



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Identificación de la actividad antimicrobiana de cepas
bacterianas del género *Enterococcus***

T E S I S

Para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología

P r e s e n t a:

I.B.I José Luis Reyes Cortes

Directora de Tesis: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesores:

Dr. Israel García Cano

Dra. Carolina Peña Montes

México D.F., Septiembre 2015

México D.F. a ___ de _____ del 2015.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Identificación de la actividad antimicrobiana de dos cepas bacterianas del género *Enterococcus*

que presentó:

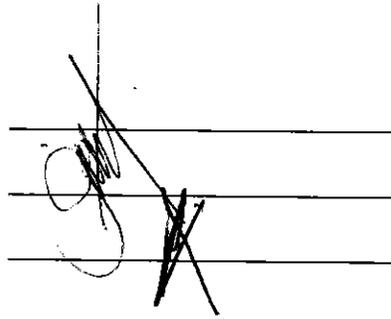
I.B.I Reyes Cortes José Luis

Comité tutorial:

Director: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor: Dr. Israel García Cano

Asesor: Dra. Carolina Peña Montes



Sinodales:

Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros
Biotecnología UAM-Iztapalapa



Dr. Francisco José Fernández Perrino
Biotecnología UAM-Iztapalapa



“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

México D.F. a ____ de _____ del 2015.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Identificación de la actividad antimicrobiana de dos cepas bacterianas del género *Enterococcus*

que presentó:

I.B.I Reyes Cortes José Luis

Comité tutorial:

Director: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor: Dr. Israel García Cano

Asesor: Dra. Carolina Peña Montes

Sinodales:

Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros
Biología UAM-Iztapalapa

Dr. Francisco José Fernández Perrino
Biología UAM-Iztapalapa

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son usadas como cultivos iniciadores para conservar los alimentos, ya que producen una amplia gama de metabolitos antibacterianos como: ácidos orgánicos, bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas (PGH). Estas últimas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos o peptídicos que se encuentran en el peptidoglucano presente en la pared celular de todas las bacterias, produciendo la lisis celular. Además están implicadas en diversas funciones celulares, tales como el crecimiento, la división y la autólisis. En particular, las BAL del género *Enterococcus* son frecuentemente utilizadas en productos cárnicos como cultivo iniciador, y se ha reportado que tienen la capacidad de inhibir algunos microorganismos patógenos. Las cepas *Enterococcus faecium* UAMI-3 y *Enterococcus faecium* MXVK22 fueron aisladas de chorizo tipo español y chorizo tipo mexicano, respectivamente. Estas cepas presentan actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias patógenas, aunque se desconocía la naturaleza de los metabolitos responsables de dicha actividad, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar el o los compuestos con actividad antimicrobiana producidos por cepas de *Enterococcus*. En primer lugar se confirmó el género y especie de las cepas de estudio mediante la secuenciación del ARNr 16S y se determinó la actividad antimicrobiana total por la prueba de difusión en agar contra diferentes microorganismos patógenos y BAL. Posteriormente se realizó la extracción de proteínas por la técnica de adsorción-desorción (que favorece la extracción de péptidos catiónicas como las bacteriocinas) y por precipitación con ácido tricloroacético (TCA por sus siglas en inglés) para su posterior identificación por LC-

MS/MS. Por otra parte se verificó la presencia de los genes que codifican para las proteínas causantes de la actividad antimicrobiana como son: la enterocina A (*entA*), enterocina B (*entB*) y PGHs, y adicionalmente se obtuvo el ADN complementario (ADNc) del gen *entA* a partir de la extracción de ARN total de las cepas UAMI-3 y MXVK22, y se realizó una amplificación con primers específicos para verificar la presencia de la enterocina A.

Se obtuvo una similitud del 100% con *Enterococcus faecium* y del 98-100% con los genes que codifican para la enterocina A, la proteína P54 y N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa para ambas cepas. En los extractos obtenidos por la técnica adsorción-desorción se identificó la proteína fosfoacetil transferasa y la proteína L5 50S ribosomal para la cepa UAMI-3 y MXVK22 respectivamente, aunque ninguna de las dos está asociada con la actividad antimicrobiana, con respecto a la secuencia obtenida con el ADNc se obtuvo una similitud de 100% con el gen *entA*, aunque no se observa actividad antimicrobiana en los zimogramas. Con respecto a los extractos obtenidos con TCA se identificaron las proteínas P54 (56.4 kDa) y N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (70.4 kDa) para la cepa MXVK22; mientras que para la cepa UAMI-3 sólo se identificó a la proteína P54 (57.7 kDa). Estas proteínas mostraron actividad antimicrobiana y se sabe que están asociadas a la hidrolisis de la pared celular, por lo que se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria de las mismas por medio de la técnica de difusión en agar contra *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*. La CMI contra *L. innocua* fue de 10 µg/mL y contra *S. aureus* fue de 20 µg/mL, siendo los mismos resultados para los extractos de las cepas UAMI-3 y MXVK22.

Por todo lo antes mencionado se determinó que la actividad antimicrobiana presente en las cepas *E. faecium* UAMI-3 y *E. faecium* MXVK22 se debe a la producción de peptidoglucano hidrolasas (P54 y N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa) y no a bacteriocinas, ya que aunque las dos cepas presentan el gen *entA* que codifica para la enterocina A y que este se transcribe a ARNm, posiblemente no se lleva a cabo la traducción o el péptido no realiza los cambios pos-traduccionales que le proporcionan la actividad antimicrobiana.

Finalmente la actividad observada de N-acetilglucoamidasa es de interés en la industria de los alimentos y la biotecnología, ya que puede ser utilizada para el control de patógenos alargando la vida de anaquel de productos alimenticios.

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) as starter cultures are used to preserve processed foods because they produce a wide range of antibacterial metabolites such as organic acids, bacteriocins and peptidoglycan hydrolase (PGH). The latter enzymes hydrolyze glycosidic linkages or peptide found in the peptidoglycan of all bacteria, producing cell lysis, they are also involved in various cellular processes such as growth, division and functions autolysis. The LAB of the genus *Enterococcus* are used in meat products as starter culture, and has been reported to have the ability to inhibit pathogens. *Enterococcus faecium* UAMI-3 and *Enterococcus faecium* MXVK22 were isolated from Mexican and Spanish chorizo sausage type respectively, and identified the supernatant of these strains showed antimicrobial activity against various pathogenic bacteria.

Due to the lytic effect of these strains of pathogenic bacteria as it is not the nature of the activity is known, the aim of this study was to identify the compound or compounds causing such activity, the spectrum of inhibition and its minimum inhibitory concentration (MIC). First total antimicrobial activity by agar diffusion test against different pathogens and microorganisms BAL was determined, subsequently identifying the genes coding for enterocin A (*entA*) and enterocin B (*entB*) was performed on both strains study, obtaining a PCR amplification product for the *entA* gene in both strains studied. After protein extraction was performed by adsorption-desorption technique favoring cationic protein extraction as bacteriocins extracted

proteins were identified by LC-MS / MS. Fosfoacetil transferase protein in the extract of strain 3 and 50S ribosomal protein in the extract was identified strain MXVK22, both not associated with antimicrobial activity.

Was carried out protein extraction with trichloroacetic acid, the antimicrobial activity is determined by inhibiting pathogenic bacteria and BAL. They were identified by LC-MS / MS two proteins in the extract of the strain MXVK22 associated with antimicrobial activity, protein P54 with a weight of 56.4 kDa and N-acetilmuramoil-L-alanine amidase weight 70.4 kDa protein and P54 equal weight 57.7 kDa extract strain UAMI-3, both strains associated with cell wall hydrolysis. The minimum inhibitory concentration by the agar diffusion method against *S. aureus* and *L. innocua* be determined CMI 10 ug / mL against *L. innocua* and 20 mcg / mL against *S. aureus* these results were the same extracts for both strains UAMI-3 and MXVK22.

Then he held for molecular identification UAMI-3 and MXVK22 strains of genes encoding proteins that cause antimicrobial activity, obtaining sequences with identity of amidase protein P54 and N-L-alanine-acetilmuramoil strains of the genus *Enterococcus* in the genome of both strains.

Was performed RNA extraction conversion to complementary DNA (cDNA) and amplification of *entA* cDNA gene such as mold and *entA* gene sequence in both strains was obtained UAMI-3 and MXVK22. For all the above is It determined that the antimicrobial activity present in strains *Enterococcus faecium* *Enterococcus faecium* UAMI-3 and MXVK22 is due to peptidoglycan hydrolases (P54 and N-acetilmuramoil-

L-alanine amidase) and not bacteriocins. Thus both strains exhibit also the gene (*entA*) encoding enterocin A and that this RNA is transcribed but not performed the translation of said protein transcribed. observed activity is N-acetilglucoamidasa interest in the food industry and biotechnology, as it can be used as lysozyme to control pathogens, extending the shelf life of food products.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Bacterias ácido lácticas.....	10
1.2 Género <i>Enterococcus</i>	11
1.3 Compuestos antimicrobianos sintetizados por genero <i>Enterococcus</i>	12
1.3.1 Ácidos orgánicos.....	12
1.3.2 Enterocinas.....	12
1.3.2.1 Mecanismos de acción	16
1.3.3 Peptidoglucano hidrolasas (PGH).....	17
1.3.3.1 Clasificación y mecanismo de acción.	19
1.3.3.2 PGHs en el género <i>Enterococcus</i>	21
1.3.3.3 Aplicación de PGHs en alimentos.....	22
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
3.1 HIPÓTESIS	27
3.2 OBJETIVO GENERAL	27
3.3 OJETIVOS PARTICULARES	27
4. METODOLOGÍA.....	28
4.1 Identificación de cepas por ADNr 16S	29
4.1.1 Extracción de ADN.....	29
4.1.2 Amplificación del gen ADNr 16S.....	29
4.1.3 Purificación de secuencia amplificada	31
4.1.4 Secuenciación del gen estructural	31
4.2 Identificación de la actividad en extracto crudo.....	31
4.2.1 Cultivo de las cepas del genero <i>Enterococcus</i>	31
4.2.2 Extracto crudo con actividad antimicrobiana.....	32
4.2.3 Determinación de la actividad inhibitoria y espectro de inhibición	32
4.3 Identificación de bacteriocinas.....	33
4.3.1 Semipurificación del péptido antimicrobiano.....	33

4.3.2 Perfil de proteínas y zimogramas.....	34
4.3.2.1 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio de SDS-PAGE en placa de agar	36
4.3.3 Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	36
4.3.4 Identificación del gen estructural	37
4.3.4.1 Amplificación del gen estructural (<i>entA</i>) por PCR	37
4.4 Identificación del transcrito del gen <i>entA</i>	39
4.4.1 Amplificación por PCR del gen <i>entA</i> con ADNc como molde.	40
4.5 Identificación de peptidoglucano hidrolasas.....	41
4.5.1 Extracción de peptidoglucano hidrolasas.....	41
4.5.2 Determinación de la actividad antimicrobiana y espectro de inhibición con el extracto de peptidoglucano hidrolasas.....	42
4.5.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	42
4.5.4 Perfil de proteínas y zimogramas.....	42
4.5.5 Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	43
4.5.6 Amplificación del gen estructural de peptidoglucano hidrolasas	45
4.5.6.1 Diseño de oligonucleótidos	45
4.5.6.2 Amplificación del gen que expresa la proteína P54	45
4.5.6.3 Amplificación del gen que expresa la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	46
5. RESULTADOS	48
5.1 Identificación de cepas por ADNr 16S	48
5.1.1 Extracción de ADN.....	48
5.1.2 Amplificación del gen ADNr 16S	49
5.2 Identificación de la actividad inhibitoria y espectro de inhibición producido por las cepas <i>E. faecium</i>	50
5.3 Identificación de actividad antimicrobiana por bacteriocinas.....	52
5.3.1 Identificación de genes de bacteriocinas	54
5.3.2 Identificación de proteínas SDS-PAGE.....	57
5.3.3 Identificación de la transcripción del gen <i>entA</i> en las cepas de <i>Enterococcus</i>	61

5.4 Identificación de actividad antimicrobiana por PGHs	64
5.4.1 Espectro de inhibición por PGHs	64
5.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	65
5.4.3 Identificación de proteínas en y actividad antimicrobiana por SDS-PAGE	66
5.4.4 Identificación de los genes que codifican para PGHs.	70
5.4.4.1 Amplificación del gen que codifica para de la proteína P54.....	70
5.4.4.2 Amplificación del gen estructural de la proteína N-acetilmuramoil-L- alanina amidasa.....	71
6. CONCLUSIONES.....	74
7. PERSPECTIVAS.....	75
8. REFERENCIAS.....	76

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos Gram-positivos muy heterogéneos desde el punto de vista morfológico y fisiológico, cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto mayoritario del metabolismo fermentativo de los carbohidratos. En general, las BAL son microorganismos de morfología bacilar o cocoide, no esporulados, microaerófilos o anaerobios facultativos, carecen de citocromos y catalasa y poseen un contenido de guanina y citosina (G+C) inferior al 50%. Actualmente, el grupo de las BAL comprende microorganismos de los géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Cintas y col., 2001; Rojas y Vargas, 2008).

Las bacterias lácticas se localizan frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas y con bajas tensiones de oxígeno, como por ejemplo la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996; Cintas y col., 2000).

Estas bacterias juegan un papel muy importante en la industria de los productos lácteos, ya que son utilizadas en la elaboración y conservación de leches

fermentadas, quesos madurados y algunos vinos, debido a su inocuidad higiénica y toxicológica. Por lo regular, algunos tipos de BAL producen efectos deseables de textura y sabor e inhiben el desarrollo de bacterias patógenas o contaminantes. A nivel industrial estas bacterias se utilizan como cultivos iniciadores en productos cárnicos, lácteos y vegetales, y también como probióticos.

1.2 Género *Enterococcus*

Los enterococos se han utilizado desde hace años en la producción de alimentos, por su importante contribución al desarrollo del aroma en quesos y productos cárnicos, como probióticos en alimentación humana, animal y como cultivos bioprotectores en productos lácteos y cárnicos (Coppola y col., 1998; Aymerich y col., 2000).

El grupo de los enterococos engloba a aquellos microorganismos en forma de cocos Gram-positivos que se agrupan en parejas o en cadenas cortas y pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas. En general son anaerobios facultativos, no esporulados, catalasa-negativos, oxidasa-negativos y presentan crecimiento óptimo a temperaturas de 35°C (aunque algunas especies del género crecen a temperaturas de 10-45°C), en presencia de NaCl al 6.5%, a pH 9.6 y pueden sobrevivir a tratamientos de 60°C durante 30 min (Schleifer, 1984).

En los últimos años ha existido un gran interés por emplear cepas de enterococos como cultivos iniciadores para la fermentación de productos cárnicos y lácteos,

debido a que éstos contribuyen en las propiedades sensoriales del producto fermentado final, además de por su capacidad para producir bacteriocinas.

1.3 Compuestos antimicrobianos sintetizados por genero *Enterococcus*

1.3.1 Ácidos orgánicos.

El resultado de la fermentación de las hexosas por la vía heterofermentativa es una gama de moléculas orgánicas que tienen actividad antibacteriana; las más comunes son el ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico. Se ha observado que ciertos ácidos débiles tienen mayor actividad antibacteriana a bajo pH que a un pH neutro. Entre el ácido acético y propiónico, el primero es el inhibidor más fuerte y tiene un amplio espectro de actividad inhibitoria, pues actúa sobre levaduras, hongos y bacterias, mientras que el ácido propiónico ejerce un fuerte efecto sobre levaduras y hongos. Esta fuerte actividad antibacteriana de los dos ácidos puede explicarse en parte por su alto pKa, comparado con el ácido láctico (Salminen y col., 2004).

1.3.2 Enterocinas

Las bacteriocinas producidas por las BAL pertenecen al grupo de péptidos sintetizados ribosomalmente, son en su mayoría péptidos antimicrobianos pequeños, catiónicos, anfifílicos, producidos naturalmente por la mayoría de las bacterias, las cuales varían en el espectro y modo de actividad, estructura y masa molecular, termoestabilidad, actividad a diferentes pHs y determinantes genéticos (Moreno y col., 2002; De Vuyst y Vandamme, 1994).

Considerando la estructura y propiedades fisicoquímicas y moleculares las bacteriocinas de BAL pueden ser divididas en tres clases ((Ingolf y col., 2007) (Tabla 1). Las bacteriocinas de la clase I son péptidos lantibióticos, pequeños, catiónicos, hidrofóbicos y termoestables que contienen un aminoácido inusual (ejemplo: el tioeter del aminoácido lantionina y/o 3- metillantionina) que son formados post-traduccionalmente y son capaces de lisar células eucarióticas. Estas son formadoras de poros en la membrana citoplasmática de sus células blanco.

La clase II son péptidos pequeños, catiónicos hidrofóbicos, termoestables que no son modificados post-traduccionalmente, excepto el corte del péptido líder en el péptido pre-bacteriocina. En esta clase, y se pueden distinguir tres subclases: subclase IIa o bacteriocinas parecidas a pediocinas con un fuerte efecto antilisterial, que poseen la secuencias consenso YGNGV en su amino terminal; subclase IIb o bacteriocinas que requieren dos cadenas de polipéptidos para su completa actividad y la clase IIc o bacteriocinas que no pertenecen a los otros subgrupos.

La clase III son proteínas largas, termoestables e hidrofóbicas (Ingolf y col., 2007; Cotter, 2005).

Desde 1955, cuando la primera sustancia inhibitoria parecida a bacteriocina (BLIS) fue reportada para *Streptococcus* del grupo D, un gran número de enterocinas han sido estudiadas. Se han reportado enterocinas con actividad antilisteria como la E1A producida por *E. faecium* E1. Hoy en día, se sabe que la habilidad de enterococos

para inhibir el crecimiento de *Listeria sp.* podría explicarse por la relación filogenética tan cercana de estos microorganismos (Moreno y col., 2006).

Las enterocinas se encuentran dentro de las bacteriocinas de clase I, clase IIa y clase IIc que se describieron anteriormente, aunque Giraffa en el 2003 reporto que las enterocinas en su mayoría pertenecen a las bacteriocinas de clase II, que son pequeñas, estables a la temperatura y no lantibióticas, con fuerte efecto antilisteria (Tabla 1).

Tabla 1. Bacteriocinas aisladas de *Enterococcus*

Organismo	Bacteriocina	Clase
<i>E. faecalis</i>	Citolisina Cyl _L	Clase I dos péptidos lantibióticos
<i>E. faecium</i>	Enterocina A	Clase IIa parecida a pediocina
<i>E. faecium</i>	Enterocina P	Clase IIa parecida a pediocina
<i>E. faecium</i>	Bac 32	Clase IIa parecida a pediocina
<i>E. faecium</i>	Bacteriocina GM-1	Clase IIa parecida a pediocina
<i>E. faecalis</i>	Bacteriocina 31	Clase IIa parecida a pediocina
<i>E. mundtii</i>	Muditicina AT06, munditicina KS, enterocina CLR 35	Clase IIa parecida a pediocina
<i>E. faecalis</i>	Enterocina SE-K4	Clase IIa parecida a pediocina
<i>E. faecium</i>	Enterocina T8	Clase IIa parecida a pediocina
<i>E. faecium</i>	Enterocina B	Clase II
<i>E. faecalis</i>	Enterocina 1017 A, Enterocina 1017 B	Clase IIc

<i>E. faecalis</i>	MR10A y MR10 B	Clase IIc
<i>E. faecium</i>	Enterocina L50	Clase IIc
<i>E. faecium</i>	Enterocina Q	Clase IIc
<i>E. faecalis</i>	Enterocina EJ97	Clase IIc
<i>E. faecium</i>	Enterocina RJ-11	Clase IIc
<i>E. faecalis</i>	Enterocina AS-48	Clase IIa

Las enterocinas, como la mayoría de las bacteriocinas, tienen como objetivo principal la membrana citoplasmática. Éstas forman poros en la membrana celular, con lo que agotan el potencial transmembranal y/o el gradiente de pH, dando como resultado la fuga de moléculas indispensables intracelularmente (Moreno y col., 2006; Ennahar y col., 2000).

Las enterocinas de la clase IIa presentan un dominio N-terminal hidrofílico altamente conservado que claramente contrasta con el dominio C-terminal hidrofóbico y/o anfifílico que está moderadamente conservado y esta variación afecta la actividad de la bacteriocina en su direccionamiento hacia la membrana. Otra característica importante de las bacteriocinas de la clase IIa es su contenido de cisteínas. De hecho, mientras que las otras bacteriocinas no lantibióticas pueden tener sólo un residuo de cisteína o ninguno, la clase IIa presenta al menos dos residuos de cisteína en el dominio N-terminal en posiciones altamente conservadas. Además la enterocina A es única en el sentido de que posee un enlace disulfuro extra que involucra un segundo par de residuos de cisteína (Ennahar y col., 2000).

1.3.2.1 Mecanismos de acción

Las bacteriocinas se pueden agrupar con base en su estructura, pero también con base en su modo de acción. Algunos miembros de la clase I (lantibióticos), como la nisina, han demostrado tener un modo dual de acción: pueden unirse al lípido II (receptor universal y principal transportador de sub-unidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular) impidiendo la síntesis correcta de la pared celular y conduciendo a la célula a la muerte. Además, puede utilizar al lípido II e interactuar con la bacteriocina para iniciar un proceso de inserción en la membrana y formación de poros, que conducen a la muerte rápida de la célula (Cotter y col., 2005).

En general, los péptidos de la clase II tienen una estructura anfifílica helicoidal la cual permite que se inserte en la membrana de las células blanco, conduciendo a la despolarización y muerte (Cotter y col., 2005). El extremo hidrofílico amino-terminal es la parte donde se da la interacción inicial con las cabezas de los fosfolípidos aniónicos de la membrana. El extremo carboxilo-terminal de la molécula, que es más hidrofóbico que el amino, se cree que tiene relación con las interacciones hidrofóbicas con la membrana. Las grandes proteínas bacteriolíticas (bacteriolisinas o clase III de las bacteriocinas) como la lisostafina, pueden funcionar directamente a nivel de la pared celular de Gram-positivos, conduciendo a la muerte y lisis de la célula (Cotter y col., 2005; (figura 1).

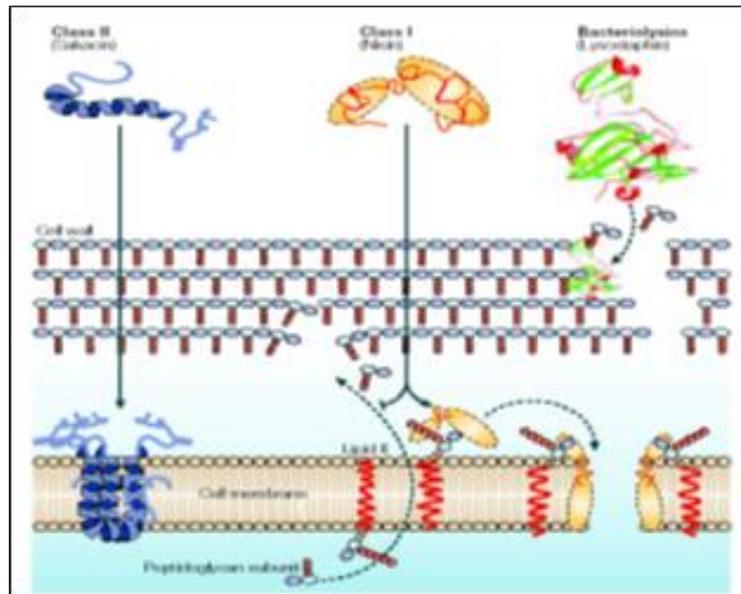


Figura 1. Mecanismo de acción (Cotter y col., 2005)

1.3.3 Peptidoglucano hidrolasas (PGH)

El peptidoglucano (o mureína) es un heteropolímero de azúcares y aminoácidos, sintetizados solamente por los procariontes. Esta molécula forma una barrera que recubre la membrana plasmática y protege a la célula contra la presión osmótica interna en condiciones hiposmóticas. El peptidoglucano consiste en cadenas de residuos alternados de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, los cuales se encuentran unidos mediante enlaces β -1,4. El ácido N-acetilmurámico se encuentra unido por un tetrapéptido poco común, que contiene aminoácidos de forma D y L (Vollmer y col., 2008a). El peptidoglucano es un exoesqueleto en forma de red, el

cual es suficientemente poroso para permitir la difusión de los metabolitos a la membrana plasmática (Sitkin y col., 2003; Vollmer y col., 2008a).

Durante todo su crecimiento, las células necesitan romper de manera controlada los enlaces del peptidoglucano. Las enzimas responsables de este proceso son conocidas como peptidoglucano hidrolasas o PGHs (Eckert y col., 2006).

Las PGHs se involucran en un gran número de funciones que requieren el peptidoglucano: durante el crecimiento, la división celular, la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células hijas durante la división, formación de flagelo (en algunos casos) y la autólisis, que generalmente se induce en condiciones adversas como la falta de nutrientes (figura 2). Para las bacterias patógenas, las PGHs juegan un papel importante en la adhesión y en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, además, están involucradas en los fenómenos de lisis en las bacterias (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Eckert y col., 2006; Vollmer y col., 2008b).

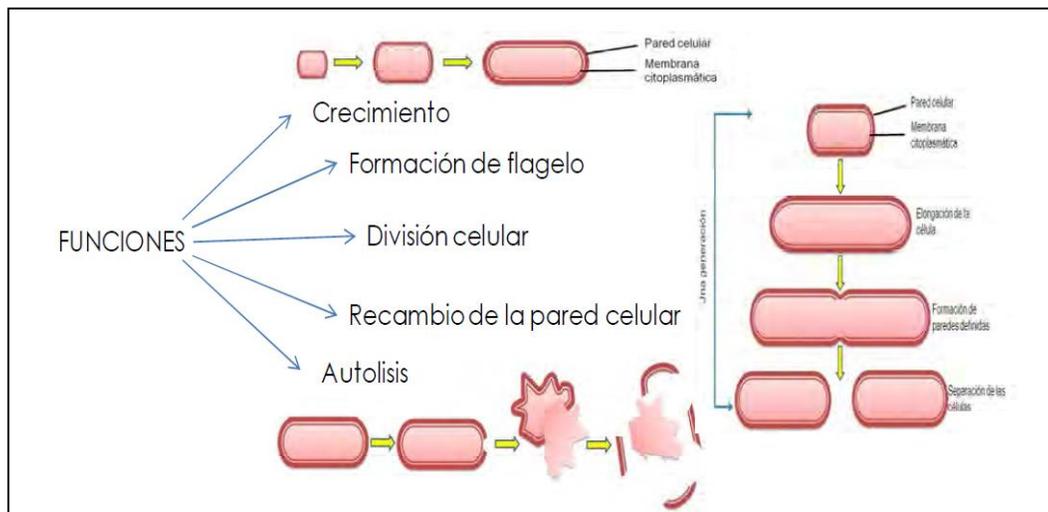


Figura 2. Funciones celulares de las PGHs (García-Cano, 2013).

1.3.3.1 Clasificación y mecanismo de acción.

Las PGHs se clasifican de acuerdo al enlace del peptidoglucano que hidrolizan: las N-acetilglucoamidasas hidrolizan el enlace β -1,4 de la cadena de glicanos dejando un extremo N-acetilglucosamina reductor; las N-acetilmuramidasa hidrolizan el mismo enlace, sin embargo dejan un extremo ácido N-acetilmurámico reductor libre, estas enzimas también son llamadas lisozimas (y si forman un anillo 1,6-anhidro en el N-acetilmurámico son llamadas transglicosilasas líticas). Las N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa rompen el enlace amida entre el N-acetilmurámico y la L-alanina del péptido.

Las peptidasas son capaces de hidrolizar el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos (carboxipeptidasas) o de romper completamente los puentes formados por los péptidos (endopeptidasas, figura 3; Vollmer y col., 2008b; Layec y col., 2008).

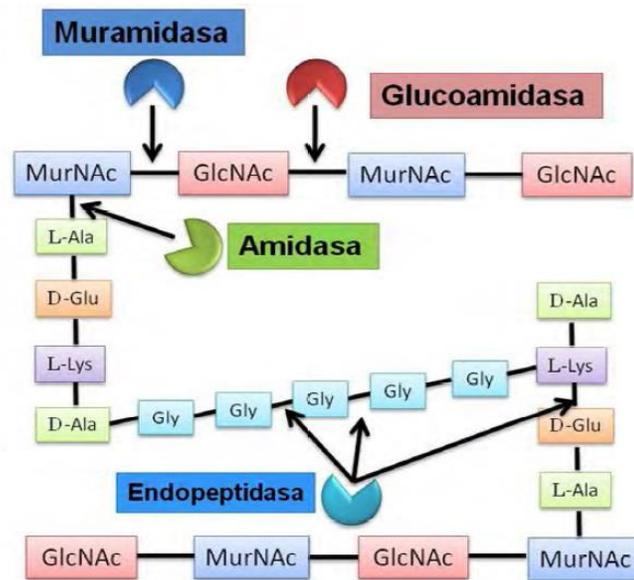


Figura 3. Estructura del peptidoglucano de *S. aureus*. Las flechas indican el tipo de enlace que hidrolizan sobre la pared bacteriana (MurNAc, N-acetilmurámico; GlcNAc, Nacetilglucosamina; García-Cano, 2013).

En las bacterias Gram-positivas, el peptidoglucano forma múltiples capas y presenta una conformación tridimensional que origina una pared celular muy fuerte y rígida. Puede estar asociada a otro tipo de compuestos, como ácidos teicóicos y lipoteicóicos y/o polisacáridos. El peptidoglucano de la pared celular de las bacterias Gram-negativas constituye una sola capa delgada; no contiene ácidos teicóicos ni lipoteicóicos (Vollmer y col., 2008b; Das y col., 2013).

1.3.3.2 PGHs en el género *Enterococcus*

Se han caracterizado peptidoglucano hidrolasas de algunas especies del género *Enterococcus*, por ejemplo: se han identificado dos hidrolasas autolíticas en *Enterococcus hirae*, la muramidasa-1, que es una N-acetilmuramidasa con una forma activa de 87 kDa (Dolinger y col., 1988), y la muramidasa-2, que tiene dos formas activas, una de 125 kDa y otra de 75 kDa (Dolinger y col., 1989). La muramidasa-1 se sintetiza como zimógeno y necesita una proteólisis para su activación. La muramidasa-2 tiene dos o tres dominios con actividad de glicosaminidasa cerca del extremo amino terminal y seis secuencias repetidas de 45 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal que están involucradas en la unión al peptidoglucano (Shockman, 1992).

Por otra parte, el genoma de *Enterococcus faecalis* codifica para 20 peptidoglucano hidrolasas, de las cuales 6 son glucosaminidasas, 7 muramidasas, 2 amidasas, 2 endopeptidasas y 3 proteínas relacionadas con transglicosilasas líticas. De todas ellas se han estudiado solamente tres. La primera enzima fue la AtlA, la cual muestra actividad de N-acetilglucosaminidasa. Posteriormente se identificaron dos autolisinas adicionales: la AtlB y la AtlC, que muestran una actividad de N-acetilmuramidasa (Mesnage y col., 2008).

En cuanto a *E. faecium* se identificó una N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de 76,7 kDa. Esta proteína posee un péptido señal y contiene una región NLPC / P60 que pertenece a una superfamilia de dominios conservados con la actividad peptidasa de

la pared celular, ampliamente representado en varios linajes bacterianos. (García-Cano y col., 2014).

1.3.3.3 Aplicación de PGHs en alimentos.

La lisozima del huevo blanco de gallina es la PGH mas extensamente estudiada. Al mismo tiempo, es una de los pocos antimicrobianos naturales que es aprovechado como conservador de alimentos en los Estados Unidos y otras regiones del mundo, la mayor aplicación actual es en la prevención de aire atrapado en quesos maduros, causado principalmente por *Clostridium tyrobutyricum*, microorganismo que es inhibido por la acción de la lisozima, y en el control de la actividad antibacteriana en vinos (Laconelli y col., 2008), aunque se han empezado a explorar nuevas oportunidades como es la prolongación de la vida útil de cerveza sin pasteurizar.

Todas las aplicaciones antes mencionadas resuelven problemas causados por bacterias Gram-positivas. La lisozima es de hecho ineficaz contra las bacterias Gram-negativas porque su capa de peptidoglucano está protegida por una membrana externa, y esto es una limitación importante para la aplicación de la lisozima como conservador de alimentos (Schneider y col., 2010).

Un campo en desarrollo en la actualidad es la incorporación de lisozima en los llamados materiales de envasado de alimentos "activos". Este enfoque es particularmente adecuado para productos de una sola pieza que se echan a perder principalmente en la superficie. La investigación sobre esta aplicación se centra principalmente en la influencia de parámetros como el tipo de matriz de polímero, el

grado de reticulación y la carga de la enzima en la cinética de liberación de lisozima, y la eficacia correspondiente en el control microbiano (Fernández y col., 2008; Gemili y col., 2009; Souza y col., 2010).

Aunque el número de PGHs identificadas y caracterizadas ha aumentado, debido a los avances en las técnicas moleculares y genómicas, solo unas pocas PGHs distintas a la lisozima han sido probadas como posibles bioconservadores de alimentos. La lisostafina se ha utilizado desde hace mucho tiempo para retener o eliminar células de *S. aureus* en varios alimentos, un hallazgo que ha sido confirmado recientemente en la leche, mayonesa y carne molida de cerdo (Szweda y col., 2007). La Lisozima obtenida de ostra es utilizada en recubrimientos, de alginato de calcio para detener el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella anatum* en muestras de salmón ahumado, pero su eficacia no es diferente a la de lisozima proveniente de bacterias (Datta y col., 2008. Blattel y col., 2009). Se reportó que una mezcla de enzimas líticas a partir de un *Streptomyces sp.* era mucho más eficaz que la lisozima para controlar el crecimiento de bacterias lácticas y con ello la disminución de producción de ácido acético en vino. (O'Flaherty y col., 2009). Esto puede ser una vía interesante para desarrollar preparaciones enzimáticas, pero la aprobación regulatoria probablemente sea más difícil de obtener para mezclas enzimáticas que para enzimas individuales.

El uso de lisinas que son las enzimas capaces de degradar el peptidoglucano producidas por bacteriófagos, en la conservación de alimentos ha recibido menor atención que su aplicación en medicina y veterinaria, pero se está convirtiendo en un

objeto de temas a debatir, especialmente en comparación con el uso de fagos (O'Flaherty y col., 2009; Coffey y col., 2010; García y col., 2010). Con vistas a posibles aplicaciones en la producción de alimentos seguros y saludables, los diferentes espectros de actividad de los fagos y lisinas de fagos puede ofrecer interesantes y diversas oportunidades.

Los fagos invariablemente pueden mostrar un bajo espectro de inhibición, que típicamente no se extiende a las fronteras de más de una sola especie, mientras que las lisinas pueden tener un amplio o un bajo espectro. En general, las lisinas que se dirigen a la cadena principal del polisacárido y al enlace amida N-acetylmuramoyl-L-alanina, poseen un espectro más amplio que las endopeptidasas porque las estructuras anteriormente nombradas son más ampliamente conservadas entre bacterias Gram negativas y Gram-positivas.

Sin embargo, la susceptibilidad de las paredes celulares de diferentes bacterias puede variar, incluso para lisinas de amplio espectro tales como la lisozima del fago lambda, que se encontró que era 100 a 1000 veces más activas en las paredes celulares de bacterias Gram-negativas que en *Micrococcus luteus* (Nakimbugwe y col., 2006). Las razones de estas diferencias no se conocen con precisión, pero merecen mayor estudio. En general, las PGHs de amplio espectro son de interés en situaciones en las que tiene que estar controlado un amplio gama de bacterias para lograr la extensión de vida útil en general, mientras que las PGHs de bajo espectro podrían resultar útiles para la eliminación o control de patógenos específicos u organismos de descomposición, como es en el caso de los productos fermentados

en la que el cultivo iniciador debe permanecer inalterado (García y col., 2010; Obeso y col., 2008).

Finalmente, las PGHs de bajo espectro también podrían ser útiles para el control de patógenos específicos en el tracto gastrointestinal, sin perturbar el ecosistema microbiano gastro-intestinal (Obeso y col., 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

El género *Enterococcus* puede producir péptidos con actividad antimicrobiana sintetizados ribosomalmente llamados enterocinas (bacteriocinas), así como peptidoglucano hidrolasas. En la industria alimentaria se tiene interés en estos compuestos antimicrobianos de origen proteico , ya que pueden actuar como conservadores inhibiendo el crecimiento de algunos microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, y *Clostridium botulinum*) y de descomposición.

En proyectos realizados por el grupo de investigación dirigido por la Dra. Edith Ponce Alquicira en la UAM-I se han aislado y estudiado BAL provenientes de productos cárnicos, como son las cepas de *Enterococcus faecium* UAMI3 y *Enterococcus faecium* MXVK22 aisladas de chorizo tipo español y chorizo mexicano, respectivamente, las cuales presentaron actividad antimicrobiana. Sin embargo no se identificó el o los compuestos causantes de dicha actividad.

Por lo anterior es de interés llevar a cabo la identificación de los compuestos antimicrobianos producidos por dichas cepas, para así poderlos caracterizar y determinar su potencial biotecnológico como conservadores naturales en la industria de los alimentos.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Si las cepas *Enterococcus faecium* MXVK22 y *Enterococcus faecium* UAMI3 presentan actividad antimicrobiana, entonces se espera que produzcan por lo menos una bacteriocina y/o alguna PGHs con algún efecto sinérgico.

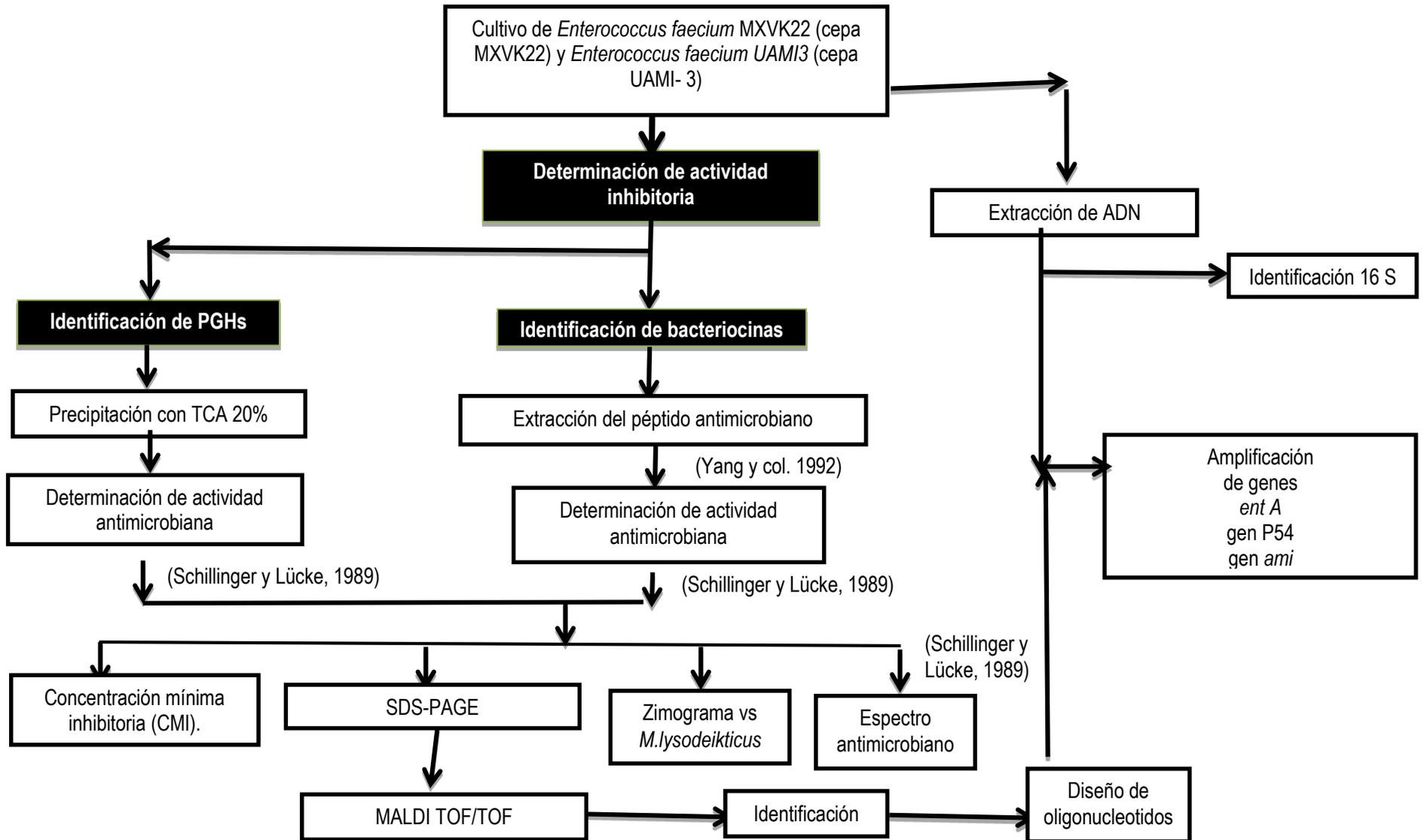
3.2 OBJETIVO GENERAL

Identificar si la actividad antimicrobiana presente en las cepas *Enterococcus faecium* MXVK22 y *Enterococcus faecium* UAMI3 es debida a la presencia de bacteriocinas, PGHs o ambas.

3.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener la secuencia en aminoácidos de las proteínas responsables de la actividad antibacteriana.
- Obtener la secuencia en nucleótidos del gen que codifica para las proteínas responsables de la actividad antibacteriana.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria.
- Determinar el espectro de inhibición.

4. METODOLOGÍA



4.1 Identificación de cepas por ADNr 16S

4.1.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con un Kit de Purificación de ADN genómico de la marca Promega Madison USA, de acuerdo a las indicaciones para bacterias Gram-positivas según lo descrito por el distribuidor. Para comprobar la integridad del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) adicionando 2 µl de colorante fluorescente "GelRed" (Biotium-41003) y se corrió a 90 V durante 1 h. El ADN se almacenó a 4°C hasta su uso.

4.1.2 Amplificación del gen ADNr 16S

La PCR es una técnica que replica al ADN in vitro, permitiendo que moléculas de ADN (molde) sean amplificadas selectivamente de manera exponencial. Por lo general, se emplea una doble cadena de ADN que es desnaturalizada por calentamiento (94-95°C), se permite el alineamiento de dos cebadores (iniciadores u oligonucleótidos) complementarios en los extremos 3' de cada cadena (a una temperatura que depende de los cebadores) y finalmente se permite la elongación de las cadenas a una temperatura de 72-74°C. Todo este proceso se conoce como un ciclo y estos pasos se repiten hasta obtener una amplificación de los segmentos de ADN de al menos 1×10^5 veces.

La amplificación del gen se ADNr 16S se realizó utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa (Thermo Scientific) y oligonucleótidos específicos que amplifican el gen completo (1500 pb, tabla 4). Se realizó una mezcla de reacción de PCR (tabla 2) y se

programaron las condiciones en un termociclador eppendorf epgradient, USA de acuerdo a la tabla 3.

Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR.

Componente	Volumen Final	Concentración final
<i>Pfu</i> buffer de reacción 10 X	5 µl	1 X
dNTPs, 10 µM	1 µl	0.2µM
Oligonucleótido fd1 10 µM	1 µl	0.2µM
Oligonucleótido rd1 10 µM	1 µl	0.2µM
<i>Pfu</i> ADN polimerasa (2.5 U/µl)	0.5 µl	1.25 U
ADN	1.5 µl	100 ng
Agua libre de nucleasas	40 µl	

Tabla 3. Condiciones de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	0.5min	35
Alineación	40°C	0.5 min	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	5 min	1

Tabla 4. Oligonucleótidos para la amplificación del gen ADNr 16S (Weisburg y col., 1991)

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Temperatura de alineación (T _m)	Tamaño (pb)
16 S	Fd1 (5´-3´)	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGA TCCTGGCTCAG	40°C	1100
	Rd1 (3´-5´)	cccgggatccaagcttAAGGAGGTGA TCCAGCC	40°C	

4.1.3 Purificación de secuencia amplificada

Posteriormente se realizó una electroforesis en agarosa al 1% (p/v) en las mismas condiciones del apartado 4.2. Después se cortó la banda de interés y se purificó siguiendo las indicaciones del manual de Promega para el kit Miniprep Wizard SV Gel and PCR Clean-Up.

4.1.4 Secuenciación del gen estructural

Los productos de PCR amplificados y purificados se enviaron a secuenciar a Macrogen, Corea, con un secuenciador automático 3730xl ADN Analyzer 96 capilares (Applied Biosystems, California). Una vez obtenidas las secuencias fueron comparadas en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

4.2 Identificación de la actividad en extracto crudo

4.2.1 Cultivo de las cepas del genero *Enterococcus*.

Las cepas de *Enterococcus faecium* UAMI3 y MXVK22 fueron aisladas de chorizo tipo español y chorizo mexicano, respectivamente, por el grupo de trabajo de la Dra. Edith Ponce Alquicira (Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa). Las cepas fueron conservadas en viales con glicerol al 50% a -80°C, y para su reactivación se colocó el 1% del contenido de un vial en un tubo con 10 mL de caldo de cultivo caseína-glucosa a 37°C durante 18 h (Álvarez, 2008).

4.2.2 Extracto crudo con actividad antimicrobiana

El extracto crudo se obtuvo a partir de un cultivo de 18 h de *Enterococcus faecium* UAMI3 y *Enterococcus faecium* MXVK22 seguido de una centrifugación a 3,100 rpm durante 10 min a 4°C. Una vez centrifugado, se colectó el sobrenadante y se ajustó el pH a un valor de 6.5; posteriormente se filtró a través de membranas estériles, con tamaño de poro de 0.22 µm. Finalmente se almacenó a -80°C hasta su uso.

Finalmente se determinó la concentración de proteína por el método Bradford para lo cual se adicionando 160 µL de muestra y 40 µL del reactivo Bradford (Bio-Rad, California, USA) sobre una placa de 96 pozos se incubó por 5 min y pasado este tiempo se midieron las absorbancias a 595 nm.

4.2.3 Determinación de la actividad inhibitoria y espectro de inhibición

La actividad inhibitoria se realizó por el método de difusión en agar (Schillinger y Lücke, 1989). Se depositaron 100 µL de los extractos crudos obtenidos del cultivo de *Enterococcus faecium* UAMI3 y MXVK22 en pozos hechos con una punta (1000 µL) de micropipeta estéril en medio TSB semisólido (0.8% de agar bacteriológico) superpuesto sobre una capa del mismo medio pero con 1.5% de agar bacteriológico. El medio semisólido fue previamente inoculado con 1 µL de un cultivo de la cepa objetivo en cual se había dejado crecer durante 18 horas (tabla 5). La actividad se evaluó determinando el halo de inhibición formado sobre la cepa sensible incubada a 37°C durante 12 h. Se determinó la actividad específica, expresada en mm de halo de inhibición por mg de proteína.

Tabla 5. Microorganismos utilizados para el espectro de inhibición.

Microorganismo objetivo	
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK29 ^b	Gram (+)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α ^a	Gram (-)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 ^a	Gram (-)
<i>Listeria innocua</i> N 27 ^a	Gram (+)
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 ^a	Gram (+)
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698 ^c	Gram (+)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a	Gram (+)
<i>Lactobacillus curvatus</i> ^b	Gram (+)
<i>Lactobacillus sakei</i> ^b	Gram (+)
<i>Weissella viridescens</i> ^b	Gram (+)
<i>Bacillus pumilus</i> GMA 1 ^a	gram (+)

^a Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México ,

^b Departamento de biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana y ^c Sygma-Aldrych.

4.3 Identificación de bacteriocinas

4.3.1 Semipurificación del péptido antimicrobiano.

La extracción o semipurificación del compuesto antimicrobiano se llevó a cabo mediante la técnica de adsorción-desorción dependiente del pH (Yang y col. 1992), con algunas modificaciones (Schneider, 2005). Los cultivos de 18 h de las cepas de *Enterococcus* fueron sometieron a un tratamiento térmico a 70°C durante 30 min para la inactivación de las proteasas (Katla y col., 2003) que pudieran estar presentes en el medio. Posteriormente se ajustó el pH del cultivo a 5.0 con una solución 10 M de NaOH y se mantuvo en agitación moderada durante 24 permitir la adsorción del compuesto antimicrobiano a la membrana celular bacteriana. Pasado este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 3,100 rpm durante 20 min a 4°C y se recuperó el precipitado celular, que se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos

(5 mM fosfato de sodio, pH 6.5). Finalmente, las células se resuspendieron (5% del volumen original) en una solución 100 mM de NaCl, pH 1 (ajustada con ácido fosfórico al 5%); este valor de pH favoreció la desorción del compuesto antimicrobiano desde la membrana celular de las bacterias hacia el medio. Las células se mantuvieron en agitación a 4°C durante 24 h. Posteriormente se sometieron a centrifugación a 3100 rpm durante 20 min a 4°C para descartar células y retener el sobrenadante, el extracto libre de células se dializó empleando membranas de celulosa (Spectra Por7[®], Arizona US) con un tamaño de poro de 1,000 Da con cambios periódicos de agua destilada hasta eliminar las sales presentes y se filtró a través de membranas estériles de tamaño de poro de 0.22 µm. Finalmente se determinó la concentración de proteína por el método Bradford y se almacenó a -80°C hasta su uso.

En cada paso de la semipurificación se tomaron muestras con las cuales se determinó actividad inhibitoria de la misma manera que en el punto 4.3.3 y se expresó en unidades específicas.

4.3.2 Perfil de proteínas y zimogramas

El peso molecular de las proteínas de interés se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida co-polimerizada en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). Se prepararon SDS-PAGE al 15% con los reactivos necesarios (Acrilamida/Bisacrilamida 30%, Tris-HCl 2 M, pH 8.8, SDS 10%, H₂O, TEMED y APS 10%). Se tomaron 30 µL de la muestra a evaluar y se les adicionaron

10 µL de amortiguador de carga (50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 2.5% glicerol, y 0.5% de azul de bromofenol). Se cargaron en el gel en una cámara Mini-proteanIII Bio-Rad, se corrió a 120 V durante 1.5 h. Después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua destilada durante 30 min, se tiñó con azul de Coomassie (0.1% azul de Coomassie R-250, 45% metanol, 10% ácido acético glacial y 45% de agua) durante 24 h y se destiñó con 10% de metanol, 10% ácido acético glacial y 80% agua. El peso molecular de las bandas de proteína se determinó por la comparación con un marcadores preteñido de bajo peso molecular (Bio-Rad, 161-0318).

Para la elaboración del zimograma, se prepararon geles SDS al 15% de poliacrilamida co-polymerizada con 0.2% de células liofilizadas de *M. lysodeikticus*, como sustrato (Leclerc y Asselin, 1989), posteriormente, las células se resuspendieron con los reactivos mencionados anteriormente para la elaboración del gel. Una vez transcurrida la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua destilada durante 30 min, se incubó a 37°C con amortiguador de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 con Tritón X-100 1% v/v) durante 12-16 h en agitación suave. Finalmente el gel se tiñó con 0.01% de KOH y 0.1% de azul de metileno durante 15 min y se destiñó con agua destilada. Finalmente ambos geles fueron analizados en un analizador de imágenes (Molecular Imager Gel Doc™ XR+ System, Bio-Rad).

4.3.2.1 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio de SDS-PAGE en placa de agar

Se realizó un SDS-PAGE al 15% bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Se cargaron al gel: marcador preteñido de bajo peso molecular (polipeptide Bio-Rad), como control positivo nisina (bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*) así como los extractos de las cepas *Enterococcus faecium* UAMI3 y *Enterococcus faecium* MXVK22.

Una vez separados los péptidos, la mitad del gel se utilizó para medir la actividad del compuesto antimicrobiano tipo bacteriocina y el otro se tiñó con azul de Coomassie R-250 para la visualización de las bandas. El gel de actividad fue fijado durante 2 h en una solución con 20% de propanol y 10% de ácido acético. Pasado este tiempo se realizaron lavados en agua destilada estéril durante 3 h, con cambios frecuentes (condiciones estériles) y se evaluó su actividad antimicrobiana según la técnica de difusión en agar. Finalmente se compararon ambos geles (teñido y actividad) para determinar que banda correspondía al compuesto antimicrobiano.

4.3.3 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Las bandas de interés en el los geles de poliacrilamida fueron cortadas y enviadas a secuenciar al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). El procedimiento que realizaron es el siguiente: las bandas fueron cortadas manualmente, y reducidas con DTT 10 mM, alquiladas con iodoacetamida 100 mM y desteñidas con ACN: NH₄HCO₃ 50 mM (50:50 v/v). La digestión proteica se llevó a cabo durante 18 h a

37°C con tripsina grado masas (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos de la digestión (ACN:H₂O:ácido fórmico 50:45:5 v/v), se disminuyó el volumen de la muestra en un concentrador (Eppendorf 5301) y se desaló la muestra utilizando columna C18 (ZipTipC18). La muestra se colocó por sextuplicado en la placa utilizando como matriz α -ciano, y se analizaron en un MALDI TOF/TOF 4800. Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda con el algoritmo de búsqueda Paragon del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66%.

4.3.4 Identificación del gen estructural

4.3.4.1 Amplificación del gen estructural (*entA*) por PCR

Para la amplificación del gen *entA* se realizó utilizando una *Pfu* ADN polimerasa tomando en cuenta las concentraciones de los componentes (tabla 6) de la reacción y condiciones a las cuales se debe llevar la reacción recomendados para el buen funcionamiento de la enzima (tabla 7). Se realizaron reacciones con oligonucleótidos que amplifican para los genes de las enterocinas A y B producidas por el género *Enterococcus* (tabla 8), los cuales fueron diseñados con base a secuencias de dichos genes presentes en base de datos.

Tabla 6. Componentes de la reacción de PCR.

Componente	Volumen Final	Concentración final
<i>Pfu</i> buffer de reacción 10 X	5 µl	1 X
dNTPMix, 10 µM	1 µl	0.2µM
Oligonucleótido <i>entA</i> f 10 µM	1 µl	0.2µM
Oligonucleótido <i>entA</i> r 10 µM	1 µl	0.2µM
<i>Pfu</i> ADN polimerasa (2.5 U/µl)	0.5 µl	1.25 U
ADN	1.5 µl	100 ng
Agua libre de nucleasas	40µl	

Tabla 7. Condiciones de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	0.51 min	35
Alineación	50/55°C ^a	1 min	
Extensión	72°C	2 min/kb ^b	
Extensión final	72°C	5 min	1

^a para el gen que codifica la enterocina A se utilizó una T_m de 55°C y para el gen que codifica la enterocina B una T_m de 50°C. ^b para el gen que codifica la enterocina A 0.5 min y para el gen que codifica la enterocina B 1 min.

Tabla 8. Oligonucleótidos para la amplificación de genes de bacteriocinas

gen	Oligonucleótido	Secuencia	T _m	Tamaño esperado
<i>ent A</i>	<i>entA</i> (5´-3´)	GGC AGA CAC AAC TTA TCT ATG GGG	57.0°C	171 pb
	<i>entA</i> (3´-5´)	GCG TCC AGG GAA GTG CTA A	53.1°C	
<i>ent B</i>	<i>entB</i> (5´-3´)	TGAGCGTACTCGTGCAAGTTT	51.8 °C	541 pb
	<i>entB</i> (3´-5´)	TTT TGC ATG TCG ATC GCG A	48.9°C	

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para verificar el tamaño de los amplicones, se purificaron según el apartado 4.2.2 y se enviaron a secuenciar a Macrogen.

4.4 Identificación del transcrito del gen *entA*.

Para verificar la transcripción del gen *entA* en las cepas de *Enterococcus faecium* UAMI-3 y *Enterococcus faecium* MXVK22, se extrajo el ARN total y se obtuvo el ADN complementario (ADNc); este último se utilizó como molde para la amplificación del gen *entA*.

4.4.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo con un kit (Trizol® Max™ Bacterial RNA Isolation Thermo Scientific), siguiendo el protocolo descrito por dicho kit para la obtención eficiente de ARN.

Se dejaron crecer las cepas *Enterococcus faecium* UAMI3 y *Enterococcus faecium* MXVK22 durante 18 h, posteriormente se tomó un volumen de 1.5 mL, se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C. Pasado el tiempo se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL del reactivo de Realce (precalentado a 95°C), se incubó a 95°C durante 4 min y se le adiciono 1 mL de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Trizol), se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para su posterior separación.

Para la separación se adicionaron 0.2 mL de cloroformo se mezcló vigorosamente durante 15 s y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente para después ser centrifugado a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente se transfirió 400 µL de la fase incolora superior que contenía ARN a un tubo nuevo, se le adiciono 0.5 mL de isopropanol frío a la fase acuosa para precipitar el ARN, se incubó el tubo a temperatura ambiente durante 10 min, después se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C.

Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de etanol al 75%, se centrifugó a 7,500 rpm durante 5 min a 4°C, finalmente se resuspendió el pellet de ARN en 50 µL de agua libre de RNAsas. Se almacenó a -70°C hasta su uso.

4.4.1 Amplificación por PCR del gen *entA* con ADNc como molde.

Para la retro-transcripción se utilizó el kit Retroscript® Kit de la marca Thermo Scientific siguiendo las indicaciones de dicho kit.

En un tubo se adicionaron 200 ng de ARN total, 1 µL de oligonucleótidos *entA* (5'-3') 10 µM, 1 µL de oligonucleótidos *entA* (3'-5') 10 µM y 12 µL de agua libre de nucleasas. Se calentó el tubo a 85°C por 3 min, pasado el tiempo se colocó en hielo.

A la mezcla anterior se le adicionaron 2 µL de buffer RT 10 X, 4 µL de desoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1 µL de la transcriptasa reversa y 13 µL de agua libre de nucleasas. Se mezcló cuidadosamente y se incubó a 43°C durante 1 h. Para

la desactivación de la transcriptasa reversa se incubó a 92°C durante 10 min. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

Con el ADNc se llevó a cabo la amplificación del gen *entA* por PCR de ambas cepas (*E. faecium* UAMI3 y *E. faecium* MXVK22), siguiendo las condiciones de la tabla 7.

4.5 Identificación de peptidoglucano hidrolasas

4.5.1 Extracción de peptidoglucano hidrolasas

La extracción de peptidoglucano hidrolasas se obtuvo a partir de un cultivo de 18 h de *E. faecium* UAMI-3 y *E. faecium* MXVK22, seguido de una centrifugación a 8,00 *rpm* durante 15 min a 4°C. Una vez centrifugado, se colectó el sobrenadante y se ajustará el pH a un valor de 6.5; posteriormente se filtró a través de membranas estériles, con tamaño de poro de 0.22 μm .

Después se realizó la precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 20% a 4°C durante 2 h, pasado este tiempo se centrifugó a 3,100 *rpm* durante 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet de proteínas fue lavado 4 veces con acetona al 90%. Posteriormente se dejó evaporar en su totalidad la acetona a 37°C. Después se adicionó 1 mL una solución que contenía Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 con Tritón X-100 1%, y se dejó incubar a 37°C durante 24 h.

Finalmente se determinó la concentración de proteína por el método Bradford y se almacenó a 4°C hasta su uso.

4.5.2 Determinación de la actividad antimicrobiana y espectro de inhibición con el extracto de peptidoglucano hidrolasas.

Para la determinación de la actividad antimicrobiana y espectro de inhibición se llevó a cabo la metodología descrita en el punto 4.2.3, cambiando solo el volumen adicionado de 100 µl a 50 µl por pozo.

4.5.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La CMI es definida como la mínima concentración de antimicrobiano que puede inhibir el crecimiento de un organismo después de ser incubado toda la noche (Andrews, 2001). Se determinó la CMI realizando la técnica de difusión en agar como se describió anteriormente (apartado 4.2.3) con *S. aureus* y *L. innocua* como microorganismos objetivo ya que son los microorganismos de mayor importancia en la industria alimentaria debido a que son agentes causantes de enfermedades para los humanos, se adicionaron diferentes concentraciones del extracto de peptidoglucano hidrolasas (4 a 100 µg/mL), se incubaron a 37°C durante 24 h y se midió el diámetro del halo de inhibición.

4.5.4 Perfil de proteínas y zimogramas

Para determinar el tamaño de la proteína causante de la actividad antimicrobiana se realizó un gel de acrilamida al 10% y un zimograma, para la elaboración de los cuales se llevó a cabo la metodología del punto 4.4.2.

4.5.5 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Las bandas de interés en los geles de poliacrilamida fueron cortadas y enviadas a secuenciar al Instituto de Medicina Genómica (INMEGEN) e Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM. El tratamiento de las muestras en el INMEGEN es el mismo descrito en el apartado 4.4.3, por su parte el tratamiento que se le dio a la muestra en el IBt es el que se describe a continuación.

Las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) digerida *in gel* con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin). Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co. San Jose, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621 se utilizan para calibrar Thermo Scientific LTQ Velos de trampa de iones y Orbitrap espectrómetros de masas en el modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se incluye para extender a menor rango de calibración de masas esto permite determinaciones con exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) durante 120 min

utilizando una columna capilar hecha en casa (ID 0.75 μm y 10cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/min. Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2⁺, 3⁺ y 4⁺ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación.

Fueron desconsiderados los iones con cargas 1⁺, superiores a 5⁺ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos.

Los datos espectrométricos (espectros de masas) fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI a través del programa ProteinProspector, así como también fueron sometidos a la búsqueda restringida contra PDB de UniProt de *Enterococcus faecium* en el Proteome Discoverer1.4.

4.5.6 Amplificación del gen estructural de peptidoglucano hidrolasas

4.5.6.1 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron los oligonucleótidos (tabla 9) utilizando la secuencia en nucleótidos para la proteína de 54 kDa reportada en el genoma de *E. faecium* DO, esta tiene una longitud de 1,581 pares de bases (NCBI Reference Sequence: WP_002344845.1) y se denomina P54. Así también se diseñaron los oligonucleótidos para la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (AMI71) con una longitud de 2,100 pares de bases (NCBI Reference Sequence: WP_002344595.1). Se utilizó el software Oligocalc para diseñarlos oligonucleótidos, los cuales se sintetizaron en Sigma-Aldrich, México.

Tabla 9. Oligonucleótidos para la amplificación de genes de PGHs.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Temperatura de alineación (Tm)	Tamaño (pb)
P54	P54F (5´-3´)	GCC GGA TCC GAA AAA GAG TTT AAT ATC AGC	60.3°C	1500
	P54R (3´-5´)	GAG CTC GAG CAT GCT GAC AGC	58.3°C	
ami	AMI71F (5´-3´)	CAT TGT TGA CGC GTT TTA TCG	50.5 °C	2100
	AMI71R (3´-5´)	GCG AAA CAA AAA AAC GAT GCG	50.5 °C	

4.5.6.2 Amplificación del gen que expresa la proteína P54

La amplificación del gen se realizó utilizando la enzima *Pfu* ADN polimerasa, tomando en cuenta las concentraciones de los componentes (tabla 10) de la reacción y condiciones a las cuales se debe llevar la reacción recomendados para el buen

funcionamiento de la enzima (tabla 11). Se realizaron reacciones con los oligonucleótidos (tabla 9) que amplifican para gen que codifica para la proteína P54.

Tabla 10. Componentes de la reacción de PCR.

Componente	Volumen Final	Concentración final
<i>Pfu</i> buffer de reacción 10 X	5 µl	1 X
dNTP Mix, 10 µM	1 µl	0.2µM
Oligonucleótido 5´-3´ 10 µM	1 µl	0.2µM
Oligonucleótido 3´-5´ 10 µM	1 µl	0.2µM
<i>Pfu</i> ADN polimerasa (2.5 U/µl)	0.5 µl	1.25 U
ADN	1.5 µl	100 ng
Agua libre de nucleasas	40µl	

Tabla 11. Condiciones de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	0.51 min	35
Alineación	59°C	1 min	
Extensión	72°C	1.5 min	
Extensión final	72°C	5 min	1

4.5.6.3 Amplificación del gen que expresa la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa

Para la amplificación del gen se utilizó la enzima DreamTaq polimerasa (Thermo Scientific) tomando en cuenta las concentraciones de los componentes (tabla 12) de la reacción y condiciones a las cuales se debe llevar la reacción recomendados para el buen funcionamiento de la enzima (tabla 13). Se realizaron reacciones con los

oligonucleótidos (tabla 9) que amplifican para gen de la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa.

Tabla 12. Componentes de la reacción de PCR.

Componente	Volumen final	Concentración final
Dream taq Buffer de reacción 10 X	5 µl	1 X
dNTPMix, 10 µM	1 µl	0.2 µM
Oligonucleótido 5´-3´ 10 µM	1 µl	0.2 µM
Oligonucleótido 3´-5´ 10 µM	1 µl	0.2 µM
DreamTaq ADN polimerasa (5 U/µl)	0.5 µl	1.25 U
ADN	1.5 µl	100 ng
Agua libre de nucleasas	40µl	cbp

Tabla 13. Condiciones de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	0.5 min	35
Alineación	50.5°C	0.5 min	
Extensión	72°C	1.0 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

5. RESULTADOS

5.1 Identificación de cepas por ADNr 16S

5.1.1 Extracción de ADN

Para estudios moleculares es de vital importancia una buena extracción de ADN ya que de la integridad del mismo dependerá de los resultados obtenidos posteriormente. La metodología de extracción depende de cada organismo y sus características. Para *Enterococcus faecium* por ser Gram-positivo y tener una pared celular rica en peptidoglucano se usó lisozima (10 mg/mL) siguiendo el protocolo de extracción de ADN para bacterias Gram (+).

Se realizó una electroforesis al 0.8% de agarosa con el fin de observar la integridad del ADN extraído. Como se observa en la figura 4, los ADNs extraídos de las cepas de estudio se encuentran por arriba de los 10 Kpb, además se observa buena integridad.

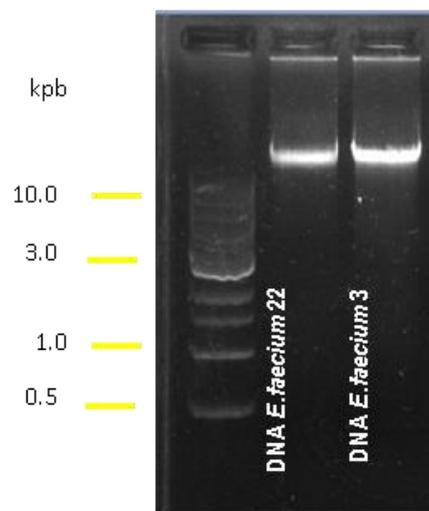


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1, marcador de tamaño 1 kb; carril 2, DNA extraído de *E. faecium* 3; carril 3, DNA extraído de *E. faecium* 22.

5.1.2 Amplificación del gen ADNr 16S

Con el propósito de garantizar que se sigue trabajando con las cepas *E. faecium* UAMI-3 y MXVK22 se realizó la identificación de las mismas por ADNr 16S. Como se puede observar en la figura 5 ambos amplicones del gen ADNr 16S se encuentran en la misma distancia de migración a un tamaño aproximado de 1,500 pb.

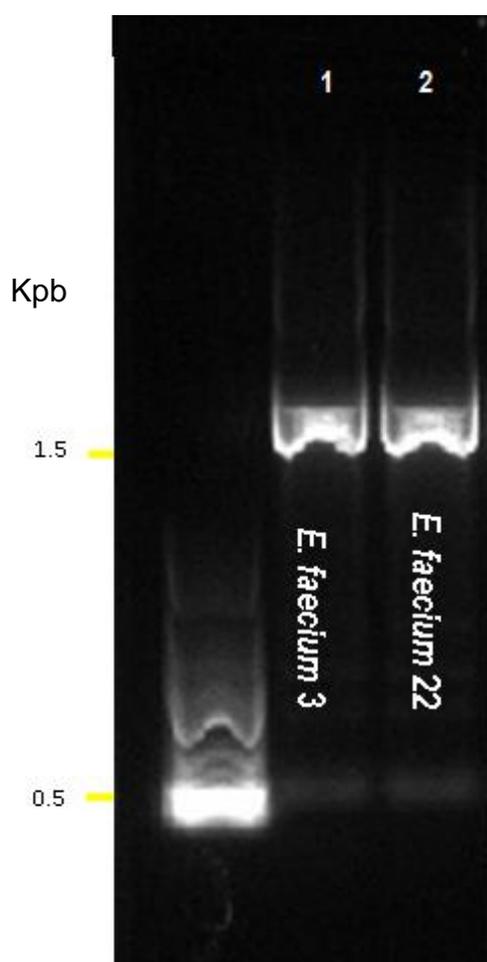


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Carril 1, marcador de tamaño 1 Kb New England Biolabs; Carril 2 y 3, producto de PCR del gen ADNr16S con ADN de la cepa *E. faecium* UAMI3 *E. faecium* MXVK22, respectivamente.

Las bandas de los carriles 2 y 3 se cortaron, purificaron y enviaron a secuenciar a Macrogen. Las secuencias en nucleótidos obtenidas se analizaron en la base de datos del sitio web National Center for Biotechnology Information, utilizando la herramienta BLAST(Basic Local Alignment Search Tool). En la tabla 14 se muestra la similitud de las secuencias obtenidas y comparadas con la base de datos y el porcentaje de identidad.

Tabla 14. Similitud de secuencias obtenidas en base de datos

Cepa	Gen identificado	Cobertura	Expectancia	Identidad
<i>Enterococcus faecium</i> UAMI 3	<i>Enterococcus faecium</i> gen ARN ribosomal 16S, secuencia parcial	100%	0.0	100%
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK22	<i>Enterococcus faecium</i> cepa gp115 gen ARN ribosomal, secuencia parcial.	100%	0.0	100%

5.2 Identificación de la actividad inhibitoria y espectro de inhibición producido por las cepas *E. faecium*

La determinación de la actividad total se llevó a cabo con los extractos crudos obtenidos de cada cepa, se realizó la técnica de difusión en agar contra diferentes microorganismos objetivo y se reportó la actividad en mm halo/mg (Figura 6).

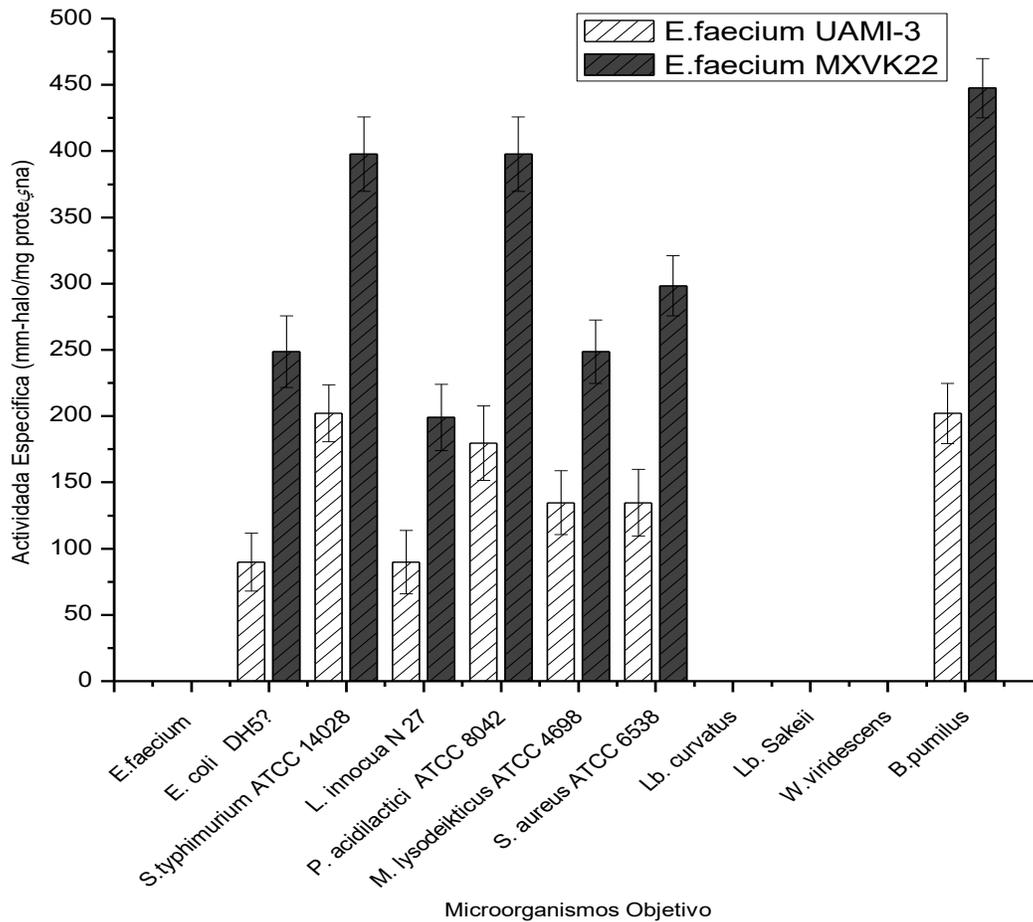


Figura 6. Gráfico del espectro de inhibición por extracto crudo de las cepas *E. faecium* UAMI-3 y *E. faecium* MXVK22.

Como se observa en la figura 6 no se ven inhibidos los microorganismos: *E. faecium*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Weissella viridescens* con los extractos de ambas cepas. También se observa que la cepa MXVK22 presenta mayor actividad que la cepa UAMI-3 para cada uno de los microorganismos inhibidos

5.3 Identificación de actividad antimicrobiana por bacteriocinas

Para determinar la actividad antimicrobiana se realizó una semi-purificación, llevando a cabo la técnica adsorción-desorción dependiente de pH que aprovecha la característica de algunas proteínas catiónicas como las bacteriocinas que a cierto pH se favorece la adsorción a la membrana celular de naturaleza aniónica. En cada paso de la semi-purificación se tomaron muestras para determinar la actividad por difusión en agar se midieron los halos de inhibición y se reportaron en unidades específicas (mm halo/mg de proteína; Figura 7 y 8).

En la semi-purificación se toman 5 muestras de los diferentes pasos de purificación: extracto crudo (EC), tratamiento térmico (TT) adsorción (ADS), desorción (DES) y dializado (DIA), en los dos últimos paso de la semi-purificación se perdió la actividad para ambas cepas por lo cual no se presentan en las Figuras 7 y 8. En la figura 7 se muestra el gráfico de la actividad contra microorganismos objetivo para la cepa MXVK22, en el cual se observa que el EC presenta un valor de actividad mayor que el TT y posteriormente aumenta el valor de actividad en ADS pero menor al de EC, esto contra la mayoría de los microorganismos objetivo, con excepción de las cepas de *E. faecium*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* y *W. viridescens*. Esto se puede deber a que al exponer el extracto a la temperatura de 70°C se provoque la desnaturalización de compuesto antimicrobiano, y la disminución de la actividad; pero posteriormente al ajustar el extracto a pH 5 se favorezca la actividad (Schneider., 2005).

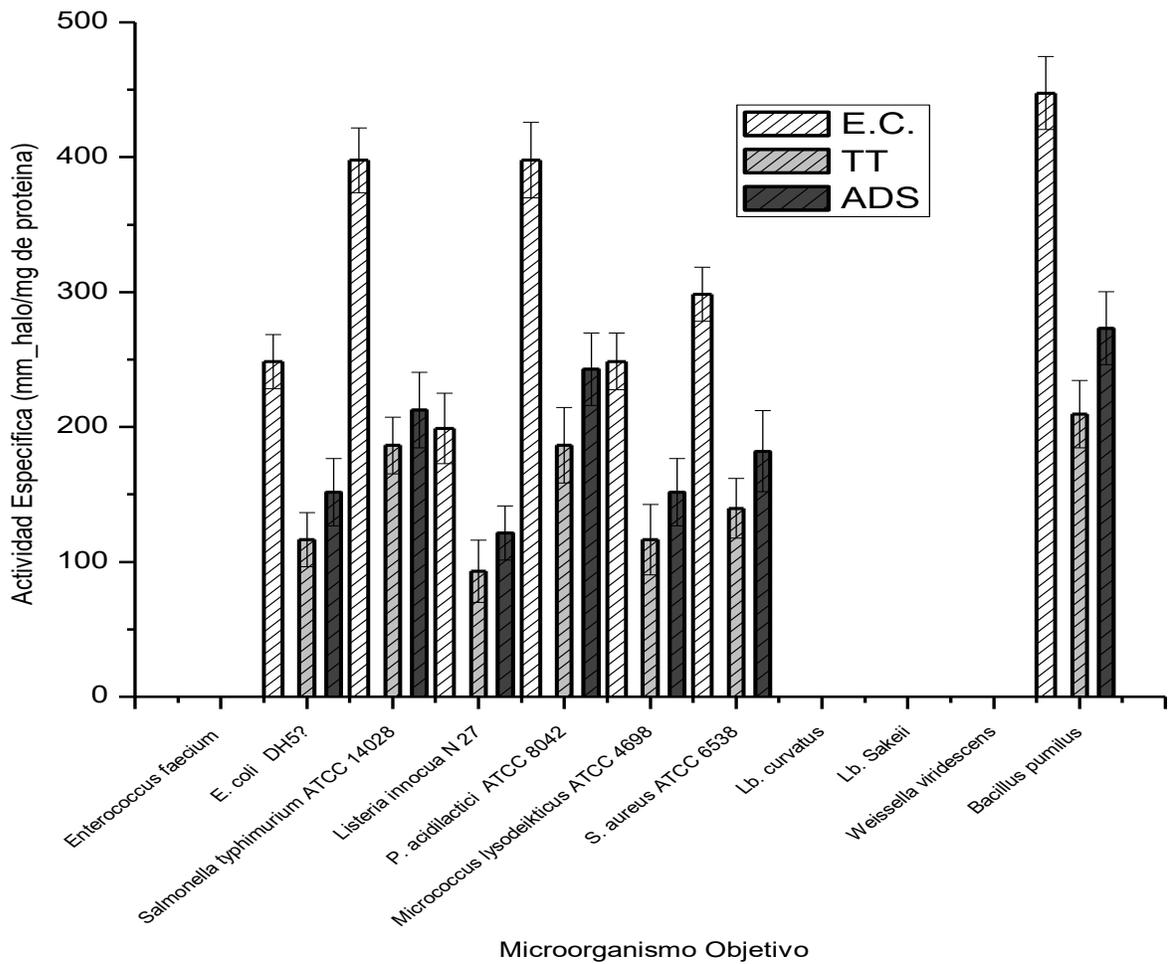


Figura 7. Espectro de inhibición del compuesto antimicrobiano tipo bacteriocina de *E. faecium* MXVK22

En la figura 8 se muestra el gráfico de actividad contra diferentes microorganismos objetivo para la cepa *E. faecium* UAMI-3, en el cual aumenta la actividad conforme aumentan los pasos de semi-purificación, es decir se va concentrando la proteína con la actividad de interés. Se logró inhibir a la mayoría de los microorganismos

objetivos exceptuando las cepas de *E. faecium*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* y *W. viridescens*.

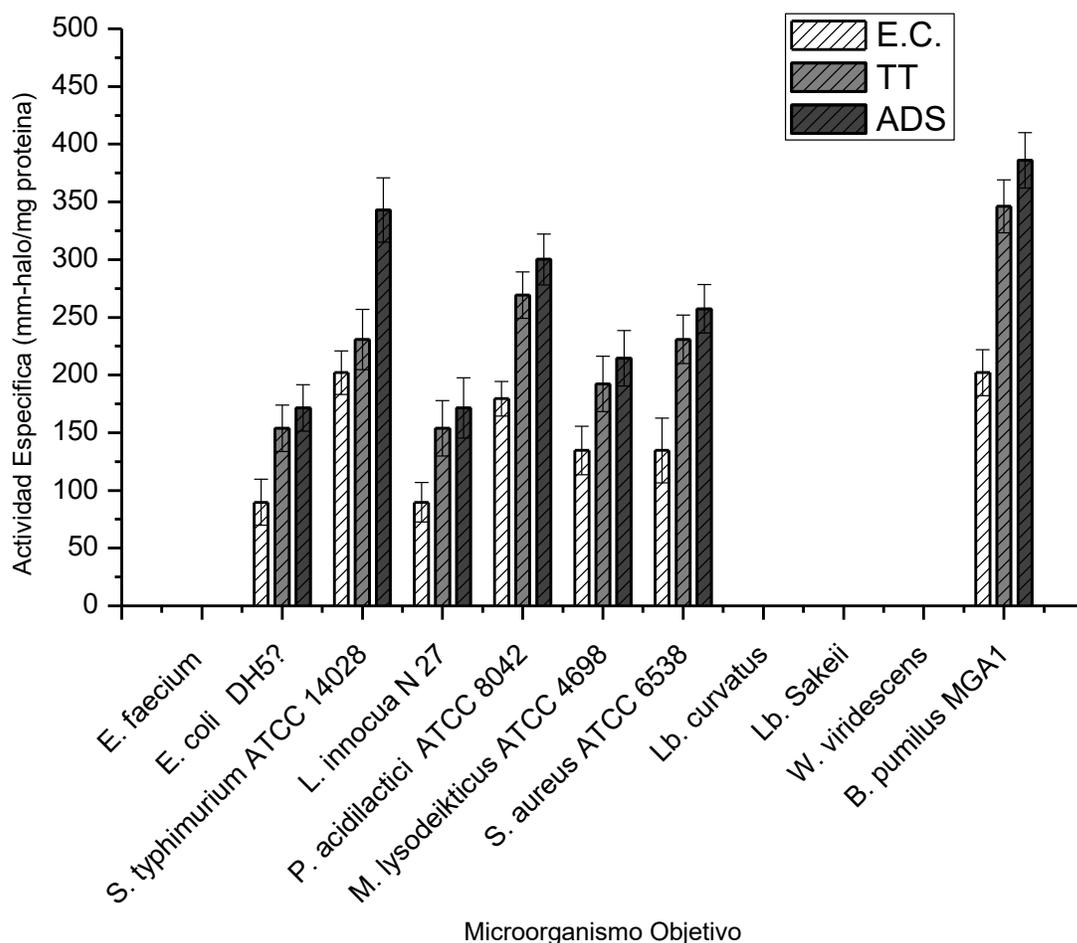


Figura 8. Gráfico del espectro de inhibición producido por las bacteriocinas de *E. faecium* UAMI-3.

5.3.1 Identificación de genes de bacteriocinas

Para conocer si la cepas de *Enterococcus* en estudio presentaban los genes que codifican para la enterocina A y B (dos bacteriocinas presentes en el genoma de *E. faecium* (Ingolf F. y col., 2007), se realizó una PCR.

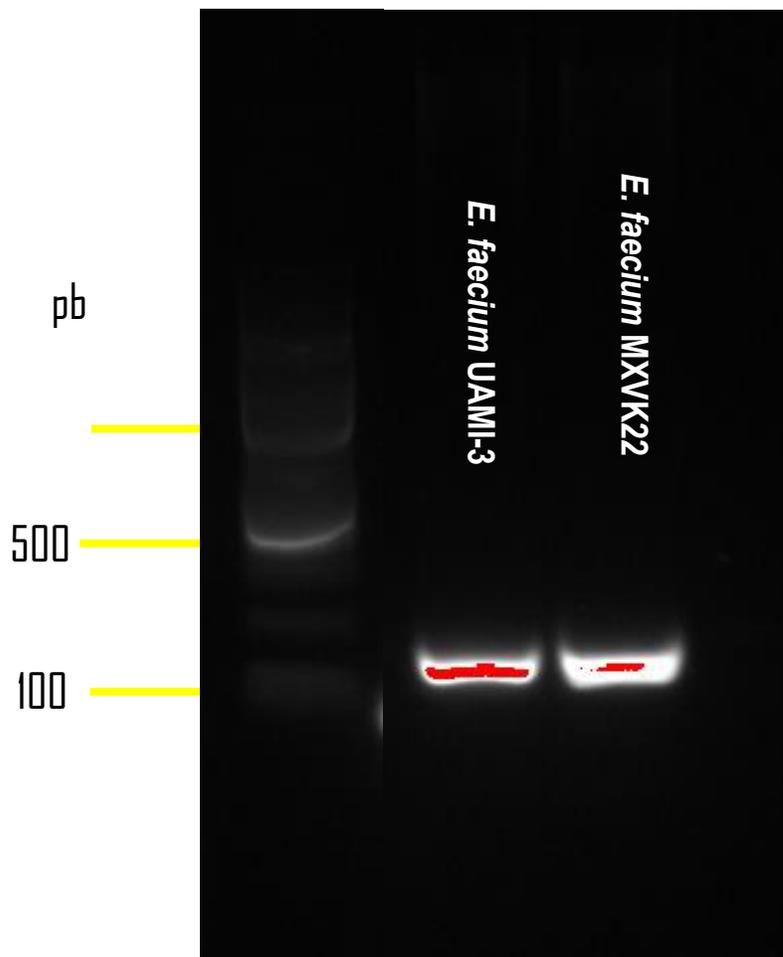


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1, marcador de 100 pb New England Biolabs; carril 2, productos de PCR para *entA*; carril 3, producto de PCR para *entB*.

En la figura 9 se observan los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% para los genes *entA* y *entB* para ambas cepas de estudio, la distancia de migración es similar en todos los carriles es decir están muy cercanos a las 100 pb, lo cual concuerda con el peso esperado que es de 120 pb (carril 2). Sin embargo para el gen *entB* el carril 3 se esperaba un producto aproximado de 500 pb.

Los productos de PCR de los genes *entA* y *entB* que fueron purificados y enviados a secuenciar a Macrogen. Las secuencias en nucleótidos obtenidas se analizaron en la base de datos como anteriormente se describió. En la tabla 18 se muestra la similitud que se obtuvo de las secuencias obtenidas con las de base de datos en qué porcentaje de identidad.

Tabla 18. Identidad secuencias obtenidas para los genes *entA* y *entB*

Cepa	Gen	Gen identificado	Cobertura	Expectancia	Identidad
<i>Enterococcus faecium</i> UAMI 3	<i>entA</i>	<i>Enterococcus faecium</i> cepa E9 gen (<i>entA</i>) enterocina A, cds parcial	100%	7E-27	99%
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK22		<i>Enterococcus faecium</i> cepa E5 gen (<i>entA</i>) enterocina A, cds parcial	100%	2E-27	100%
<i>Enterococcus faecium</i> UAMI 3	<i>entB</i>	No similitud significativa	-----	-----	-----
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK22		No similitud significativa	-----	-----	-----

----- = No existe ningún valor

Como se observa en la tabla 18 no se obtuvo ninguna similitud para las secuencias obtenidas de los productos de PCR para el gen *entB* de ambas cepas en estudio. Sin embargo para el gen *entA* para la cepa *E. faecium* UAMI-3 nos arroja una similitud con la enterocina A de la cepa *Enterococcus faecium* E9 con una identidad del 99%, esto para ambos sentidos de la reacción. Para el caso de la cepa *E. faecium* MXVK22 nos da una similitud con el gen *entA* de la cepa *Enterococcus faecium* E5

con un 100% de identidad para ambos sentidos. Lo cual indica que ambas cepas presentan el gen que codifica para la enterocina A dentro de su genoma.

5.3.2 Identificación de proteínas SDS-PAGE

Una vez determinada la presencia de genes que codifican para la enterocina A en ambas cepas, se evaluó si estas se expresaban y se encontraban activas. Se utilizaron los extractos obtenidos de ambas cepas, los cuales fueron cargados en un SDS-PAGE al 15% en condiciones desnaturalizantes para observar el perfil de proteínas presentes en los extractos así también se realizó un zimograma al 15% con *M. lysodeikticus* embebido en el gel para determinar la actividad antimicrobiana de las proteínas presentes.

En la figura 10 se muestra el gel de acrilamida al 15%, en los pasos de EC, ADS y DES se observa una banda por debajo de los 6 kDa pero para los pasos de DES y DIA no se observa ninguna banda, es decir se pierde la proteína presente en los pasos anteriores. También se muestra el zimograma, en cual se cargaron en el mismo orden las muestras, que en el gel de acrilamida, se observa que no presentan bandas de actividad para ninguno de los pasos de semi-purificación y con ninguna de las cepas.

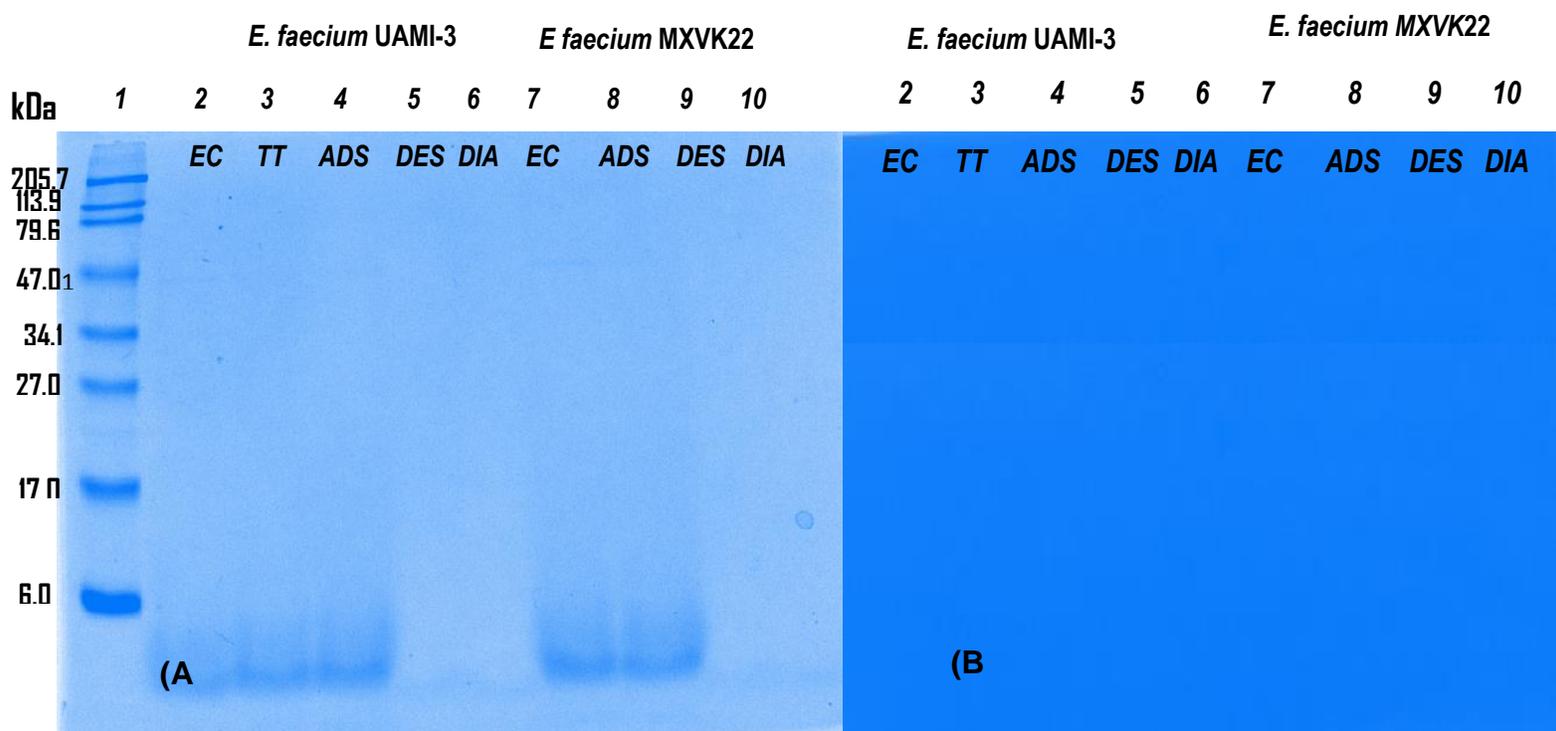


Figura 10. (A) SDS-PAGE al 15%. Carril 1, marcador de peso Bio-Rad; carril 2 a 6, pasos de semi-purificación del extracto de la cepa *Enterococcus faecium* UAMI-3; carril 7 a 10, pasos de semi-purificación del extracto de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK22. (B) Zimograma al 15% con *M. lysodeikticus* embebido. Carril 2 a 6, pasos de semi-purificación del extracto de la cepa *Enterococcus faecium* UAMI-3; carril 7 a 10, pasos de semi-purificación del extracto de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK22. Extracto crudo (EC), tratamiento térmico (TT), adsorción (ADS), desorción (DES), y dializado (DIA).

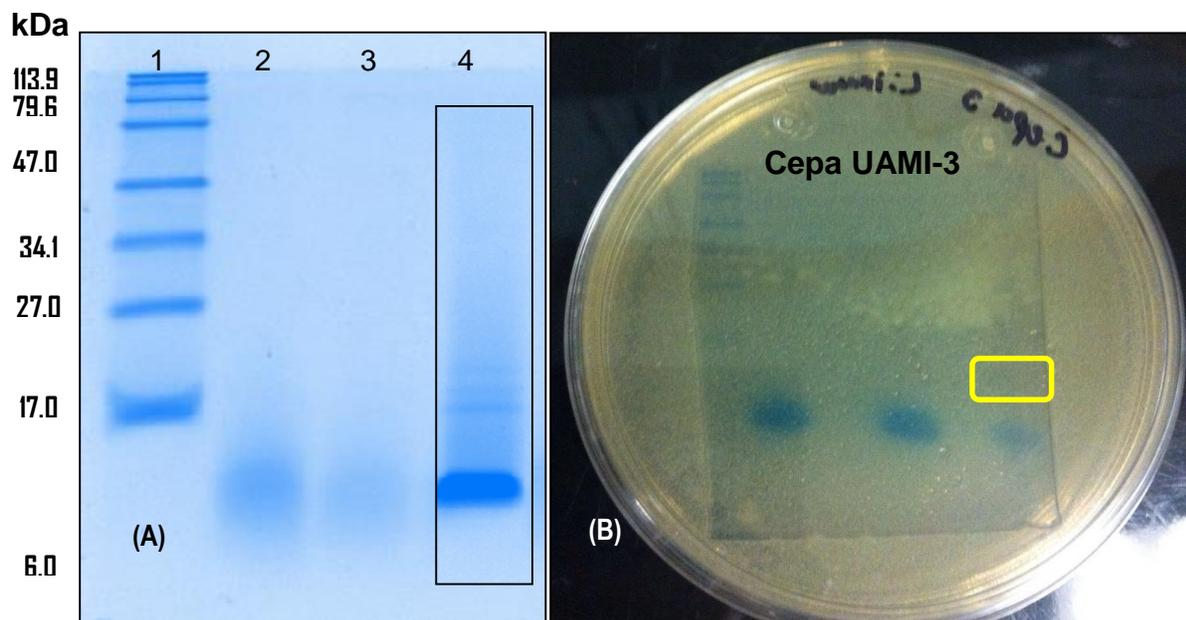


Figura 11. (A) SDS-PAGE al 15%. Carril 1, marcador de peso pre-teñido (Bio-Rad); carril 2, extracto crudo liofilizado obtenido a partir de la cepa de *Enterococcus faecium* UAMI-3; carril 3, extracto crudo obtenido a partir de la cepa de *Enterococcus faecium* UAMI-3. Carril,4 Nisina (Control positivo).(B) Difusión en agar contra *L. innocua* como microorganismo objetivo con SDS-PAGE 15% superpuesto, zona de actividad dada por Nisina (recuadro amarillo).

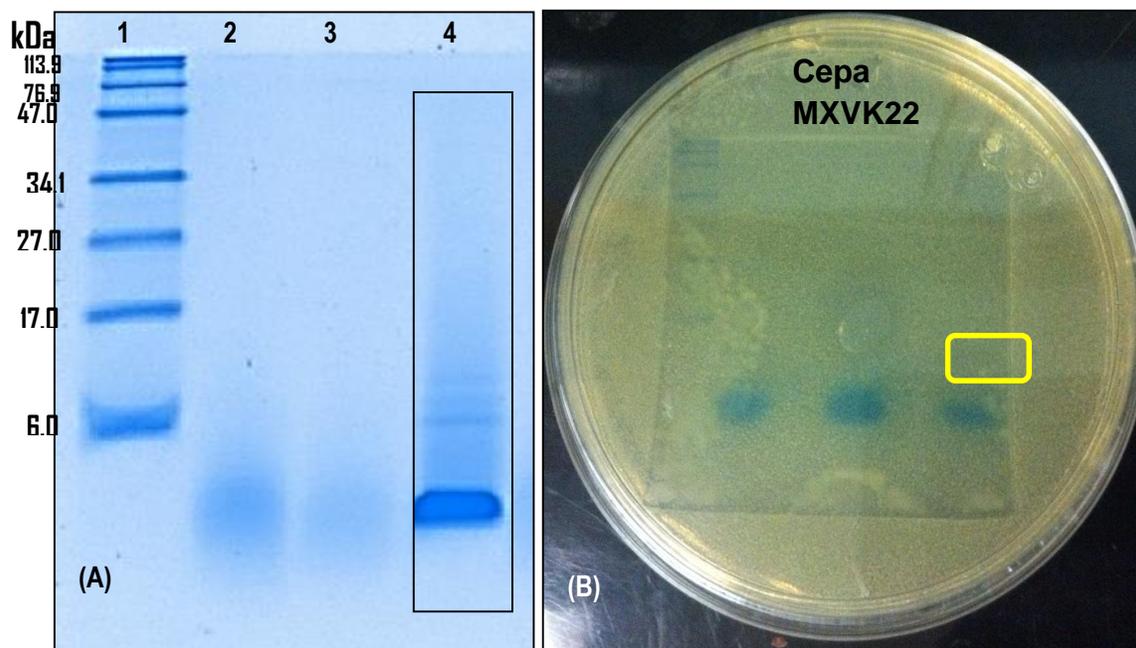


Figura 12. (A) SDS-PAGE al 15%. Carril 1, marcador de peso pre-teñido (Bio-Rad); carril 2, extracto crudo liofilizado obtenido a partir de la cepa de *Enterococcus faecium* MXVK22; carril 3, extracto crudo obtenido a partir de la cepa de *Enterococcus faecium* MXVK22. Carril 4 Nisina (Control positivo) (B) Difusión en agar contra *L. innocua* como microorganismo objetivo con SDS-PAGE 15% superpuesto, zona de actividad dada po nisina (recuadro amarillo).

Se observa en la figura 11 (A) y 12 (A) tres bandas por debajo de los 6 kDa siendo más intensa en el carril 3 (nisina). En la caja en la cual se llevó a cabo difusión en agar contra *L. innocua*, se observa una zona de actividad (recuadro amarillo),

correspondiente a nisina (control positivo del ensayo). Así también se observa que los extractos obtenidos de las cepas de estudio no presentan actividad alguna.

Las bandas obtenidas (Figura 10) se cortaron e enviaron a identificar por espectrometría de masas al INMEGEN. Las secuencias en aminoácidos se analizaron en el sitio web National Center for Biotechnology Information utilizando la herramienta BLAST. En la tabla 19 se muestra la similitud que se obtuvo y el porcentaje de identidad.

Tabla 19 Similitud de las secuencias obtenidas en aminoácidos.

Cepa	Proteína identificada	Expectancia	Identidad
<i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3	fosfato acetiltransferasa [<i>Enterococcus faecium</i>]	8E-09	85%
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK22	proteína L5 50S ribosomal [<i>Enterococcus</i>]	1E-22	88%

Como se puede observar en la tabla 19 se tuvo similitud con una acetiltransferasa para la cepa *E. faecium* UAMI-3 y proteína L5 ribosomal para la cepa *E. faecium* MXVK22, lo cual indica que no hay actividad de la enterocina A y concuerda con el zimograma de la figura 7, en el cual no se observa ninguna banda de actividad antimicrobiana. La presencia de estas proteínas en los extractos durante la semi-purificación se debe a que la técnica de adsorción-desorción dependiente de pH atrae proteínas catiónicas, no siendo así específica para bacteriocinas por lo cual es

posible que estas proteínas al ser catiónicas estén presentes en dichos extractos. (Nes y Holo, 2000).

5.3.3 Identificación de la transcripción del gen *entA* en las cepas de *Enterococcus*.

Debido a que no se obtuvo activada ni la secuencia en aminoácidos de bacteriocinas en ambas cepas de estudio, pero sin embargo presentan el gen *entA* en su genoma se decidió realizar la extracción de ARN y este ser llevado por retrotranscripción a ADNc para así utilizar este último como molde en PCR para la amplificación del gen *entA*. Se realizó la extracción de ARN de las cepas en estudio y de *Enterococcus faecium* MXVK29 (Cepa 29; control positivo para el gen *entA*) así como *Pediococcus acidilactici* MXVK133 (cepa 133). El ARN fue utilizado para obtener el ADNc, con el fin de determinar si el gen *entA* se transcribe. En la figura 13 se muestra el ADNc producido con los diferentes ARNs antes mencionados los cuales están muy cercanos a las 100 pb y presentan buena integridad.

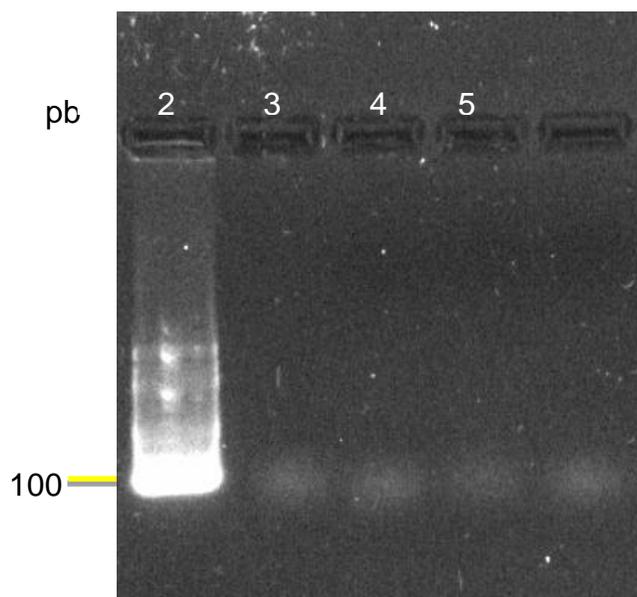


Figura 13. Gel de agarosa al 1.5%, carril 1 marcador de peso 100 pb, carril 3, 4 y 5 cDNA obtenido a partir de la cepa UAMI3, MXVK22, MXVK29 y MXVK133 respectivamente.

En la figura 14 se muestran los productos de amplificación del gen *entA* los cuales tienen un tamaño cercano a 100 pb, todos los productos de amplificación tanto los obtenidos con ADNc como ADN migraron a la misma distancia.

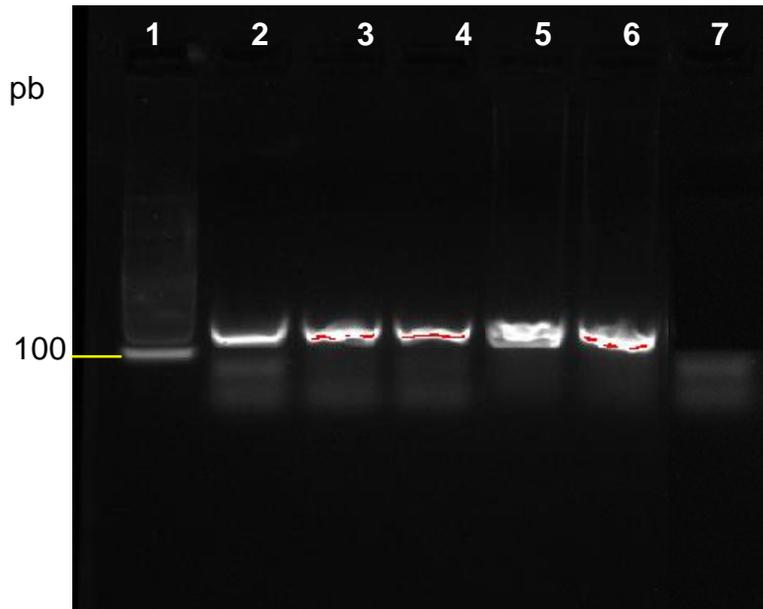


Figura 14. Gel de agarosa al 1.5%, carril 1 marcador de peso 100 pb New England Biolabs, carril 2, 3 y 4 producto de amplificación del gen *entA* obtenido a partir del ADNc de las cepas UAMI-3, MXVK22 y MXVK29 respectivamente. Carril 5 y 6, producto de amplificación del gen *entA* obtenido a partir del ADN de las cepas UAMI-3 y MXVK22, respectivamente. Carril 7 producto de amplificación del gen *entA* obtenido a partir del ADNc de la cepa 133.

Tabla 20. Identidad de secuencias obtenidas.

Cepa	Gen	Gen identificado	Cobertura	Expectancia	Identidad
<i>Enterococcus faecium</i> UAMI 3	entA	<i>Enterococcus faecium</i> cepa E9 gen (<i>entA</i>) enterocina A , cds parcial	100%	7E-45	97%
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK22		<i>Enterococcus faecium</i> cepa E5 gen (<i>entA</i>) enterocina A , cds parcial	99%	2E-45	100%
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK29		<i>Enterococcus faecium</i> cepa E9 gen (<i>entA</i>) enterocina A , cds parcial	100%	6E-40	97%

Las bandas obtenidas se purificaron y se enviaron a secuenciar a Macrogen. En la tabla 20 se muestran las identidades que se obtuvieron con base de datos. Para el gen *entA* para la cepa UAMI-33 se obtuvo una identidad del 97% con el gen *entA* de la cepa *Enterococcus faecium* E9 con un porcentaje de cobertura del 100% y un valor E igual 7e-45, para la cepa MXVK22 se obtuvo una identidad del 100% con el gen *entA* de la cepa *Enterococcus faecium* E5 con un porcentaje de cobertura del 99% y un valor E igual 2E-45, para la cepa MXVK29 se obtuvo una identidad del y 97% con el gen *entA* de la cepa *Enterococcus faecium* E9 con un porcentaje de cobertura del y 100% y un valor E igual a y 6e-40.

Esto concuerda con lo antes ya obtenido al amplificar el gen *entA* con ADN genómico de las cepas *Enterococcus faecium* UAMI-3 y *Enterococcus faecium* MXVK22. Además estos resultados pueden indicar que el gen *entA* además de estar presente en el genoma, también se transcribe. Sin embargo no se presenta la enterocina A en el extracto de ninguna de las cepas de estudio, con lo cual podemos inferir que el

ARNm del gen *entA* no llega hasta la traducción, esto puede ser debido a mecanismo de interferencia en la traducción, como el que es llevado a cabo por los pequeños ARNs (sARNs) que bloquean los sitios de unión del ribosoma. Charlotte (2014) ha descrito en *Enterococcus faecalis* la presencia de 17 sARNs putativos en su genoma, y se considera que otras especies del mismo género, pueden tener el mismo mecanismo.

5.4 Identificación de actividad antimicrobiana por PGHs

5.4.1 Espectro de inhibición por PGHs

Una vez precipitadas y renaturalizadas las proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo de las cepas de estudio, se determinó la actividad inhibitoria por difusión en agar contra los mismos microorganismos objetivo que para la determinación de actividad de bacteriocinas.

En la Figura 15 se muestra la actividad específica en mm halo por mg de proteína obtenidos contra los microorganismos objetivos para ambas cepas de estudio. En la figura 15 se muestra el gráfico de las actividades de inhibición para ambas cepas de estudio. Se observa actividad inhibitoria contra la mayoría de los microorganismos objetivo excepto *Lactobacillus curvatus*, así también que la cepa UAMI-3 presenta mayor actividad en comparación con la cepa MXVK22. Esto puede deberse a que la o las proteínas causantes de la actividad sean distintas para ambas cepas de estudio. Se puede observar que el espectro de inhibición con el extracto obtenido de PGHs es mayor comparado con el presentado por el espectro de inhibición por los extractos de semi-purificación de bacteriocinas.

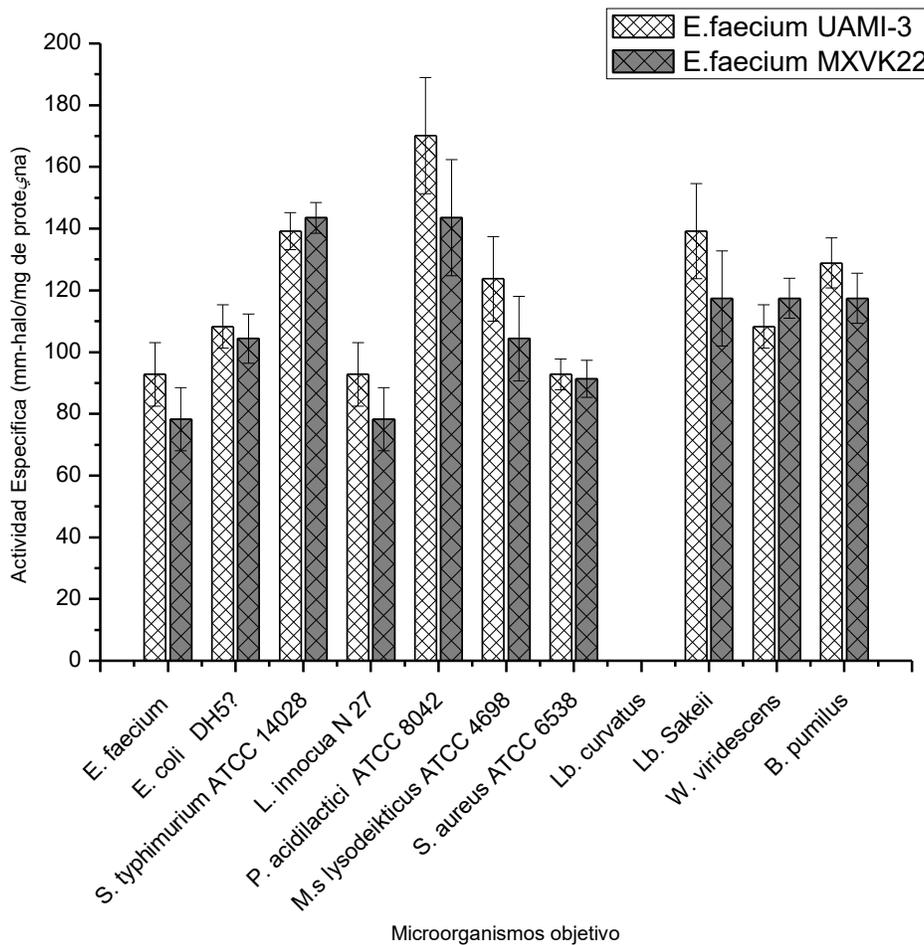


Figura 15. Gráfico del espectro de inhibición debido a PGHs de las cepas *E. faecium* UAMI-3 y *E. faecium* MXVK22.

5.4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

En este tipo de enzimas es importante conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la cual es capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo objetivo, por lo que se realizaron pruebas por difusión en agar contra *S. aureus* y *L. innocua*. Se probaron varias concentraciones del extracto de PGH en un intervalo de 4 a 100

µg/mL. La PGH extraída de las cepas de estudio tuvieron una CMI de 10 µg/mL de proteína contra *L. innocua* y de 20 µg/mL de proteína contra *S. aureus* (tabla 22).

Tabla 22. Concentración Mínima Inhibitoria

Proteína (µg/mL)	<i>L.innocua</i>		<i>S.aureus</i>	
	Cepa UAMI-3 mm/mg prot	Cepa MXVK22 mm/mg prot	Cepa UAMI-3 mm/mg prot	Cepa MXVK22 mm/mg prot
4	0	0	0	0
10	5714.28	6666.66	0	0
20	4285.71	4761.90	2142.85	2142.85
30	3333.33	3809.52	2380.95	1904.76
40	3214.28	3214.28	2142.85	1785.71
100	1571.4	1571.42	1000	857.14

La diferencia en la CMI obtenida contra *L. innocua* y *S. aureus* puede deberse a la diferencia de estructura del peptidoglucano presente en ambas cepas ya que se sabe existen diferencias como lo es la presencia de puentes de penta-glicina en *S. aureus* lo cual le confiere mayor resistencia a la hidrólisis de ciertas PGHs. (Boris y col., 2004).

5.4.3 Identificación de proteínas en y actividad antimicrobiana por SDS-PAGE

Se llevó a cabo electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes para determinar la presencia y tamaño del o las proteínas, además se realizó un zimograma contra *M. lysodeikticus* para determinar la actividad antimicrobiana. En la figura 16 se observa que el perfil de proteínas fue similar para ambas cepas de estudio, así también en el zimograma que presenta bandas de

actividad a la misma altura de migración. Se cortaron las dos bandas encerradas en el recuadro rojo y se enviaron a su identificación por espectrometría de masas al INMEGEN para las muestras de *E. faecium* UAMI-3 y al IBT-UNAM para las muestras de *E. faecium* MXVK22. El corte de más de una banda para su identificación fue debido a que no se sabe con exactitud cuál de esas bandas produce la actividad antimicrobiana ya que en el zimograma al estar embebido el microorganismo objetivo se ve afectada la migración de las proteínas por lo cual no están al mismo nivel de migración que en el gel de acrilamida.

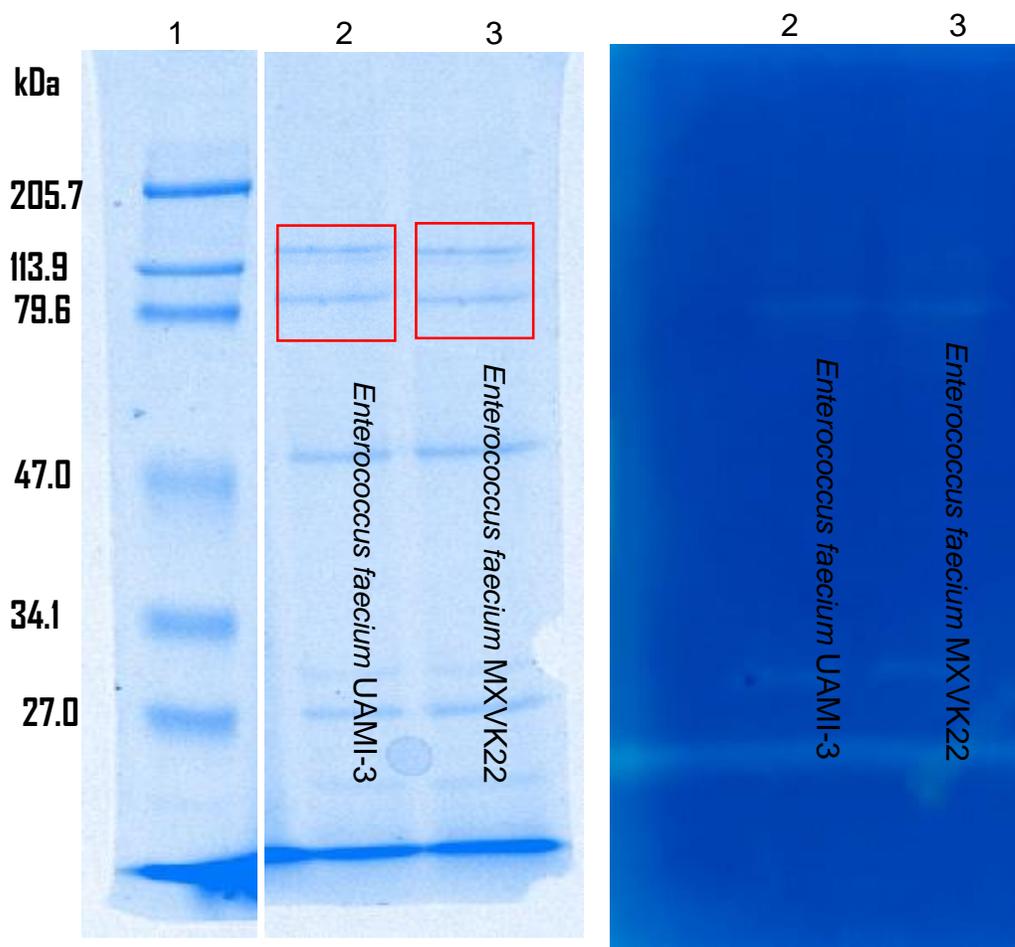
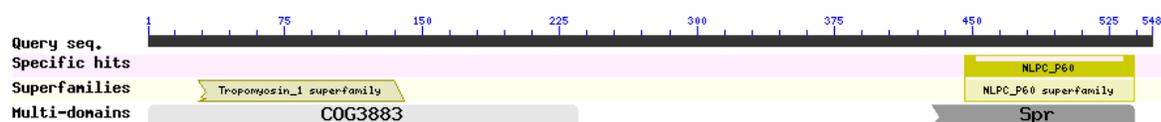


Figura 16. SDS-PAGE y zimograma al 10% de acrilamida. Carril 1, marcador de peso molecular (polipeptide Bio-Rad); carril 2, proteínas extraídas del sobrenadante de la cepa *E. faecium* UAMI-3; carril 3, proteínas extraídas del sobrenadante de la cepa *E. faecium* MXVK22.

Las secuencias en aminoácidos obtenidas se analizaron en la base de datos del sitio web del NCBI utilizando la herramienta BLAST para determinar la similitud de las secuencias con las presentes en la base de datos. En la tabla 23 se muestra la proteína identificada para la cepa *E. faecium* UAMI-3 y el porcentaje de identidad.

Tabla. 23 Proteínas identificadas en la base de datos para *E. faecium* UAMI-3.

Cepa	Proteína Identificada	Expectancia	Identidad	Tamaño en aminoácidos	Peso molecular
<i>Enterococcus faecium</i> UAMI 3	<i>Enterococcus faecium</i> , Proteína P54	0.0	100 %	548 a.a.	570 kDa



Dominios conservados	
NLPC/P60	Superfamilia asociada a peptidisas de la pared celular
Spr	Asociado a la hidrolisis de la pared celular

Figura 17. Dominios conservados presentes en la proteína P54.

Se identificó la proteína P54 para la cepa *E. faecium* UAMI-3 con un peso de 57.7 kDa y 548 aminoácidos. En dicha proteína están presentes los dominós conservados

Spr asociado a hidrólisis de la pared celular y NLPC/P60 que pertenece a la superfamilia asociada a peptidasas de la pared celular. La superfamilia NLPC/P60 se ha asociado a la hidrólisis de los enlaces formados por el ácido N-acetilmurámico y D-γ-glutamil-meso-diaminopimelato o bien N-acetilmurámico y N-acetilmuramato-L-alanina es decir según el sitio de corte se clasifican como amidasas (Anantharaman, 2003).

Para la cepa *E. faecium* MXVK22 se identificaron 2 proteínas (tabla 24) estas fueron la proteína P54 de *E. faecium* con una identidad del 99% y tamaño de 56.42 kDa y la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de *E. faecium* con una identidad del 100% y un tamaño de 70.4 kDa. La proteína P54 obtenida presenta los mismos dominios conservados Spr y NLPC/P60 que la obtenida para la cepa *E. faecium* UAMI-3.

Tabla 24. Proteínas Identificadas en base de datos para *E. faecium* MXVK22.

Cepa	Proteína Identificada	Expectancia	Identidad	Tamaño en aminoácidos	Peso molecular
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK22	Enterococcus faecium, Proteína P54	6E-82	99 %	533 a.a.	56.42 kDa
	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	7E-05	100 %	711 a.a.	70.4 kDa

Lo anterior concuerda con lo publicado por García-Cano en 2014, quien reportó la producción de la enzima N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de tamaño 76.5 kDa por una cepa de *Enterococcus faecium* aislada de queso Cotija.

5.4.4 Identificación de los genes que codifican para PGHs.

5.4.4.1 Amplificación del gen que codifica para de la proteína P54

Se realizó la amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína P54, para observar el tamaño del producto de amplificación se llevó a cabo una electroforesis en agarosa al 1.2%. Como se observa en la figura 18 se obtuvo productos de amplificación cercanos a las 1000 pb para ambas cepas de estudio, estas bandas fueron cortadas, se purificaron los productos de PCR y se enviaron a secuenciar.

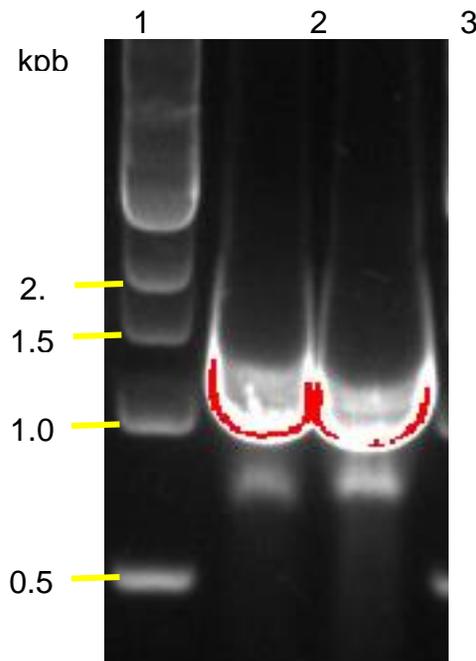


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Carril 1, marcador de peso 1 kb; carril 2, producto de PCR llevado a cabo con DNA de la cepa *E. faecium* UAMI-3 como molde; carril 3, producto de PCR llevado a cabo con DNA de la cepa *E. faecium* 22.

5.4.4.2 Amplificación del gen estructural de la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa

Se realizó la amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, para observar el tamaño del producto de amplificación se llevó a cabo una electroforesis en agarosa al 1.0%. Se observa en la figura 19 productos de amplificación cercanos a las 2,000 pb para ambas cepas de estudio.

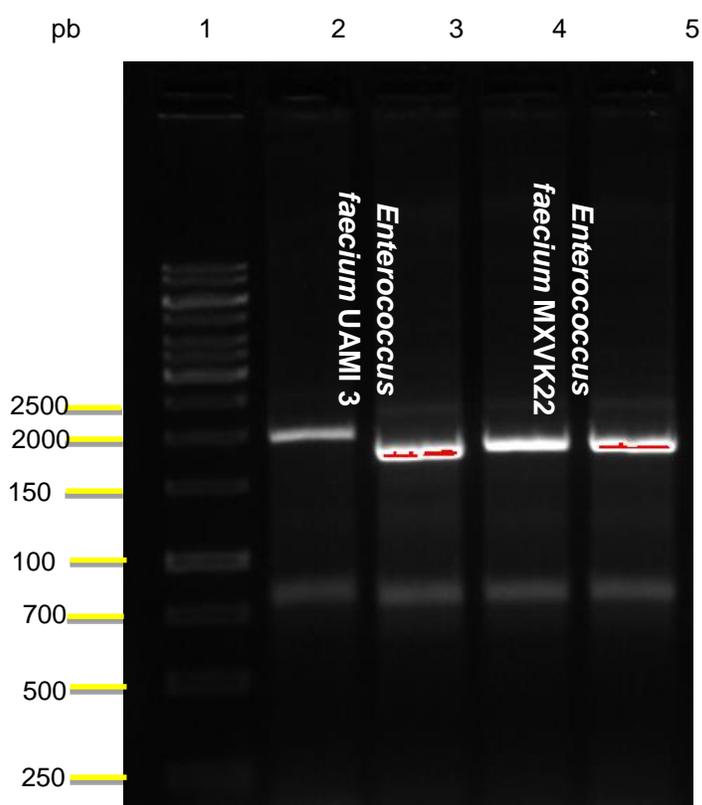


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0%. Carril 1, marcador de peso 1 kb Bio-Rad; carril 2 y 3, producto de PCR llevado a cabo con ADN de la cepa *E. faecium* UAMI-3 como molde; carril 4 y 5, producto de PCR llevado a cabo con ADN de la cepa *E. faecium* MXVK22.

Las bandas del gel de agarosa se cortaron, purificaron e enviaron a secuenciar al Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-I. Las secuencias en nucleótidos obtenidas se analizaron en la base de datos del sitio web National Center for Biotechnology Information utilizando la herramienta BLAST. En la tabla 25 se muestra la similitud que se obtuvo de las secuencias obtenidas y en qué porcentaje de identidad.

Tabla 25. Identidad de secuencias obtenidas para los genes que codifican para PGHs.

Cepa	Gen	Gen identificado	Cobertura	Expectancia	Identidad
<i>Enterococcus faecium</i> UAMI 3	P54	<i>Enterococcus faecium</i> DO, proteína P54	70%	1E-112	100%
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK22		<i>Enterococcus faecium</i> DO, proteína P54	72%	2E-112	98%
<i>Enterococcus faecium</i> UAMI 3	ami	<i>Enterococcus faecium</i> , N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	99%	0.0	99%
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK22		<i>Enterococcus faecium</i> , N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	99%	0.0	100%

Como se puede observar en la tabla 25, se obtuvo identidad con el gen que codifica para la proteína P54 de *Enterococcus faecium* con una cobertura del 70% y un Expectancia de 1e-112, en ambos sentidos de la reacción, esto para la amplificación de dicho gen con el ADN como molde de la cepa *Enterococcus faecium* UAMI-3. Para el producto que se amplificó con el ADN como molde de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK22 se obtuvo una identidad de 98%, una cobertura de 72% y un

Expectancia $2e-112$ con el gen que codifica para la proteína P54 de *Enterococcus faecium* esto en ambos sentidos de la reacción. Así también para los productos que se obtuvieron al amplificar el gen que codifica para la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa se obtuvo una identidad de 99% , una cobertura del 99% en ambos sentidos de la reacción y un Expectancia 0.0 con el gen que codifica para la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de *Enterococcus faecium*, esto para la cepa *Enterococcus faecium* UAMI-3. Para la cepa *Enterococcus faecium* MXVK22 se obtuvo una identidad de 99%, una cobertura igual a 100% y un Expectancia 0.0 con el gen que codifica para la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de *Enterococcus faecium* en ambos sentidos de la reacción.

Lo cual nos hace saber que en ambas cepas *Enterococcus faecium* UAMI-3 y *Enterococcus faecium* MXVK22 se encuentran presentes el gen que codifica para la proteína P54 y la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa. Sin embargo en la identificación de proteínas no se logró obtener e identificar la secuencia en aminoácidos de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa en la cepa *Enterococcus faecium* UAMI-3, esto puede ser debido al diferente procesamiento al cual fueron sometidas las muestras para su identificación, así también como espectrómetro de masas que se utilizó ya que el INMEGEN cuenta con un MALDI-TOF y por su parte el IBT-UNAM con un LTQ Orbitrap Velos con trampa de iones lineal de presión doble, teniendo este último una mejor resolución, lo cual pudo contribuir a la secuenciación de las dos bandas activas.

6. CONCLUSIONES

Se determinó la actividad antimicrobiana producida por el sobrenadante (extracto crudo) del cultivo de las cepas *E. faecium* UAMI-3 y *E. faecium* MXVK22, así como también el espectro de inhibición en el cual no se observó inhibición de los microorganismos: *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium* y *Weissella viridescens*. Además se observó que la cepa MXVK22 presenta mayor actividad en comparación con la cepa UAMI-3.

Se logró determinar la actividad antimicrobiana por distintas técnicas de extracción de compuestos antimicrobianos de origen proteico a partir del sobrenadante de cultivo de las cepas de estudio (una para bacteriocinas y otra para peptidoglucano hidrolasas), en las cuales se observó diferencias en el espectro de inhibición siendo mayor el de las PGHs (únicamente no se logró inhibir la cepa de *Lactobacillus curvatus*). Para el caso de los péptidos extraídos por adsorción-desorción (bacteriocinas), su espectro de inhibición es similar al obtenido con el extracto crudo no inhibiendo a los microorganismos *L. curvatus*, *L. sakei*, *E. faecium* y *W. viridescens*, sin embargo las cepas de estudio presentan diferente perfil durante los pasos de semi-purificación, en el cual para la cepa UAMI-3 se observa un aumento en la actividad conforme los pasos de semi-purificación.

Se identificó el gen *entA* en ambas cepas, sin embargo en los geles de acrilamida y su respectivo zimograma, no se logró observar actividad antimicrobiana. Por lo cual

se concluye que a pesar de que ambas cepas tienen presente en su genoma el gen *entA* y que este se transcribe, no se realiza la traducción.

Se logró identificar la proteína P54 con dominios conservados Spr y NLPC/P60 asociados a la hidrólisis de la pared celular, así también se logró la amplificación del gen estructural que codifica para dicha proteína esto para ambas cepas UAMI-3 y MXVK22, además de la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa.. Por lo cual se concluye que la actividad antimicrobiana presentada por la cepa UAMI-3 y MXVK22 es debido a las proteínas P54 y N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas se propone la clonación y expresión en un microorganismo heterólogo de los genes que codifican para las proteínas P54 y N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, para así aumentar y controlar la producción de dichas enzimas. Así también la aplicación como conservadores de estos compuestos antimicrobianos sobre los alimentos.

8. REFERENCIAS

- Álvarez, (2008). Tesis de maestría. Identificación de bacteriocinas producidas por *Enterococcus* sp. Aislados de productos cárnicos. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. D.F., México.
- Álvarez, (2011). Tesis de doctorado. Aspectos de seguridad de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aislados de productos cárnicos y caracterización molecular de bacteriocinas. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. D.F., México.
- Anantharaman, V., and Aravind, L. (2003). Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biology*, 4:R11.
- Ayala, (2004). Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas. Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca. México.
- Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M., and Hugas, M. (2000). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection* 63: 721-726.
- Barefoot, S.F., and Klaenhammer, T.R., (1983). Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 1808-1815.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. and Kalchayanad, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 25-33.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. and Kalchayanad, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 25-33.
- Blättel V., Wirth K., Claus H., Schlott B., Pfeiffer P. and Ko" nig H. (2009). A lytic enzyme cocktail from *Streptomyces* sp. B578 for the control of lactic and acetic acid bacteria in wine. *Applied Microbiology Biotechnology*, 83:839-848.
- Boris A., Filip V., Holst O., Rietschel E., and Ehlers S. (2004). Tertiary Structure of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Murein. *Journal of Bacteriology*, 50:7141-7148.
- Bustamante, N., Campillo, N.E., Garcia, E., Gallego, C., Pera, B., Diakun, GP., Saiz, J.L., Garcia, P., Diaz, J.F., and Menendez M. (1987). Cpl-7, a lysozyme encoded by a pneumococcal bacteriophage with a novel cell wall-binding. 87: 46-49
- Charlotte, M., Hartke, A., Martini, C., Reiss, S., Albrecht, D., Budin-Verneuil, A., Sanguinetti, M., Engelmann, S., Hain, T., Verneuil, N., Giardb, and J. (2014). Involvement of *Enterococcus faecalis* Small RNAs in Stress Response and Virulence. *Infection and Immunity Journal*, 45:3599-3611.
- Chikindas, M.L., Chi-Zhang, Y., and Yam, K.L. (2004). Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 15-22.
- Cintas, L. M., Casaus, P. and Hernández, P. E. (2000) Bacterias lácticas de origen alimentario:

consideraciones taxonómicas y filogenéticas, *Alimentaria*, 38:61-70.

- Cintas, L. M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I. F. and Hernández, P. E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *Food Science Technology*, 74:281- 305.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F. and Harvarstein, L.S. (1998). Enterocins L50 A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180: 1988-1994.
- Coffey, B., Mills' S., Coffey, A., McAuliffe, O., Ross, R.P. (2010). Phage and their lysins as biocontrol agents for food safety applications. *Annu Review Food Science Technology*, 1:449-468.
- Coppola, S., Parente, E., Dumonet, S. and Peccerella, A. (1988). The microflora of natural whey cultures utilized as starters in manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Microbiology Reviews*, 68: 295-310.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. (2005). Bacteriocins developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews*, 3: 777-788.
- Huang, E., Liwen, Z., Yoon, K., Zheng, Z., Yousef, A.E. (1990). Characterization and Application of Enterocin RM6, a Bacteriocin from *Enterococcus faecalis*. International. *Food fermentations, FEMS Microbiology Reviews*, 87:149-164.
- Das, D., Hervé, M., Elsliger, M.A., Kadam, R.U., Grant, J., Chiu, H.J., Knuth, M.W., Klock, H.E., Miller, M.D., Godzik, A., Lesley, S.A., Deacon, A.M., Mengin-Lecreux, D. and Wilson I.A. (2013) Structure and function of a novel LD-carboxypeptidase A involved in peptidoglycan recycling. *Journal of Bacteriology*, 76:678-695.
- Datta, S., Janes, M.E., Xue, Q-G., Losso, J., La, Peyre. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella anatum* on the surface of smoked salmon coated with calcium alginate coating containing oyster lysozyme and nisin. *Journal of Food Science*, 73:67-71.
- Dolinger, D.L., Daneo-Moore, L., Shockman, G.D. (1989). The second peptidoglycan hydrolase of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 covalently binds penicillin. *Journal of Bacteriology*, 171(8):4355-4361.
- Dolinger, D.L., Schramm, V.L., Shockman, G.D. (1988). Covalent modification of the beta-1, 4-N-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium* with 5-mercaptouridinemonophosphate. *PNAS*. 85(18):6667-6671
- de Souza, P.M., Fernández, A., López-Carballo, G., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2010). Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme. *Food Hydrocolloid*, 24:300-306.
- Eckert, C., Lecerf, M., Dubost, L., Arthur, M. and Mesnage, S. (2006). Functional Analysis of AtlA, the Major N-Acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 188: 8513-8513.
- Ennahar, S. and Deschamps, N. (2000). Anti-listeria effect of enterocin A, produced by chesse-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid

- bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 449-457.
- Fernández, A., Cava, D., Ocio, M.J. and Lagaro, J.M. (2008) Perspectives for biocatalysts in food packaging. *Trends Food Science Technology*, 19:198-206.
 - Franz, C.M.A.P., Van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H., Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *Feed fermentations, FEMS Microbiology, Review* 31: 293–310.
 - Franz, C.M.A.P., Worobo, R.W., Quadri, L.E.N., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. (1999). Atypical locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2170-2178.
 - Franz, C.M.A.P., Grube, A., Hikmate, A.A.H. (2001). Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5):2550.
 - Garcia-Cano, (2013). Tesis de doctorado. Peptidoglucano hidrolasa de *pediococcus acidilactici* ATCC 8042: detección, localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico., D.F.
 - García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., Quirasco, M. (2014). Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese, *Food and Science Technology*, 26-34.
 - Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of Food Microbiology*, 88: 215-222.
 - Gemili, S., Yemencioğlu, A., Altınkaya, S.A. (2009). Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme. *Journal Food*, 90:453-462.
 - Grayson, P., Molineux, I.J. (2007). Is phage DNA 'injected' into cells—biologists and physicists can agree? *Journal of Microbiology*, 10:401-409.
 - Han, M.L.J., Joosten, N.M., Devreese, B., Van-Beeumen, J., Marugg, J. D. (1996). Purification and Characterization of Enterocin 4, a Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Applied Environmental Microbiology*, 62(11):4220.
 - Heng, N.C.K. and Tagg, J.R. (2006). Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 1-2.
 - Hoover, D. and Steenson, L. (1993). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Academic Press*, 23:41-48.
 - Ingolf, F.N., Dzung, B.D., and Helge, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology*, 189 (4): 1189–1198.
 - Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59: 171-200.
 - Katla, T., Netersatd, K., Vancanneyt, M., Swings, J. and Axelsson L. (2003). Differences in

- susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to Sakacin P, Sakacin A, Pediocin PA-1, and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8): 4431–4473.
- Katla, T., Moretro, T., Sveen, I., Aasen, I.M., Axelsson, L., Rorvik, L.M. and Naterstad, K. (2002). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P producing by *Lactobacillus sakei*. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 191-196.
 - Kjems, E. (1955). Studies on streptococcal bacteriophages, I. Techniques for isolating phage producing strains. *Pathology and Microbiology Scandinavia*, 36: 433– 440.
 - Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 39-86.
 - Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15: 680-685.
 - Iaconelli, A., Fiorentini, L., Bruschi, S., Rossi, F., Mingrone, G., Piva, G. (2008). Absence of allergic reactions to egg white lysozyme additive in Grana Padano cheese. *Journal of Nutrition*, 27:326-331.
 - Leclerc, D. and Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing gel electrophoresis. *Journal of Microbiology*, 35: 749-753.
 - Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food. *FEMS feed fermentations*, 87:149-164.
 - Lortal, S. and Chapot-Chartier, M. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Journal of Microbiology*, 15: 857-871.
 - Moreno, M. R., Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M., and DeVuyst, L. (2002). Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 147-157.
 - Nakimbugwe, D., Masschalck, B., Deckers, D., Callewaert, L., Aertsen, A., Michiels, and B. (2006). Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts. *FEMS Microbiology*, 259:41-46.
 - Nes, I.F., Holo, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (PeptideScience)*, 55: 50-61.
 - Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S. and Brurberg, M.B. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 113-128.
 - Nettles, C.G. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 56: 338-356.
 - O'Flaherty, S., Ross, R.P., Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33:801-819.
 - Obeso, J.M., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P. (2008) Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage FH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk.

Journal Food Microbiology, 128:212-218.

- Rojas, C., Vargas, P. (2008). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria, *Tecnología en Marcha*, 21(2):9-16.
- Salminen, S., Von, W.A., Ouwehand, A. (2004). Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3ª edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos.454-510.
- Schägger, H. and Von, J.G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polycrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166: 368-379.
- Schillinger, U., Lucke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1901-1906.
- Schillinger, U., Kaya, M. and Lücke, F.K. (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 473-478.
- Schleifer, P.M. and Kilpper-Balz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 31-34.
- Schneider, R. (2005). Caracterización bioquímica y molecular de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de productos cárnicos mexicanos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Distrito Federal, México.
- Schneider, N., Becker, C.M., Pischetsrieder, M. (2010). Analysis of lysozyme in cheese by immunocapture mass spectrometry. *Journal Chromatografy*, 878:201-206.
- Schneider, R., Fernández, F.J., Aguilar, M.B., Guerrero-Legarreta, I., Alpuche-Solís, A. and Ponce-Alquicira, E. (2006). Partial characterization of a class II pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican "chorizo"). *Food Control*, 17 (11): 909-915.
- Shockman, C.D. (1992). The autolytic ('suicidase') system of *Enterococcus hirae*: from lysine depletion autolysis to biochemical and molecular studies of the two muramidases of *Enterococcus hirae* ATCC 9790.
- Sitkin, B.V., Lysanskaia, V., Tsfasman, I.M., Stepnaia, O.A. and Kulaev, I.S. (2003). The structure of peptidoglycan from *Lysobacter* sp.--a producer of extracellular bacteriolytic enzymes. *Journal of Biochemistry*, 72: 136-147.
- Stiles, M. E. (2004). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 331-345
- Svetoslav, T., Vaz-Velho, M. and Gibbs, P. (1996). Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 157-160.
- Szweda, P., Kottowski, R., Łacka, I., Synowiecki, J. (2007). Protective effect of lysostaphin from *Staphylococcus simulans* against growth of *Staphylococcus aureus* in milk and some other food

- products. *Journal of Food Safety*, 27:265-274.
- Van-Belkum, M.J. and Stiles, M.E. (2000). Nonantibiotics antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Product Reports*, 17: 323–335.
 - Vollmer, W., Blanot, D. and de Pedro, M.A. (2008-a). Peptidoglycan structure and architecture *FEMS Microbiology Reviews* 32, 149-67.
 - Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008-b). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32: 259–286.
 - Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D., and Lane, D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173:697-703.
 - Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M., Mitsuo, O. (2003) .Purification and Characterization of a Novel Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* Strain RJ-11. *Applied and environmental microbiology*, 71: 5746–5753.
 - Yang, R., Johnson, M. and Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3355-3359.