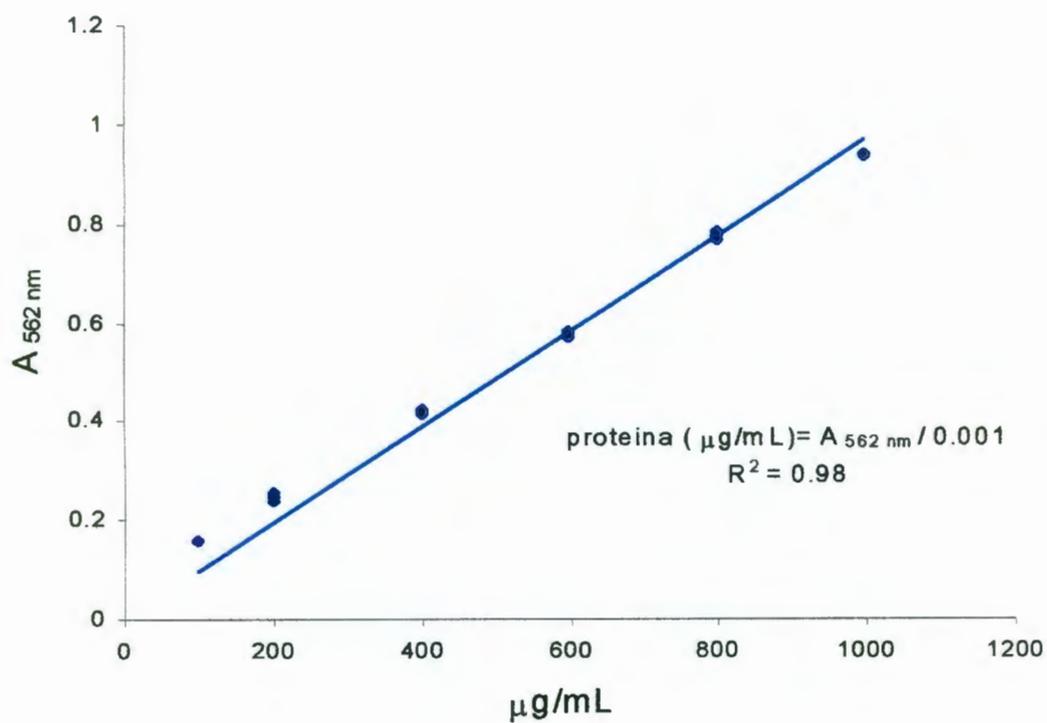
Wagen, E.S (1990). Purification Procedures: Cromatographic methods. Gel filtration. En: Guide to protein purification. Deutscher M.P (Ed.). Academic Press Inc. San Diego. pp. 317-328.

Wessels, S., Jelle, M. y Nes, I.F. (1999). Bacteriocins of the Lactic Acid Bacteria: Science, Application and Legislation. pp. 20-37.

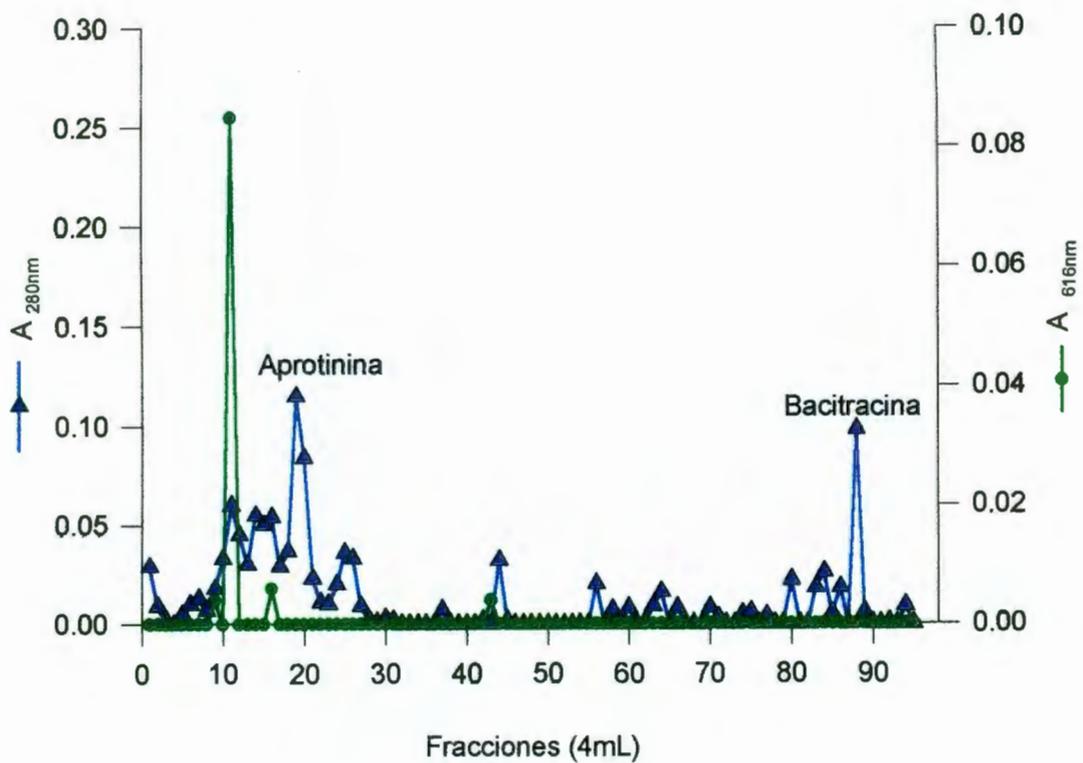
Williams y Wilkins (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9° Ed.). pp. 528 y 538.

Yang, R., Johnson M.C. y Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 355-3359.

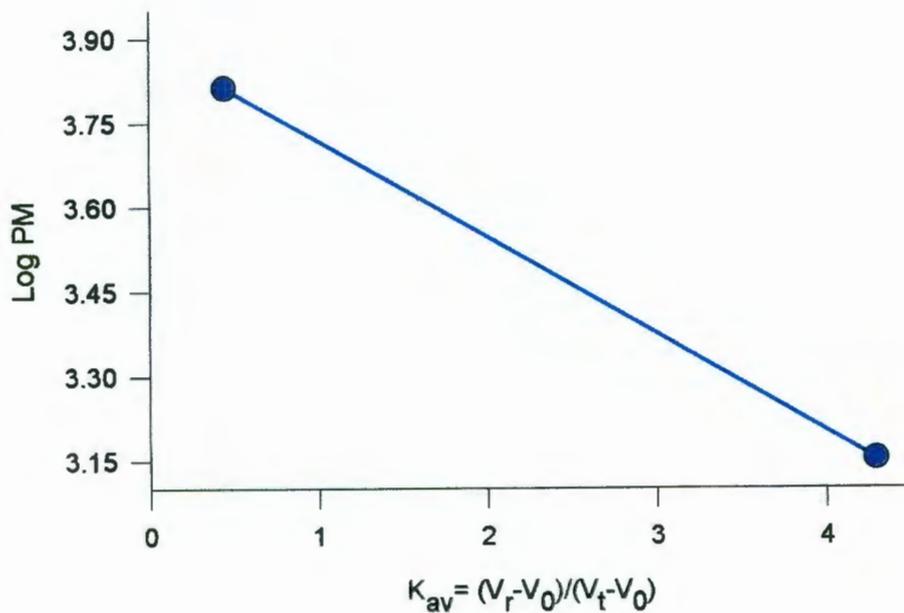
9. Apéndices



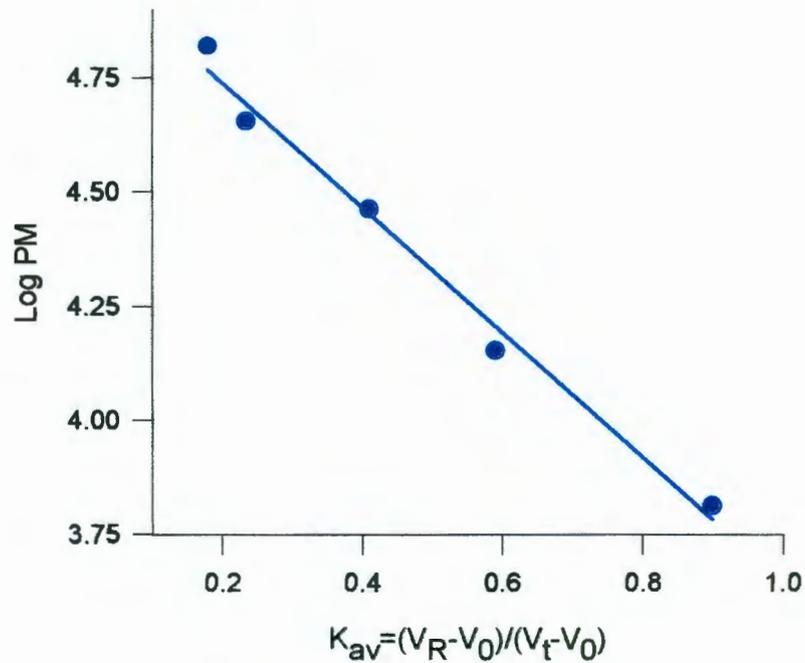
A1. Curva de calibración para la cuantificación de proteína soluble, usando el método de ácido bicinónico a 37°C (Smith et al., 1985). Estándar seroalbúmina bovina.



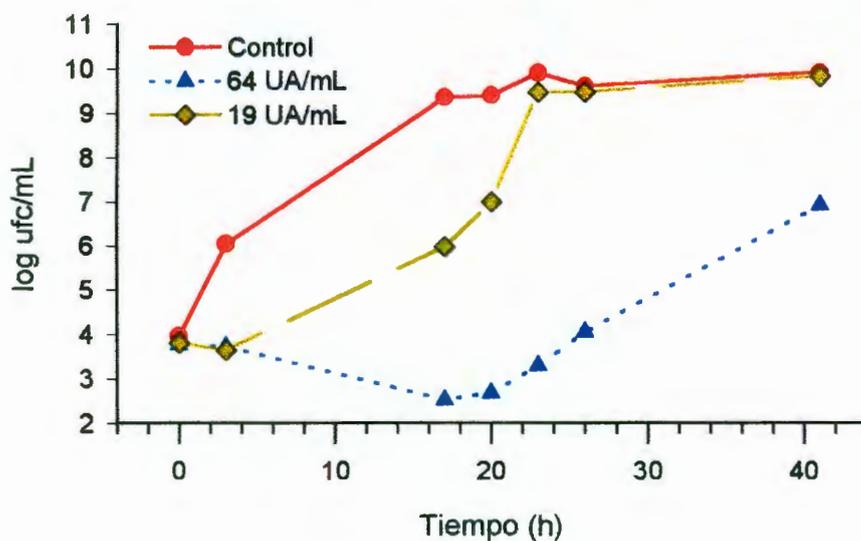
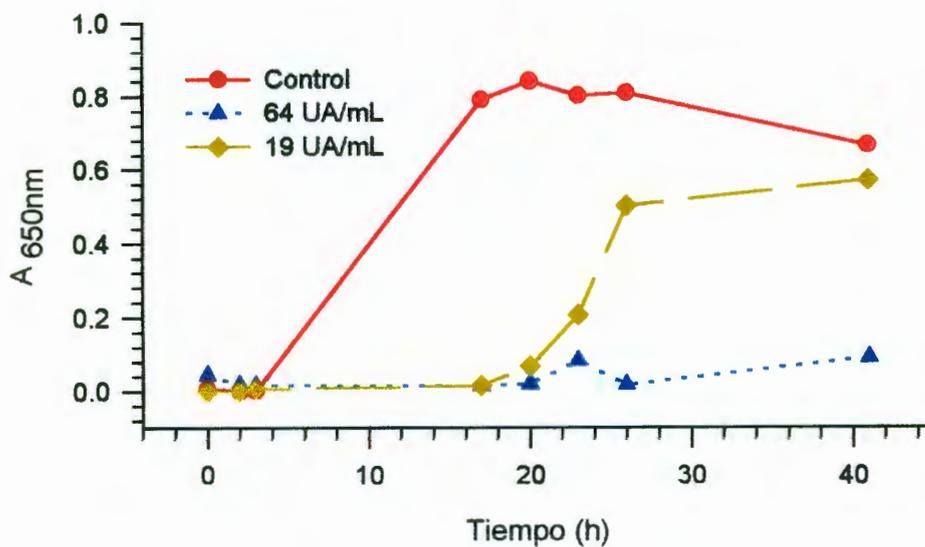
A2. Curva de calibración de la filtración en gel con Superdex 30. Velocidad de flujo 0.2 mL/min. Amortiguador: fosfatos 20 mM, 0.5 M NaCl, 6 M Urea, pH6.5. Vo=44 mL. Marcadores: Aprotinina 6512 Da y Bacitracina de 1423 Da.



A3. Curva de calibración para determinación de pesos moleculares de la cromatografía de filtración en gel con Superdex 30. Marcadores: Aprotinina 6512 Da y Bacitracina de 1423 Da. $PM = \text{Antilog}(-0.1717K_{av} + 3.8903)$



A4. Curva de calibración de pesos moleculares, con Sephadex G-100. Velocidad de flujo de 0.1 mL/min. Marcadores: seroalbúmina bovina (66 kDa), ovalbúmina de huevo (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), α -lactalbúmina (14.2 kDa) y aprotinina (6.5 kDa). K_{av} = coeficiente de distribución promedio, V_r =volumen de retención, V_0 =volumen muerto V_t =volumen total de líquido de la columna.



A5. Efecto de la bacteriocina producida por *E. faecium* UQ1 en el crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en fase exponencial. Caldo soya tripticaseina-0.6% Extracto de Levadura, 37°C.