

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Caracterización bioquímica y molecular de las bacteriocinas producidas por *Pediococcus parvulus* MXVK133 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aisladas de productos cárnicos mexicanos”

TESIS  
Que para obtener el grado de  
Doctor en Biotecnología  
PRESENTA

**Raquel Schneider Schanzenbach**

DIRECTORES: Dra. Edith Ponce Alquicira

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Diciembre 2005

Iztapalapa, D.F., 7 de diciembre de 2005

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

“Caracterización bioquímica y molecular de las bacteriocinas  
producidas por *Pediococcus parvulus* MXVK133 y *Enterococcus  
faecalis* MXVK22 aisladas de productos cárnicos mexicanos”

que presentó

**Raquel Schneider Schanzenbach**

**Comité tutorial**

**Directores:** Dra. Edith Ponce Alquicira  
Biotecnología, UAMI



---

Dr. Francisco José Fernández Perrino  
Biotecnología, UAMI

---

**Asesores:** Dra. Isabel Guerrero Legarreta  
Biotecnología, UAMI

---

Dr. Ángel Alpuche Solís  
Biología Molecular, IPICyT

---

**Sinodales:** Dra. María del Carmen Wachter Rodarte  
Facultad de Química, UNAM

---

Dr. Carlos Regalado González  
Facultad de Química, UAQ

---

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Postgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el convenio 471-01 doctorado en Biotecnología.

Este trabajo de investigación fue realizado con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores en el marco del programa CUAUHTEMOC III SRE/ CONACYT desde Junio de 2002 hasta Mayo de 2005.

La etapa final esta tesis fue financiada con una beca otorgada por la Universidad Autónoma Metropolitana para alumnos en etapa de redacción de tesis desde Julio de 2005 hasta Diciembre de 2005.

Iztapalapa, D.F., 7 de diciembre de 2005

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

“Caracterización bioquímica y molecular de las bacteriocinas  
producidas por *Pediococcus parvulus* MXVK133 y *Enterococcus  
faecalis* MXVK22 aisladas de productos cárnicos mexicanos”

que presentó

**Raquel Schneider Schanzenbach**

### Comité tutorial

**Directores:** Dra. Edith Ponce Alquicira  
Biotecnología, UAMI

\_\_\_\_\_

Dr. Francisco José Fernández Perrino  
Biotecnología, UAMI

\_\_\_\_\_

**Asesores:** Dra. Isabel Guerrero Legarreta  
Biotecnología, UAMI

\_\_\_\_\_

Dr. Ángel Alpuche Solís  
Biología Molecular, IPICyT

\_\_\_\_\_

**Sinodales:** Dra. María del Carmen Wachter Rodarte \_\_\_\_\_  
Facultad de Química, UNAM

Dr. Carlos Regalado González \_\_\_\_\_  
Facultad de Química, UAQ

## Agradecimientos:

- A la Secretaría de Relaciones Exteriores y al CONACyT por otorgarme la beca sin la cual no hubiera podido realizar mis estudios.
- A la Universidad Autónoma Metropolitana, por recibirme en su casa y apoyarme con una beca en la finalización de mi doctorado.
- Al Postgrado de Biotecnología de la UAM Iztapalapa y en especial al Dr. Ernesto Favela por la colaboración desinteresada y la buena predisposición para la solución de los problemas.
- A la Dra. Edith Ponce Alquicira y al Dr. Francisco Fernández Perrino...mejor dicho a Edith y a Paco, que más que mis directores fueron mis amigos. Gracias por sus sabios consejos, por abrirme las puertas, por siempre estar en todo y apoyarme cada vez que lo necesité. Gracias por su profesionalismo, los quiero y admiro mucho.
- A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta por crear el nexo “argentino-mexicano” que me trajo hasta aquí, por su asesoramiento y su colaboración para conmigo.
- Al Dr. Ángel Alpuche Solís, asesor de tesis, por su seguimiento, sugerencias y opiniones.
- A los Dres. Carmen Wachter Rodarte y Carlos Regalado González por su gentileza y amabilidad, por la revisión de la tesis y por sus sugerencias constructivas.
- Al Dr. Manuel Aguilar del Instituto de Neurofisiología de la UNAM por su apoyo con la secuenciación de proteínas.
- A la Dra. “Lulú” por su siempre buen sentido del humor y por los momentos gratos compartidos.
- A mis compañeros de laboratorio que durante este tiempo vivieron conmigo las alegrías y las penas, los logros y los fracasos. Sin querer olvidarme de nadie, Elvia, Octavio, Raquel, Bacy, Marisol, Lety, Celia, Marcelo, Isadora, Hugo, Rosa, Miriam, Isela, Rocío, Julio, Cuauthemoc, Silvia y Ernesto. Gracias por integrarme al grupo y por hacerme sentir como en casa.
- A Tania, Jaime, Mónica, Edgar, Carolina y Ángel por su ayuda con las técnicas de biología molecular.
- Al “Chelo”, porque siempre estuvo y está allí, para lo que sea. También a Mercedes y a las nenas, mis sobrinas postizas, por los mates, por las largas charlas y por todo lo que hemos compartido en este tiempo.

- A “los mendocinos”, Cristian, Natalia y Darío, por los momentos lindos compartidos, por los favores, por los asados y el buen vino.
- A Pablo...por todo...fundamentalmente por el “aguante”. Por muchas cosas vividas juntos, muchas emociones y también broncas. Gracias por estar, gracias por quererme y gracias por todo lo que vendrá.
- A mis queridísimos viejos, por apoyarme siempre, toda la vida...por aguantarse mis idas y venidas, mis ausencias prolongadas y mis visitas de médico una vez al año. Gracias y mil gracias, son lo más grande que tengo.
- A mis hermanos, Gabriela, Sebastián y Silvina. También a Marina y a José por ayudar y estar cada vez que necesité una mano.
- A mis sobrinos, porque con su inocencia y su ocurrencia hacen mi vida más feliz.
- A México y su gente, por su calidez y sencillez.

Mis más sinceros agradecimientos a todos los que de una u otra manera me acompañaron durante estos años de mi doctorado.

Dedicatoria:

*A mis papás, por su amor incondicional,  
por darme todo sin jamás pedirme algo*

*A Pablo, por ser mi hombro en todo este  
tiempo*

Resumen

El desarrollo de algunos tipos de bacterias ácido lácticas en alimentos produce efectos deseables en su textura y sabor, sumado al efecto bioprotector ocasionado por la producción de ácido láctico fundamentalmente y a la producción de bacteriocinas en algunas especies.

El objetivo de esta tesis fue caracterizar funcional, estructural y molecularmente las bacteriocinas producidas por cepas microbianas aisladas de “chorizo” mexicano, un producto cárnico ampliamente consumido, para su posible utilización en la preservación de alimentos.

La primera parte de este estudio fue la caracterización bioquímica de las bacteriocinas y comprendió diversos aspectos como: la determinación del espectro inhibitorio, su carácter proteico, la asociación del crecimiento celular con la producción de bacteriocinas, su termoestabilidad, ciertos aspectos para la purificación, la determinación del punto isoelectrico, la separación electroforética y la secuenciación de aminoácidos.

En la segunda parte se realizó la caracterización molecular de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133. Aquí se trabajó en la localización e identificación del gen estructural de producción de bacteriocina y su comparación con las bacteriocinas reportadas en base de datos. Para esto, se utilizaron técnicas como: hibridación de Southern, PCR, curado de plásmidos y secuenciación de ADN.

Las propiedades fisicoquímicas y finalmente, la secuencia nucleotídica de la pediocina MXVK133 producida por *P. parvulus* indican que es idéntica a la pediocina AcH, bacteriocina de la clase IIa, con gran actividad contra *Listeria* y con la secuencia consenso YGNGV en su parte amino terminal.

En el caso de la enterocina MXVK22 podríamos sugerir que se trata de un miembro de este mismo grupo de bacteriocinas “tipo pediocinas”, ya que su secuencia de aminoácidos difiere por lo menos en dos de ellos con las bacteriocinas reportadas previamente. Sin embargo es indispensable la secuenciación completa de esta bacteriocina y su comparación en base de datos para poder confirmar esto.

Son necesarios estudios posteriores para poder obtener más información acerca de la organización del operón y de las características del plásmido que lo contiene para poder continuar con la sobreexpresión de la pediocina MXVK133 o la producción heteróloga en la misma cepa de dos o más bacteriocinas de interés como podrían ser la nisina o la enterocina MXVK22 y así ampliar el espectro inhibitorio de la cepa que las contiene.

Palabras claves: bacteriocinas-*Pediococcus*-*Enterococcus*-cárnicos

## Abstract

Antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria may significantly contribute to control of spoilage and food-borne pathogenic bacteria. Bacteriocins are antimicrobial peptides active against strains closely related to the producing microorganism.

The aim of this work was to characterize antimicrobial peptides produced by two lactic acid bacteria strain isolated from Mexican “chorizo” (a traditional, widely consumed meat product), with a view toward its possible application as natural food preservative and/or protective culture.

Bacteriocin biochemical characterization included several studies such as: antagonistic activity, purification methods optimization, bacteriocin production associated to cellular growth, isoelectric point, molecular weight, heat resistance and amino acid sequencing.

The objective of the second part was molecular characterization of the bacteriocin produced by *P. parvulus* MXVK133. To identify the bacteriocin structural gene, molecular biology techniques like Southern hybridization, PCR, plasmid curing and DNA sequencing were used. Results were compared to bacteriocin sequences published in data bases to establish similarities.

Biochemical and molecular characteristics of pediocin MXVK133 demonstrated being identical to pediocin AcH or A1, a well known class IIa bacteriocin with high antilisterial activity.

Enterocin MXVK22 biochemical properties and amino acid sequence suggested that it could be a member of class IIa YGNGV consensus motif bacteriocins. However, its complete amino acid sequence and/or cloning of the gene coding for bacteriocin production will be required to determine similarities to other antimicrobial peptides already described.

Class IIa bacteriocins have enormous potential to be used as antimicrobial substances in food, either as a purified additive or by direct inoculation of the producer strain as a starter or protective culture. With regard to new approaches, genetic modifications, such as the development of overproducing strains, are under study. Further research on alternative methods to obtain and purify large amounts of bacteriocins at reduced costs are necessary to consider industrial scale production.

Key words: bacteriocin-*Pediococcus-Enterococcus*-meat

## Índice General

Justificación.....	1
<b>1. Introducción.....</b>	<b>3</b>
1.1. Contaminación y deterioro de los alimentos.....	3
1.2. Conservación de los alimentos.....	7
1.3. Las bacterias lácticas en la fermentación de alimentos.....	8
1.4. Bacteriocinas.....	11
1.4.1. Características generales.....	13
1.4.2. Eficacia de las bacteriocinas en alimentos.....	16
1.4.3. Factores que afectan la producción de bacteriocinas.....	17
1.4.4. Mecanismo de acción.....	18
1.4.5. Resistencia a bacteriocinas.....	20
1.4.6. Pediocinas.....	21
1.4.7. Enterocinas.....	23
1.5. Aplicaciones en biotecnología.....	24
<b>2. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>29</b>
3.1. Identificación de las cepas.....	29
3.2. Caracterización bioquímica y purificación de las bacteriocinas.....	29
3.2.1. Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.....	29
3.2.2. Determinación de la actividad inhibitoria.....	30
3.2.3. Tratamiento con proteinasa K.....	31
3.2.4. Producción de bacteriocinas asociada al crecimiento celular.....	31
3.2.5. Espectro inhibitorio.....	32
3.2.6. Termoestabilidad.....	32
3.2.7. Determinación de los valores de pH óptimos para la adsorción y desorción de las bacteriocinas a las células productoras.....	32
3.2.8. Purificación de las bacteriocinas.....	33
3.2.8.1. Ultrafiltración de las bacteriocinas.....	33
3.2.8.2. Recuperación de bacteriocinas utilizando diferentes medios de cultivo.....	34

3.2.9. Isoelectroenfoque preparativo.....	34
3.2.10. Electroforesis.....	35
3.2.11. Secuenciación de aminoácidos.....	36
3.2.11.1. Inmovilización de proteínas a membranas.....	36
3.2.11.2. Secuenciación .....	37
<b>3.3. Caracterización molecular de la pediocina .....</b>	<b>38</b>
3.3.1. Aislamiento de ADN total.....	38
3.3.2. Digestión con enzimas de restricción.....	40
3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	40
3.3.4. Diseño de sondas.....	41
3.3.5. Hibridación de Southern.....	41
3.3.5.1. Transferencia a membrana de nylon a partir del gel de agarosa.....	41
3.3.5.2. Marcaje de sondas.....	43
3.3.5.3. Purificación de la sonda.....	43
3.3.6. PCR.....	45
3.3.7. Determinación de la localización en plásmido del gen para la pediocina.....	47
<b>4. Resultados y Discusión.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1. Identificación de las cepas.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2. Caracterización bioquímica y purificación de las bacteriocinas.....</b>	<b>49</b>
4.2.1. Tratamiento con enzimas.....	49
4.2.2. Espectro inhibitorio.....	50
4.2.3. Recuperación de bacteriocinas en diferentes medios de cultivo.....	53
4.2.4. Determinación de los valores de pH de máxima y mínima adsorción para la enterocina producida por <i>E. faecalis</i> MXVK22.....	55
4.2.5. Determinación de la producción máxima de las bacteriocinas según la fase de crecimiento.....	56
4.2.6. Termoestabilidad de las bacteriocinas a diferentes pH.....	58
4.2.7. Isoelectroenfoque preparativo.....	59
4.2.8. Electroforesis.....	61
4.2.9. Determinación parcial de la secuencia de aminoácidos.....	63

<b>4.3.</b> Caracterización molecular de la pediocina producida por <i>P. parvulus</i> MXVK133.....	67
4.3.1. Determinación de la localización en plásmido del gen para la pediocina.....	67
4.3.2. Hibridación de Southern.....	68
4.3.2.1. Diseño de sondas .....	68
4.3.2.2. Hibridación .....	69
4.3.3. Clonación por PCR del operón de la pediocina.....	71
4.3.4. PCR de cepas curadas y cepa original.....	72
4.3.5. Análisis de secuencia.....	73
<b>4.4.</b> Síntesis de resultados.....	76
<b>4.5.</b> Conclusiones finales.....	77
<b>4.6.</b> Perspectivas .....	77
Bibliografía.....	79
Anexo 1.....	102
Anexo 2.....	103
Anexo 3.....	104
Anexo 4.....	105

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Brotes de listeriosis.....	6
<b>Tabla 2.</b> Brotes de listeriosis en EUA (1970-2002).....	6
<b>Tabla 3.</b> Algunos cultivos iniciadores para leches fermentadas y mantequillas cultivadas.....	9
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de las bacteriocinas producidas por BAL.....	13
<b>Tabla 5.</b> Cepas utilizadas.....	30
<b>Tabla 6.</b> Espectro inhibitorio de la pediocina producida por <i>P. parvulus</i> MXVK133 y de la enterocina producida por <i>E. faecalis</i> MXVK22.....	51
<b>Tabla 7.</b> Composición de medios de cultivo utilizados.....	55
<b>Tabla 8.</b> Comparación de secuencias cortas y de alineación casi exacta para pediocina producida por <i>P. parvulus</i> MXVK133.....	64
<b>Tabla 9.</b> Comparación de secuencias cortas y de alineación casi exacta para enterocina producida por <i>E. faecalis</i> MXVK22.....	65
<b>Tabla 10.</b> Secuencias de las enterocinas más estudiadas.....	65
<b>Tabla 11.</b> Posibles codones para la codificación de los diferentes aminoácidos.....	68

## Indice de figuras

<b>Figura 1.</b> Modelo de poro en forma de cuña (nisina).....	19
<b>Figura 2.</b> Modelo de poro en forma de barril (bacteriocinas clase II).....	20
<b>Figura 3.</b> Acción de la proteinasa K sobre la pediocina producida por <i>P. parvulus</i> MXVK133 y la enterocina producida por <i>E. faecalis</i> MXVK22.....	50
<b>Figura 4.</b> Recuperación de enterocina en diferentes medios de cultivo .....	53
<b>Figura 5.</b> Recuperación de pediocina en diferentes medios de cultivo.....	54
<b>Figura 6.</b> Determinación del pH de máxima y mínima adsorción celular para la enterocina.....	56
<b>Figura 7.</b> Producción de bacteriocinas en relación a la curva de crecimiento microbiano.....	57
<b>Figura 8.</b> Termoestabilidad de la enterocina producida por <i>E. faecalis</i> MXVK22.....	58
<b>Figura 9.</b> Termoestabilidad de la pediocina producida por <i>P. parvulus</i> MXVK133.....	58
<b>Figura 10.</b> Isoelectroenfoque utilizando extracto purificado de enterocina.....	60
<b>Figura 11.</b> Isoelectroenfoque utilizando extracto crudo de enterocina.....	60
<b>Figura 12.</b> Isoelectroenfoque utilizando extracto purificado de pediocina.....	61
<b>Figura 13.</b> Isoelectroenfoque utilizando extracto crudo de pediocina.....	61
<b>Figura 14.</b> Tricina-SDS-PAGE (10-16 % T) de la enterocina .....	62
<b>Figura 15.</b> Tricina-SDS-Page (10-16 % T) de la pediocina.....	62
<b>Figura 16.</b> Hibridación de la pediocina .....	69
<b>Figura 17.</b> Fragmento amplificado por PCR correspondiente al gen estructural de la pediocina producida por <i>P. parvulus</i> MXVK133.....	71
<b>Figura 18.</b> PCR de cepas curadas y no curadas de <i>P. parvulus</i> MXVK133.....	72

**Figura 19.** Comparación de la secuencia nucleotídica obtenida para

*P. parvulus* MXVK133 con la pediocina AcH.....74

## *Justificación*

---

Las bacteriocinas de la clase IIa tienen gran actividad antimicrobiana contra *Listeria*, un patógeno de origen alimentario frecuente en brotes asociados al consumo de productos lácteos, cárnicos y vegetales contaminados.

La caracterización bioquímica y molecular de sustancias antimicrobianas naturales como las bacteriocinas es de importancia fundamental para su aplicación posterior en alimentos. Asimismo, algunas características de las cepas productoras, como condiciones óptimas de crecimiento y producción de bacteriocinas, por ejemplo, deben ser determinadas.

La caracterización de sustancias de este tipo es un paso obligado antes de su empleo directo en cualquier alimento, ya que sus propiedades fisicoquímicas y condiciones de producción determinarán en gran parte la factibilidad de sus aplicaciones futuras como antimicrobianos naturales. Por otra parte, la caracterización molecular de las bacteriocinas es necesaria para determinar algunas propiedades de importancia, como expresión, secreción, resistencia e inmunidad; además de ser una etapa indispensable para manipulaciones futuras de la cepa con vistas a la sobreproducción o producción heteróloga de las bacteriocinas.

La generación de cepas capaces de producir altas cantidades de estas sustancias resulta de gran interés ya que la cantidad de bacteriocina producida por la cepas es generalmente muy baja. Por otra parte, el mejoramiento de cepas utilizadas como cultivos iniciadores mediante la incorporación de los genes que codifican para la producción de bacteriocinas es otro paso importante en la obtención de productos alimenticios seguros de alta calidad.

# *1.Introducción*

---

## 1.1. Contaminación y deterioro de los alimentos

La contaminación de los alimentos es un problema serio para la industria alimentaria, debido a que da lugar a la aparición de productos inaceptables para el consumo humano. La producción industrial de alimentos es un proceso que se desarrolla a gran escala, razón por la cual las pérdidas por contaminación microbiana son elevadas y altamente costosas. Este fenómeno generalmente es un proceso mixto, en el que participan bacterias, levaduras, hongos y parásitos, y al mismo tiempo es un proceso competitivo, en el cual prevalecen aquellos grupos que muestran la mejor adaptación a las condiciones ambientales que se manifiestan en el producto en particular.

Los alimentos crudos de origen animal son los que tienen más probabilidad de estar contaminados aunque las frutas y legumbres que se consumen crudas también pueden estarlo. El lavado de los vegetales puede reducir el riesgo de contaminación, pero no eliminarlo. Por otra parte la utilización de aguas negras para riego de verduras y hortalizas constituye un peligro potencial de contaminación de las mismas con microorganismos patógenos. La calidad microbiológica del agua utilizada para lavar y enfriar alimentos es un

factor de vital importancia.

Los alimentos pueden contaminarse por una gran variedad de microorganismos, tanto patógenos como de deterioro. La flora inicial presente en los mismos está formada por cantidades variables de microorganismos. La capacidad de adaptación y resistencia a factores ambientales de cada microorganismo (refrigeración, actividad de agua, agentes antimicrobianos, por ejemplo), determinará qué grupos sobrevivirán y serán los dominantes.

En cuanto a la contaminación de la carne, el músculo como tal podría considerarse estéril hasta el momento de su obtención. Sin embargo, los procesos posteriores como el desollado y eviscerado siempre acarrearán cierto grado de contaminación, tanto por microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal como en la piel del animal. También los operarios y los utensilios que se utilizan durante el procesamiento de la canal aportan microorganismos indeseables a la carne. El agua utilizada para la limpieza, las superficies de contacto durante el almacenamiento y procesado, el equipo de trabajo y las puertas y paredes del local son algunas de las principales fuentes de contaminación. Por otra parte, después del sacrificio ya no existen las barreras inmunológicas que poseía el animal como defensa ante los microorganismos y los tejidos quedan entonces expuestos a un gran número de gérmenes, como los de la piel o los del tracto digestivo. El manejo incorrecto de las canales en el frigorífico limita inevitablemente el tiempo de vida de anaquel de la carne. El control de los microorganismos se logra mediante la aplicación de buenas prácticas de manufactura y por el establecimiento de la cadena de frío, fundamentalmente.

La microbiota inicial de la carne está conformada por bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las bacterias Gram negativas predominantes son *Pseudomonas* y algunas enterobacterias, mientras que entre las Gram positivas están fundamentalmente los micrococcos, bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta*. Las bacterias del género *Pseudomonas* predominan en la flora de deterioro de carnes no conservadas al vacío, las bacterias acidolácticas en carnes empacadas al vacío y *Shewanella putrefaciens* y *B. thermosphacta*, que son anaerobios facultativos y pueden acelerar el deterioro temprano de la carne, tanto en aquellas expuestas al oxígeno como en las envasadas en atmósferas

modificadas (Gill, 1998). Las bacterias acidolácticas proliferan fundamentalmente en condiciones de alta humedad; las principales alteraciones que producen son el “inflado” del empaque de carnes almacenadas bajo vacío, debido a la producción de gas, y la acidificación del producto ocasionada por la producción de ácido láctico.

Otros grupos presentes, en menor medida, son las bacterias saprofíticas Gram positivas (por ejemplo *Kurthia* y algunos estafilococos no toxigénicos). Los gérmenes patógenos y toxinogénicos provienen, por lo general, del tracto gastrointestinal de los animales faenados, de animales enfermos o de contaminación cruzada debida a los operarios. Algunos ejemplos de éstos son *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, estreptococos del grupo A, *Clostridium* spp. (fundamentalmente *C. perfringens* A y C, *C. bifermentans*, *C. botulinum* A, B, E y F, *C. novyi* y *C. sordellii*). La sola presencia de cualquiera de estos microorganismos constituye un riesgo para la salud. *C. perfringens* y *Staphylococcus aureus* están asociados a intoxicaciones alimentarias por carnes; *Salmonella*, *Escherichia coli* verocitotoxigénica, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolítica*, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila*, son causantes de enfermedades entéricas y, en la mayoría de los casos también, de enfermedades sistémicas.

*L. monocytogenes* es un contaminante frecuente de alimentos. Su capacidad de sobrevivir y crecer a temperaturas de refrigeración permite a esta bacteria acumularse en los alimentos durante su almacenamiento y la convierte en un riesgo potencial para los consumidores, sobre todo para los individuos inmunocomprometidos. Por otra parte, *Listeria* es relativamente tolerante a factores como el NaCl y valores de pH reducidos. En el caso de alimentos con valores de pH bajos o a los que se les ha agregado ácidos orgánicos, las listerias que llegan a sobrevivir en estas condiciones pueden recuperarse y crecer a bajas temperaturas, si es que no existen otras barreras antimicrobianas presentes. Además, la exposición de la bacteria a ácidos induce una respuesta de estrés, haciendo a la bacteria más tolerante a condiciones más ácidas, a etanol y a peróxido de hidrógeno (Doyle, 1999).

Los alimentos implicados en brotes de listeriosis (Tablas 1 y 2) incluyen los cuatro grandes grupos nutricionales: lácteos, vegetales, carnes y pescados.

**Tabla 1.** Brotes de listeriosis

Año	País	Casos (muertes)	Alimento
1980-81	Canadá	41 (18)	Ensalada de col
1983	EUA	49 (14)	Leche pasteurizada
1983-87	Suiza	122 (34)	Pastel de nata
1985	EUA	142 (48)	Queso suave estilo mexicano
1987-89	Reino Unido	>350 (>90)	Paté belga
1992	Nueva Zelanda	4 (2)	Mejillones ahumados
1992	Francia	279 (63)	Lengua de cerdo
1994	EUA	45 (0)	Leche chocolatada
1995	Francia	20 (4)	Queso suave de leche cruda

Fuente: Bell y Kyriakides (1998)

**Tabla 2.** Brotes de listeriosis en EUA (1970-2002)

Año	Alimento involucrado	Casos	Mortalidad (% del total)
1979	Vegetales crudos o queso	20	3 (15.0)
1983	Leche fluida pasteurizada	32	14 (43.8)
1985	Queso estilo mexicano (leche cruda)	142	48 (33.8)
1986-1987	Helado, salami, queso	36	16 (44.4)
1986-1987	Huevo crudo	2	Desconocido
1987	Manteca	11	Desconocido
No especificada	Vegetales congelados	7	Desconocido
1998-1999	Hot dogs, carnes	101	21 (20.8)
1999	Paté	11	Desconocido
2000	Delicatessen de carne de pavo	29	7 (24.1)
2000-2001	Queso estilo mexicano casero (leche cruda)	12	5 (41.7)
2002	Delicatessen de carne de pavo	63	7 (11.1)
Total		466	

Fuente: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov). (Centers for Disease Control and Prevention, julio 2005)

*Listeria* spp. está presente en una gran variedad de alimentos crudos naturalmente expuestos a fuentes de contaminación ambiental. Debido a esto las condiciones y prácticas

---

de higiene a lo largo de la cadena de producción de alimentos deben ser muy cuidadosas.

Algunos tratamientos aplicados a alimentos con algún grado de procesamiento pueden ser eficaces en la eliminación de las listerias que pudieran estar presentes en los mismos. Las listerias pueden sobrevivir durante varias semanas en algunos alimentos congelados, además de poder crecer a temperaturas de refrigeración (0-8°C) aunque de manera lenta. *L. monocytogenes* no es termoresistente, por lo que los tratamientos de cocción bien controlados logran reducir significativamente el número de estos microorganismos (Bell y Kyriakides, 1998). Otros factores como el pH y la actividad de agua (aa) también pueden reducir el número de listerias. El efecto bacteriostático de la baja aw sobre *L. monocytogenes* se potencia al almacenar los productos en refrigeración (Bell y Kyriakides, 1998). La combinación de factores físicoquímicos como pH, temperatura y actividad de agua tienen generalmente mayor efecto antimicrobiano que cualquiera de estos factores utilizados individualmente.

## 1.2. Conservación de los alimentos

Como se mencionó anteriormente, las características físicoquímicas de los alimentos los convierten en un medio óptimo para el crecimiento de microorganismos, tanto patógenos como deteriorantes. Debido a esto, es necesaria la aplicación de medidas de conservación que logren prolongar la vida de anaquel de los mismos.

Los procesos que se utilizan para preservar productos alimenticios son variados, y a su vez la combinación de dos o más de estos procesos en un mismo producto es práctica corriente. En el caso de alimentos cárnicos, probablemente la técnica de preservación más difundida sea la refrigeración, combinada o no con otro tipo de métodos como puede ser el envasado al vacío, la deshidratación, el curado, la cocción, la irradiación, la adición de agentes antimicrobianos o sales, etc.

La incorporación de sustancias antimicrobianas a películas de recubrimiento en carnes ha sido probada por varios investigadores. Mauriello y col. (2004) incorporaron la bacteriocina producida por *Lactobacillus curvatus* a recubrimientos de polietileno y lograron la reducción de un orden de magnitud en la población de *L. monocytogenes* inoculada en carne de cerdo y vacuno. Siragusa y col. (1999) encontraron una disminución de dos órdenes de magnitud para *B. thermosphacta* en carnes empacadas al vacío cubiertas con una película con nisina; Kim y col. (2002) incorporaron nisina o lacticina a recubrimientos en carnes para el control de microorganismos aerobios totales y coliformes. Dentro de las sustancias utilizadas hasta la fecha en los recubrimientos están bacteriocinas, solas o en combinación de agentes tales como ácidos orgánicos (Eswaranandam y col., 2004), o sustancias quelantes como el EDTA.

### 1.3. Las bacterias lácticas en la fermentación de alimentos

El desarrollo de algunos tipos de bacterias ácido lácticas (BAL) en alimentos produce efectos deseables en su textura y sabor. Su aplicación se ha extendido a varios tipos de alimentos y algunos de los usos más difundidos de las mismas se detallan a continuación (Lücke, 1996):

- Cultivos iniciadores en productos cárnicos, lácticos y vegetales
- Cultivos probióticos en alimentos para humanos y animales
- Cultivos protectores

El agregado directo de cultivos iniciadores seleccionados a materiales crudos ha aportado grandes beneficios en la obtención de alimentos fermentados, permitiendo un alto grado de control sobre el propio proceso fermentativo y logrando la estandarización del producto final. Las cepas utilizadas en este tipo de procesos son usualmente aisladas de hábitats naturales o de fermentaciones ocurridas naturalmente en alimentos de origen similar (Leroy y de Vuyst, 2004).

Su utilización como conservadores en alimentos se debe a la producción de ácidos (láctico, fundamentalmente, y acético) derivados de su metabolismo, que contribuyen a la disminución de la microbiota contaminante (Daeschel, 1989; Stiles, 1996; Cleveland y *col.*, 2001; Signorini, 2002; Signorini y *col.* 2003; Park y *col.*, 2005).

- Productos lácteos:

De todos los productos fermentados por BAL los lácteos son los más importantes tanto en volumen como en valor de mercado (Tabla 3). En general, todas las fermentaciones lácteas comprenden una fermentación láctica inicial seguida por fermentaciones secundarias efectuadas por cierto tipo de microorganismos, como propionibacterias o brevibacterias, que contribuyen a las características sensoriales deseables en algunos productos.

La acidificación producida por la producción de ácidos orgánicos por parte de las BAL puede provocar en alimentos proteicos modificaciones en la textura. Sobre los componentes del aroma, las BAL no aportan demasiado, si bien en algunos productos como la mantequilla o algunos quesos la producción de diacetilo puede resultar importante.

**Tabla 3.** Algunos cultivos iniciadores para leches fermentadas y mantequillas cultivadas.

Producto tipo	Composición del cultivo	Actividad metabólica deseable
Mantequilla, crema ácida, mantequilla ácida. Leche ácida estilo escandinavo	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> y <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> biovar <i>diacetiactis</i> , <i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	Ácido láctico a partir de lactosa, diacetilo a partir de citrato.
Yoghurt	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Ácido láctico a partir de lactosa, acetaldehído a partir de piruvato o treonina
Kefir	<i>L. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. kefirgranum</i> , <i>L. paraquefir</i> , <i>Leuconostoc</i> sp.	Ácido láctico a partir de lactosa, diacetilo a partir de citrato.

Fuente: Lücke, 1996.

- Productos cárnicos:

Algunas bacterias lácticas productoras de bacteriocinas son utilizadas como cultivos iniciadores en la producción de embutidos fermentados. Estos cultivos se presentan en estado puro o mixto y han sido seleccionados de acuerdo a propiedades específicas para el producto en que se vayan a aplicar, con el objeto de mejorar su aspecto, aroma, sabor y la conservación de los mismos (Leroy y *col.*, 2005). Otro factor importante a tener en cuenta es la inocuidad de las cepas.

Los cultivos iniciadores tienen su origen en aislamientos seleccionados, provenientes generalmente de la microbiota natural de la propia carne. Los microorganismos más importantes y más difundidos a nivel comercial son las bacterias acidolácticas y los pertenecientes a la familia *Micrococcaceae*. Todas las BAL usadas en la fermentación de embutidos son homofermentativas. Estos microorganismos producen un descenso en el pH a valores por debajo de 5.3 por formación de ácido láctico, contribuyendo así a la inhibición de gérmenes patógenos y de deterioro. Además, este pH bajo acelera la formación del color curado y la coagulación de proteínas solubles facilita el secado. También el aroma puede estar influenciado por las BAL en estos productos, debido a la formación de ácido acético y diacetilo.

Los preparados de BAL disponibles comercialmente más difundidos contienen: *L. plantarum*, *L. sake*, *L. curvatus*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*. En cuanto a los integrantes de la familia *Micrococacceae*, se encuentran fundamentalmente especies de *Micrococcus*, y se agregan al alimento con el objeto de reducir los nitratos a nitritos, generando así efectos positivos sobre el color y el aroma del curado. Los preparados existentes en el mercado contienen *Micrococcus varians*, *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus carnosus*. A continuación se mencionan algunas de sus características:

- Mesófilicos: *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* y *P. pentosaceus*. Crecen lo suficientemente rápido en productos fermentados a 20-25°C para asegurar un período de fermentación relativamente corto. Algunas cepas de *Lactobacillus*

reducen nitratos a nitritos.

- Psicrótrofos: *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sake*. Son efectivos en la supresión de otras bacterias, incluidas las lácticas, a temperaturas de 20-22°C. Tienen el inconveniente de que pueden continuar produciendo ácido a temperaturas más bajas, pudiendo ocasionar la sobreacidificación del producto.
- Termofílicos: *Pediococcus acidilactici*. Principalmente utilizado en los embutidos de verano de Estados Unidos que son fermentados a 37°C durante un período muy corto (Hammes y Knauf, 1994).

Dentro de los productos cárnicos, los embutidos crudos curados son los fermentados más importantes. Las salmueras con concentraciones de más del 12% de NaCl (aa por debajo de 0.91) inhiben cualquier desarrollo de bacterias lácticas. Las condiciones que favorecen el crecimiento de estas bacterias durante el período de fermentación incluyen un pH por debajo de 6.0 (valor normal de la carne de vacuno y cerdo), una aa inicial entre 0.955 y 0.965 (por adición de 2.5 a 3% de sal), el agregado de por lo menos 0.3% de un azúcar fácilmente fermentable y entre 100-150 mg/kg de nitrito de sodio.

Los cultivos iniciadores a utilizarse en carnes deben ser competitivos en sistemas de carne salada y tener actividad antagónica contra patógenos. Ya hay cepas productoras de bacteriocinas que han sido seleccionadas y evaluadas para su utilización en productos cárnicos fermentados (Cintas y col., 1995; Jack y col., 1996; Martínez y col., 2000b; Mora y col., 2003)

## 1.4. Bacteriocinas

Algunas BAL tienen la propiedad de sintetizar sustancias antimicrobianas como parte de un mecanismo de defensa y de competencia ante otros microorganismos (Klaenhammer, 1988 y 1993; Daeschel, 1989; Jack y col., 1995; Nes y col., 1996). Estas sustancias, conocidas como bacteriocinas, han despertado el interés de muchos

investigadores debido a su carácter antimicrobiano natural, con potencial aplicación para el control de microorganismos patógenos y de deterioro en alimentos. Sumado a esto, el origen proteico de las mismas representa una ventaja adicional, ya que durante el paso por el tracto digestivo son inactivadas por las proteasas presentes en el estómago, evitando así problemas de resistencia o inhibición de la microbiota normal del tracto gastrointestinal.

Dentro de los géneros de BAL productores de bacteriocinas se han reportado *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus*, entre otros (Bareffot y Klaenhammer, 1983; Schillinger y col., 1991; Jack y col., 1995; Cintas y col., 1998; Katla y col., 2002).

El espectro de actividad que presentan las bacteriocinas es variable pero en general actúan contra especies emparentadas filogenéticamente, siendo fundamentalmente, bacterias Gram positivas. Su utilización como antimicrobiano frente a bacterias Gram negativas ha dado buenos resultados solamente cuando fueron combinadas con alguna otra sustancia como el EDTA (Tu y Mustapha, 2002) o algún ácido orgánico (Mustapha y col., 2002).

La mayoría de las bacteriocinas de BAL son péptidos catiónicos, hidrofóbicos o anfifílicos compuestos de 20 a 60 aminoácidos (Nes y Holo, 2000). Estas sustancias han sido agrupadas según características diversas como espectro de inhibición, mecanismo de acción, estructura química, tamaño y resistencia a temperatura (Klaenhammer, 1993; Nes y col., 1996) (Tabla 4):

**Tabla 4.** Clasificación de las bacteriocinas producidas por BAL.

Clase	Subclase	Descripción
Clase I		Lantibióticos
Clase II		Pequeñas (<10 kDa), estabilidad térmica moderada (100°C) a alta (121°C), péptidos activos de membrana, no contienen lantibióticos
	IIa	Péptidos activos contra <i>Listeria</i> con secuencia Y-G-N-G-V-X-C cerca del extremo amino terminal
	IIb	Bacteriocinas de 2 péptidos
	IIc	Bacteriocinas producidas por la vía secretora general ( <i>sec pathway</i> ) (Nes y col., 1996) o péptidos tiol activados (Klaenhammer, 1993)
Clase III		Proteínas de alto peso molecular (>30 kDa) lábiles al calor
Clase IV		Bacteriocinas complejas: proteínas con lípidos y/o carbohidratos

Fuente: Ouwehand, 1998

Recientemente, Cotter y col. (2005), sugirieron una modificación a esta clasificación en donde quedan agrupadas las bacteriocinas en dos grupos mayoritarios: los lantibióticos que contienen lantionina en la Clase I y las bacteriocinas que no contienen lantionina en la Clase II, mientras que las bacteriocinas de alto peso molecular y termolábiles (antigua clase III) quedarían agrupadas bajo la designación de “bacteriolisinas”. Con respecto a la Clase IV, estos autores no la incluyen dentro de esta clasificación debido a que ninguno de los miembros de este grupo ha sido lo suficientemente caracterizado como para demostrar su existencia.

### 1.4.1. Características generales

#### Clase I: Lantibióticos

Esta clase de bacteriocinas son moléculas pequeñas (<5 kDa), termoestables, caracterizadas por la presencia de aminoácidos no comunes (deshidroalanina, deshidrobutirina, lantionina, β-metil-lantionina, por ejemplo) en su estructura. Se sintetizan en forma de propéptidos, sufriendo modificaciones postraduccionales que originan la aparición de aminoácidos modificados. Las bacteriocinas de esta clase fueron subdivididas

en tipo A y B según su estructura química y actividad antimicrobiana (Jung, 1991; Sahl y Bierbaum, 1998).

Los lantibióticos del tipo A son moléculas anfifílicas, flexibles y de forma alargada con 2-7 cargas positivas netas y forman poros en las membranas bacterianas. A este grupo pertenece la nisina. Otras bacteriocinas que han sido agrupadas en el tipo A son: subtilina, Pep5, epilacina K7, epidermina y gallidermina, entre otras. En el tipo B se agrupan péptidos de forma globular, fuertemente anfifílicos, que producen la muerte celular mediante la inhibición enzimática de la síntesis de la pared celular. Ninguno de ellos es producido por bacterias lácticas. Algunos ejemplos de las bacteriocinas de este grupo son mersacidina y actagardina (Sahl y Bierbaum, 1998).

## **Clase II: No lantibióticos, péptidos activos contra *Listeria***

Este grupo incluye péptidos pequeños (<10 kDa), estables al calor y es el grupo que mayor cantidad de bacteriocinas comprende. Se divide en tres subgrupos. El primero de ellos, la **clase IIa**, incluye péptidos similares a pediocina (*pediocin-like peptides*), que contienen una secuencia aminoacídica consenso en su extremo amino terminal (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Cys). El gran interés que han recibido las bacteriocinas de este grupo ha sido fundamentalmente debido a la alta actividad contra *Listeria* que presentan (Ennahar y Deschamps, 2000). Dentro de las BAL que producen este tipo de bacteriocinas encontramos *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Leuconostoc*. Yamazaki y col. (2005), han descrito una bacteriocina perteneciente a esta clase, la piscicolina (producida por *Carnobacterium piscicola* aislado de surimi), que a diferencia del resto del grupo posee L en lugar de V final de la secuencia consenso (YGNGL en vez de YGNGV).

La **clase IIb** agrupa bacteriocinas cuya actividad requiere la acción complementaria de dos péptidos (Nissen-Meyer y col., 1992). Aquí encontramos a la lactococcina G, lactococcina M y plantaricina A, entre otras (Chen y Hoover, 2003).

La **clase IIc** comprende todos aquellos no lantibióticos que no pertenecen a las clases IIa o IIb. Como ejemplos se pueden mencionar la acidocina B, divergicina A, enterocina P, enterocina B y enterocina L50, entre otras.

Van Belkum y Stiles (2000) presentan algunas modificaciones a la clasificación de las bacteriocinas clase II. Estos autores dividen a la clase II en 6 subgrupos, dándole la denominación de cistibióticos y thiolibióticos citada por Jack y *col.* (1995) para las bacteriocinas de la clase IIa con uno o dos pares de cisteínas que forman puentes disulfuro (cistibióticos) y para aquellas que poseen una sola cisteína que debe estar reducida en su forma de thiol para ser activa (thiolibióticos). En la clase IIa agrupan a las bacteriocinas que contienen dos puentes disulfuro en su estructura (PA-1, enterocina A y divercina V41), mientras que en la clase IIb incluyen a las que poseen un sólo puente disulfuro en su extremo amino terminal (leucocina A, mesentericina Y105, carnobacteriocina B2, carnobacteriocina BM1, sakacina P, curvacina A, enterocina P y bacteriocina 31). En la subclase IIc engloban los cistibióticos que carecen de la región consenso Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Cys (carnobacteriocina A y enterocina B). En el grupo IId colocan a las lactococinas A y B, que carecen también de la secuencia consenso y contienen uno o ningún residuo de cisteína. En la clase IIe agrupan a aquellos péptidos ya mencionados anteriormente que requieren la acción complementaria de dos péptidos para actuar. El subgrupo IIf o bacteriocinas clase IIa atípicas comprende péptidos cíclicos y otras que no requieren péptido líder (AS-48, gassericina A, acidocina B y enterocinas L50 A y B).

En la clasificación sugerida por Cotter y *col.* (2005) este grupo aparece bajo la denominación de bacteriocinas clase II que no contienen lantionina, dividiéndolas en subclase a (bacteriocinas “pediocin-like”), subclase b (bacteriocinas de dos péptidos), subclase c (bacteriocinas cíclicas) y subclase d (bacteriocinas de un solo péptido y lineares).

### **Clase III:**

Aquí se encuentran bacteriocinas de mayor tamaño (>30 kDa) y termolábiles. La mayoría de ellas son producidas por bacterias del género *Lactobacillus* (Óscariz y Pisbarro,

2001). Como ejemplos se pueden mencionar a la helveticina J y la lacticina B.

#### **Clase IV** (Klaenhammer, 1993):

Esta clase comprende péptidos complejos que requieren moléculas lipídicas o carbohidratos en conjunción con la fracción proteica para su actividad. Estas bacteriocinas incluyen glucoproteínas, como la leucocina S (Lewus y *col.*, 1992) y la lactocina 27 (Upreti, 1994), lipoproteínas como la mesentericina 52 (Sudirman y *col.*, 1994) y glucolipoproteínas como la fermenticina (de Klerk y Smit, 1967).

#### 1.4.2. Eficacia de las bacteriocinas en alimentos

La composición química y las condiciones físicas del alimento pueden tener gran importancia sobre la actividad de la bacteriocina. Varios investigadores han trabajado en cepas de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas con vistas a su utilización como cultivos iniciadores en alimentos fermentados. Nuñez y *col.* (1997) inocularon queso manchego con *Enterococcus faecalis* productor de bacteriocina y lograron reducir los conteos de *L. monocytogenes* en 6 órdenes de magnitud después de 7 días. De la misma forma Campanini y *col.* (1993) lograron reducir la población contaminante de *L. monocytogenes* en salami al inocular el producto con una cepa de *L. plantarum* productor de bacteriocina. Como *Pediococcus* no tiene aplicación como cultivo iniciador en quesos, Buyong y *col.* (1998) expresaron el operon que codifica para la producción de pediocina en *L. lactis* para asegurar la calidad microbiológica durante la fermentación. Con esto obtuvieron una reducción en la población de *L. monocytogenes* de 5 ciclos logarítmicos después de dos semanas de maduración en queso cheddar.

Como las bacterias lácticas se encuentran comúnmente en carnes, las bacteriocinas de estos microorganismos han sido ampliamente investigadas, aunque para la aplicación de estas sustancias en alimentos se requiere tener en cuenta que las condiciones imperantes en el mismo podrían ser sustancialmente distintas a las existentes *in vitro*. Un ejemplo típico de esto es el caso de la nisina A en carnes. Este péptido es 200 veces más soluble a pH 2 que a

pH 8 (Cleveland y *col.*, 2001). Debido a su capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de *Clostridium*, podría haberse utilizado como alternativa al uso de nitritos en carnes, sin embargo las condiciones de pH y las interacciones con componentes de la carne disminuyen su eficacia como antimicrobiano (de Vuyst y Vandamme, 1994a). Debido a estos inconvenientes, se han estudiado otras bacteriocinas como leucocina A, enterocina, sakacina y carnobacteriocinas A y B como preservantes en carnes crudas, aunque los mejores resultados se obtuvieron con la pediocina PA-1 producida por *P. acidilactici* (Nielsen y *col.*, 1990).

En general, la utilización de bacteriocinas en alimentos estaría contemplada como parte de un mecanismo de barreras y no como agente preservante único.

#### 1.4.3. Factores que afectan la producción de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas está influenciada por diversos factores. Si bien la síntesis de de estas sustancias en muchos casos tiene una relación linear con el incremento de masa celular microbiana (Aymerich y *col.*, 2000b; Guerra y Pastrana, 2003) algunos autores encontraron desviaciones a esta linearidad, relacionadas en general con complejas interacciones que afectan la síntesis de bacteriocinas, como la composición del medio de cultivo y las condiciones de fermentación (Biswas y *col.*, 1991; Kim y *col.*, 1997, Guerra y *col.*, 2001). Yang y Ray (1994) estudiaron algunos factores que influyen la producción de bacteriocinas. Con respecto a la composición del medio de cultivo encontraron que la suplementación del medio con triptona (1.5%), glucosa (2%) y/o extracto de levadura (1.5%) incrementaron la producción de pediocina AcH, coincidiendo con lo reportado por Biswas y *col.* (1991).

El pH del medio de cultivo es también un factor importante. Bacteriocinas como la pediocina AcH requieren un pH de 3.6/3.7 para maximizar su producción (Biswas y *col.*, 1991). Sin embargo la nisina o la leuconocina fueron producidas en mayor cantidad a valores de pH de 5.8 y 5 respectivamente (Yang y Ray, 1994).

Aymerich y *col.* (2000a) evaluaron el efecto de algunos ingredientes y aditivos utilizados en la elaboración de embutidos sobre la producción de enterocinas A y B por parte de *E. faecium* CTC492. Los autores determinaron que aditivos como el cloruro de sodio y la pimienta disminuyeron 16 veces la producción de enterocina, sin afectar la masa celular microbiana. La posible explicación de este fenómeno estaría en los iones sodio de la sal y en el manganeso que contiene la pimienta, que podrían competir con la enterocina F por los sitios de unión de la proteína sensora, bloqueando así la producción de las enterocinas A y B (Aymerich y *col.*, 2000a). Sin embargo, estas bacteriocinas aplicadas como aditivo redujeron en forma significativa (1.13 órdenes de magnitud) el conteo de *L. monocytogenes* en estos productos, por lo que podría ser considerada su utilización como uno más de los obstáculos dentro de la tecnología de barreras en la preservación de embutidos fermentados contra *Listeria*. Por otra parte, los mismos autores reportaron incrementos en la actividad inhibitoria al agregar Tween 80 al medio de cultivo. De la misma forma, la adición de glucosa (0.5%) o la combinación de sacarosa (2%) y glucosa (0.25%) también mejoraron notablemente la producción de bacteriocinas. En general, las condiciones de cultivo que propician una mayor densidad celular son también las que mayores cantidades de bacteriocinas producen.

#### 1.4.4. Mecanismo de acción

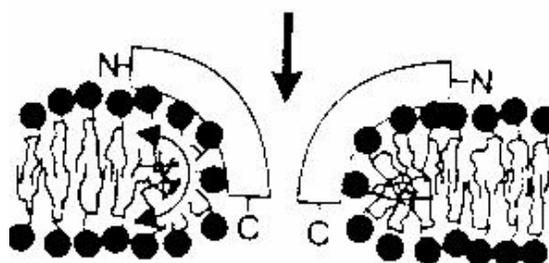
Diversos mecanismos de acción han sido propuestos para describir la acción bactericida de las bacteriocinas. La formación de poros o canales selectivos es uno de los mecanismos mayormente descritos. El espectro de acción, relativamente reducido, que poseen algunas de ellas, sugiere la presencia de receptores moleculares a nivel de membrana en la célula blanco, aunque esto no ha sido demostrado aún (van Belkum y Stiles, 2000).

El extremo hidrofílico amino terminal de la molécula es la parte donde se daría la interacción inicial con las cabezas de los fosfolípidos aniónicos de la membrana. El extremo C terminal de la molécula, que es más hidrofóbico que el amino, se cree que tiene relación con las interacciones hidrofóbicas con la membrana. Por otra parte, esta región parece ser importante en la determinación de la especificidad de la bacteriocina a sus células blanco, ya

que algunas variantes de bacteriocinas con la región C terminal alterada por mutagénesis dirigida mostraron un espectro de acción diferente al de las cepas nativas (Fimland y *col.*, 2000 y 2002). Johnsen y *col.* (2005) también obtuvieron resultados similares al trabajar con bacteriocinas híbridas. Estos autores encontraron que el espectro antimicrobiano de estos híbridos era similar al de la bacteriocina de la cual derivaba el extremo C-terminal.

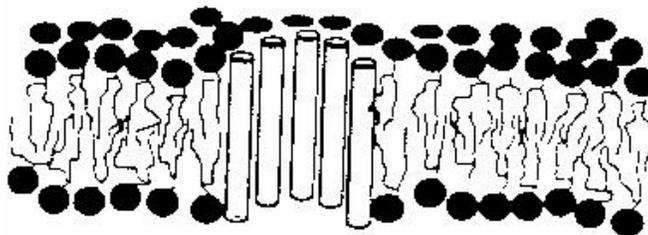
Para el caso de la nisina, que posee un espectro de actividad inhibitoria más amplio, se ha sugerido la ausencia de los receptores requeridos para su acción, o bien la presencia de un receptor universal. Varios autores (Brötz y *col.*, 1998; Gravesen y *col.*, 2004) mencionan que la nisina ejercería su acción antimicrobiana a través de la formación de poros en la membrana citoplasmática mediada por la interacción con el lípido II, precursor de los peptidoglicanos. Esta interacción hace que la nisina inhiba la síntesis de peptidoglicanos y forme poros muy específicos (Wiedemann y *col.*, 2001). Aparentemente, gran parte de los lantibióticos actúan utilizando el lípido II como blanco y uniéndose a él llevan a cabo un mecanismo de acción dual, que previene la síntesis de peptidoglicanos por un lado y por el otro forman los poros (Cotter y *col.*, 2005). El modelo de poro que se ha sugerido por Moll y *col.* (1999) para la nisina es conocido como en forma de cuña (“wedge model”, Figura 1).

Las bacteriocinas de la clase II forman poros en forma “de barril” (“barrel stave” Figura 2); esto implica la unión cooperativa de monómeros a la membrana, la inserción posterior en la misma y, finalmente, la agregación, llevando a la formación de poros que rodean un área central (Ennahar y *col.*, 2000).



**Figura 1.** Modelo de poro en forma de cuña (nisina)

Fuente: Moll y *col.*, 1999.



**Figura 2.** Modelo de poro en forma de barril (bacteriocinas clase II)

Fuente: Moll y *col.*, 1999.

La interacción inicial de las bacteriocinas de la clase II con la membrana dependería en primera instancia de los fosfolípidos aniónicos de la membrana citoplasmática produciéndose entonces su desestabilización. Esto aumenta la permeabilidad de la misma y ocasiona el escape de material intracelular. Algunos estudios con PA-1 sugirieron que se requería la presencia de un receptor proteico en la membrana para que la bacteriocina pudiera actuar (Bhunja y *col.*, 1991; Ennahar, 2000). Sin embargo, otros estudios con vesículas lipídicas preparadas de *L. monocytogenes* demostraron que la PA-1 funciona en ausencia de receptor proteico (Chen, y *col.*, 1997a y 1997b). Ciertos cambios en la membrana celular podrían entonces influenciar la adhesión y formación de poros mediados por la bacteriocina.

#### 1.4.5. Resistencia a bacteriocinas

La utilización de cultivos iniciadores productores de bacteriocinas como preservantes naturales en alimentos ha despertado gran interés. En los últimos años se han realizado grandes avances en los conocimientos sobre mecanismos de acción, estructura y síntesis y caracterización molecular de estas sustancias. Sin embargo, el surgimiento de cepas resistentes a bacteriocinas hizo necesaria la ampliación de los estudios hacia ese campo.

Crandall y Montville (1998) propusieron que la tolerancia a nisina en *L. monocytogenes* podría aumentar por alguno de los siguientes factores: 1) cambios en la pared celular que disminuyan la difusión pasiva de moléculas a través de la misma; 2)

disminución de sitios de unión en la membrana (por ejemplo fosfolípidos aniónicos); y 3) competición por los sitios de unión, como sucedería con la presencia de cationes divalentes. También se reportó (de Martinis y *col.*, 1997) que la exposición a bajas temperaturas (10°C) y la presencia de sales (2-3 % de NaCl) aumenta la tolerancia a nisina en *L. monocytogenes*. Jydegaard y *col.* (2000) determinaron que la pediocina PA-1 era incapaz de inhibir en la misma forma células sometidas a estrés osmótico (6.5% NaCl) o a bajas temperaturas (5°C durante 60 minutos) que células no sometidas a estos tratamientos.

Estudios recientes sobre cepas de *L. monocytogenes* resistentes a bacteriocinas de la clase IIa (Gravesen y *col.*, 2002; Vadyvaloo y *col.*, 2004) indican que existe un mecanismo de acción común entre varias cepas de *L. monocytogenes* y de *Enterococcus faecalis* (Hécharad y *col.*, 2001). Este mecanismo estaría ligado a la ausencia de la subunidad EIIAB de una manosa permeasa del sistema fosfotransferasa (PTS), implicado en el transporte de azúcares por translocación de grupo. Ramnath y *col.*, (2004) demostraron que la expresión del operón *mptC*, que codifica para la subunidad mencionada, induce sensibilidad a varias bacteriocinas de la clase IIa en *L. lactis*.

#### 1.4.6. Pediocinas

Este tipo de bacteriocinas pertenece a la clase IIa, también denominada “tipo pediocinas” según la clasificación presentada anteriormente. La característica más trascendental de este grupo la constituye su gran efectividad contra *Listeria* (Aymerich y *col.*, 1996; Bennik y *col.*, 1999). Las bacteriocinas “tipo pediocinas” son producidas por varias BAL y se conocen por lo menos catorce bacteriocinas diferentes. Algunas de ellas son: PA-1, leucocina A, UAL-187, mesentericina Y105, sakacina P entre otras (Johnsen y *col.*, 2000).

A partir de la caracterización de la PA-1 (AcH) muchos estudios se han hecho sobre este tipo de bacteriocina (Bhunja y *col.*, 1991; Marugg y *col.*, 1992; Chikindas y *col.*, 1993; Ray y *col.*, 1999; Halami y *col.*, 2000; Johnsen y *col.*, 2000). El análisis de las secuencias aminoacídicas de nueve pediocinas provenientes de diversas cepas de *Pediococcus* (PAC1.0,

H, LB42-923, UL5, entre otras) demostraron ser idénticas a la PA-1 (Ray y Miller, 2000), si bien Bauer y col. (2005) describieron recientemente la caracterización parcial de la pediocina PD-1 producida por *P. damnosus* y que muestra homología parcial con el antibiótico plantaricina C. Además Ennahar y col. (1996) describieron la producción de Pediocina AcH por *Lactobacillus plantarum*. La pediocina PA-1 está constituida por 44 aminoácidos con un peso molecular estimado de 4,628 Da (Ray y Miller, 2000) y posee dos puentes disulfuro que sumados a una secuencia de 5 aminoácidos, YGNGV, (presente en todas las bacteriocinas de este grupo) serían indispensables para su actividad bactericida (Jack y col., 1995; Ennahar y col., 2000; Fimland y col., 2000). Presenta carácter catiónico debido a la presencia de 3 histidinas y cuatro lisinas; el carácter hidrofóbico se debe al contenido relativamente alto en aminoácidos no polares, característica por la cual tiende a formar agregados (Ray y Miller, 2000).

En cuanto al espectro inhibitorio, las pediocinas se caracterizan fundamentalmente por su inhibición sobre *L. monocytogenes*. Muchos autores han aplicado esta bacteriocina en distintos alimentos para estudiar su efectividad como antimicrobiano (Buyong y col., 1998; Bennik y col., 1999; Loesner y col., 2003). Con la aplicación de pediocina, en combinación con otros métodos como la irradiación, se ha logrado un efecto sinérgico en la inhibición de *L. monocytogenes* en salchichas inoculadas con este patógeno (Chen y col., 2004). Daeschel y Klaenhammer (1985) reportan la inhibición de varias cepas de *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *S. aureus*, *L. lactis*, *Lactobacillus spp.*, *C. botulinum*, *C. perfringens* y *C. sporogenes*.

Muchos investigadores han trabajado en la dilucidación de los mecanismos de expresión genética de estas sustancias. Los trabajos reportados hasta el momento indican, en la mayoría de los casos, una codificación plasmídica para la producción de pediocina, siendo dichos plásmidos generalmente menores a 20 kpb (Ray y Miller, 2000).

La producción de esta pediocina parece estar mediada por un operón que contiene cuatro genes: *pedA*, B, C y D (*papA*, B, C y D) (Marugg y col., 1992; Bukhtiyarova y col., 1994; Motlagh y col., 1994; Venema y col., 1995). Estudios de mutación y delección de estos

cuatro genes revelaron que la pediocina PA-1/AcH se producía sólo en las células transformadas que tenían intactos los genes *ped* (*pap*) A y D, mientras que el gen C, junto con el D, serían necesarios para el transporte de la pediocina. La función de *pedB* está relacionada con la inmunidad de la bacteria hacia su propia bacteriocina (Marugg y col., 1992; Bukhtiyarova y col., 1994; Venema y col., 1995). Miller y col. (2005) analizaron la secuencia y localización de plásmidos de *P. parvulus*, *P. pentosaceus* y *L. plantarum* productores de pediocina AcH y encontraron que el operón que codifica para la producción de esta bacteriocina, y que se encuentra codificado en plásmidos distintos, es idéntico en distintas especies y géneros de bacterias acidolácticas.

#### 1.4.7. Enterocinas

Las bacteriocinas producidas por especies de enterococos (enterocinas) muestran una diversidad variable. Las especies de *Enterococcus* asociadas a producción de bacteriocinas son *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. mundtii*. El análisis de las secuencias aminoacídicas y/o nucleotídicas y su amplio espectro inhibitorio las incluye dentro del grupo de compuestos del “tipo pediocina” (Aymerich y col., 1996). Según esto, y de acuerdo a la clasificación anteriormente presentada, pertenecen al grupo II de bacteriocinas no lantibióticos, de bajo peso molecular y estables al calor. Las enterocinas L50 A y B han sido incluidas en la Clase IId (Cintas y col., 1995) ya que no comparten la similitud de secuencias descritas para las bacteriocinas de la Clase IIa. Cintas y col. (2001) reportaron además la producción de una enterocina de alto peso molecular, perteneciente a la Clase III.

La primera enterocina purificada y caracterizada a nivel aminoacídico fue la enterocina A. También se han caracterizado la enterocina B y la P, todas ellas producidas por cepas de *E. faecium* aisladas de productos cárnicos fermentados (Aymerich y col., 1996; Casaus y col., 1997; Franz y col., 1999). Diversos aislamientos reportados posteriormente de cepas de *E. faecium* resultaron ser similares o idénticas a las enterocinas A y B (Franz y col., 1999; Du Toit y col., 2000; Ennahar y col., 2001; Losteinkit y col., 2001). La enterocina A pertenece al grupo “tipo pediocina” mientras que las enterocinas B, L50A, L50B, enterocina P, enterocina Q y enterocina I no han sido incluidas en este grupo (Floriano y col., 1998;

---

Cintas y col., 2000).

Con respecto a su espectro inhibitorio, Ananou y col. (2004) utilizaron enterocina AS-48 producida por *E. faecalis* para controlar una cepa enterotoxigénica de *S. aureus*. Estos autores combinaron métodos de preservación con la aplicación de la enterocina obteniendo los mejores resultados a 4°C y con altas concentraciones de NaCl (6-7%). Aymerich y col. (2000b) también demostraron la efectividad de las enterocinas A y B para el control de *L. innocua* en varios productos cárnicos (jamón cocido, paté, fermentados) logrando reducciones de hasta 8 y 9 órdenes de magnitud en productos almacenados a 7°C durante 37 días. Ananou y col. (2004) encontraron inhibición de varias especies de *Staphylococcus* por la enterocina AS-48. Ennahar y Deschamps (2000) encontraron alta actividad de la enterocina A producida por *E. faecium* contra 13 cepas de *L. monocytogenes*.

La genética de estas bacteriocinas también resulta variable entre ellas. La enterocina A no está codificada por plásmidos, sino que los genes estructurales para su biosíntesis se hallan en el cromosoma, a diferencia de la L50A, L50B, Q y B que están codificadas por plásmidos (Franz y col., 1999; Cintas y col., 2001). Recientemente fue reportada la localización en un plásmido conjugativo de los genes que codifican para la producción de Enterocina EJ97 producida por *E. faecalis* EJ97 (Sánchez-Hidalgo y col., 2003).

Estudios previos realizados con la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 demostraron su resistencia a altas temperaturas. Por otra parte su actividad se mantuvo en un intervalo amplio de pH (2.6 a 10), si bien a pH alcalinos disminuyó notablemente. El tratamiento con pepsina, proteinasa K y  $\alpha$ -quimotripsina produjo pérdida total de la actividad (Kuri, 1998).

## 1.5. Aplicaciones en biotecnología

La utilización de bacterias lácticas en tecnología de alimentos está ampliamente difundida y en los últimos años los avances sobre la genética de estas bacterias han sido extensos. La mayor parte de estos estudios se realizaron con *Lactococcus*, microorganismo

ampliamente utilizado como cultivo iniciador en productos lácteos, aunque las últimas investigaciones se han trasladado también a bacterias lácticas productoras de bacteriocinas de la clase IIa, como el caso de *Pediococcus*. Si bien este tipo de microorganismo es utilizado mayormente en productos cárnicos, la gran efectividad contra *L. monocytogenes* de las cepas productoras de pediocina las hace muy interesantes para la industria láctea. Como estas cepas no tienen la capacidad de digerir la lactosa algunos investigadores se han centrado en el diseño de microorganismos que combinen ambas propiedades.

Chikindas y col. (1995) lograron la expresión del operón de la pediocina PA-1 en *L. lactis* y el de lactococcina A en *P. acidilactici*, logrando cepas productoras de ambas bacteriocinas. Coderre y Somkuti (1999) también trabajaron en la expresión heteróloga de bacteriocinas en cepas de interés para la industria láctea (*Streptococcus thermophilus*) así como Buyong y col. (1998) y Horn y col. (1999) con *L. lactis*. El mismo principio puede ser aplicado a cultivos iniciadores de interés para la industria cárnica, con el objeto de incorporarles la producción de bacteriocinas y así sumarle actividad antimicrobiana a las propiedades tecnológicas. Biet y col. (1998) trabajaron en la expresión heteróloga de la mesentericina, mientras que van Reenen y col. (2003) reportaron la expresión heteróloga de la plantaricina 423 (perteneciente a la Clase IIa) de *L. plantarum* en *Saccharomyces cerevisiae*. Martínez y col. (2000a) también realizaron la producción heteróloga de enterocina A y pediocina PA-1 en *L. lactis*.

Este sistema además de lograr que una cepa no productora de bacteriocinas se vuelva productora, permite también aumentar el espectro antimicrobiano de la cepa por la expresión de varias bacteriocinas con distintos espectros de acción en un mismo microorganismo (Allison y col., 1995).

Otra de las posibles aplicaciones de las bacteriocinas ha sido enfocada al área de salud animal, puntualmente en el caso de ciertas enfermedades como es la mastitis en ganado bovino lechero. Oldham y Daley (1991) utilizaron con éxito lisostatina, una proteína antimicrobiana producida por *S. simulans*, en el tratamiento de mastitis producidas por *S. aureus*. También Ryan y col. (1998) lograron muy buenos resultados en la prevención de

---

mastitis por *Streptococcus* y *Staphylococcus* al utilizar lacticina y nisina en selladores mamarios utilizados para el período de secado de bovinos lecheros.

Finalmente, la adición de cepas de bacterias lácticas con actividad probiótica a suplementos dietarios o productos lácteos es uno de los campos que se ha desarrollado de manera muy importante en los últimos tiempos (Garriga y col., 1998; Rowland, 2004; Aubin y col., 2005; Bouzaine y col., 2005; Medici y col., 2005) y que parece tener grandes perspectivas para la prevención y/o curación de cierto tipo de enfermedades, tanto en humanos como en animales.

---

## 2. Hipótesis y Objetivos

---

### *Hipótesis:*

Si las bacteriocinas producidas por *Pediococcus parvulus* MXVK133 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 pertenecen al grupo de bacteriocinas clase IIa, con gran eficacia frente a *Listeria*, podrían presentar un gran potencial para ser utilizadas como agentes de biopreservación en alimentos.

### *Objetivos:*

#### *General*

- Caracterizar funcional, estructural y molecularmente las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos mexicanos para su posible utilización en la preservación de alimentos.

## *Particulares:*

- Estudiar la cinética de crecimiento y producción de bacteriocinas de *Pediococcus parvulus* MXVK133 y *Enterococcus faecalis* MXVK22
- Determinar la actividad inhibitoria de las bacteriocinas contra gérmenes patógenos y de deterioro de interés para la industria cárnica
- Obtener las bacteriocinas en forma purificada para posteriores análisis de la secuencia de aminoácidos
- Clonar el gen que las codifican y determinar la secuencia de nucleótidos para realizar comparaciones con otras bacteriocinas descritas anteriormente

---

## 3. Materiales y Métodos

---

### 3.1. Identificación de las cepas

La identificación de las cepas productoras de bacteriocinas se realizó por el método de secuenciación del gen correspondiente al ARNr 16S (MIDI LABS, Inc., Nueva Jersey) realizándose la comparación de secuencias homólogas de acuerdo al BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### 3.2. Caracterización bioquímica y purificación de las bacteriocinas

#### 3.2.1. Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento

Las cepas productoras de bacteriocinas, *P. parvulus* y *E. faecalis*, fueron aisladas de chorizo mexicano (producto cárnico fermentado) por el grupo de trabajo del Dr. M. Collins de la Queen's University of Belfast. Las cepas utilizadas para la prueba de inhibición se obtuvieron de diferentes fuentes (Tabla 5). Las cepas se conservaron en viales con glicerol al 30% a -80°C. Para su reactivación se colocó el contenido de un criovial en un tubo con 9 mL del caldo de cultivo correspondiente. *P. parvulus* y *E. faecalis* fueron cultivado en medio CGB (caldo caseína-glucosa; extracto de levadura 0.5%, Bioxón, México, peptona

biotriptasa 2 %, Bioxón, México, glucosa 1%, J.T. Baker, México, tween 80 0.1%, sulfato de magnesio 0.01%, J.T. Baker, México, sulfato de manganeso 0.005 %, J.T. Baker, México, citrato de amonio, J.T. Baker, México, 0.2%, fosfato disódico, 0.2%, J.T. Baker, México) a 37°C. Los microorganismos utilizados para evaluar la actividad inhibitoria *Bacillus subtilis*, *Brochothrix thermosphacta*, *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecium*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carnosus* y *Escherichia coli* se cultivaron en caldo TSB (tripticase soya, Difco Laboratories, Detroit, Michigan) a 37°C, salvo *B. thermosphacta* que se incubó a 30°C. *Clostridium sporogenes* se incubó en anaerobiosis con 11% CO<sub>2</sub>. *Campylobacter* spp. se cultivó en caldo Müller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

**Tabla 5.** Cepas utilizadas

Cepa
<i>Bacillus subtilis</i> PL1 (1)
<i>Brochothrix thermosphacta</i> NCIB-10018 (2)
<i>Clostridium sporogenes</i> NCTC 8594 (2)
<i>Escherichia coli</i> JM P101 (1)
<i>Enterococcus faecium</i> 29 (2)
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090 (2)
<i>Listeria innocua</i> MP 2418 (1)
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (4)
<i>Listeria monocytogenes</i> LM 82 (3)
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48 (4)
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47 (4)
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325 (2)
<i>Staphylococcus carnosus</i> (2)
<i>Campylobacter jejuni</i> dolyei NCTC11987 HG2 (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 12500 HG2 (1)
<i>Campylobacter coli</i> NCTC 12143 HG2 (1)
<i>Campylobacter fetus</i> NCTC 10842 (1)

1. Dr. M Collins, Queen's University of Belfast, Irlanda
2. Laboratorio de Macromoléculas, Universidad Autónoma Metropolitana, México
3. Dr. J M Uruburu, Universidad de Valencia, España
4. Dr. F M Iniesta, Universidad de Murcia, España

### 3.2.2. Determinación de la actividad inhibitoria

La actividad antimicrobiana se midió por el método de difusión en agar (Schillinger y Lücke, 1989) con modificaciones, utilizando *L. innocua* MP 2418 como cepa sensible. Para

ello se cubrieron placas con agar TSB con 12 mL de agar suave (0.8%) sembrados con 70  $\mu$ L de un cultivo en fase logarítmica de *L. innocua* (D.O=0.45 a 600 nm). Una vez solidificada la capa de agar suave, se realizaron en la misma pozos de 0.4 cm de diámetro, donde se colocaron 30  $\mu$ L del sobrenadante de los cultivos de las cepas productoras para evaluar su actividad inhibitoria. Para descartar la presencia de halos de inhibición derivados de la producción de peróxido de hidrógeno los tubos con las cepas productoras se incubaron en condiciones de anaerobiosis. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 horas y finalmente se midieron los halos de inhibición, calculándose las unidades arbitrarias (UA) según la siguiente relación: el inverso de la mayor dilución que produjo un halo de inhibición de dos mm de diámetro multiplicado por 1/0.030 mL (volumen de bacteriocina colocado en cada pozo).

### 3.2.3. Tratamiento con proteinasa K

En este punto se evaluó el efecto de la aplicación de proteinasa K (Promega, Madison, Wisconsin) en dos concentraciones diferentes, sobre la actividad de las bacteriocinas. Para esto se incubaron alícuotas de las bacteriocinas con proteinasa K en concentraciones finales de 0,5 y 1 mg/mL de enzima, utilizándose controles negativos sin proteinasa. Las muestras así conformadas se incubaron 15 minutos a 37°C. Finalmente se evaluó la actividad antimicrobiana de las muestras según la técnica descrita en el punto anterior.

### 3.2.4. Producción de bacteriocinas asociada al crecimiento celular

Tubos con 9 mL de caldo CGB y TGE (caldo triptona-glucosa; extracto de levadura 2%, triptona 2 %, glucosa 2%, tween 80 0.1%; sulfato de magnesio 0.05%; sulfato de manganeso 0.005 %) se inocularon al 1% v/v a partir de un cultivo de 16 horas de *P. parvulus* y *E. faecalis*, respectivamente, y se incubaron a 37°C. Durante 16 horas y con intervalos de dos horas se midió la absorbancia a 600 nm de las muestras utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 650 (Bekman, Fullertown, EUA). Para cada una de las fracciones obtenidas se midió la actividad antimicrobiana y se realizó la curva de crecimiento versus producción de bacteriocina.

### 3.2.5. Espectro inhibitorio

El sobrenadante que contenía la bacteriocina se obtuvo por centrifugación de un cultivo de 16 horas de cada una de las cepas productoras, *P. parvulus* y *E. faecalis*. Para la determinación de la actividad antagónica se utilizó el método de difusión en agar (Schillinger y Lücke, 1989). Los microorganismos patógenos y deteriorantes de alimentos utilizados para evaluar su sensibilidad fueron: *B. thermosphacta*, *C. sporogenes*, *E. faecium*, *E. coli*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *B. subtilis*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *S. carnosus*, *S. aureus*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus*.

### 3.2.6. Termoestabilidad

El objetivo de este experimento fue determinar la resistencia a la temperatura de las bacteriocinas a distintos valores de pH. El sobrenadante resultante de centrifugar el cultivo de 16 horas de *E. faecalis* MXVK22 y *P. parvulus* MXVK133 se dividió en 5 fracciones, las cuales se ajustaron a valores de pH 4 a 8. Cada una de estas fracciones se dividió en tres alícuotas que fueron sometidas a los tratamientos térmicos correspondientes (95°C/15 minutos, 121°C/15 minutos y control sin calentamiento). Posteriormente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se ajustaron a pH 6 y se evaluó su actividad antimicrobiana.

### 3.2.7. Determinación de los valores de pH óptimos para la adsorción y desorción de las bacteriocinas a las células productoras.

Este ensayo se realizó con el objetivo de optimizar la técnica de purificación de bacteriocinas descrita por Yang y col. (1992) para la enterocina producida por *E. faecalis* MXVK22, ya que las condiciones óptimas para la purificación de la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK133 fueron establecidas según lo reportado por Hernández-López (2002) quien trabajó con la misma bacteriocina. Un cultivo de 16 horas de *E. faecalis* MXVK22 fue calentado durante 30 minutos a 70°C (Yang y col., 1992) y posteriormente

dividido en 9 fracciones calibradas a valores de pH 1 a 9; a continuación los tubos se mantuvieron en agitación moderada a 4°C durante 4 horas. Transcurrido este período se procedió a centrifugar las muestras a 3100 x g durante 20 minutos. Los sobrenadantes se llevaron a pH 6 y las células se resuspendieron en 1 mL de búfer fosfato pH 6 para evaluar posteriormente la actividad antimicrobiana residual en los sobrenadantes y lo adsorbido en las células. El pH óptimo de desorción se determinó en el valor para el cual se registró la menor actividad inhibitoria en las células y la mayor en el sobrenadante (se consideró el punto donde la diferencia entre la actividad en el sobrenadante y la actividad en las células fuese mayor).

### 3.2.8. Purificación de las bacteriocinas

La purificación de las bacteriocinas se llevó a cabo mediante el método de adsorción-desorción descrito previamente (Yang y col., 1992) con algunas modificaciones. Cultivos de 16 horas de *P. parvulus* y *E. faecalis* se calentaron a 70°C durante 30 minutos para eliminar proteasas 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 4 horas a 4°C para permitir la adsorción de la bacteriocina a la membrana celular bacteriana. Pasado este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 3100 x g durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se lavó dos veces con búfer de fosfatos (5 mM fosfato de sodio, pH 6). Finalmente, las células se resuspendieron en una solución 100 mM de NaCl, pH 1 (5% del volumen original); este valor de pH favorece la desorción de la bacteriocina desde la membrana celular de las bacterias hacia el medio. Las células se mantuvieron en agitación a 4°C durante 10 horas, luego se procedió a centrifugar a 3100 x g durante 20 minutos para, finalmente, descartar las células reteniendo el sobrenadante con la bacteriocina.

#### 3.2.8.1. Ultrafiltración de las bacteriocinas

Una vez obtenido el extracto semipurificado por la técnica de adsorción dependiente del pH se realizó la concentración del extracto. Para esto se realizó una ultrafiltración a

través de membranas de 10000 y 5000 kDa diámetro nominal de corte (YM 10/YM 5 Centricon, Millipore, Billerica, Massachusset) siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto concentrado se mantuvo a -80°C hasta su uso.

### 3.2.8.2. Recuperación de bacteriocinas utilizando diferentes medios de cultivo.

En este experimento se evaluó la recuperación de ambas bacteriocinas aplicando el método de purificación descrito en el punto 3.1.8 y utilizando tres medios de cultivo diferentes para el crecimiento de las cepas productoras. Los medios evaluados fueron TGE, CGB y MRS (caldo de Mann-Rogosa-Sharpe: extracto de levadura 0.5%, glucosa 2%, sulfato de magnesio 0.01%, sulfato de manganeso 0.005 %, citrato de amonio 0.2%, fosfato dipotásico 0.2%, polisorbato 80 0.1%, extracto de carne 1%, proteosa peptona 1%). Para ello fueron inoculados al 1% con *P. parvulus* MXVK133 y *E. faecalis* MXVK22 tubos con 9 mL de cada uno de los medios, incubándose 16 horas a 37°C. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 3100 × g durante 20 minutos y se procedió a la purificación de las bacteriocinas según el método mencionado anteriormente. La actividad antimicrobiana se midió en el extracto crudo, en la fase de post-adsorción y en el concentrado final. Los resultados se analizaron según un diseño factorial 3×3 por análisis de la varianza y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan (Anexo 4).

### 3.2.9. Isoelectroenfoque preparativo

Para la realización del isoelectroenfoque se utilizaron dos tipos de extractos. En primer lugar se utilizó el extracto crudo obtenido de centrifugar durante 20 minutos a 3100 × g un cultivo de 16 horas de *P. parvulus* MXVK133 y otro de *E. faecalis* MXVK22. En segundo lugar se utilizaron los extractos semipurificados obtenidos después de aplicada la técnica de adsorción dependiente del pH a cultivos de 16 horas de cada una de las cepas productoras. Ambos extractos, crudo y semipurificado, fueron dializados durante 48 horas a 4°C contra agua desionizada, realizando cambios frecuentes de la misma para lograr el

desalado. A 50 mL de cada dializado se le agregaron anfolitos Bio-Lyte® 3/10 (BioRad, Richmond, California) en concentración final de 1%. La muestra se colocó en una célula de Rotofor de BioRad (Richmond, California) y la separación se llevó a cabo durante 3 horas.

Posteriormente se colectaron las distintas fracciones y se procedió a medir el pH de cada una de ellas, ajustarlo a un valor cercano a 6 para finalmente determinar la actividad inhibitoria de las fracciones.

### 3.2.10. Electroforesis

Las electroforesis se realizaron a partir del extracto semipurificado por la técnica de adsorción dependiente del pH y ultrafiltrado, siguiendo la técnica de tricina-SDS-PAGE descrita por Schägger y von Jagow (1987) para péptidos pequeños. Esta técnica utiliza dos geles, uno de 10 y otro de 16 (%T) para mejorar la separación de los péptidos más pequeños. La separación electroforética se llevó a cabo en una cámara Mini Protean II (Bio-Rad, Hercules, California). Las condiciones de experimentación fueron 90 V, 50 W y 5 mA durante 3.5 horas a 5°C. Una vez separados los péptidos, uno de los geles se utilizó para medir la actividad de bacteriocina (Bhunia y *col.*, 1987) y el otro se tiñó con nitrato de plata para la visualización de las bandas (Oakley y *col.*, 1980).

El gel de actividad fue fijado durante 2 horas en una solución con 20% de propanol y 10% ácido acético. Pasado este tiempo se realizaron lavados en agua desionizada estéril durante tres horas, con cambios frecuentes. Por último se colocó el gel en una placa de Petri con agar tripticasa soya y se vertieron sobre el mismo 12 mL de agar suave con 70 µL de *L. innocua* (DO<sub>600</sub>=0.45). Esta placa fue incubada a 37°C durante 16 horas y examinada luego para determinar la presencia de una zona de inhibición.

Finalmente se compararon ambos geles (teñido y de actividad) para determinar qué banda correspondía a la bacteriocina. Se corrieron dos tipos de muestras: la primera con SDS adicional (concentración final de 2%) y la segunda sin este último, para evaluar la efectividad del SDS en la ruptura de los posibles agregados de las moléculas de bacteriocina que pudieran afectar a la resolución de las bandas obtenidas.

### 3.2.11. Secuenciación de aminoácidos

#### 3.2.11.1. Inmovilización de proteínas a membranas

Una vez realizada la separación electroforética y visualizadas las bandas de interés, es posible inmovilizar las proteínas en una membrana de fluoruro de polivinilideno (Sequi-Blot PVDF Membrane for Protein Sequencing; Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Esto impide la difusión o el lavado de las proteínas y permite la aplicación directa de la membrana a un secuenciador automatizado de proteínas. Normalmente una banda visualizada a través de la tinción con azul de Coomassie (1-10 µg) aporta suficiente cantidad de proteína para obtener la secuencia aminoacídica del extremo N-terminal. Los pasos detallados a continuación corresponden al tratamiento de las membranas previo a la transferencia (según indicaciones del fabricante):

1. Se sumergieron las membranas en 100 % metanol por unos segundos hasta que se tornaron transparentes.
2. Luego se transfirió la membrana a metanol 50 % hasta quedar totalmente saturada.
3. Por último se colocó la membrana en el búfer de transferencia (Towbin búfer: 25 mM tris; 192 mM glicina; 20% metanol) manteniéndola allí hasta su colocación en el módulo.

#### **Armado del casete de transferencia**

Una vez preparada la membrana se procedió al armado del casete para la electrotransferencia (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) según se detalla a continuación:

**Cátodo (-)**

- papel de filtro
- SDS-PAGE gel
- membrana PVDF
- papel de filtro

**Ánodo (+)**

Antes de cerrar el casete se roló por encima del papel filtro un tubo de vidrio para eliminar las burbujas de aire que pudieran quedar atrapadas. Seguidamente se cerró el casete y se colocó en el módulo de transferencia. La electrotransferencia se llevó a cabo a 90 V durante 40 minutos. Pasado este tiempo se procedió al desarmado del casete y a la tinción de la membrana con azul de Coomassie (Azul de coomassie R-250 al 0.025% en metanol al 40%) sin añadir ácido acético. La membrana puede mantenerse a 4°C hasta su utilización.

**3.2.11.2. Secuenciación**

Una vez realizada la transferencia a la membrana PVDF se recortó la banda de interés y se colocó directamente en el secuenciador automático de proteínas Procise 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California). Se utilizó el cartucho especial para muestras transferidas a membrana de PVDF (Blot cartridge) y se empleó el método Pulsed-liquid Blot (Anexo 1).

En la sección 3.1 se ha descrito la metodología empleada para la caracterización bioquímica de las bacteriocinas producidas por *E. faecalis* MXVK22 y *P. parvulus* MXVK133. En la siguiente sección se describe la caracterización a nivel molecular de la pediocina MXVK133, únicamente. Las razones de continuar solamente con la caracterización de la pediocina están basadas fundamentalmente en su potencial para ser utilizada a corto plazo como agente antimicrobiano en alimentos. Asimismo, la realización de estudios en paralelo desarrollados con la misma pediocina en nuestro laboratorio, como

son la incorporación a recubrimientos comestibles y los estudios sobre generación de resistencia en cepas de *Listeria*, requerían información complementaria sobre esta bacteriocina con prioridad sobre la enterocina.

### 3.3. Caracterización molecular de la pediocina MXVK133

Para la localización de los genes de producción de esta bacteriocina se empleó la técnica de hibridación de Southern. Para esto, se extrajo el ADN total de *P. parvulus* MXVK133 para luego realizar una digestión del mismo con enzimas de restricción. El gel de agarosa con los fragmentos digeridos se utilizó para transferir a una membrana de nylon para su posterior hibridación con sondas homólogas. A continuación se describen los protocolos utilizados para la realización de este apartado.

#### 3.3.1. Aislamiento de ADN total

La técnica utilizada para el aislamiento de ADN total fue la descrita por Lawson y *col.* (1993), con modificaciones El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Centrifugar un cultivo (1-10 mL) de 16 horas (5000 x g durante 3 minutos) de la cepa productora correspondiente
- **Lisis:** Resuspender las células en 500  $\mu$ L de búfer TES (0.05 M Tris, 0.05 M de NaCl, 0.005 M EDTA pH 8), agregar 35  $\mu$ L de lisozima (10 mg/mL) e incubar 15-30 minutos a 37°C.
- Agregar 1.4  $\mu$ L de proteinasa K (10 mg/mL) y 2.7  $\mu$ L de RNAsa (10 mg/mL), mezclar e incubar el vial durante 1 hora a 65°C.
- Posteriormente agregar 20  $\mu$ L de una solución de SDS al 25% e incubar durante 10 minutos a 50°C.

- **Fenolización:** Añadir un volumen de fenol neutro (anexo 2) y mezclar 5 minutos. Centrifugar a 14000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Tomar cuidadosamente con micropipeta la fase superior acuosa, que contiene el ADN, y transferir a un vial nuevo.
- Homogeneizar agregando un volumen de fenol-CIA (anexo 2), mezclar 5 minutos y centrifugar a 14000 x g durante 5 minutos.
- Repetir los dos últimos pasos.
- **Precipitación:** Transferir la fase superior acuosa a un nuevo tubo y agregar 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20° C. Dejar precipitar 12 horas a -20° C.
- Centrifugar 30 minutos a 14000 x g a 4°C y eliminar cuidadosamente el sobrenadante cuidando de no perder el precipitado de ADN.
- Lavar el precipitado con 500 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente.
- Centrifugar 5 minutos a 14000 x g y eliminar el sobrenadante.
- Dejar secar el precipitado colocando el tubo abierto a 37° C durante 1 hora para permitir la evaporación del etanol remanente.
- Resuspender el precipitado en 30 µL de agua destilada estéril o TE y conservar a -20°C.

### 3.3.2. Digestión con enzimas de restricción

Una vez obtenido el ADN total se procedió a realizar la digestión con enzimas de restricción para lograr fragmentos identificables. Las enzimas utilizadas fueron *EcoRI* e *HindIII* (Invitrogen, California). El protocolo seguido fue el siguiente (para una reacción de 40  $\mu$ l totales):

ADN	10 $\mu$ L
Enzima (10U/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L
Tampón (10X)	4 $\mu$ L
Agua	24 $\mu$ L

Las digestiones del ADN total se llevaron a cabo a 37° C. Una vez transcurridas dos horas de incubación se procedió a extraer el ADN digerido con fenol-cloroformo y a precipitarlo con etanol. Posteriormente se analizó el ADN por electroforesis en un gel de agarosa.

### 3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa

Una vez disuelto el precipitado de ADN se procedió a su análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %. Para esto se mezclaron 5  $\mu$ L del ADN con 2  $\mu$ L de búfer de corrida y se completaron los 12  $\mu$ L con agua destilada estéril. Una vez colocada la muestra en los pocillos del gel se procedió a realizar la corrida a 100 V durante 1 hora, aproximadamente.

Una vez finalizada la corrida se tiñó el gel durante veinte minutos en una solución de bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/mL) y se analizó bajo luz ultravioleta a 280 nm en un analizador de imágenes (GelDoc 2000, Bio-Rad, Hércules, California).

### 3.3.4. Diseño de sondas

A partir de la secuencia aminoacídica obtenida se diseñaron las sondas necesarias para la hibridación. Para esto se realizó un análisis de la utilización más frecuente de codones en *Pediococcus*. Con estos datos se determinó la traducción más probable de la secuencia aminoacídica obtenida para esta bacteria. Finalmente se realizó la traducción de las secuencias aminoacídicas utilizando el programa de análisis de secuencias DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin). A continuación se presentan las sondas utilizadas:

5' GTN-ACN-CAA-GGN-AAA-CAY-WSW-CAA 3'

3' TTT-ATG-ATG-CCN-TTR-CCN-CAN-TGN 5'

### 3.3.5. Hibridación de Southern

La detección del fragmento de interés por hibridación de Southern requirió de varias etapas. En primer lugar se realizó una separación electroforética en un gel de agarosa del ADN digerido con enzimas de restricción. La utilización de ADN digerido nos permitió asociar con un determinado tamaño y corte el fragmento deseado (aquel que presenta similitud con la sonda). Se debe tener en cuenta en este paso la colocación en el mismo gel de marcadores de peso molecular adecuado, para la determinación posterior del tamaño de los fragmentos detectados. Una vez realizado el gel, se tiñó con bromuro de etidio por el procedimiento normal y se fotografió, cuidando de colocar una regla a la hora de capturar la imagen.

#### 3.3.5.1. Transferencia a membrana de nylon a partir del gel de agarosa

Una vez fotografiado el gel se somete a los siguientes tratamientos:

1. Lavado en solución de HCl 0.25 N durante 15 minutos con agitación moderada. Transcurrido este tiempo se lavó el gel con agua destilada, realizando varios cambios.
2. Se colocó el gel en solución desnaturalizante (Anexo 2) durante 30 minutos, con agitación moderada, y se lavó con agua destilada.
3. Se sumergió en solución neutralizante (Anexo 2) durante 30 minutos con agitación moderada. Se lavó nuevamente con agua destilada.
4. Se colocó un taco de papel absorbente de unos 5 centímetros de grosor y de las mismas dimensiones del gel en un recipiente apropiado. Sobre este taco se acomodaron dos láminas de papel de filtro (Whatman 3 mm) del mismo tamaño del gel, humedecidas en búfer de transferencia (Anexo 2).
5. Se colocó el gel encima de los papeles de filtro y se situó la membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, Nueva Jersey) directamente sobre el gel. La membrana debe tener un centímetro más en anchura y longitud que el gel y debe humedecerse previamente en agua destilada primero y luego en búfer de transferencia antes de su colocación.
6. Se acomodaron dos papeles de filtro Whatman 3MM, humedecidos en búfer de transferencia, sobre la membrana e inmediatamente encima se colocó otro taco de papeles asorbentes de unos 10 centímetros de espesor. Finalmente se puso encima un objeto pesado (500 g, aproximadamente).
7. Se vertió búfer de transferencia (Anexo 2) en el recipiente hasta alcanzar aproximadamente el límite superior del primer taco de papeles. El sistema se mantuvo en reposo durante aproximadamente 16 horas.

8. Transcurrido ese tiempo se retiraron los papeles, se marcó la ubicación de los pocillos en la membrana y se lavó en una solución de SSC 5X. El lavado debe ser cuidadoso ya que el ADN aún no está fijado a la membrana.
9. Se dejó secar la membrana entre dos papeles de filtro y se fijó el ADN con irradiación UV en un transiluminador UVP (Bio-link, San Francisco, California) durante 4 minutos. Las membranas así tratadas se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

### 3.3.5.2. Marcaje de sondas

El marcaje se hizo utilizando la enzima T<sub>4</sub> polinucleótido quinasa, que cataliza la transferencia del fosfato en posición gamma del ATP al OH 5' del ADN sonda.

#### Reacción de marcaje

oligonucleotido (20 pmol/μL)	1 μL
5X T <sub>4</sub> búfer quinasa	5 μL
T <sub>4</sub> quinasa (10 U)	1 μL
P <sup>32</sup> γ ATP (20 pmoles, >5000 Ci/mmol)	12.5 μL
Agua estéril	5.5μL
	-----
Total	25 μL

Se incubó 10 minutos a 37°C y se inactivó a 65°C durante 10 minutos.

### 3.3.5.3. Purificación de la sonda

Finalizada la incubación se procedió a la purificación de la sonda marcada mediante la utilización de cromatografía de filtración en gel. Para esto se utilizaron columnas de matriz de gel de poliacrilamida (Econo-Pac® 10DG, Bio-Rad, Hercules, California) con tamaño de exclusión de solutos mayor a 6,000 Da, permitiendo la salida de la sonda en el

volumen muerto. El procedimiento de lavado de la columna y recuperación de la sonda se describe en el anexo 3.

### **Prehibridación**

- Se realizó a 55°C (10°C menos de la T<sub>m</sub> recomendada por el fabricante del oligonucleótido) durante 2 horas con la siguiente solución (Church y Gilbert, 1984):

Búfer fosfato	0.5 M
EDTA	1 mM
SDS	7 %
BSA	1 %

Se puede utilizar la misma solución para la hibridación, agregando en este caso la sonda marcada al líquido. El volumen de solución a utilizar es de 30 µL/cm<sup>2</sup> de filtro.

### **Hibridación**

Se llevó a cabo a la misma temperatura (55°C), en las mismas botellas y utilizando el mismo tampón de la prehibridación. La sonda marcada y purificada se agregó directamente a la misma botella y se incubó en horno rotativo durante 16 horas. Debido a que la sonda utilizada era ADN de cadena simple no fue necesario el paso de desnaturalización previo a la hibridación.

### **Lavados**

Finalizada la hibridación, se retiraron las botellas del horno y se eliminó cuidadosamente la solución con la sonda. Posteriormente se agregaron 50 mL de solución de lavado 1 (SDS 0.1 % y SSC 2X) a cada botella de hibridación para realizar un arrastre

del material no adherido a las membranas.

Realizado este primer enjuague se retiraron las membranas y se colocaron en un recipiente para el lavado de las mismas. En primer lugar se lavó durante 10 minutos con solución de lavado 1 y se verificó la señal. Como todavía se registraba señal importante se realizó un segundo lavado con solución de lavado 2 (SDS al 0.1% y SSC al 0.1X). Estos lavados se realizaron a 55°C.

Debe recordarse que la astringencia aumenta disminuyendo la concentración de sales o aumentando la concentración de detergentes en el búfer de lavado o aumentando la temperatura y la duración del lavado.

### **Revelado:**

Las membranas se colocaron en pantallas intensificadoras en contacto con placas de radiografías durante tres días y se mantuvieron a -80°C. Pasado este tiempo se revelaron las placas expuestas y se localizaron los fragmentos hibridados para la determinación del peso molecular aproximado del fragmento marcado. Para esto se realizó una recta de regresión con las bandas del marcador de peso molecular conocido y en base a éstas se calculó el peso molecular aproximado del fragmento hibridado.

### 3.3.6. PCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar un segmento de la cadena de ADN a partir de cebadores de secuencia conocida y complementaria a los extremos 3' de la cadena de ADN blanco.

En el presente caso los cebadores fueron diseñados con base en la secuencia nucleotídica completa del operón de la pediocina AcH reportado por Miller y *col.* (2005), ya que los aminoácidos obtenidos de la secuenciación del extremo amino terminal no permitieron diseñar cebadores del tamaño suficiente para la realización de un PCR.

La secuencia de los cebadores utilizados se detalla a continuación:

(5' a 3') AGA GGA TCC TTG ACA TTT AAA TTG AGT GGG AAC T

(3' a 5') TAT CTG ATA AGA ACA GGC ACT TTA GCT TAA GCA G

La composición de la reacción para el PCR fue la siguiente:

Búfer 10X	5 µL
Mg <sub>2</sub> Cl (50 mM)	1.5 µL
ADN total	5 µL
Cebador 1 (20 µM)	2.5 µL
Cebador 2 (20 µM)	2.5 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Taq Polimerasa (10U x µL)	0.5 µL
H <sub>2</sub> O	27 µL

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Nº de Ciclos	Fase	Tiempo y Temperatura
1	desnaturalización	94°C durante 30 segundos
30	desnaturalización	94°C durante 30 segundos
	hibridación	58°C durante 30 segundos
	polimerización	72°C durante 1 minuto
1	polimerización	72°C durante 1.30 minutos

Finalmente el fragmento amplificado bajo estas condiciones fue purificado utilizando el kit de purificación de ADN QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, California) y secuenciado en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 16 capilares (Applied Biosystems, California).

### 3.3.7. Determinación de la localización en plásmido del gen para la pediocina

Los genes para las bacteriocinas pueden estar localizados en plásmidos o integrados en el cromosoma. Para determinar si la producción de la pediocina MXVK133 estaba codificada en plásmido se realizó el curado de la cepa. La técnica utilizada fue la reportada por Ruiz-Barba y *col.* (1991), utilizando novobiocina como agente curante. En primer lugar se inocularon tubos con 10 mL de caldo TGE con concentraciones crecientes de novobiocina (1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ ) (Sigma Aldrich, San Louis, Missouri) con 10  $\mu\text{L}$  de un cultivo de 18 horas de *P. parvulus*. Estos tubos se incubaron durante 72 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se seleccionaron los tubos que presentaban crecimiento visible con la mayor concentración de novobiocina y se sembraron alícuotas en placas de TGE agar, incubándolas durante 18 horas a 37°C. Posteriormente, se seleccionaron colonias al azar para determinar la producción de bacteriocina. Finalmente, se realizó la extracción del ADN total de la cepas que habían perdido la actividad inhibitoria y se realizó un PCR en las mismas condiciones descritas en el punto anterior, con el ADN de la cepa sin curar como control positivo.

---

## 4. Resultados y Discusión

---

### 4.1. Identificación de las cepas

Las cepas de *P. parvulus* MXVK133 y *E. faecalis* MXVK22 fueron aisladas de productos cárnicos mexicanos (chorizo y carne de cerdo) por el Dr. Víctor Kuri en trabajos previos (Kuri, 1998). En ese mismo trabajo se establecieron algunas características generales de las cepas como Gram, morfología y producción de compuestos antimicrobianos, entre otros. A partir de esta primera clasificación general se realizó la comparación de secuencias del gen para ARNr 16S con el objeto de conseguir la identificación a nivel de especie.

Esta técnica permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los microorganismos procarióticos, lo que tiene gran importancia en taxonomía bacteriana, permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Rodicio y Mendoza, 2004).

La técnica consta de cuatro pasos básicos:

- Obtención del ADN total del microorganismo
- Amplificación del fragmento de la región ADNr 16S con oligonucleótidos universales por PCR
- Secuenciación del fragmento obtenido
- Comparación de secuencias en base de datos y determinación de porcentajes de similitud

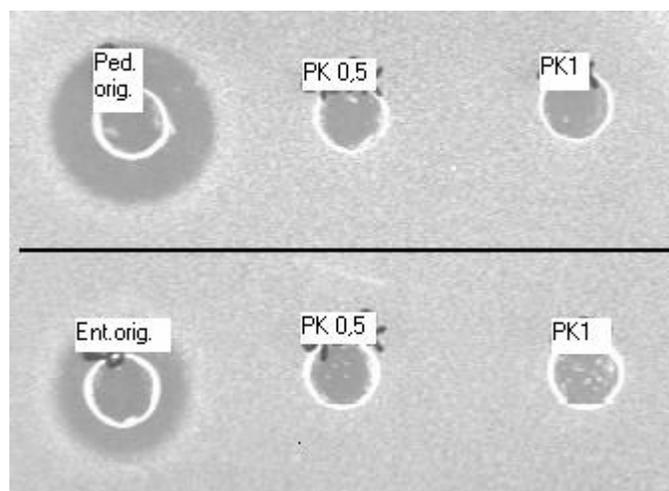
La comparación de secuencias del ADNr 16S de las cepas productoras de bacteriocinas indicó altos porcentajes de similitud (99.8 %) con *P. parvulus*, la primera, y con *E. faecalis* la segunda (99.8 %).

## 4.2. Caracterización bioquímica y purificación de las bacteriocinas

### 4.2.1. Tratamiento con enzimas

El tratamiento con enzimas proteolíticas es uno de los test comúnmente reportados por diversos autores para identificar la composición proteica o no proteica de las bacteriocinas (van Reenen y *col.*, 1998; Kang y Lee, 2005; Todorov y Dicks, 2005; Yanagida y *col.*, 2005). Las enzimas proteolíticas frecuentemente utilizadas para evaluar esta característica son pepsina, tripsina, pronasa, proteinasa K y papaína, entre otras.

En este estudio se evaluó la actividad que ejercía la proteinasa K en concentraciones de 0.5 y 1 mg/mL sobre la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas. En ambos casos el tratamiento con las dos concentraciones de enzima mencionadas resultó en la pérdida total de actividad, lo que indica el carácter proteico de estas sustancias (Figura 3). Esta característica resulta de gran importancia para aplicaciones futuras, ya que las bacteriocinas serían degradadas en el tracto gastrointestinal cuando fueran ingeridas con los alimentos.



**Figura 3.** Acción de la proteinasa K sobre la pediocina MXVK133 y la enterocina MXVK22. **Ped. orig. y Ent. orig.:** Pozos conteniendo extracto crudo de pediocina y enterocina, respectivamente. **PK 0.5 y 1:** Pozos conteniendo bacteriocinas tratadas con proteinasa K en concentración de 0.5 y 1 mg/mL respectivamente.

#### 4.2.2. Espectro inhibitorio

Los resultados se presentan en la Tabla 6. La actividad de la **pediocina MXVK133** y la **enterocina MXVK22** contra otros microorganismos como *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, además de las 6 cepas de *Listeria* probadas, demostró que ambas bacteriocinas poseen amplio espectro de inhibición. La **enterocina MXVK22** posee un espectro inhibitorio aún mayor al de la **pediocina MXVK133**, ya que fue capaz de inhibir a *Brochothrix thermosphacta* y *Clostridium sporogenes*, que no fueron afectadas por la pediocina.

**Tabla 6.** Espectro inhibitorio de la pediocina MXVK133 y enterocina MXVK22

Microorganismos probados	Enterocina	Pediocina
<i>Bacillus subtilis</i> PL1	-	-
<i>Brochotrix thermosphacta</i> NCIB-10018	+	-
<i>Campylobacter coli</i> NCTC 12143 HG2	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> NCTC 10842	-	-
<i>Campylobacter jejuni doleyi</i> NCTC11987 HG2	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 12500 HG2	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i> NCTC 8594	+	-
<i>Enterococcus faecium</i> 29	+	+
<i>Escherichia coli</i> JM P101	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	+	+
<i>Listeria innocua</i> MP 2418	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> LM 82	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB 92000/48	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB 911204/47	+	+
<i>Staphylococcus carnosus</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	-	-

(-) sin halo de inhibición visible (+) halo de inhibición detectado

La totalidad de las cepas de *Listeria* probadas, tanto de *L. innocua* como de *L. monocytogenes*, fueron inhibidas por ambas bacteriocinas, coincidiendo con lo reportado por la bibliografía para bacteriocinas similares (Aymerich y col., 1996; Casaus y col., 1997; Bennik y col., 1999; Meghrous y col., 1999). Aymerich y col., (2000a), describieron una reducción de 5.26 ciclos logarítmicos en los recuentos de *L. innocua* en carnes con enterocinas Ay B y Aymerich y col. (2000b) lograron reducciones de 1.13 ciclos logarítmicos de *Listeria* en embutidos secos fermentados con enterocinas. Cintas y col. (1998) describieron la inhibición de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, y varias cepas de *Lactobacillus*. Casaus y col. (1997) reportaron la inhibición de *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum*, *S. aureus* y *S. carnosus*; *Lactobacillus sake*, *L. curvatus* y *P. pentosaceus* por las enterocinas A y B, pero no de *C. perfringens* y *C. botulinum*. Arqués y col. (2005) obtuvieron recientemente 4 ciclos logarítmicos de reducción en los conteos de *S. aureus* en quesos, combinando la aplicación de una cepa bacteriocigénica de *Enterococcus* y tratamientos de alta presión. Bennik y col. (1997) reportaron la inhibición de varias cepas

de *L. monocytogenes* y de *C. botulinum* por una pediocina producida por *P. parvulus*. Cintas y col. (1998) también reportan la inhibición de *C. perfringens*, *C. botulinum* y *C. sporogenes* por una pediocina. En nuestro caso, no se obtuvo inhibición de *C. sporogenes* cuando se utilizó **pediocina MXVK133**. Du Toit y col. (2000) encontraron actividad inhibitoria de enterocinas producidas por *E. faecium* contra *C. sporogenes* pero no produjeron inhibición aquellas producidas por *E. faecalis*, contrariamente a nuestros resultados.

*Bacillus subtilis* no fue inhibido por la **enterocina MXVK22**. Los reportes sobre el efecto inhibitorio de enterocinas sobre *Bacillus* spp. son variables. Algunos autores describen la inhibición de *Bacillus* spp. por diferentes enterocinas. Abriouel y col. (2002) y Muñoz y col. (2005) reportan la inhibición de *B. cereus* por la enterocina AS-48; García y col., (2004) lograron inhibir cepas de *B. macroides* y *B. maroccanus* con la enterocina EJ97 producida por *E. faecalis*. Cintas y col., (1998) obtuvieron muy buenos resultados con enterocina L50 contra *B. cereus*, pero solamente cuando se utilizó un extracto purificado concentrado (no se inhibió al utilizar el sobrenadante crudo obtenido de la simple centrifugación del cultivo). Esta ausencia de inhibición podría deberse a diferencias de sensibilidad entre las distintas cepas, mediada probablemente por bajo número o la ausencia de receptores específicos a nivel de membrana.

Tanto la **pediocina MXVK133** como la **enterocina MXVK22** inhibieron a *S. carnosus* coincidiendo con Cintas y col. (1998) quienes evaluaron la pediocina PA-1 (*P. acidilactici*) y la enterocina L50 (*E. faecium*). *B. thermosphacta* sólo fue inhibida por la **enterocina MXVK22**, no siendo afectada por la **pediocina MXVK133**, coincidiendo con Achemchem y col. (2005) quienes describieron la inhibición de *Brochothrix* por la enterocina L50 producida por *E. faecium* F58.

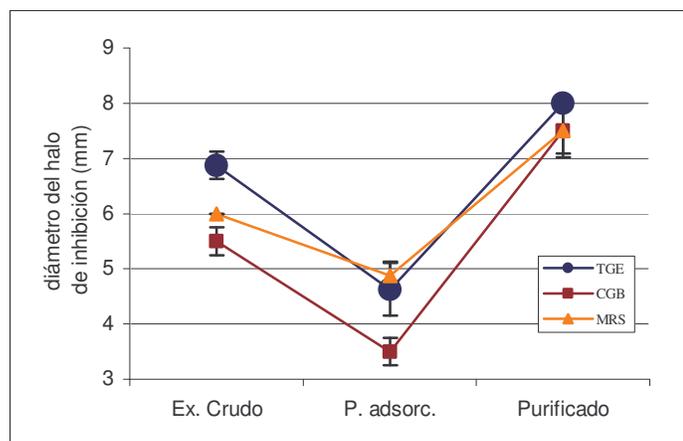
Las bacterias Gram negativas probadas no fueron sensibles a ninguna de las bacteriocinas, sin embargo la adición de sustancias quelantes como el EDTA podría tornar susceptibles a estos microorganismos. Este efecto estaría mediado por la captura de iones magnesio por el EDTA, lo que desestabilizaría la capa de lipopolisacáridos provocando la

ruptura de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Nikaido y Vaara, 1987; Stevens y col., 1992). Eijsink y col. (1998) probaron cuatro bacteriocinas de la clase IIa (pediocin PA-1, enterocina A, sakacina P y curvacina A) para determinar su espectro inhibitorio. Estos autores encontraron que la pediocina PA-1 y la enterocina A tienen un espectro inhibitorio más amplio y fueron más activas que la sakacina y la curvacina.

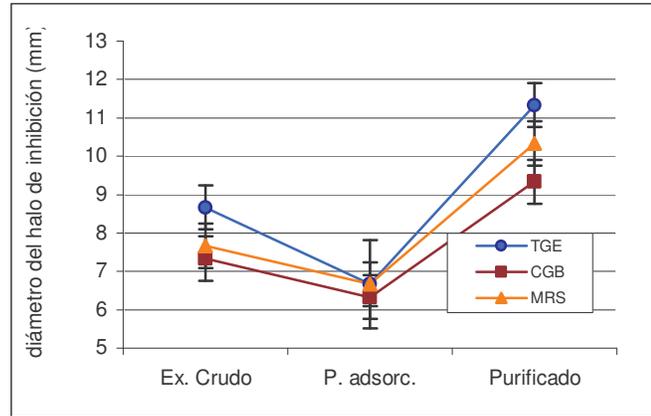
#### 4.2.3. Recuperación de bacteriocinas en diferentes medios de cultivo

El objetivo de este experimento fue comparar tres medios de cultivo (MRS, TGE y CGB) para determinar si existían diferencias entre los mismos con respecto a la producción y recuperación final de ambas bacteriocinas después de aplicada la técnica de purificación de adsorción-desorción dependiente del pH.

Tanto *P. parvulus* MXVK133 como *E. faecalis* MXVK22 produjeron bacteriocina en los tres medios probados. Sin embargo, al aplicar la técnica de purificación mencionada, el TGE resultó el medio del cual se recuperó mayor producto con actividad antimicrobiana, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), (Figuras 4 y 5).



**Figura 4.** Recuperación de enterocina MXVK22 en diferentes medios de cultivo



**Figura 5.** Recuperación de pediocina MXVK133 en diferentes medios de cultivo

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Biswas y *col.* (1991), quienes obtuvieron mayor producción de bacteriocina usando medio TGE. Sin embargo, los mismos autores obtuvieron mayor densidad celular con el medio MRS, mientras que en nuestro estudio la mayor densidad celular se obtuvo también utilizando el medio TGE. La producción de bacteriocinas puede verse afectada según los componentes del medio de cultivo utilizado (Bhunja y *col.*, 1991; Ray y Miller, 2000).

La mayor producción en medio TGE podría deberse a que éste es más rico en algunos componentes como dextrosa y extracto de levadura (Cabo y *col.*, 2001), lo que permitiría lograr un mayor crecimiento celular y valores de pH final más bajos que mejorarían la producción de la bacteriocina (ver Tabla 7). Yang y *col.* (1992) obtuvieron un rendimiento del 90% de pediocina partiendo de cultivos crecidos en TGE utilizando la técnica de purificación de adsorción-desorción dependiente del pH.

Probablemente la presencia de sustancias como fosfato, acetato y citrato en los otros medios utilizados podría interferir en la adsorción de las bacteriocinas sobre las células y por consiguiente afectar el rendimiento en el concentrado final. Por otra parte los medios en los que se observa una caída de pH mayor han sido reportados como aquellos con mayor producción de bacteriocinas, debido en parte a que a valores de pH más bajos la adsorción

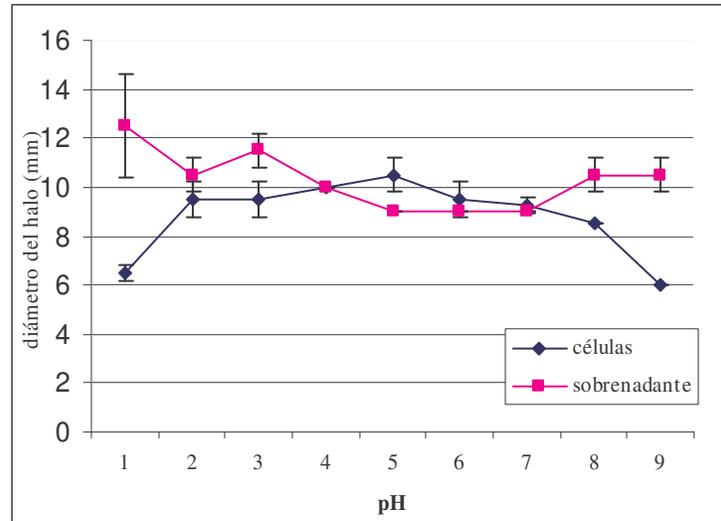
de la bacteriocina sobre las células productoras es menor que a valores más altos, lo que resulta en mayor actividad antimicrobiana aparente (Guerra y Pastrana, 2002); más aún, la tasa máxima de producción y liberación de bacteriocinas se da a valores de pH más bajos que el óptimo para el crecimiento del microorganismo productor (Drosinos y col., 2005).

**Tabla 7.** Composición de medios de cultivo utilizados.

Componentes (g/L)	TGE	CGB	MRS
Extracto de levadura	20	5	5
Dextrosa	20	10	20
Triptona	20	20	-----
Tween 80	0.1%	0.1%	-----
Sulfato de magnesio	0.5	0.1	0.1
Sulfato de manganeso	0.05	0.05	0.05
Citrato de amonio	-----	2	2
Fosfato disódico	-----	2	-----
Fosfato dipotásico	-----	-----	2
Polisorbato 80	-----	-----	1
Extracto de carne	-----	-----	10
Proteosa peptona	-----	-----	10

#### 4.2.4. Determinación de los valores de pH de máxima y mínima adsorción para la enterocina producida por *E. faecalis* MXVK22.

Este experimento se realizó para poner a punto la técnica de purificación de la **enterocina MXVK22**. Para la **pediocina MXVK133** se utilizaron los valores reportados por Hernández-López (2002) quién trabajó con la misma bacteriocina. Para determinar el pH de máxima y mínima adsorción para la enterocina se realizó el experimento con valores de pH en un rango de 1 a 9. Los resultados se presentan en la Figura 6 .



**Figura 6.** Determinación del pH de máxima y mínima adsorción celular para la enterocina.

El valor de pH donde se encuentra mayor cantidad de bacteriocina adsorbida a las células es 5.0. La mayor actividad en el sobrenadante y menor actividad en las células se encontró a pH 1.

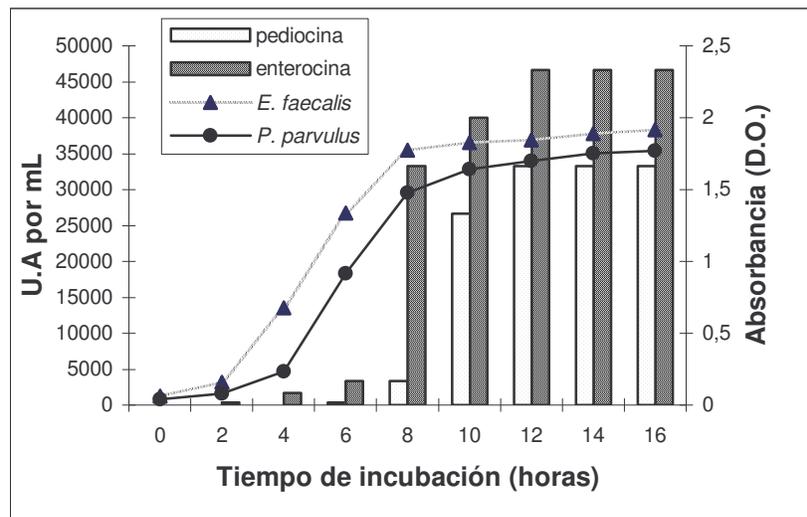
Como se desprende de los resultados obtenidos, el pH de 5.0 es el que presenta menor actividad en el sobrenadante y mayor actividad en las células, por lo que se infiere que la mayor cantidad de bacteriocina está adsorbida en las mismas. A su vez el pH de menor grado de adsorción registrado fue de 1, coincidiendo aquí la mayor actividad en el sobrenadante con la menor actividad inhibitoria en las células. Si bien no se encontraron reportes sobre la utilización del método de adsorción-pH dependiente para la purificación parcial de enterocinas, estos valores son similares a los reportados para otras bacteriocinas del tipo pediocina (Bhunja y col., 1991; Hernández-López, 2002) leucocina, nisina y sakacina (Yang y col.; 1992). El efecto de mayor o menor adsorción de la bacteriocina a las células se debe fundamentalmente a las interacciones electrostáticas entre los fosfolípidos aniónicos de la membrana y la bacteriocina de carácter catiónico.

#### 4.2.5. Determinación de la producción máxima de las bacteriocinas según la fase de crecimiento

Este ensayo tuvo como objetivo determinar en que fase del crecimiento se daba la máxima producción de bacteriocinas. Para el caso de *E. faecalis*, la mayor producción se

registró a partir de las doce horas de incubación. Este tiempo corresponde a los inicios de la fase estacionaria-finales de fase logarítmica de crecimiento de la cepa productora semejante a lo descrito por Du Toit y *col.* (2000) para cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* productoras de bacteriocinas. Para el caso de *P. parvulus*, el resultado fue similar, registrándose la máxima producción a las 12 horas de incubación, difiriendo en cierto grado este valor con lo reportado por Henández-López (2002), quién obtuvo tasas máximas de producción de 12 horas al utilizar temperaturas de incubación de 30°C. Estas diferencias podrían deberse a pequeñas modificaciones en los experimentos, tal como cantidad de inóculo inicial y/o a diferencias en la medición de los halos de inhibición.

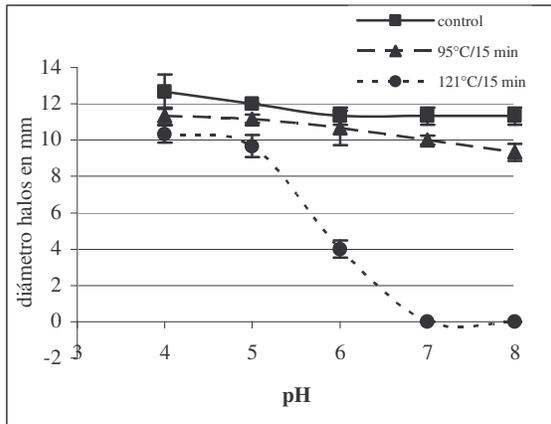
El patrón de producción de bacteriocinas tanto para la enterocina MXVK22 como para la pediocina MXVK133 parece ser el de metabolitos secundarios, en donde el incremento en la tasa de crecimiento celular no va directamente asociado con el incremento en la producción de bacteriocina. Esta característica ha sido reportada por varios autores para diversas bacteriocinas de la clase IIa (Parente y *col.*, 1996; Leroy y de Vuyst, 1999; Guerra y Pastrana, 2002). En la Figura 7 se presentan los resultados.



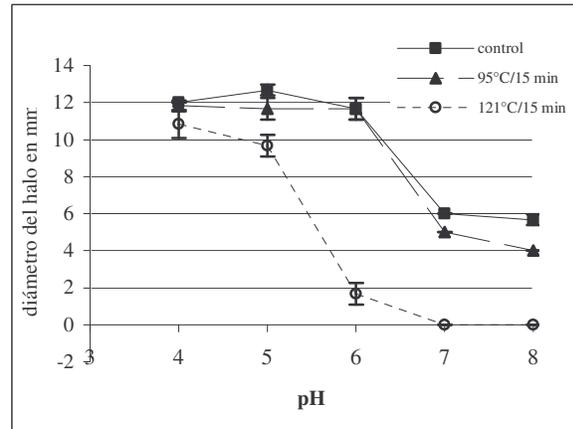
**Figura 7.** Producción de bacteriocinas en relación a la curva de crecimiento microbiano.

#### 4.2.6. Termoestabilidad de las bacteriocinas a diferentes valores de pH

Dos tratamientos de altas temperaturas y con distintos valores de pH fueron aplicados a ambas bacteriocinas. Las Figuras 8 y 9 muestran los resultados obtenidos después de los tratamientos térmicos de 95°C y 115°C durante 15 minutos y con valores de pH entre 4 y 8. Como puede apreciarse el valor de pH de los extractos fue determinante sobre la estabilidad térmica de la pediocina MXVK133 y la enterocina MXVK22. Los extractos con valores de pH bajos (4-5) tuvieron pérdidas mínimas o nulas de su actividad antimicrobiana. Sin embargo al aumentar el pH las soluciones perdieron totalmente su actividad.



**Figura 8.** Termoestabilidad de la enterocina. Actividad antimicrobiana de la enterocina después de tratamientos térmicos a 95°C y 121°C durante 15 minutos a diferentes valores de pH.



**Figura 9.** Termoestabilidad de la pediocina. Actividad antimicrobiana de la pediocina después de tratamientos térmicos a 95°C y 121°C durante 15 minutos a diferentes valores de pH.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Bhunia y *col.* (1988), Ray y Miller (2000) y Foulque y *col.* (2003) para otras pediocinas y enterocinas. Estos autores reportan datos similares, mencionando también la notoria influencia del pH sobre la resistencia a la temperatura de varias bacteriocinas. Las condiciones de esterilización que inactivaron los extractos a pH 8 en ambas bacteriocinas y aún los de pH 7 de pediocina, mantuvieron una actividad superior al 90% a pH 4. Este efecto podría explicarse debido a la estructura que adoptarían estos péptidos con valores de pH más bajos. Abriouel y *col.*

(2001), estudiaron la influencia de factores físico químicos sobre la oligomerización y la actividad biológica de una bacteriocina producida por *E. faecalis*. Los autores encontraron que el pH y la concentración de proteína podían modificar la oligomerización de la bacteriocina, de forma que altos valores de pH (6-8) y de proteínas (más de 0.55 mg/mL) favorecieron la formación de dímeros. Como estos valores de pH inducen el mayor grado de oligomerización, los resultados sugieren que los oligómeros son mucho menos estables que los monómeros. Se conoce que las pediocinas son capaces de formar dímeros y precipitar cuando se obtienen en extractos altamente purificados (Ray y Miller, 2000). De Vuyst y Vandame (1994b) sugieren que la termoestabilidad podría deberse a la formación de estructuras globulares compactas estabilizadas por uniones covalentes.

Por otra parte, los puentes disulfuro entre los grupos sulfidrilo de las cisteínas presentes en las bacteriocinas de la clase IIa confieren estabilidad al péptido y son en parte los responsables de la rigidez y plegamientos de la molécula, manteniendo su estabilidad en diferentes condiciones de pH, osmolaridad y temperatura. Estos datos resultan de gran importancia en vista de la aplicación potencial de estas sustancias como antimicrobianos en alimentos, fundamentalmente en aquellos que requieran de tratamientos térmicos durante su procesado.

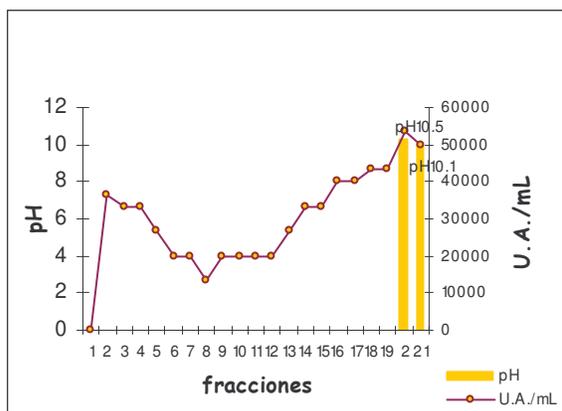
#### 4.2.7. Isoelectroenfoque preparativo

La separación por isoelectroenfoque preparativo de las bacteriocinas utilizando extractos sin purificar (Figuras 11 y 13) resultó más precisa que aquella realizada con el extracto purificado (Figuras 10 y 12). Cuando se emplearon estos últimos no se obtuvo una separación eficiente apareciendo actividad antimicrobiana en gran parte de las fracciones dentro de la escala de pH. Esto podría explicarse en parte por el fenómeno de agregación, ya comentado anteriormente y descrito para algunas bacteriocinas en extractos concentrados y purificados. La formación de estos agregados impediría la separación correcta de las bacteriocinas, encontrándose actividad antimicrobiana en gran parte de las fracciones. Por otra parte, los anfolitos utilizados fueron de intervalo amplio, para valores de pH de 3 a 10. La utilización de anfolitos de menor intervalo de pH y más cercano al

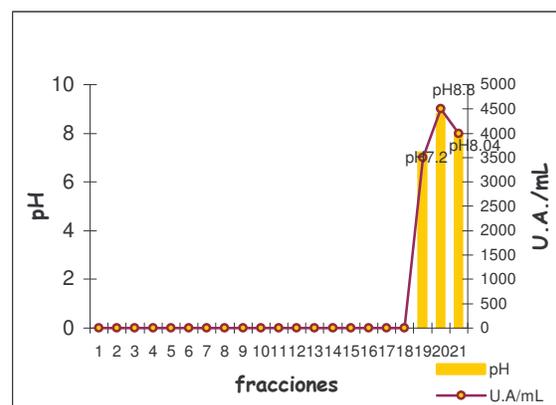
punto isoelectrico de las bacteriocinas probablemente podría traducirse en una separación más eficiente del extracto purificado. Según lo indicado en las Figuras 11 y 13 la mayor actividad antimicrobiana se encontró en el valor de pH de 8.65 para la pediocina y 8.8 para la enterocina. Estos valores son similares a los que se reportan para bacteriocinas de la clase IIa (Nes y Holo, 2000).

La pediocina PA-1 tiene un pI de 9.6 según Ray y Miller (2000), mientras que Venema y *col.* (1997) encontraron un pI cercano a 9 cuando purificaron por isoelectroenfoque esta misma pediocina. El cálculo teórico en base a la secuencia de aminoácidos de la pediocina MXVK133 es de 8.53.

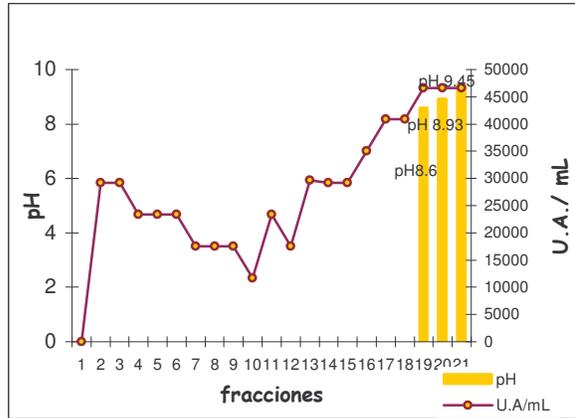
Para las enterocinas, los pI citados por la bibliografía son variables. Casaus y *col.* (1997) encontraron un pI de 9.49 para la enterocina B; Ennahar y *col.* (2001) citan un pI calculado en 9.07 para la enterocina A. Estos valores aproximados de punto isoelectrico implicarían que la solubilidad de la bacteriocina aumentará a pH bajos. Al aumentar el pH podrían formarse agregados resultando en una pérdida de actividad aparente como lo mencionan Schved y *col.* (1993). Este efecto se puede ver notoriamente en los resultados de inactivación por calor de la pediocina al compararlo con el control. En el caso de la enterocina no se aprecia una inactivación tan marcada a pH alto.



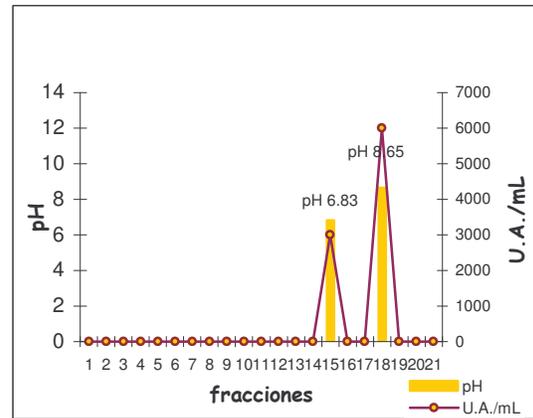
**Figura 10.** Isoelectroenfoque utilizando extracto purificado de enterocina.



**Figura 11.** Isoelectroenfoque utilizando extracto crudo de enterocina.



**Figura 12.** Isoelectroenfoque utilizando extracto purificado de pediocina

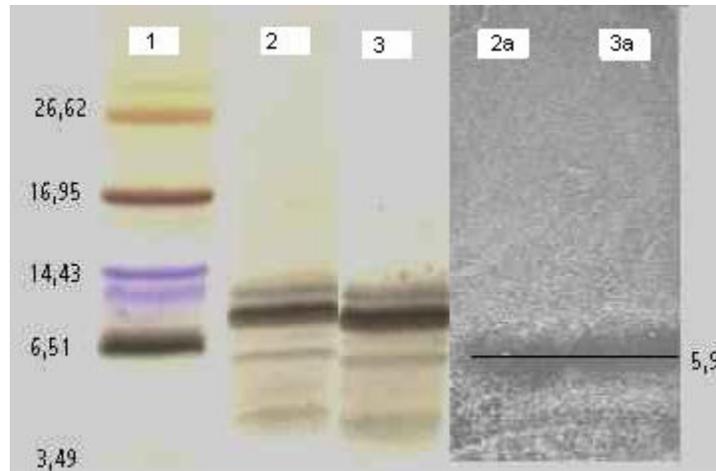


**Figura 13.** Isoelectroenfoque utilizando extracto crudo de pediocina

#### 4.2.8. Electroforesis

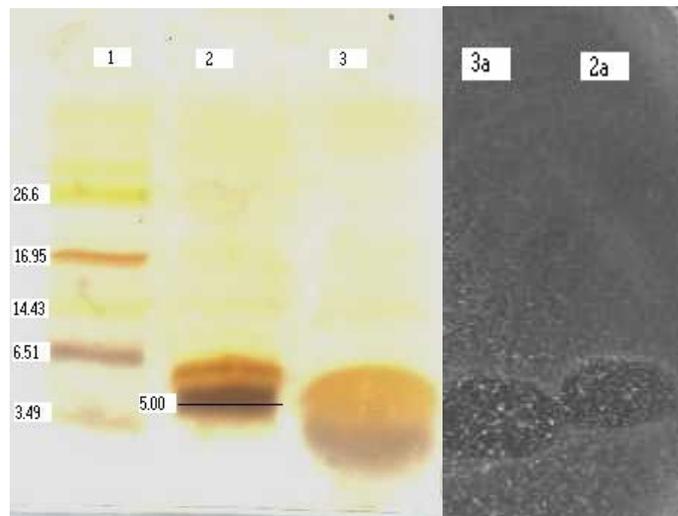
El peso molecular estimado para la enterocina fue de 5.9 kDa (Figura 14) mientras que para la pediocina fue de 5 kDa (Figura 15). En las dos figuras se puede observar las muestras corridas tanto con SDS como sin él.

En el caso de la pediocina se observa que la resolución de las bandas mejora en parte con la adición de SDS, en comparación con el carril sin la adición de dicho compuesto. No ocurrió lo mismo con la enterocina, para la cual no se detectaron diferencias entre el carril con SDS o sin él. Sin embargo, los halos inhibitorios de las muestras con SDS son algo mayores en el gel de actividad que los de las muestras sin SDS, indicando probablemente que esta sustancia ejerce un efecto de disrupción de algunos oligómeros resultantes del fenómeno de agregación mencionado por Ray y Miller (2000), lo que podría traducirse en un aumento aparente de la actividad antimicrobiana.



**Figura 14.** Tricina-SDS-PAGE (10-16 % T) de la enterocina MXVK22.

El carril 1 muestra los marcadores de peso molecular. Los carriles 2 y 3 contienen las muestras de enterocina sin SDS y con 2% de SDS extra en la muestra, respectivamente. La línea negra indica el peso molecular estimado de la bacteriocina (5.9 kDa) sobre el gel de actividad. Los carriles 2a y 3a corresponden a las bandas activas de los carriles 2 y 3 respectivamente.



**Figura 15.** Tricina-SDS-PAGE (10-16 % T) de la pediocina MXVK133.

El carril 1 muestra los marcadores de peso molecular. El carril 2 contiene la pediocina MXVK133 sin la adición de SDS extra. La línea indica la localización de la banda activa y su peso molecular aproximado (5 kDa). El carril 3 contiene pediocina con 2% de SDS adicional. En este caso, la definición de la banda no fue clara y la banda de actividad resultó más difusa que en la muestra del carril 2. Los carriles 2a y 3a corresponden a los gels de actividad de los carriles 2 y 3 respectivamente.

#### 4.2.9. Determinación parcial de la secuencia de aminoácidos

Para la secuenciación aminoacídica se transfirió el gel de electroforesis a una membrana de PVDF y de allí se recortaron los trozos de membrana con las bandas de interés. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático de proteínas aplicando directamente los trozos de membrana mencionados. Los ciclos que se obtuvieron claramente fueron 17 para la pediocina y 15 para enterocina.

Las secuencias resultantes de la degradación de Edman de la molécula intacta de cada una de las bacteriocinas se presentan a continuación:

K Y Y G N G V T C G K H S C S V D

Pediocina: Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Thr-Cys-Gly-Lys-His-Ser-Cys-Ser-Val-Asp

K Y Y G N G V T Q G K H S Q S

Enterocina: Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Thr-Gln-Gly-Lys-His-Ser-Gln-Ser

Estos datos se introdujeron a la base de datos NCBI para realizar una comparación de “secuencias cortas de alta coincidencia”(short, nearly sequences) y determinar si existía similitud con secuencias de bacteriocinas reportadas anteriormente.

A continuación se presentan las secuencias que presentaban un mayor porcentaje de similitud con la pediocina MXVK133 (Tabla 8), en primer lugar, y posteriormente con la enterocina MXVK22 (Tabla 9).

### Pediocina MXVK133

**Tabla 8.** Comparación de secuencias cortas y de alineación casi exacta para pediocina ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

<b>Pediocina</b> [ <i>P. parvulus</i> MXVK133]	KYYGNGVTCGKHSCSVD
<b>Enterocina</b> [ <i>E. faecalis</i> MXVK22]	KYYGNGVTQCGKHSQS
Pediocin PA-1 [ <i>P. acidilactici</i> ] <a href="#">AAB23877</a> (1)	KYYGNGVTCGKHSCSVD
CoaA [ <i>B. coagulans</i> ] <a href="#">AAG28763</a> (2)	KYYGNGVTCGKHSCSVD
prebacteriocin 423 [ <i>L. plantarum</i> ] <a href="#">AAL09346</a> (3)	KYYGNGVTCGKHSCSVN
Bacteriocin sakacin P precursor [ <i>L. sakei</i> ] <a href="#">AAM88858</a> (4)	KYYGNGVHCGKHSC TVD

(1) Nieto Lozano y *col.*, 1992; (2) Le Marrec y *col.*, 2000; (3) van Reenen y *col.*, 2003; (4) Larsen y *col.*, 1993.

Como se desprende de esta comparación, los primeros 17 aminoácidos en el extremo N-terminal de la pediocina MXVK133 son idénticos a los de la pediocina A-1 (producida por *P. acidilactici*), y otras bacteriocinas de la clase IIa, como la coagulina producida por *B. coagulans*, y que difiere sólo en el aminoácido de la posición 41 (que en la pediocina A-1 es asparagina y en la coagulina es treonina) (Le Marrec y *col.*, 2000).

La prebacteriocina 423, el precursor de una bacteriocina producida por *L. plantarum*, y el precursor de sakacina difieren de la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK133 por uno y dos aminoácidos, respectivamente.

Estos datos sumados a las características fisicoquímicas descritas anteriormente, como peso molecular estimado, termorresistencia, punto isoeléctrico y su espectro inhibitorio nos indican que la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK133 es otra bacteriocina de la clase IIa “tipo pediocina”. Sin embargo sería necesaria la secuenciación completa del péptido para poder afirmar contundentemente que se trata de una nueva bacteriocina.

El análisis Blast para enterocina MXVK22 resultó en lo siguiente:

**Enterocina MXVK22****Tabla 9.** Comparación de secuencias cortas y de alineación casi exacta para enterocina ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

<b>Enterocina</b> ( <i>E. faecalis</i> MXVK22)	<b>KYYGNGVTQ GKHSQS</b>
Pediocin PA-1 [ <i>Pediococcus acidilactici</i> ] <a href="#">AAB23877</a> (1)	<b>KYYGNGVT CGKHS CS</b>
prebacteriocin 423 [ <i>Lactobacillus plantarum</i> ] <a href="#">AAL09346</a> (2)	<b>KYYGNGVT CGKHS CS</b>
CoaA [ <i>Bacillus coagulans</i> ] <a href="#">AAG28763</a> (3)	<b>KYYGNGVT CGKHS CS</b>
Bacteriocin sakacin P precursor [ <i>L. sakei</i> ] <a href="#">AAM88858</a> (4)	<b>KYYGNGVHC GKHSCT</b>

(1) Nieto Lozano y col., 1992; (2) van Reenen y col., 2003; (3) Le Marrec y col., 2000; (4) Larsen y col., 1993. En primer lugar se indica el nombre de la bacteriocina seguido por el nombre del microorganismo productor y finalmente el número de acceso en la base de datos.

**Tabla 10.** Secuencias de las enterocinas más estudiadas

<b>Enterocina</b> ( <i>E. faecalis</i> MXVK22)	<b>KYYGNGVTQ GKHSQS</b>
Enterocina CRL 35 [ <i>E. faecium</i> ] <a href="#">AAB37715</a> (1)	<b>KYYGNGVT LNK XGXS</b>
Enterocina A [ <i>E. faecium</i> ] <a href="#">CAA63890</a> (2)	<b>KYYGNGVYCTK NKCT</b>
Mundticin [ <i>E. mundtii</i> ] <a href="#">P80925</a> (3)	<b>KYYGNGV SCNKKGCSV</b>
Enterocina P [ <i>E. faecium</i> ] <a href="#">AAC45870</a> (4)	ATRS <b>YGNVY</b> C NNSK
Enterocina L50 A [ <i>E. faecium</i> ] <a href="#">CAA11520</a> (5)	MGAI AKLVTKFGWP
Enterocina I [ <i>E. faecium</i> ] <a href="#">CAA76199</a> (6)	MGAI AKLVAKFGWPI
Enterocina Q [ <i>E. faecium</i> ] <a href="#">AAP83165</a> (7)	MNFLKNGIAKWM TGA

(1) Farías y col., 1996 ; (2) Aymerich y col., 1996; (3) Bennik y col., 1998; (4) Cintas y col., 1997; (5) Cintas y col., 1998; (6) Floriano y col., 1998; (7) Cintas y col., 2000. En primer lugar se indica el nombre de la bacteriocina seguido por el nombre del microorganismo productor y finalmente el número de acceso en la base de datos.

Las secuencias resultantes de la comparación de Blast (Tabla 9) muestran alto porcentaje de similitud con las bacteriocinas de la clase IIa “tipo pediocinas”. La enterocina producida por *E. faecalis* MXVK22, además, difiere de las demás enterocinas reportadas

(Tabla 10). Los resultados indican que al menos los 15 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la enterocina poseen mayor parecido con la pediocina A-1 que con cualquier otra enterocina.

Con las enterocinas pertenecientes a la misma clase IIa, la enterocina MXVK22 comparte sólo cinco aminoácidos pertenecientes a la secuencia consenso YGNGV. Una característica importante de la bacteriocina producida por *E. faecalis* MXVK22 es la ausencia de las cisteínas de las posiciones 9 y 14, las cuales son características de los péptidos miembros de la clase IIa similares a pediocina AcH y que en la enterocina MXVK22 se encuentran reemplazadas por el aminoácido glutamina.

El contenido de cisteínas parecen estar relacionado con la eficacia antimicrobiana de las bacteriocinas (Jack y col., 1995); aquellas que contienen dos o más cisteínas capaces de formar puentes disulfuro tienen un espectro inhibitorio más amplio, mientras que las que no tienen cisteínas poseen un espectro inhibitorio reducido (Eijsink y col., 1998). Entre las enterocinas, la enterocina 4, la AS 48 y la ENTI no poseen cisteínas pero tienen un espectro de inhibición amplio (Martínez-Bueno y col., 1994; Joosten y col., 1996; Floriano y col., 1998), como pareciera ser también el caso de la enterocina caracterizada en este estudio, lo cual contradice la teoría planteada por los autores mencionados anteriormente.

Tal como lo demuestra la secuencia aminoacídica del extremo amino terminal, las propiedades de termoestabilidad, su pI aproximado y el espectro inhibitorio que posee, la enterocina producida por *E. faecalis* MXVK22 podría tratarse de una nueva bacteriocina, perteneciente a la clase IIa de bacteriocinas “tipo pediocina” y de secuencia consenso YGNGV en su extremo amino terminal, si bien es necesaria la secuenciación del gen estructural o la secuencia de aminoácidos completa para poder confirmar esto.

#### 4.3. Caracterización molecular de la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK133

La caracterización molecular de la pediocina se realizó con el objetivo de identificar el gen estructural de producción de la misma. Esto se llevó a cabo mediante la aplicación de la técnica conocida como hibridación de Southern y a través de la cual se logró la detección de fragmentos de ADN donde se localizan los genes involucrados en la producción de la pediocina MXVK133. Por otra parte también se realizaron ensayos para determinar si la producción de pediocina estaba codificada en plásmido. Finalmente se trabajó con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar y posteriormente secuenciar el fragmento de interés.

#### 4.3.1. Determinación de la localización en plásmido del gen para la pediocina

Dentro de las bacteriocinas producidas por microorganismos Gram positivos, incluido *Pediococcus*, el gen estructural que codifica para la producción de una bacteriocina específica puede estar ligado a un plásmido o al cromosoma. Entre las cepas de *Pediococcus* productoras de bacteriocina estudiadas hasta el momento los determinantes genéticos de esta característica han estado siempre ligados a plásmidos (Daeschel y Klaenhammer, 1985; Gonzalez y Kunka, 1987; Kim y col., 1992; Ray y col., 1992; Daba y col., 1994; Ray y Miller, 2000; Miller y col., 2005).

Este estudio se realizó con el objetivo de conocer si la producción de bacteriocina por *P. parvulus* VKMX133 estaba también codificada por un plásmido. Para esto se incubó la cepa en concentraciones crecientes de novobiocina y se seleccionaron colonias obtenidas del cultivo que presentó crecimiento visible en los tubos con mayores concentraciones del antibiótico, que en nuestro caso fue de 4 µg/mL de novobiocina. Estas colonias fueron evaluadas para producción de bacteriocina mediante la técnica descrita en Materiales y Métodos (punto 3.1.3) resultando todas negativas, lo que implica que la eliminación de plásmidos es suficiente para que desaparezca la producción de bacteriocina.

#### 4.3.2. Hibridación de Southern

#### 4.3.2.1. Diseño de sondas

El diseño de sondas necesarias para la hibridación de Southern se realizó en base a la secuencia aminoacídica del extremo amino terminal de la pediocina MXVK133. Como un determinado aminoácido puede estar codificado por más de un triplete, se realizó una búsqueda de patrón de utilización de codones para el género *Pediococcus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para de esta manera mejorar la especificidad de la hibridación. La Tabla 11 muestra la variabilidad de codones para un aminoácido determinado.

**Tabla 11.** Posibles codones para la codificación de los diferentes aminoácidos

AGA	UUA	AGC			
AGG	UUG	AGU			
GCA CGA	GGA	CUA	CCA UCA	ACA	GUA
GCC CGC	GGC	AUA CUC	CCC UCC	ACC	GUC
GCG CGG AAC GAC UGC GAA GGG CAC AUC CUG AAA			UUC CCG UCG	ACG UAC GUG	
GCU CGU AAU GAU UGU GAG GGU CAU AUU CUU AAG AUG UUU CCU UCU UGG ACU UAU GUU					
ala arg asn asp cys glu gly his ile leu lys met phe pro ser trp thr tyr val					

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Basados en los códigos preferenciales encontrados se realizó la deducción de codones de nucleótidos a partir de la lectura de aminoácidos obtenida de la secuenciación del extremo amino terminal, resultando en las siguientes sondas:

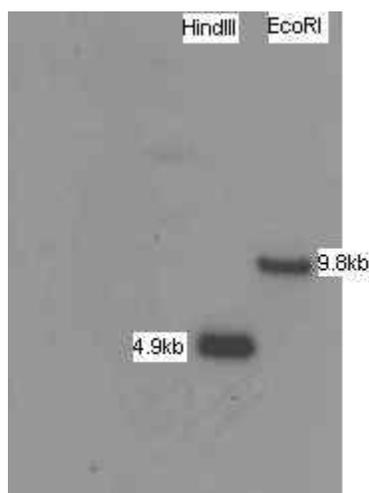
PI1: (5' a 3') GTI ACI TGT GGI AAA CAT WSW GTI GAT

PI2: (3' a 5') TTT ATG ATG CCI TTR CCI CAI TGI

La W corresponde a A o T, la S a C o G, la R a A o G y la I a inosina (una base inusual que puede aparearse con cualquiera de las otras bases, excepto con G). Estas bases se colocaron para disminuir la probabilidad de error que podría darse en determinados aminoácidos que tenían varios posibles tripletes de codificación.

#### 4.3.2.2. Hibridación

Los resultados obtenidos de la hibridación de Southern realizada con las dos sondas diseñadas a partir del extremo amino terminal de la pediocina MXVK133 se muestran en la Figura 16.



**Figura 16.** Hibridación de la pediocina MXVK133

La Figura 16 muestra la señal presentada al hibridar con las sondas el ADN digerido de *P. parvulus*. Las digestiones se realizaron con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*. Los fragmentos para los que se indica peso molecular estimado son los que se consideraron como positivos y se extrajeron para clonación. Las bandas marcadas presentaron un tamaño de 4.9 kpb y 9.8 kpb para los cortes con *HindIII* y *EcoRI*, respectivamente. Digestiones idénticas del ADN de *P. parvulus* fueron separadas en un gel de agarosa y los fragmentos de tamaño aproximado al esperado fueron sometidos a ligación en plásmido y transformación (de forma que se obtuviera una biblioteca parcial enriquecida en los tamaños de interés). Tras hibridar las colonias obtenidas con las dos sondas

---

anteriormente mencionadas no se pudo obtener ninguna que hubiera incorporado los fragmentos de ADN que contenían los genes para pediocina.

Como estrategia alternativa, con los cebadores o sondas diseñados en el punto anterior se intentó la clonación del fragmento por PCR inversa, algo ya contemplado como posibilidad a la hora del diseño inicial de las sondas. Esta es una técnica particular de PCR que amplifica las cadenas hacia los extremos partiendo de dos cebadores específicos que se unen a ADN circularizado. Esta técnica podría resultar útil para los casos en que no se conoce más que una pequeña parte de la secuencia problema y resulta insuficiente para diseñar cebadores de tamaño apropiado para la realización de un PCR convencional. Se trabajó con el ADN total de *P. parvulus* digerido con enzimas de restricción y posteriormente ligado para la generación de los fragmentos circulares. En la generación de estos fragmentos se evaluaron diversas variables como tiempo de ligación de los fragmentos, volumen de la mezcla de ligación, diferentes ligasas y concentraciones de ADN. Por otro lado también se probaron distintas variables en las condiciones de la amplificación para establecer las condiciones adecuadas, como fueron: tiempo y temperatura de hibridación, polimerasas, tiempo de polimerización y concentración de cloruro de magnesio.

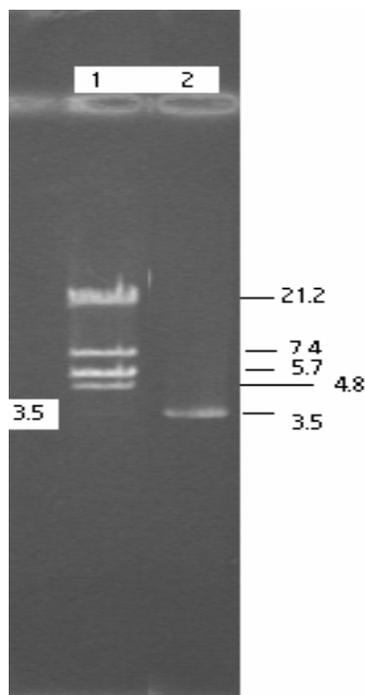
Si bien la utilización de la PCR inversa resultaba una técnica interesante para nuestros objetivos, no se lograron resultados positivos de la aplicación de la misma durante el desarrollo de esta tesis. Ciertos pasos de esta técnica, como son la circularización de los fragmentos de ADN digeridos y la utilización de cebadores muy pequeños que requieren temperaturas de hibridación relativamente bajas, son claves y deben ser optimizados en el futuro para lograr la amplificación del fragmento de interés.

#### 4.3.3. Clonación por PCR del operón de la pediocina

La amplificación del cluster de genes de pediocina se consiguió finalmente mediante

un PCR tradicional utilizando cebadores basados en el operón de la pediocina ACh reportado por Miller y *col.* (2005), uno de cada extremo del operón y bajo las condiciones descritas en el punto 3.3.6.

La banda amplificada obtenida presentó un tamaño aproximado de 3.5 kpb y se muestra en el carril 1 de la Figura 17.



**Figura 17.** Fragmento amplificado por PCR correspondiente al gen estructural de la pediocina MXVK133.

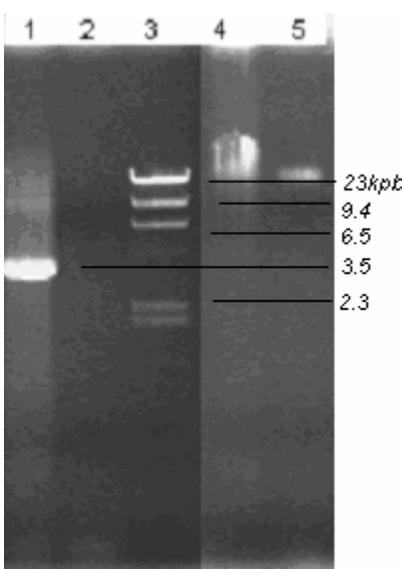
Carril 1: marcador de peso molecular lambda *EcoRI*. Carril 2: Fragmento amplificado partiendo del ADN de *P. parvulus* MXVK133 de aproximadamente 3.5 kpb.

#### 4.3.4. PCR de cepas curadas y cepa original

Como prueba confirmatoria para determinar la codificación plasmídica de la

producción de bacteriocina, se procedió a extraer el ADN total de una de las colonias de la cepa curada y se realizó un PCR teniendo como control positivo la cepa original (no curada) de *P. parvulus* MXVK133.

Los resultados se muestran en la Figura 18. En el carril 1 se muestra la banda amplificada por PCR utilizando ADN de la cepa de *P. parvulus* MXVK133 original con los oligonucleótidos citados en el punto 3.2.6, mientras que el carril 2 contiene la muestra de ADN de la cepa curada sometida a las mismas condiciones de amplificación que 1. Como puede observarse la cepa curada no registra amplificación alguna, por lo que podemos deducir que la producción de pediocina MXVK133 es de codificación plasmídica.



**Figura 18.** PCR de cepas curadas y no curadas de *P. parvulus* MXVK133.

Carril 1: banda amplificada por PCR utilizando ADN de la cepa de *P. parvulus* MXVK133 original. Carril 2: PCR del ADN de la cepa curada. Carril 3: marcador de peso molecular ( $\lambda$  *Hind*III). Carriles 4 y 5: ADN total de la cepa de *P. parvulus* MXVK133 original y de la cepa curada utilizado para las reacciones 1 y 2 respectivamente.

#### 4.3.5. Análisis de secuencia

El producto del PCR se purificó mediante un kit de purificación de productos de PCR QIAquick PCR Purification (Qiagen, Valencia, California) y el ADN recuperado se utilizó para la determinación de su secuencia de nucleótidos. Ésta se realizó con los dos cebadores utilizados para el PCR con el fin de obtener datos más certeros.

Una vez obtenida la secuencia se realizó un análisis por BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)), para establecer la similitud con secuencias reportadas anteriormente.

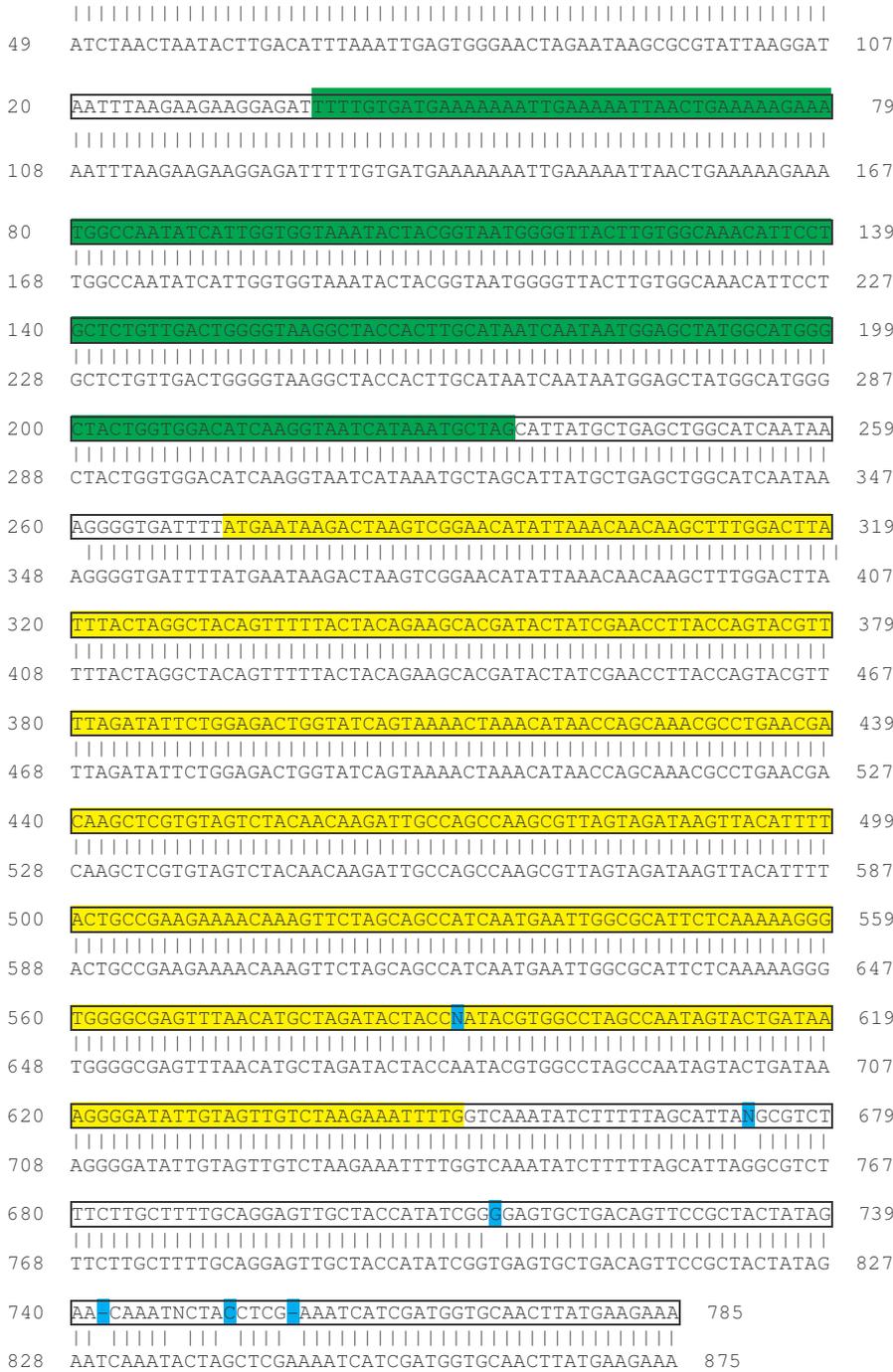
Los resultados de alineación por similitud fueron los siguientes:

[AY705375.1](#) | *Pediococcus acidilactici* strain K10 pediocin operon  
[U02482.2](#) | [PAU02482](#) | *Pediococcus acidilactici* H plasmid pSMB74  
[M83924.1](#) | [PDCBCTCN](#) | *Pediococcus acidilactici* bacteriocin operon genes  
[AY316525.1](#) | *Pediococcus pentosaceus* plasmid pS34 pediocin AcH production operon  
[AY316524.1](#) | *Pediococcus parvulus* plasmid pAT077 pediocin AcH production operon  
[AY316526.1](#) | *Lactobacillus plantarum* plasmid pWHE92 pediocin AcH production operon  
[AF300457.1](#) | [AF300457](#) | *Bacillus coagulans* plasmid pI4 coagulin operon  
[AY083244.3](#) | *Pediococcus acidilactici* pediocin (*pedA*) gene  
[AJ242489.1](#) | [LPL242489](#) | *Lactobacillus plantarum* *pedB* gene for putative pediocin AcH/PA-1 immunity protein  
[AJ242488.1](#) | [PPA242488](#) | *Pediococcus parvulus* *pedB* gene for putative pediocin AcH/PA-1 immunity protein

La alineación con estos microorganismos se da a nivel del operón de la pediocina A1 o AcH, ya que todos ellos son productores de dicha pediocina. La Figura 19 muestra la secuencia obtenida de la pediocina MXVK133 alineada con la secuencia del operón de la pediocina A1 reportada en base de datos ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). El cebador utilizado para la secuenciación de este fragmento se detalla a continuación:

PPR: (5' a 3') GAC GAA TTC GAT TTC ACG GAC AAG AAT AGT CTA T

1 ----- GATAGCGCGTATTAAGGTT 19



**Figura 19.** Comparación de la secuencia nucleotídica obtenida para *P. parvulus* MXVK133 con la pediocina AcH.

Secuencia nucleotídica de la pediocina MXVK133 (en recuadro) comparada con la secuencia de la pediocina AcH (abajo). En verde se muestra la ubicación del gen *pedA* que es idéntico al de la pediocina AcH y en amarillo el gen *pedB* asociado con la inmunidad a la propia bacteriocina, también idéntico al de la pediocina AcH. Los recuadros en celeste indican los puntos de no coincidencia o de no lectura en la

secuencia de la pediocina MXVK133.

Como se ve en la comparación de secuencias el gen de inmunidad y el gen de la prepediocina de la pediocina A1 o AcH (*pedB* y *pedA* respectivamente), son idénticos al de la pediocina MXVK133. En la pediocina MXVK133 se localiza el gen de inmunidad *pedB* a partir de la base 272 hasta la base 650 y el *pedA* a partir de la base 39 y hasta la base 234.

Estos resultados complementan los datos de la secuencia aminoacídica y nos permiten concluir que la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK133 es idéntica a la pediocina A1 o AcH. Varios microorganismos, entre ellos algunas especies de *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Bacillus* han sido descritos como productores de esta bacteriocina (Nieto Lozano y col., 1992; Le Marrec y col., 2000; van Reenen y col., 2003; Larsen y col., 1993). Un trabajo recientemente publicado por Miller y col. (2005) demostró que la producción de pediocina AcH está dirigida por un cassette de genes común que está diseminado en plásmidos únicos en diferentes géneros de bacterias acidolácticas (*L. plantarum* WHE92, *P. pentosaceus* S34, *P. parvulus* ATO77).

Estudios en particular sobre la conformación plasmídica y la organización del operón productor de la pediocina MXVK133 resultan aún interesantes para poder continuar con el desarrollo de cepas de alta producción y/o expresión heteróloga.

#### 4.4. Síntesis de resultados

- Los compuestos antimicrobianos producidos por *P. parvulus* MXVK133 y *E. faecalis* MXVK22 son de origen proteico
- Estas sustancias presentan un espectro antimicrobiano similar a las bacteriocinas de la clase IIa con gran actividad frente a *Listeria*
- La recuperación de bacteriocinas mediante la técnica de purificación de adsorción pH dependiente es mayor en medio TGE
- A valor de pH 5 la máxima cantidad de enterocina está adsorbida a las células, mientras que a pH 1 se presenta la adsorción mínima
- El incremento en la producción de bacteriocinas está asociado al crecimiento celular en ambas cepas
- Ambas bacteriocinas son termoestables y su termoestabilidad aumenta al disminuir el pH
- El punto isoeléctrico de la pediocina se encuentra aproximadamente en 8.65 mientras que el de la enterocina está a pH 8.8.
- El peso molecular estimado por electroforesis es de 5.9 para la enterocina de 5.00 para la pediocina
- La secuencia aminoacídica del extremo aminoterminal de la pediocina es idéntica a la de la pediocina A-1 o AcH
- La secuencia aminoacídica de la enterocina no muestra coincidencia total con las enterocinas reportadas en bases de datos, aunque sus características bioquímicas son muy similares a las de las bacteriocinas de la clase IIa

- La pediocina producida por *P. parvulus* MXVK133 es de codificación plasmídica

#### 4.5. Conclusiones finales

Las propiedades fisicoquímicas y finalmente, la secuencia nucleotídica de la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK133 indica que es idéntica a la pediocina AcH, bacteriocina de la clase IIa, con gran actividad contra *Listeria* y con la secuencia consenso YGNGV en su parte amino terminal.

En el caso de la enterocina MXVK22, podría tratarse de un miembro de este mismo grupo de bacteriocinas “tipo pediocina”, ya que su secuencia de aminoácidos difiere por lo menos en dos residuos con las bacteriocinas reportadas previamente. Sin embargo es necesaria la secuenciación completa de esta bacteriocina para poder confirmar este dato.

#### 4.6. Perspectivas

La tendencia de los consumidores al consumo de productos naturales, sin el uso de aditivos o sustancias sintéticas agregadas que pudieran causar algún efecto nocivo a corto o largo plazo en su salud, plantean una problemática secundaria referida a la vida de anaquel de los alimentos. Muchas de estas sustancias tienen la función de prolongar la vida de anaquel del mismo al evitar o retrasar la proliferación de microorganismos patógenos y/o de deterioro. Las bacteriocinas parecerían ser parte de la solución a este problema, ya que son sustancias naturales, susceptibles de degradación por las enzimas del tracto digestivo y que no resultan tóxicas al ser ingeridas.

Muchos estudios se han publicado sobre estas sustancias y su aplicación eficaz como antimicrobiano en alimentos, tanto como sustancias purificadas o por aplicación directa de los cultivos productores de las mismas. Por otra parte, se han estudiado en detalle las características genético-moleculares de estas sustancias lo cual ha aportado información relevante sobre los procesos de síntesis, transporte, mecanismos de acción, resistencia e

inmunidad, entre otros. Si bien estos avances han mejorado mucho el conocimiento sobre estas sustancias, aún quedan muchos puntos a estudiar para su aplicación directa a productos de consumo. Para el caso de las pediocina MXVK133 actualmente se está experimentando su comportamiento en películas comestibles para su aplicación en alimentos sólidos.

Si bien los datos reportados en esta tesis presentan una caracterización general de pediocina MXVK133 y enterocina MXVK22, aún resta la profundización sobre sus características genético-moleculares para poder continuar con la sobreexpresión de la pediocina o la producción heteróloga en la misma cepa de dos o más bacteriocinas de interés como podrían ser la nisina o la enterocina MXVK22 y así ampliar el espectro inhibitorio de la cepa que las contiene.

Por otra parte también es necesario obtener mayores datos sobre la implementación de estas bacteriocinas directamente en alimentos cárnicos para determinar cuáles son las condiciones óptimas de estabilidad y de efectividad al ser aplicadas sobre estos productos.

**Bibliografía:**

1. Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A., y Maqueda, M. 2001. Influence of physico-chemical factors on the oligomerization and biological activity of bacteriocin AS-48. *Current Microbiology*, **42**:89-95.
2. Abriouel, H., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez Bueno, M., y Valdivia, E. 2002. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth on strain of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**:1473-1477.
3. Achemchem, F., Martínez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E., y Maqueda M. 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *Journal of Applied Microbiology*, **99**:141-150.
4. Allison, G.E., Worobo, R.W., Stiles, M.E., y Klaenhammer, T.R. 1995. Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**:1371-1377.
5. Ananou, S., Valdivia, E., Martinez Bueno, M., Gálvez, A., y Maqueda, M. 2004. Effect of combined physico-chemical preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain. *Journal of Applied Microbiology*, **97**:48-56.
6. Arqués, J.L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B., y Nuñez, M. 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, **98**:254-260.

7. Aubin, J., Gatesoupe, F-J., Labbé, L., y Lebrun, L. 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, **36**:758-767.
8. Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M., y Nes, I.F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**:1676-1682.
9. Aymerich, T., Artigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M., y Hugas, M. 2000a. Effect of sausages ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of *in vitro* production and anti-listeria effect in dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, **88**:686-694.
10. Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M., y Hugas, M. 2000b. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection*, **63**:721-726.
11. Bareffot, S.F., y Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**:1808-1815.
12. Bauer, R., Chikindas, M.L., y Dicks, L.M. 2005. Purification, partial amino acid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *International Journal of Food Microbiology*, **101**:17-27.
13. Bell, C., y Kyriakides, A. 1998. Outbreaks: causes and lessons to be learnt. En "Listeria. A Practical Approach to the Organism and its Control in Foods." Editado por Bell, C., y Kyriakides, A. Blackie Academic & Professional, Nueva York, EUA, pp. 10-29.

14. Bennik, M. H., Smid, E.J., y Gorris, L.G.M. 1997. Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA1. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:2074-2076.
15. Bennik, M. H. J., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L. G. M., y Smid, E. J. 1998. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*, full characterization and interaction with target organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1373**:47-58.
16. Bennik, M.H.J., van Overbeek, W., Smid, E.J., y Gorris, L.G.M. 1999. Biopreservation in modified atmosphere stored mungbean sprouts: the use of vegetable-associated bacteriocinogenic lactic acid bacteria to control the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, **28**:226-232.
17. Bhunia, A.K., Johnson, M.C., y Ray, B. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology*, **2**:319-322.
18. Bhunia, A.K., Johnson, M.C., y Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, **65**:261-268.
19. Bhunia, A.K., Johnson, M.C.; Ray, B., y Kalchayanad, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*, **70**:25-33.
20. Biet, F., Berjeaud, J.M., Worobo, R. W., Cenatiempo, Y., y Fremaux, C. 1998. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway. *Microbiology*, **144**:2845-2854.

21. Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., y Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Applied and Environmental Microbiology, **57**:1265-1267.
22. Bouzaine, T., Dauphin, R.D., Thonart, Ph., Urdaci, M.C., y Hamdi, M. 2005. Adherence and colonization properties of *Lactobacillus rhamnosus* TB1, a broiler chicken isolate. Letters in Applied Microbiology, **40**:391–396.
23. Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., y Sahl, H-G. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. Molecular Microbiology, **30**:317-327.
24. Bukhtiyarova, M., Yang, R., y Ray, B. 1994. Analysis of the pediocin AcH cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. Applied and Environmental Microbiology, **60**:3405-3408.
25. Buyong, N., Kok, J., y Luchansky, J.B. 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin - producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. Applied and Environmental Microbiology, **64**:4842-4845.
26. Cabo, M.L., Murado, M.A., Gonzalez, M.P., Vazquez, J.A., y Pastoriza, L. 2001. An empirical model for describing the effects of nitrogen sources on nisin production. Letters in Applied Microbiology, **33**:425-429.
27. Campanini, M., Pedrazzoni, I., Barbuti, S., y Baldini, P. 1993. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic acid bacteria starter cultures. International Journal of Food Microbiology, **20**:169-175.

- 
28. Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. y Holo, H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, **143**:2287-2294.
29. Cintas, L.M.; Rodríguez, J.M., Fernández, M.F., Sletten, Nes, I.F., Hernández, P.E., y Holo, H. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**:2643-2648.
30. Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernández, P.E., y Nes, I.F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:4321-4330.
31. Cintas, L.M, Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., y Havarstein, L.S. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*, **180**:1988-1994.
32. Cintas, L.M., Casaus,P., Herranz, C., Havarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., y Nes, I.F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces Enterocin L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology*, **182**:6806-6814.
33. Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., y Hernández, P.E. 2001. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, **7**:281-305.
34. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., y Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **71**:1-20.

- 
35. Coderre, P.E., y Somkuti, G.A. 1999. Cloning and expression of the pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. *Current Microbiology*, **39**:295-301.
36. Cotter, P.D., Hill, C., y Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature, Microbiology Reviews*, **3**:777-788.
37. Crandall, A.D., y Montville, T.J. 1998. Nisin resistance in *L. monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**:231-237.
38. Chen, H., y Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Technology*, **2**:82-99.
39. Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M., y Montville, T. 1997a. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:524-531.
40. Chen, Y., Ludescher, R.D., y Montville, T.J. 1997b. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:4770-4777.
41. Chen, C.-M., Sebranek, J.G., Dickson, J.S., y Mendonca, A.F. 2004. Combining pediocin with postpackaging irradiation for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *Journal of Food Protection*, **67**:1866-1875.

- 
42. Chikindas, M.L., García-Garcera, M.J., Driessen, A.J.M., Ledebøer, A.M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N., y Venema, G. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin of *Pediococcus acidilacti* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**:3577-3584.
43. Chikindas, M.L., Venema, K., Ledebøer, A.M., Venema, G., y Kok, J. 1995. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Letters in Applied Microbiology*, **21**:183-189.
44. Church, G.M., y Gilbert, W. 1984. Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **81**:1991-1995.
45. Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R.E., y Lemieux, L. 1994. Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *Journal of Applied Bacteriology*, **77**:682-688.
46. Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. *Food Technology*, **43**: 164-167.
47. Daeschel, M.A., y Klaenhammer, T.R. 1985. Association of a 13.6 megadaltons plasmid in *P. pentosaceus* with bacteriocin activity. *Applied and Environmental Microbiology*, **50**:1538-1541.
48. de Klerk H.C., y Smit J.A. 1967. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. *Journal of General Microbiology*, **48**:309-316.
49. de Martinis, E.C.P., Crandall, A.D., Mazotta, A.S. y Montville, T.J. 1997. Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **60**:420-423.

50. de Vuyst, L. y Vandamme, E. 1994a. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis and applications. En "Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, genetics and applications". Editado por de Vuyst, L., Vandamme, E. Blackie Academic and Professional, Londres, pp.151-221.
51. de Vuyst, L., y Vandamme, E.J. 1994b. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En "Lactic Acid Bacteria". Ed. By de Vuyst, L., y Vandamme, E.J. Glasgow Blackie Academic and Professional, pp. 91-142.
52. Doyle, E. 1999. Control of *Listeria* in meat. Food Research Institute. <http://www.wisc.edu/fri/briefs.htm>, pp.1-24.
53. Drosinos, E.H., Mataragas, M., Nasis, P., Galiotou, M., y Metaxopoulos, J. 2005. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. Journal of Applied Microbiology, (disponible en <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.2005.02735.x>). Aceptado para publicación Junio 2005.
54. Du Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., y Holzapfel, W.H. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. Journal of Applied Microbiology, **88**:482-494.
55. Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., y Nes, I. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, **64**:3275-3281.
56. Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., van Dorsselaar, A., Bringel, F., Hubert, J.C., y Hasselmann, C. 1996. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. Applied and Environmental Microbiology, **62**:4381-4387.

- 
57. Ennahar, S. y Deschamps, N. 2000. Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, **88**:449-457.
58. Ennahar, S., Sahihara, T., Sonomoto, K., e Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**:85-106.
59. Ennahar, S.; Asou, Y.; Zendo, T., Sonomoto, K., y Ishizaki, A. 2001. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE81. *International Journal of Food Microbiology*, **70**:291-301.
60. Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N.S. y Johnson, M.G. 2004. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157.H7, and *Salmonella gaminara*. *Journal of Food Science*, **69**:79-84.
61. Farias, M.E., Farias, R.N., de Ruiz Holgado, A.P., y Sesma, F. 1996. Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL 35, a 'pediocin-like' bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL 35. *Letters in Applied Microbiology*, **22**:417-419.
62. Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G., y Nissen-Meyer, J. 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *Journal of Bacteriology*, **182**:2643-2648.
63. Fimland, G., Eijsink, V. G., y Nissen-Meyer; J. 2002. Mutational analysis of the role of tryptophane residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry* **41**:9508-9515.

- 
64. Floriano, B., Ruiz-Barba, J.L., y Jiménez-Díaz, R. 1998. Purification and genetic characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6TIIa, a novel antilisterial plasmid encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**:4883-4890.
65. Foulquie Moreno, M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., y de Vuyst, L. 2003. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology*, **94**:214-229.
66. Franz, C.M.A.P., Worobo, R.W., Quadri, L.E.N., Schillinger, U., Holzapfel, Vederas, J.C., y Stiles, M.E. 1999. Atypical locus associated with constitutive production of Enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 5:2170-2178.
67. García, M.T., Lucas, R., Abriouel, H, Omar, N.B, Pérez, R., Grande, M.J., Martínez-Cañamero, M., y Gálvez, A. 2004. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 against '*Bacillus macroides/Bacillus maroccanus*' isolated from zucchini purée. *Journal of Applied Microbiology*, **97**:731-737.
68. Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M., y Hugas, M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *Journal of Applied Microbiology*, **84**:125-132.
69. Gill, C.O. 1998. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. En "The Microbiology of Meat and Poultry". Editado por Davies, A., y Board, R. Blackie Academic and Professional, Nueva York, pp. 118-157.
70. Gonzalez, C.F., y Kunka, B.S. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**:2534-2538.

71. Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, B., Andersen, N., Jänsch, L., Héchard, Y., Hastings, J.W., y Knochel, S. 2002. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, **148**:2361-2369.
72. Gravesen, A., Kallipolitis, B., Holmstrom, K., Hoiby, E., Ramnath, M., y Knochel S. 2004. pbp2229-Mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**:1669-1679.
73. Guerra, N.P., Rua, L.M., y Pastrana, L. 2001. Nutricional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology*, **70**:267-281.
74. Guerra, N.P., y Pastrana, L. 2002. Dynamics of pediocin biosynthesis in batch fermentation on whey. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **1**:96-106.
75. Guerra, N.P. y Pastrana, L. 2003. Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology*, **37**:51-55.
76. Halami, P., Ramesh, A., y Chandrashekar, A. 2000. Megaplasmid encoding novel sugar utilizing phenotypes, pediocin production and immunity in *Pediococcus acidilactici* C20. *Food Microbiology*, **17**:475-483.
77. Hammes, W.P., y Knauf, H.J. 1994. Starters in the processing of meat products. *Meat Science*, **36**:155-168.
78. Héchard, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y. y Frére, J. 2001. Analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a manose PTS permease (EII<sup>Man</sup>) is involved in

- sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, **147**:1575-1580.
79. Hernández-López, J.C. 2002. Caracterización parcial de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
80. Horn, N., Martínez, M.I., Hernández, P., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M., y Dodd, H. 1999. Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:4443-4450.
81. Jack, R.W., Tagg, J.R., y Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Review*, **59**:171-200.
82. Jack, R.W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Wettenhall, R.E.H., Hickey, M., y Coventry, M.J. 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**:2897-2903.
83. Johnsen, L., Fimland, G., Eijsink, V., y Nissen-Meyer, J. 2000. Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**:4798-4802.
84. Johnsen, L., Fimland, G., y Nissen-Meyer, J. 2005. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**:9243-9250.
85. Joosten, H.M.L., Núñez, M., Devreese, B., van Beeumen, J., y Marugg, J. D. 1996. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**:4220-4223.

- 
86. Jung, G. 1991. Lantibiotics: a survey. En "Nisin and Novel Lantibiotics". Editado por G. Jung y H-G Sahl. Escom, Leiden, pp. 1-34.
87. Jydegaard, A.-M., Gravesen, A., y Knochel, S. 2000. Growth condition-related response of *Listeria monocytogenes* 412 to bacteriocin inactivation. Letters in Applied Microbiology, **31**:68-72.
88. Kang, J.H., y Lee, M.S. 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 from an infant. Journal of Applied Microbiology, **98**:1169-1176.
89. Katla, T., Moretro, T., Sveen, I., Aasen, I.M., Axelsson, L., Rorvik, L.M., y Naterstad, K. 2002. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. Journal of Applied Microbiology, **93**:191-196.
90. Kim, W.J., Ray, B., y Johnson, M.C. 1992. Plasmid transfers by conjugation and electroporation in *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Bacteriology, **72**:201-207.
91. Kim, W.S., Hall, R.J., y Dunn, N.W. 1997. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology Biotechnology, **48**:449-453.
92. Kim, Y-M., Paik, H-D., y Lee, D-S. 2002. Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin-coated plastic packaging film. Journal of the Science of Food and Agriculture, **82**:998-1002.
93. Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie, **70**:337-349.

- 
94. Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS. Microbiology Reviews, **12**:39-86.
95. Kuri, V. 1998. Regardless of the retail conditions lactic acid bacteria and *Salmonella* from Mexican pork products: characterization and antagonism. Tesis doctoral. Queen's University of Belfast. Irlanda del Norte, Reino Unido.
96. Larsen, A.G., Vogensen, F.K., y Josephsen, J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. Journal of Applied Bacteriology, **75**:113-122.
97. Lawson, P.A., Llop-Perez, P., Hutson, R.A., Hippe, H., and Collins, M.D. 1993. Towards a phylogeny of the clostridia based on 16S rRNA sequences. FEMS Microbiology Letters, **113**:87-92.
98. Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bresollier, P., Verneuil, B., y Urdaci, M.C. 2000. Biochemical and genetical characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I<sub>4</sub>. Applied and Environmental Microbiology, **66**:5213-5220.
99. Leroy, F., y de Vuyst, L. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. Applied and Environmental Microbiology, **65**:974-981.
100. Leroy, F., y de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology, **15**:67-78.
101. Leroy, F., Verluyten, J., y de Vuyst, L. 2005. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. International Journal of Food Microbiology (disponible en <http://www.sciencedirect.com>). Aceptado para publicar octubre 2005.

- 
102. Lewus C.B., Sun S., y Montville T.J. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 143–149.
103. Loesner, M., Guenter, S., Steffan, S., y Scherer, S. 2003. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**:1854-1857.
104. Losteinkit, C., Uchiyama, K., Ochi, S., Takaoka, T., Nagahisa, K., y Shioya, S. 2001. Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**:390-395.
105. Lücke, F.K. 1996. Lactic acid bacteria involved in food fermentations and their present and future uses in food industry. En “Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications”. Editado por Bozoglu, F.T. y Ray, B. NATO ASI Series. Springer, Berlín, pp. 81-101.
106. Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., Van Beeumen, J., Coyette, J., and Valdivia, E. 1994. Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *Journal of Bacteriology*, **176**:6334-6339.
107. Martínez, J.M., Kok, J., Sanders, J.W., y Hernández, P. E. 2000a. Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: Detection by specific peptide-directed antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**:3543–3549.

108. Martínez, J.M., Martínez, M.I., Herranz, C., Suárez, A.M., Cintas, L.M., Fernández, M.F., Rodríguez, J.M., y Hernández, P.E. 2000b. Use of genetic and immunological probes for pediocin PA-1 gene detection and quantification of bacteriocin production in *Pediococcus acidilactici* strains of meat origin. *Food and Agricultural Immunology*, **12**:299-310.
109. Marugg, J.D., Gonzales, C.F., Kunka, B.S., Ledebor, A.M., Pucci, M.J., Toonen, M.Y., Walker, S.A., Zoetmulder, L.C.M., y Vandenberg, P.A. 1992. Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1 from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**:2360-2367.
110. Mauriello, G., Ercolini, D., La Stora, A., Casaburi, A., y Villani, F. 2004. Development of polythene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *Journal of Applied Microbiology*, **97**:314-322.
111. Medici, M., Vinderola, C.G., Weill, R., y Perdigon, G. 2005. Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of an enteroinvasive *Escherichia coli* infection in mice. *Journal of Dairy Research*, **72**:243-9.
112. Meghrous, J., Lacroix, C., y Simard, R.E. 1999. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, **16**:105-114.
113. Miller, K.W., Ray, P., Steinmetz, T., Kanekamp, T., y Ray, B. 2005. Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. *Letters in Applied Microbiology*, **40**:56-62.
114. Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M.G., Senini, L., y Manachini, P.L. 2003. Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus Pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, **94**:561-570.

- 
115. Moll, G.N., Konings, W.N., y Driessen, A.J.M. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**:185-198.
116. Motlagh, A.M., Bukhtiyarova, M., y Ray, B. 1994. Complete nucleotide sequence of pSMB74 a plasmid encoding the production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology*, **18**:305-312.
117. Muñoz, A., Maqueda, M., Galvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A. y Valdivia, E. 2005. Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a nonfat hard cheese by an enterococcal strain-producing enterocin AS-48. *Journal of Food Protection*, **68**:448-450.
118. Mustapha, A., Ariyapitipun, T., y Clarke, A.D. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. *Journal of Food Science*, **67**:262-267.
119. Nes, I.F., y Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Peptide Science)*, **55**:50-61.
120. Nes, I.F.; Diep, D.B.; Havarstein, L.S., y Brurberg, M.B. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**:113-128.
121. Nielsen, J.W.; Dickson, J.S.; y Crouse, J.D. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**:2142-2145.
122. Nieto Lozano, J.C., Meyer, J.N., Sletten, K., Pelaz, C., y Nes, I.F. 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of General Microbiology*, **138**:1985-1990.

123. Nikaido, H., y Vaara, M. 1987. Outer membrane. In: *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. Cellular and molecular biology. Editado por Neidhardt, F.C. American Society for Microbiology. Washington, DC., pp. 7-22.
124. Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K. y Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*, **174**:5686-5692.
125. Núñez, M., Rodríguez, J.L., García, E., Gaya, P., y Medina, M. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology*, **83**:671-677.
126. Oakley, B.A., Kirsch, D.R., y Morris, N.R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **105**:361-363.
127. Oldham, E. R., y Daley, M. J. 1991. Lysostaphin: Use of a recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. *Journal of Dairy Science*, **74**:4175-4182.
128. Óscariz, J.C., y Pisabarro, A.G. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International Microbiology*, **4**:13-19.
129. Ouwehand, A. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En "Lactic Acid Bacteria". Microbiology and functional aspects. 2da Edición. Editado por Salminen, S., y von Wright, A. Marcel Dekker, Inc. Nueva York., p.145.
130. Parente, E., Moles, M., y Ricciardi, A. 1996. Leucocin F10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. *International Journal of Food Microbiology*, **33**:231-43.

131. Park, J.H., Seok, S.H., Cho, S.A., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Cheng, M.J., Kim, S.D., Hong, U.P., y Park, J.H. 2005. Antimicrobial effect of lactic acid producing bacteria culture condensate mixture (LCCM) against *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, **101**:111-117.
132. Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J.W., y Héchard, Y. 2004. Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, **150**:2663-2668.
133. Ray, B., Motlagh, A., Johnson, M.C., y Bozoglu, F. 1992. Mapping of pSMB74, a plasmid encoding bacteriocin, pediocin AcH, production (Pap +) by *Pediococcus acidilactici* H. *Letters in Applied Microbiology*, **15**:35-37.
134. Ray, B., Schamber, R., y Miller, K.W. 1999. The pediocin AcH precursor is biologically active. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:2281-2286.
135. Ray, B., y Miller, K.W. 2000. Pediocin. En "Natural Food Antimicrobial Systems". Editado por Naidu, A.S. CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 525-566.
136. Rodicio, M., y Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, **22**:238-245.
137. Rowland, I. 2004. Probiotics and colorectal cancer risk. *British Journal of Nutrition*, **91**:805-807.
138. Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C., y Jiménez-Díaz, R. 1991. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, **71**:417-421.

139. Ryan, M.P., Meaney, W.J., Ross, R. P., y Hill, C. 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**:2287–2290.
140. Sahl, H.G., y Bierbaum, G. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **52**:41-79.
141. Sánchez-Hidalgo, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Abriouel, H., Valdivia, E. y Martínez-Bueno, M. 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**:1633-1641.
142. Schägger, H., y von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **166**:368-379.
143. Schillinger, U., y Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**:1901-1906.
144. Schillinger, U., Kaya, M. y 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.
145. Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y., y Juven, B.L. 1993. Purification, partial characterization and plasmid linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, **74**:67-77.
146. Signorini, M. 2002. Efecto de la fermentación láctica sobre las propiedades funcionales de las proteínas cárnicas. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D.F.

- 
147. Signorini, M., Ponce-Alquicira, E., y Guerrero-Legarreta, I. 2003. Proteolytic and lipolytic changes in beef inoculated with spoilage microorganisms and bioprotective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Properties*, **6**:147-163.
148. Siragusa, G.R., Cutter, C.N., y Willett, J.L. 1999. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiology*, **16**:229-235.
149. Stevens, K. A., Klapes, N. A, Sheldon, B. W., y Klaenhammer, T. R.. 1992. Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**:1786–1788.
150. Stiles, M. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**:331-345.
151. Sudirman I., Mathieu F., Benoit, V., y Lefebvre, G. 1994. Properties of two bacteriocins synthesized by *Leuconostoc* strains. *Current Microbiology*, **28**:155–159.
152. Todorov, S.D, y Dicks, L.M.T. 2005. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus platarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. *Food Technology and Biotechnology*, **43**:165-173.
153. Tu, L., y Mustapha, A. 2002. Reduction of *Brochothrix thermosphacta* and *Salmonella* serotype *Typhimurim* on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin and nisin combined with EDTA. *Journal of Food Science*, **67**:302-306.
154. Upreti G.C. 1994. Lactocin 27, a bacteriocin produced by homofermentative *Lactobacillus helveticus* strain LP27. En “Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria”. Editado por de Vuyst, L., y Vandamme, E.J. Blackie Academic & Professional. Londres. pp. 331–335.

155. Vadyvaloo, V., Snoep, J.L., Hastings, J.W., y Rautenbach, M. 2004. Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*, **150**:335-340.
156. van Belkum, M.J., y Stiles, M.E. 2000. Nonantibiotics antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Product Reports*, **17**:323-335.
157. van Reenen, C.A., Dicks, L.M., y Chikindas, M.L. 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, **84**:1131-1137.
158. van Reenen, C.A., Chikindas, M.L., Van Zyl, W.H., y Dicks, L.M. 2003. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, **81**:9-40.
159. Venema, K., Kok, J., Marugy, J.D, Toonen, M.Y., Ledebøer, A.M., Venema, G., y Chikindas, M.L. 1995. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici*: *pedB* is the immunity protein and *pedD* is the precursor processing enzyme. *Molecular Microbiology*, **17**:515-522.
160. Venema, K., Chikindas, M.L, Seegers, J.F.M.L., Haandrikman, A.J.; Leenthou, K.J., Venema, G., y Kok, J. 1997. Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:305-309.
161. Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O., Bierbaum, G., de Kruijff, B., y Salh, H-G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**:1772-1779.

- 
162. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov). Centers for Disease Control and Prevention. Julio 2005.
163. [www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Original8Hour/Genetics/geneticcode.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Original8Hour/Genetics/geneticcode.html). National Center for Biotechnology Information. Octubre 2005.
164. Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., y Montville, J. 2005. Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, piscicocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:554-557.
165. Yanagida, F., Chen, Y., Onda, T., y Shinohara, T. 2005. Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*, **40**:430-435.
166. Yang, R.; Johnson, M., y Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**:3355-3359.
167. Yang, R., y Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, **11**:281-291.

---

## **Anexo 1:**

### **Secuenciación de aminoácidos**

Referencia: Procise™ Sequencing System User's Manual Set (1994). Applied Biosystems, Foster City, California.

El método "Pulsed-Liquid Blot" utilizado para la secuenciación de las bacteriocinas transferidas a membrana PVDF emplea varios submétodos que se mencionan a continuación:

-Flask Stándar, para el tratamiento del estándar de PTH-aminoácidos (que es una mezcla de los derivados feniltiohidantoín de los 20 aminoácidos, excepto cisteína).

-Fast Normal I, para la separación cromatográfica mediante HPLC de los PTH-aminoácidos (tanto del estándar como de los sucesivos PTH-aminoácidos de la proteína problema)

-Cart Pulsed-liquid Blot, para la degradación de Edman automática sucesiva de cada aminoácido de la proteína estudiada, y que da como resultado derivados anilintiazolinona de los sucesivos residuos de la proteína.

-Flask Normal Blot, para la conversión de los derivados anilintiazolinona de los sucesivos aminoácidos a derivados feniltiohidantoín

## Anexo 2

### 1. Soluciones y tampones para el aislamiento de ADN:

- **STET:** EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa al 8 % (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 8.0, Tritón X-100 al 0.5 % (v/v)
- **Fenol neutro:**
  1. Disolver los cristales de fenol en baño maría. Una vez disuelto, agregar un volumen igual de agua destilada estéril. Agitar esta solución 15 minutos para mezclar bien las dos fases y posteriormente dejar en reposo hasta que se separen bien las dos fases. Retirar cuidadosamente la fase superior con pipeta
  2. Agregar un volumen igual de 0.1 M Tris-Cl (pH 8). Agitar en agitador magnético durante 15 minutos. Dejar en reposo hasta que se separen bien las dos fases y retirar la fase acuosa superior como se describió en el punto 1
  3. Repetir las extracciones con Tris-Cl (pH 8) hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor a 7 (medido con papel indicador)
  4. Una vez equilibrado el fenol y retirada la fase acuosa superior se agrega 0.1 volumen de 0.1 M de Tris-Cl (pH 8)
  5. Conservar en refrigeración y protegido de la luz
- **CIA:** Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1

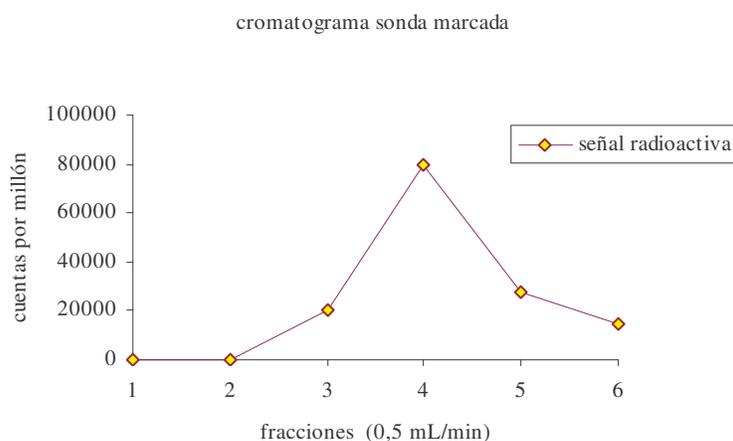
### 2. Soluciones y tampones para la hibridación:

- **SSC 20X:** citrato sódico 0.3 M y NaCl 3 M, ajustar a pH 7 con NaOH.
- Solución desnaturalizante: NaCl 1.5 M y NaOH 0.5M
- Solución neutralizante: NaCl 3 M y Tris-HCl 1 M pH 7.5.
- Búfer de transferencia: SSC 10X.

### Anexo 3:

#### Purificación de la sonda de ADN marcada radiactivamente para la hibridación de Southern

El lavado de la columna de filtración en gel (Econo-Pac® 10DG, Bio-Rad, Hercules, California) se realizó mediante el paso de 10 mL de agua destilada estéril y finalmente se introdujo 1 mL de la sonda marcada radiactivamente. Se recuperaron alícuotas de 0.5 mL y se midió la radiactividad en cpm (cuentas por minuto) mediante un contador tipo Geiger para cada una de las alícuotas. Los resultados se pueden apreciar en la siguiente gráfica:



De las fracciones obtenidas se recogieron las que presentaron mayor actividad (4 y 5).

## Anexo 4

### Análisis estadístico

#### Recuperación de bacteriocinas utilizando diferentes medios de cultivo.

#### Enterocina MXVK22

##### Factores

	N
Fase 1 Extracto crudo	12
2 Post adsorción	12
3 Extracto Final	12
Medio 1 TGE	12
2 MRS	12
3 CGB	12

#### ANOVA

Variable dependiente: inhibición

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Significancia
Fase	63.597	2	31.799	327.071	.000
Medio	3.014	2	1.507	15.500	.000
Fase-Medio	2.069	4	.517	5.321	.003
Error	2.625	27			

**Test de Duncan****Fase**

Fase	N	1	2	3
2.00 Post adsorción	12	4.4583		
1.00 Extracto crudo	12		6.2500	
3.00 Extracto final	12			7.7083

Alfa: .05

**Medio**

Medio	N	1	2	3
2.00 MRS	12	5.7917		
3.00 CGB	12		6.1250	
1.00 TGE	12			6.5000

Alfa: .05

**Pediocina MXVK133****Factores**

	N
Fase 1 Extracto crudo	9
2 Post adsorción	9
3 Extracto final	9
Medio 1 TGE	9
2 CGB	9
3 MRS	9

## ANOVA

Variable dependiente: inhibición

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Significancia
Fase	66.07	2	33.03	74.33	.000
Medio	6.74	2	3.37	7.58	.004
Fase-Medio	2.37	4	.59	1.33	.296

Test de DuncanFase

Fase	N	1	2	3
Post adsorción	9	6.55		
Extracto crudo	9		7.88	
Extracto final	9			10.33

Alfa: .05

Medio

Medio	N	1	2
CGB	9	7.66	
MRS	9	8.22	
TGE	9		8.88

Alfa: .05