

Detección de Proteínas con Actividad Antibacteriana Producidas por Bacterias Ácido Lácticas

Myrna Olvera-García, Carlos Eduardo Serrano-Maldonado y Maricarmen Quirasco*
*L-312, Conjunto E, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Coyoacán, D.F., México.*

E-mail: quirabma@unam.mx

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas se han empleado históricamente en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, como agentes de bioconservación. Tal función se atribuye a la producción de compuestos antibacterianos, como pueden ser los ácidos orgánicos o incluso compuestos de naturaleza proteínica, como las bacteriocinas y las enzimas que degradan la pared celular de bacterias (p. ej., peptidoglucano hidrolasas). Dichas proteínas pueden ser producidas por la bacteria en el alimento directamente durante la fermentación, o se pueden adicionar en su forma purificada. Su potencial biotecnológico ha ocasionado que en varios grupos de investigación exista el interés de caracterizar a las proteínas responsables de dicho efecto antagónico. En este trabajo se revisarán algunas de las estrategias para su purificación, identificación y caracterización bioquímica, ya que frecuentemente se producen en baja concentración, por lo que son difíciles de detectar y de analizar. También es común que la actividad antibacteriana sólo se atribuya al alguno de los dos tipos de moléculas, cuando existe la posibilidad de que la bacteria ácido láctica presente ambos tipos de actividades.

Palabras clave: *bacterias ácido lácticas, actividad antibacteriana, peptidoglucano hidrolasas, bacteriocinas, zimogramas.*

ABSTRACT

Lactic acid bacteria have been historically used in the production of fermented foods and beverages, due to their function as biopreservative agents. That role is attributed to the production of antibacterial compounds, such as organic acids or even to proteinaceous compounds, like bacteriocins and bacterial cell wall-degrading enzymes (i.e. peptidoglycan hydrolases). Those proteins could be produced directly in the food matrix during the fermentation process, or they can be added in a purified form. Several research groups are interested in characterizing the proteins responsible of this antagonistic effect, because of their biotechnological potential. In this work, some strategies for their purification, identification and biochemical characterization will be reviewed, considering that frequently they are produced in low concentrations, which makes their

detection and analysis difficult. It is also common that the antibacterial activity would be attributed only to one of those sort of molecules, when there is the possibility that the lactic acid bacteria would show both kind of activities.

Key words: lactic acid bacteria, antibacterial activity, peptidoglycan hydrolases, bacteriocins, zymograms.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo conformado por cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, anaerobios facultativos, que producen ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos. Los principales géneros que conforman este grupo son: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Salminen *et al.*, 2004).

Las BAL se han utilizado en la elaboración de alimentos fermentados, dentro de los que se encuentran: productos vegetales (aceitunas, pepinillos), lácteos (yogurt, algunos quesos) y cárnicos (salami, ciertos tipos de salchichas y de chorizos). Algunas cepas de BAL aportan beneficios a la salud, en su uso como probióticos, en la producción de péptidos bioactivos y como vehículos transportadores de moléculas con valor terapéutico (Nouaille *et al.*, 2003). Pero sin duda, la aplicación más importante es su uso como cultivos iniciadores en varios productos lácteos fermentados (Savijoki *et al.*, 2006), ya que la utilización de los azúcares presentes en el alimento lleva a la producción de ácidos orgánicos y a un descenso en el pH, importante en el fenómeno de la

coagulación de las proteínas y en la reducción o prevención del crecimiento de la microbiota acompañante. Por otra parte, su presencia puede tener un efecto en el desarrollo de características sensoriales deseables. Por ejemplo, participan en la hidrólisis de proteínas, contribuyendo a la textura y sabor final de diferentes alimentos fermentados; sintetizan compuestos que dan sabor y aroma, como ácidos orgánicos, acetaldehído, diacetilo, acetoina, etc.; y pueden producir agentes texturizantes, como exopolisacáridos, los cuales aportan consistencia al producto. Adicionalmente, pueden producir componentes inhibitorios de otros microorganismos, dentro de los que se pueden encontrar patógenos y de descomposición (Salminen *et al.*, 2004).

La mayoría de las BAL no representan un riesgo para los seres humanos. Han sido utilizadas consciente e inconscientemente desde hace siglos en procesos de elaboración de alimentos sin causar daños a los consumidores. Poseen el estatus de GRAS (Generally Recognised As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos y de QPS (Qualified Presumption of Safety) por la Unión Europea (Peterbauer *et al.*, 2011). Como se mencionó, este grupo de bacterias tiene la capacidad de producir una gran variedad de sustancias que pueden inhibir

inhibir a otros microorganismos y, aunado a su grado alimenticio, se han utilizado como agentes de bioconservación con el fin de contribuir a la inocuidad de los alimentos y/o de incrementar la vida de anaquel de los mismos. Su aplicación puede hacerse inoculando la bacteria para que produzca el agente antibacteriano directamente en el alimento; o usando dicho agente, previamente purificado, como aditivo alimentario (Elsser-Gravesen & Elsser-Gravesen, 2014).

PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA PRODUCIDOS POR LAS BAL

Además de la producción de ácido láctico u otros ácidos orgánicos (acético y propiónico), las BAL pueden producir compuestos de diferente naturaleza con actividad antibacteriana. Algunos de esos compuestos son: peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, reuterina, reuteriicina, bacteriocinas, BLIS (Bacteriocin Like Inhibitor Substances) y peptidoglucano hidrolasas (Moreno *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 2004). De los cuales, los últimos tres son de naturaleza proteínica.

Las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) son enzimas que hidrolizan el peptidoglucano, principal componente de la pared celular de bacterias. El peptidoglucano consiste en cadenas de residuos alternados de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) unidos mediante enlaces β -1,4, que se entrecruzan por péptidos cortos formados por L- y D-aminoácidos. Las PGHs están involucradas en un gran número de funciones que requieren la modificación de la

red rígida del peptidoglucano durante el crecimiento y la división celular. Algunas de estas funciones incluyen la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células hijas durante la división y la autólisis, que generalmente se induce en condiciones adversas como la falta de nutrientes (Lortal & Chapot-Chartier, 2005; Eckert *et al.*, 2006; Vollmer *et al.*, 2008). Tienen pesos moleculares que pueden ir desde los 27 kDa de la lisostafina, hasta los 137 kDa de la proteína Atl, la principal autolisina de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* (Kumar, 2008; Götz *et al.*, 2014). Las PGHs se han clasificado de acuerdo con el tipo de enlace que son capaces de romper en el peptidoglucano (Fig. 1). Las N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasas rompen el enlace amida entre MurNAc y la L-alanina del péptido. Las peptidasas son capaces de hidrolizar el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos (carboxipeptidasas), o de romper completamente los puentes formados por los péptidos (endopeptidasas). Las N-acetilglucosaminidasas y las N-acetilmuramididasas hidrolizan los enlaces β -1,4 de la cadena de glicanos. Las primeras lo hacen dejando un extremo GlcNAc reductor, mientras que las segundas hidrolizan el enlace entre MurNAc y GlcNAc, pudiendo dejar libre un extremo MurNAc reductor, llamadas lisozimas, o formando un anillo 1,6-anhidro en MurNAc, conocidas como transglicosilasas líticas (Vollmer *et al.*, 2008; Layec *et al.*, 2008). Algunas PGHs han sido utilizadas como agentes antibacterianos por ejemplo, la lisostafina que es

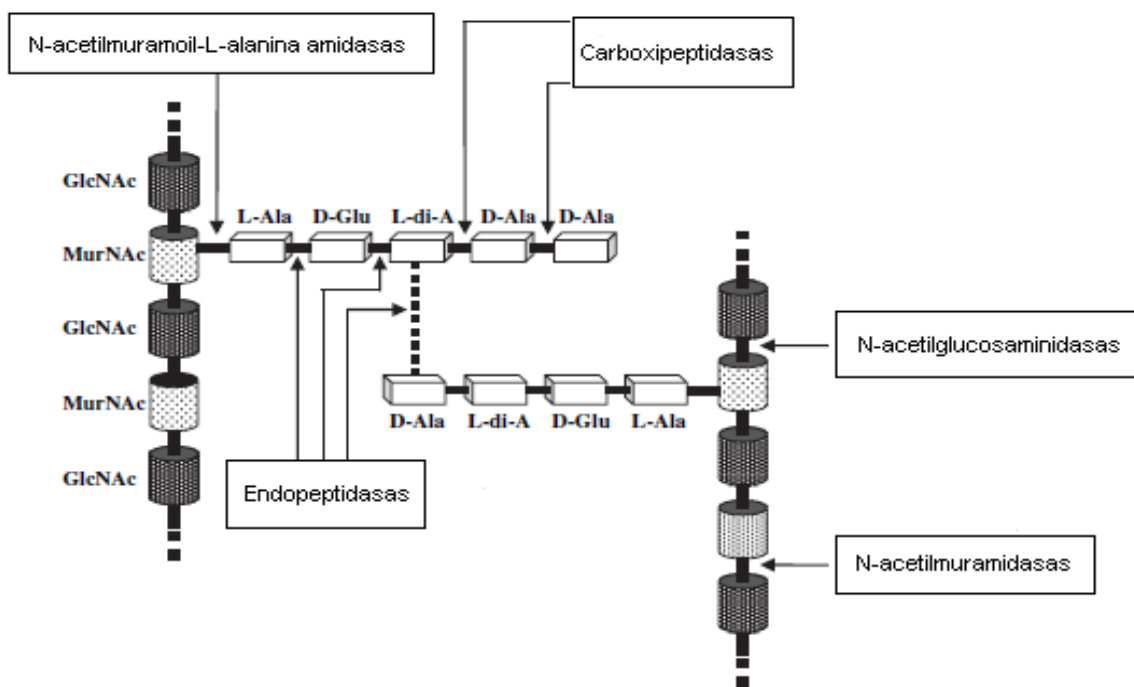


Fig. 1. Estructura del peptidoglucano y especificidad por sustrato de las PGHs (adaptado de Layec *et al.*, 2008).

una endopeptidasa que hidroliza los enlaces glicina-glicina específicos de la pared celular de *S. aureus*, tiene aplicaciones terapéuticas para tratar infecciones causadas por este microorganismo (Kumar, 2008). Otro ejemplo es la lisozima de huevo de gallina, que es utilizada como conservador en quesos y vinos (Callewaert *et al.*, 2011).

Las bacteriocinas son péptidos antibacterianos de bajo peso molecular (por lo regular, de menos de 10 kDa), sintetizadas ribosomalmente, son estables en rangos amplios de pH y son resistentes a tratamientos térmicos. Pueden ser activas en contra de bacterias de la misma especie (espectro reducido), o de diferente género (de amplio espectro); por otra parte, las cepas de bacterias que las producen tienen un mecanismo

específico que les otorga autoinmunidad. Una clasificación propuesta por Cotter *et al.* (2005), comprende tres clases de bacteriocinas (Fig. 2). La **clase I** incluye a los lantibióticos, son pequeños péptidos de entre 19 y 38 aminoácidos de longitud, que contienen residuos de lantionina o β -metil-lantionina, los que son producto de modificaciones post-traduccionales. La lantionina se obtiene por la condensación de una serina deshidratada (dehidroalanina) con el grupo sulfhidrilo de una cisteína vecina, con lo que se forma un puente entre los dos residuos. Cuando los aminoácidos que se unen son una treonina deshidratada (deshidrobutilina) y cisteína, lo que se forma es la β -metil-lantionina. La formación del puente entre residuos del péptido es catalizada enzimáticamente forma un anillo en la estructura

Artículos

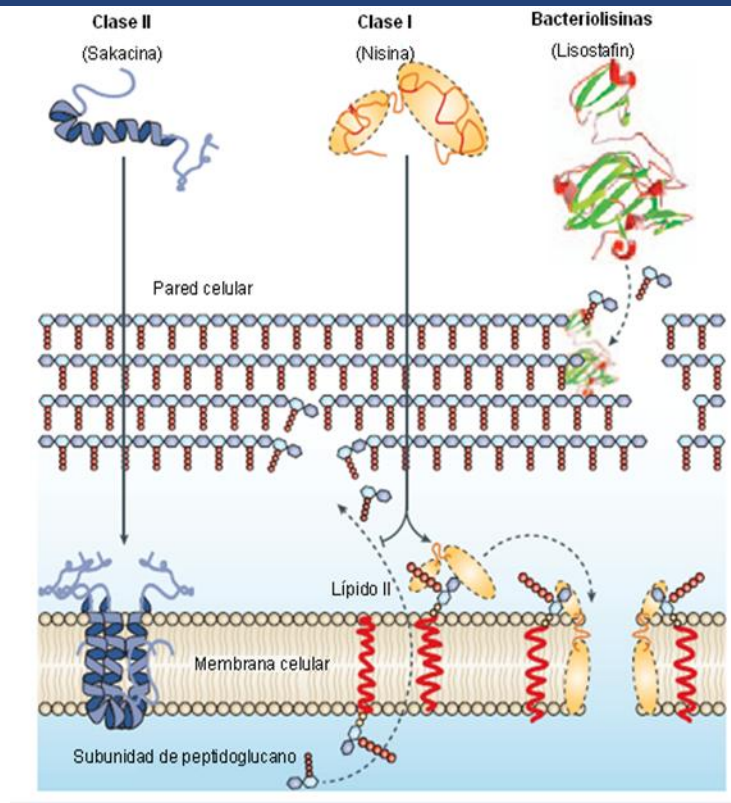


Fig. 2. Modo de acción de las bacteriocinas (Adaptado de Cotter *et al.*, 2005).

del lantibiótico, característica estructural importante de las bacteriocinas clase I.

Éstas pueden actuar de dos formas: se pueden enlazar al lípido II, el mayor del transportador de subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular, lo que evita la síntesis correcta de la pared, con la consecuente muerte celular; además, pueden usar al lípido II como molécula de acoplamiento para insertarse en la membrana e iniciar la formación de poros, lo que lleva a una muerte rápida. La **clase II**, o bacteriocinas que no contienen lantionina, son péptidos termoestables pequeños (menos de 10 kDa), inducen la permeabilización de la membrana y, consecuentemente, la salida de moléculas del interior de la bacteria. Esta clase

está formada por un grupo heterogéneo de moléculas, dentro de las que destacan: las que tienen alta especificidad contra *Listeria monocytogenes* - tipo pediocinas - (clase IIa), las que están compuestas por dos péptidos (clase IIb) y las que tienen una unión covalente entre el extremo N- y el C- terminal, esto es, que tienen una estructura circular (clase IIc). Y en la **clase III** se encuentran las bacteriolisinas o proteínas bacteriolíticas, son termolábiles, de alto peso molecular y su modo de acción es mediante la lisis de la pared celular. En general, poseen el dominio catalítico (homólogo a las endopeptidasas) en el extremo N-terminal y el de reconocimiento al sustrato, en el amino terminal. A diferencia de las otras clases de bacteriocinas, no tienen relacionado un gen que

confiera inmunidad a la bacteria productora (Cotter *et al.*, 2005).

La única bacteriocina aprobada para su utilización como conservador en alimentos por la FDA (denominada tipo GRAS) y aceptada como aditivo alimentario en otros 45 países es la nisina. Esta bacteriocina es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y tiene un peso molecular de 3.5 kDa. La marca comercial más usada es Nisaplin (Danisco); es una preparación que contiene 2.5 % de nisina, NaCl (77.5%) y leche en polvo descremada. Otra bacteriocina comercial es la pediocina PA-1, denominada Atla® 2341, que inhibe el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. Pese a que son pocas las bacteriocinas de las cuales se permite su aplicación en forma purificada, éstas pueden ser producidas directamente en alimentos por cepas iniciadoras o no iniciadoras o en humanos y animales por cepas probióticas (Cotter *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2014).

BLIS es un término aplicado a sustancias antimicrobianas de naturaleza proteínica de bajo peso molecular, cuyo mecanismo de acción no está completamente definido o que no cumplen con alguno de los criterios de la definición de bacteriocinas, por lo que se clasifican en un grupo aparte. Las BLIS por lo general tienen un espectro más amplio de actividad que las propias bacteriocinas, ya que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como hongos y levaduras (Atanassova *et al.*, 2003).

¿CÓMO DETECTAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA?

Las BAL pueden producir una gran variedad de compuestos inhibitorios, como ya se mencionó, por lo que tienen un gran potencial de aplicación biotecnológica. Uno de los aspectos a evaluar cuando se está analizando la posibilidad de aplicación de alguna BAL, es su capacidad de producir compuestos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos y ubicar la localización de dichos compuestos, ya sean extracelulares, intracelulares, o adheridos a la membrana o a la pared celular.

Uno de los métodos más utilizados para detectar actividad inhibitoria es el de difusión en agar (Liu *et al.*, 2014). Éste consiste en inocular el microorganismo contra el cual se quiera detectar la actividad en un medio con agar suave (0.7 - 0.8% p/v) a una concentración tal que, al crecer, forme un césped homogéneo. Previamente se puede poner una primera capa más sólida con mayor concentración de agar (1.0 - 1.5% p/v). Sobre la capa de agar suave se forman pozos dentro de los cuales se carga la muestra a la que se le quiera analizar la actividad antibacteriana. Las placas se incuban para permitir el crecimiento del microorganismo control y la difusión de la muestra. Si presenta actividad antibacteriana, se observará un halo de inhibición alrededor del pozo (Fig. 3).

Los compuestos antibacterianos que pueden producir las BAL, que hay que considerar primeramente, son los ácidos orgánicos. La influencia de éstos sobre la actividad inhibitoria se elimina al ajustar el pH de la muestra a valores entre 6 y 7, lo cual se puede hacer empleando una solución de NaOH. La forma no disociada es la forma tóxica de la molécula, ya

que ésta difunde a través de la membrana celular por ser liposoluble y, una vez dentro,

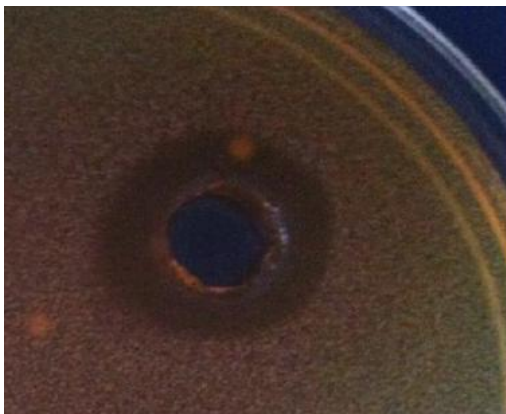


Fig. 3. Halo de inhibición del sobrenadante de la fermentación de una BAL en contra de *Listeria innocua*. Tomado de Olvera-García, 2013.

dependiendo del pH intracelular, puede disociarse en mayor o menor medida liberando iones H^+ que acidifican el citoplasma. Además del efecto del pH, la forma no disociada de la molécula contribuye al efecto antibacteriano mediante el colapso del gradiente electroquímico de protones, causando bacteriostasis y la eventual muerte de la bacteria susceptible. El efecto es más pronunciado a valores de pH por debajo del pKa del ácido, ya que una mayor proporción de éste está en su forma no disociada (Magnusson, 2003; Salminen, 2004).

Otro compuesto a considerar, por su capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano, es el peróxido de hidrógeno. La actividad antibacteriana se atribuye a un efecto fuertemente oxidante sobre la pared celular y a la modificación de las estructuras moleculares de proteínas celulares. Se puede eliminar su acción mediante la neutralización de la muestra

y con el uso de catalasa, ya que esta enzima cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Liu *et al.*, 2014).

Mediante la neutralización de la muestra también se puede reducir el efecto de otros compuestos como el diacetilo, ya que su actividad antibacteriana es más efectiva a valores de pH menores a 7. Además, las cantidades necesarias para que se presente la actividad antibacteriana son muy elevadas. También se ve disminuida la actividad de la reuteriicina, ya que es más efectiva a valores de pH menores a 4.5 (Magnusson, 2003; Salminen, 2004).

Tras haber realizado estos pasos, si se observa actividad antibacteriana, ésta puede estar dada por la presencia de bacteriocinas, PGHs o ambas. A continuación se mencionan algunas estrategias para la detección y purificación de dichas proteínas con actividad antibacteriana, que pueden ser útiles para diferenciarlas.

ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS

Las PGHs son enzimas extracitoplasmáticas debido a que su sustrato es el peptidoglucano, una de las capas más externas de las bacterias (Navarre & Schneewind, 1999; Vollmer *et al.*, 2008). Las PGHs pueden ser secretadas mediante la vía dependiente de Sec o mediante el sistema TAT, por lo que la mayoría presentan un péptido señal. Para efectos de la purificación, el que su localización sea extracelular representa una gran ventaja, ya que trabajar con el sobrenadante de la fermentación es más

sencillo que con células completas. Sin embargo, las PGHs también se pueden encontrar adheridas a la célula ya que la interacción entre las enzimas y la pared celular es crucial para su actividad. Algunas PGHs se unen de manera covalente al sustrato, aunque no es muy común; la mayoría presenta dominios conservados de interacción iónica con el peptidoglucano u otros componentes de la pared celular (dominios de unión a peptidoglucano o CBD: cell wall binding domains). Muchas enzimas presentan carga positiva a pH neutro, lo que facilita su unión a los componentes cargados negativamente de la pared celular (Vollmer *et al.*, 2008). De encontrarse de esta manera, la purificación requeriría un paso más para separar a la enzima de su sustrato. Algunas PGHs presentan mayor capacidad de unión al peptidoglucano a valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico, tal es el caso de la AcmD de *Lactococcus lactis*, que en medio ácido presenta mayor capacidad de unión que en un medio neutro (Visweswaran *et al.*, 2013), por lo que al modificar el pH podrían liberarse al medio.

Para detectar actividad de PGH, no siempre es necesario que estén puras. Es posible identificarlas a partir de extractos crudos o semipuros del medio extracelular. Como se mencionó anteriormente, las PGHs desempeñan diferentes funciones en la célula, por lo que es posible encontrarlas en cualquier fase de crecimiento; sin embargo, una función importante que desempeñan es la autólisis, la cual se presenta después de la fase exponencial de crecimiento, en donde se puede encontrar la mayor actividad. Una vez que se

tiene un cultivo en este punto, deben separarse las células del sobrenadante.

Concentración y semipurificación de la preparación enzimática

La precipitación diferencial de proteínas puede utilizarse como primera operación en la estrategia de purificación; los métodos de precipitación de proteínas se basan en la disminución de la solubilidad, reparto selectivo a una fase en un sistema de dos fases o precipitación por afinidad. De tal modo que la precipitación proteínica puede ser realizada por la adición de sales, solventes o polímeros orgánicos, por alteraciones de pH y temperatura o por la adición de ligandos.

La solubilidad de las proteínas se reduce generalmente a altas concentraciones de sal; cuando una sal es adicionada al sistema, el agua solvata los iones de sal y a medida que la concentración salina aumenta, el agua que rodea a la proteína es secuestrada, exponiendo eventualmente las porciones hidrofóbicas. Es entonces cuando los segmentos hidrofóbicos de una molécula proteínica pueden interactuar con los de otra, resultando en la agregación de éstas. Por lo que las proteínas con segmentos hidrofóbicos largos tienden a agregarse y precipitar antes que aquellas con pequeños o pocos segmentos hidrofóbicos. La precipitación ocurre por la neutralización de cargas de la superficie de la proteína por la sal, por la reducción de la actividad acuosa de la proteína y por la disminución efectiva de la concentración de agua en el medio, este efecto es conocido como "salting out".

Por otra parte, la adición de ciertas sales en la cantidad correcta puede precipitar selectivamente algunas proteínas, mientras que otras permanecen en solución. El sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) es particularmente efectivo y se usa generalmente para precipitar proteínas. Las proteínas precipitadas pueden ser removidas de las que permanecen solubles mediante una centrifugación a baja velocidad. Las cantidades residuales de sulfato de amonio pueden interferir con otras mediciones y métodos de purificación y tiene que ser removido posteriormente (Prado-Barragán *et al.*, 1999; Nelson & Cox, 2008).

También, es posible utilizar ácido tricloroacético (TCA) para la precipitación de proteínas. Con este método se concentra la muestra, y es efectivo para remover sales, polisacáridos y muchos detergentes (como el SDS) de las proteínas (Matsudaira, 1993; Nandakumar *et al.*, 2002). Los residuos de TCA deben ser removidos con lavados exhaustivos con acetona o etanol. La principal desventaja de este método es que se somete a las enzimas a un tratamiento drástico y no todas mantienen la actividad o son capaces de recuperarla con tratamientos renaturalizantes.

Por lo general, las PGHs se encuentran por arriba de los 20 kDa y se pueden separar de moléculas pequeñas mediante la diálisis a través de una membrana semipermeable, como puede serlo una membrana porosa de celulosa. Las moléculas de dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro se retienen dentro de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas más pequeñas y los iones atraviesan los poros de esta membrana.

Esta técnica es útil para retirar las sales u otras moléculas pequeñas como el sulfato de amonio después de una precipitación (Berg *et al.*, 2008).

Otra técnica que se puede emplear para la semipurificación y concentración de PGHs es la ultrafiltración. Esta técnica involucra la aplicación de una fuerza (presión) sobre el fluido a través membranas semipermeables. Los componentes que son más pequeños que los poros de la membrana pasan a través de ella (sales, azúcares, proteínas más pequeñas, etc.) y los más grandes son retenidos. La ultrafiltración tiene un umbral de exclusión en el rango de 1 a 200 kDa, de acuerdo al poro de la membrana que se utilice. Se puede utilizar una con tamaño de corte de 10 kDa, con la que se podrían concentrar las PGHs (Prado-Barragán *et al.*, 1999).

Purificación de la preparación enzimática

Uno de los métodos de utilidad general para la purificación de proteínas es la cromatografía, la cual aprovecha las diferencias en carga, tamaño, afinidad de enlaces, etc. que hubiera en una mezcla de proteínas. Un material poroso sólido con propiedades químicas apropiadas (fase estacionaria) se coloca dentro de una columna, y una solución amortiguada (fase móvil) pasa a través de ésta. La solución que contiene las proteínas se vierte por la parte superior de la columna y pasa a través de la matriz sólida. Las proteínas migran más rápido o más lento a través de la columna dependiendo de su interacción con la fase estacionaria, con lo que se logra su separación. Hay diferentes tipos de matrices para

cromatografía. Las de intercambio iónico constan de pequeñas esferas que contienen cargas positivas o negativas, de modo que las proteínas se separan en función de la disposición de cargas de la superficie. Las columnas hidrofóbicas están empacadas con esferas que poseen cadenas laterales hidrofóbicas que sobresalen de ellas, de modo que las proteínas que tengan regiones hidrofóbicas al descubierto quedan retardadas en su tránsito por la columna. Las columnas de filtración en gel, que separan proteínas en función de su tamaño, contienen diminutas esferas porosas: a medida que van descendiendo por la columna, las moléculas suficientemente pequeñas para penetrar en los poros pasan sucesivamente por el interior de estas esferas, mientras que las moléculas más grandes permanecen en la solución fluyendo entre las esferas y, por lo tanto, eluyen más rápidamente a través de la columna y salen primero. Existe también la cromatografía de afinidad, donde la fase estacionaria interactúa específicamente con la proteína de interés. Ejemplos de estas matrices son las que se utilizan para separar a proteínas que tengan una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, por la presencia de algún metal como Ni, Co o Cu en la fase estacionaria. O por la interacción de la proteína de interés con un anticuerpo específico que se encuentra unido a la fase estacionaria.

También existen resinas cromatográficas en forma de diminutas esferas (de 3 a 10 μm de diámetro) que pueden ser empaquetadas mediante un aparato especial formando un lecho uniforme en la columna. Con estas

columnas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, de High Performance Liquid Chromatography) se alcanza un alto grado de separación. Como las columnas de HPLC contienen partículas empaquetadas de forma muy compacta, la velocidad de flujo a través de ellas es prácticamente nula a menos que se apliquen altas presiones (Alberts *et al.*, 2002).

A través de la aplicación de uno o varios de los métodos descritos anteriormente, se puede obtener la PGH de interés con diferentes grados de pureza. Así, por ejemplo, para la purificación de la AtIB de *Enterococcus faecalis* JH2-2, Mesnage *et al.* (2008) emplearon la siguiente metodología: la cepa fue reactivada en caldo BHI hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.7. Las células fueron recolectadas por centrifugación y se usaron para inocular un medio sintético. Tras la fermentación, se retiraron las células y al sobrenadante se le agregó gradualmente sulfato de amonio hasta una concentración final de 0.7 g/mL, con agitación a 4 °C. Las proteínas que precipitaron se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en Tris-HCl (pH 8.5). Posteriormente, la enzima fue purificada mediante dos cromatografías de intercambio aniónico (HiTrap Q-Sepharose fast flow y MonoQHR5) usando gradientes de NaCl en Tris-HCl.

La metodología a seguir depende de las características de cada proteína, como peso molecular, punto isoeléctrico, carga, hidrofobicidad, resistencia a diferentes tratamientos, etc. y se pueden combinar uno o varios métodos de los ya descritos.

Evaluación de la actividad enzimática

Artículos

Una vez que se tiene la muestra concentrada o con una mayor pureza, se debe verificar la actividad lítica. Esto se puede hacer espectrofotométricamente mediante el monitoreo de la disminución de la DO_{600nm} de una suspensión de células de la cepa productora de la enzima, debido a que las PGHs son activas en contra de la misma. También se puede hacer un ensayo con el peptidoglucano en lugar de las células completas, esta vez monitoreando la DO a 450 nm (Leclerc & Asselin, 1989). Hay un método para la medición de la actividad de muramidasa, el cual es descrito por Sigma-Aldrich como ensayo enzimático de lisozima (EC 3.2.1.17). El cual se basa en que la lisozima es capaz de lisar células intactas de *Micrococcus lysodeikticus*, reduciendo la densidad óptica a 450 nm de una suspensión de este microorganismo. Esta misma bacteria se puede utilizar como sustrato para la realización de zimogramas (Sigma-Aldrich).

Los métodos zimográficos se basan en la separación de enzimas por electroforesis en gel de poliacrilamida seguida de un paso de renaturalización; al recobrar su estructura funcional, la actividad de la enzima se detecta por su efecto sobre el sustrato que se ha embebido, esparcido o sobrepuesto en el gel. Los zimogramas se han utilizado para la detección de PGHs en numerosos estudios. Generalmente se utiliza como sustrato células de *M. lysodeikticus* (también llamado *M. luteus*), ya sea liofilizadas, de cultivo fresco o inactivadas por calor, las cuales se embeben dentro de la red de la poliacrilamida

polimerizada. Este microorganismo es utilizado debido a que posee una pared celular delgada y susceptible a la degradación; sin embargo, es posible utilizar como sustrato cualquier bacteria contra la que se desee probar la actividad lítica. Las enzimas se separan por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, para evitar interacción prematura con el sustrato. Posteriormente, se lleva a cabo una renaturalización (con una solución de Tritón X-100 1 % v/v) para que las enzimas recuperen la actividad e hidrolicen el sustrato embebido, ésta se observa como una banda clara en un fondo opaco. Para aumentar el contraste, el gel puede ser teñido con una solución de azul de metileno (0.1 % p/v) en KOH (0.01 % p/v). Este método permite una detección simultánea de la actividad enzimática y una estimación del peso molecular, además de que posee una elevada sensibilidad (Hardt *et al.*, 2003). En la figura 4 se muestra un zimograma donde se pueden observar varias bandas de pesos moleculares entre 45 y 95 kDa que tienen actividad lítica contra varias bacterias indicadoras. También es posible identificar a la proteína responsable de la actividad y conocer parcialmente su secuencia de aminoácidos si de manera paralela al zimograma se corre un gel para observar el patrón de bandas tiñendo con azul de Coomassie, posteriormente se comparan ambos geles y la banda con actividad se corta para analizarla. La identificación de la proteína se puede realizar por el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, capaz de producir espectros en tándem (LC-MS/MS).

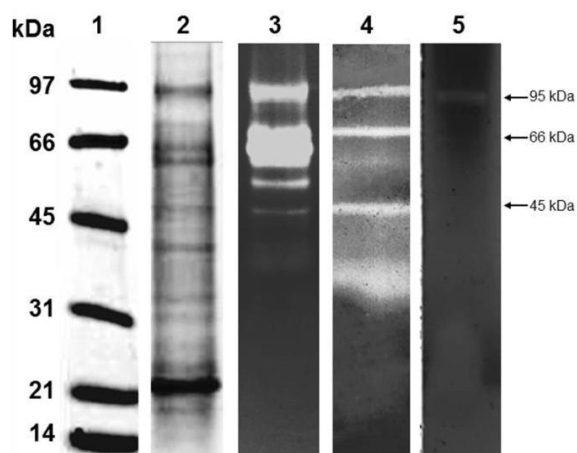


Fig. 4. Perfil de proteínas (carril 2) y zimograma de actividad lítica contra *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, carriles 3, 4 y 5. Modificado de García-Cano *et al.*, 2014.

En este método, la proteína es digerida (generalmente con tripsina) y el análisis de espectrometría de masas arroja la secuencia de los fragmentos generados. Al someter los espectros de fragmentación o las secuencias de estos péptidos a los bancos de datos se puede identificar una determinada proteína (Unidad de Proteómica, Instituto de Biotecnología, UNAM).

ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS

Como se mencionó anteriormente, las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos, catiónicos y con tendencia a adoptar estructuras helicoidales. Son producidas por diferentes microorganismos con actividad antagónica contra bacterias relacionadas filogenéticamente.

Concentración y purificación de bacteriocinas

Los métodos de extracción y purificación de bacteriocinas, como el resto de las proteínas, depende de su naturaleza. Por lo tanto para obtenerlas, en la mayoría de las ocasiones se deben combinar diferentes estrategias. Cabe resaltar que estos péptidos con actividad antibacteriana se caracterizan por producirse durante la fase logarítmica de crecimiento, y su mayor presencia se observa durante la fase logarítmica tardía.

A continuación se enuncian algunas estrategias para la extracción y purificación de bacteriocinas:

1. Adsorción y desorción.

Se parte de un cultivo que se encuentra en fase logarítmica tardía, el cual se somete a un tratamiento térmico durante 30 min a 70 °C para la inactivación de proteasas que pudieran estar presentes en el medio (Katla *et al.*, 2003). Posteriormente, se ajusta el medio a pH 5 para permitir la adsorción del compuesto antimicrobiano a la membrana celular bacteriana (Dündar *et al.*, 2014). A continuación se obtiene el paquete celular por centrifugación, el cual se lava con buffer de fosfatos. Finalmente, las células se resuspenden en una solución 100 mM de NaCl a pH 2 para favorecer la desorción y liberación del compuesto de interés de la membrana celular de la bacteria hacia el medio. Así mismo, el NaCl previene la aglutinación de las bacteriocinas, lo cual evita que éstas no sean removidas de la membrana (Yang *et al.*, 1992; Álvarez-Cisneros, 2010). Los sobrenadantes se dializan empleando membranas de celulosa con un tamaño de poro de 1 kDa y, finalmente, se liofilizan para

concentrar. La actividad antibacteriana se observa en geles SDS-Tris-tricina (que se describirán más adelante) y por prueba de difusión en agar (Olvera-García, 2013).

2. Precipitación con sulfato de amonio.

La siguiente metodología fue descrita para la purificación de la enterocina 62-6, producida por *Enterococcus faecium* 62-6. El sobrenadante libre de células, obtenido de cultivo en fase logarítmica tardía, se somete a una precipitación de proteínas usando sulfato de amonio al 60% p/v (se recomienda probar un gradiente) a 4 °C y es separado por centrifugación. El precipitado se resuspende en buffer de citratos (pH 5), y se dializa usando una membrana de celulosa (corte de 12 kDa) durante 3 días. La muestra dializada se pasa a través de una columna de intercambio catiónico, cargando 20 mL en 10 mL de la columna de Carboximetil Sepharosa Fast-Flow que ha sido previamente equilibrada con buffer de citratos pH 5 a un flujo de 8 mL/h. Las proteínas son eluidas de la columna empleando un gradiente salino de 0.1 - 0.7 M de NaCl. Se colectan fracciones de 2 mL y éstas se emplean para el ensayo de actividad inhibitoria a través de la prueba de difusión en agar. Las fracciones que fueron positivas en el ensayo anterior se analizaron en un gel SDS-PAGE al 15 % (p/v) de acrilamida, teñido con azul de Coomassie R-250 o plata. El peso molecular se determinó usando un patrón de referencia y por análisis de espectrometría de masas (Dezwaan *et al.*, 2007).

3. Precipitación con acetona.

A continuación se cita la metodología empleada para la purificación de la lactococina 972. Se realizó un cultivo en medio M17 hasta

llegar a la fase logarítmica tardía y se obtuvo el sobrenadante por centrifugación (fracción I). El sobrenadante se precipitó con 5 volúmenes de acetona fría, dejando reposar durante 30 min a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó y el precipitado obtenido, una vez seco, se solubilizó en buffer de fosfato sódico 50 mM, pH 7 (fracción II). A continuación, se tomaron muestras de 20 mL de la fracción II y se cargaron en una columna de intercambio catiónico High-S de 5 mL, equilibrada con buffer de fosfatos, tras haberla lavado con NaCl 0.1 M. La bacteriocina se eluyó con 30 mL de NaCl 0.4 M con un flujo de 1 mL/min, obteniendo fracciones de 1 mL (fracción III). La actividad inhibitoria de las tres fracciones se evaluó por la prueba de difusión en agar (Martínez-Fernández, 1996).

4. Adsorción y desorción /Cromatografía de intercambio catiónico en SP-Sepharosa y Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HLPC).

Dündar *et al.* (2014) reportan la siguiente metodología para la purificación de las enterocinas A, B, P, I, L50A y L50B, producidas por *E. faecium* W3. Se parte de un cultivo en medio MRS de 16 h de incubación. Esta técnica es empleada cuando la bacteriocina se encuentra asociada a la superficie celular, por lo que el paquete celular del cultivo es sometido al tratamiento de adsorción y desorción descrito anteriormente. Las muestras liofilizadas son resuspendidas en ácido trifluoroacético 0.1 % (p/v) para, posteriormente, separar los péptidos por RP-HLPC inyectando alícuotas de 100 µL. Las fracciones peptídicas son colectadas y ensayadas para probar su actividad de

bacteriocinas. El análisis de secuencia de aminoácidos se realizó a través de espectrometría de masas MALDI-TOF.

La siguiente estrategia general se ha empleado en la producción de diversas bacteriocinas, como lo es la pediocina PA-1 por *Pediococcus pentosaceus*, lo cual resalta que las técnicas descritas anteriormente pueden ser aplicadas para cualquier BAL (Fig. 5).

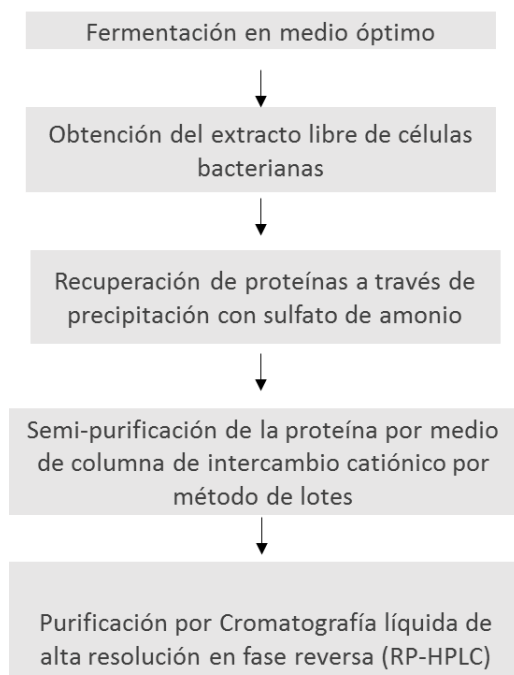


Fig. 5. Esquema de purificación rápida utilizada para la producción de la pediocina PA1. Modificado de Vijay *et al.*, 2012.

Detección de la actividad bacteriolítica

Una vez que se han purificado las bacteriocinas, se debe utilizar una metodología para su detección. A continuación se mencionan algunos métodos, reportados en la bibliografía, para este fin:

1. Geles SDS-Tris-tricina y zimografía.

Para identificar las bandas con actividad antibacteriana se pueden realizar geles de SDS-Tris-tricina al 10 % (p/v) con células embebidas con un microorganismo indicador (ej.: *Listeria innocua*). Este método, que está basado en la introducción de tricina como ión acarreador, da una resolución mayor que el de SDS-Tris-glicina, especialmente en el rango de 5 a 30 kDa (Schägger, 2006).

Se parte del paquete celular de un cultivo del microorganismo indicador, el cual se lava y centrifuga dos veces con buffer de fosfatos a pH 7. El pellet limpio se resuspende en solución salina al 0.85 % (p/v), pH7 y se mide D.O. a 600 nm. Una D.O. de 7 a 8 se considera óptima para *L. innocua* o *Micrococcus lysodeikticus*, como microorganismos indicadores (Olvera-García, 2013). En la tabla 1 se presentan los reactivos y el orden en que se deben agregar al paquete celular que corresponde a la D.O. mencionada. Las muestras obtenidas por el método de adsorción y desorción son ideales para la visualización de la actividad por zimografía ya que se encuentran libres de impurezas. Los liofilizados se resuspenden en 30 μ L de buffer de carga del gel (Tris-HCl 3M/SDS 0.3 % p/v, pH 8.45) y se calientan 5 min a 95 °C para después añadirse en los pozos del gel. Como patrón de referencia se utiliza un marcador de peso molecular de polipéptido (de 1.4 a 26.6 kDa). Las condiciones de la electroforesis son 80 V durante 5 h, a 4 °C. Posteriormente, se incuban a 37°C y 50 rpm, durante 18 h en una solución renaturalizante (Tris-HCl 100 mM y Tritón X-100 1 % v/v, pH 8) para que las proteínas puedan recobrar su estructura y actividad, la cual se verá reflejada en el gel por

Artículos

Tabla 1. Reactivos para la preparación del zimograma para bacteriocinas (Mini-PROTEAN III, Bio-rad).

Orden de incorporación	Reactivo	Gel	
		separador	concentrador
1	Agua	1.93 mL	1.56 mL
2	Glicerol 80 % (v/v)	0.89 mL	-
3	Acrilamida Tris-tricina	2.83 mL	324 µL
4	Buffer de gel	2.83 mL	620 µL
5	Temed	5.66 µL	1.5 µL
6	Persulfato de amonio 10 % (p/v)	42.5 µL	13.3 µL
	Volumen final	8.5 mL	2.5 mL

(Olvera-García, 2013)

la presencia de una banda clara o translúcida sobre un fondo opaco. Para aumentar el contraste, el gel es teñido con una solución de azul de metileno, durante 20 minutos y posteriormente se destiñe con agua destilada hasta observar la aparición de las bandas. En la figura 6 se pueden visualizar bandas de actividad antibacteriana de aproximadamente 5 kDa, correspondiente a la enterocina A, producida por diferentes cepas de *E. faecium* C, D y G) y *E. faecalis* (E) aisladas del queso Cotija Región de Origen (Olvera-García, 2013). Se recomienda hacer un gel SDS-PAGE Tris-tricina sin microorganismo indicador al mismo tiempo, con el fin de visualizar la presencia de la banda que corresponde a la proteína con actividad inhibitoria.

2. SDS-PAGE acoplado a ensayo en placa.

Geles de SDS-PAGE-Tris-tricina se preparan y corren tal y como se mencionó previamente,

pero sin adicionar las células del microorganismo a inhibir. El primer gel es teñido, ya sea usando azul de Coomassie o tinción con plata para visualizar las bandas pertenecientes a

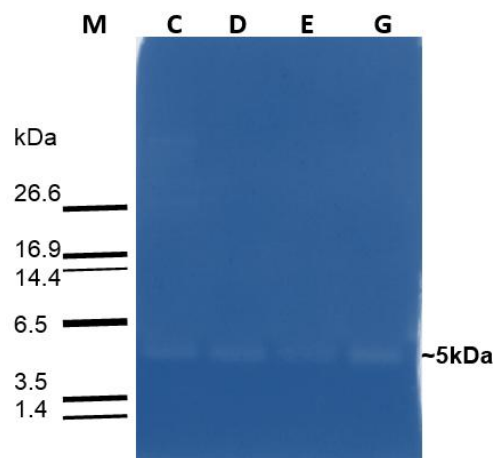


Fig. 6. Zimograma contra el microorganismo indicador *Micrococcus lysodeikticus*.

M: Marcador de peso molecular de polipéptido Bio-Rad. C, D, E y G, cepas de *Enterococcus faecalis* (Olvera-García, 2013).

Artículos

proteínas. A su vez, el segundo gel es sometido a la técnica de superposición. En ésta se tiene una placa de agar donde se inocula al microorganismo indicador a inhibir, por vertido. El gel se coloca sobre el agar y se incuba a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. Una zona translúcida en el tapete del cultivo, indica que la prueba es positiva para actividad antibacteriana (Fig. 7). Ambos geles pueden ser comparados para poder determinar el peso molecular de la(s) bacteriocina(s). Sin embargo, esta técnica es menos sensible que los zimogramas con células embebidas, además de que es más difícil distinguir la zona de inhibición del microorganismo. En la figura 7 se observa la detección directa de la enterocina E-760, contra *Campylobacter jejuni*. Los autores identificaron una banda de 5.5 kDa, como responsable de la actividad antibacteriana (Line *et al.*, 2008).

Este ensayo no es tan sensible como la zimografía, descrita en el punto anterior, y en nuestra experiencia de laboratorio, la zona translúcida no se obtiene tan clara como lo que reportan Line *et al.* Adicionalmente, el crecimiento del césped del microorganismo indicador puede afectarse por otros factores, no necesariamente a la actividad de una determinada proteína del gel.

CONCLUSIONES

En los últimos años, proteínas como las PGHs o las bacteriocinas han cobrado gran relevancia, como alternativa al uso de antibióticos, al provenir de organismos que no representan riesgo alguno para el consumidor; ya que pueden ser utilizadas para evitar la

presencia de microorganismos indeseables en alimentos, así como en ambientes clínicos o áreas que deban permanecer en condiciones de asepsia. Para su análisis bioquímico es necesario contar con una preparación suficientemente concentrada y libre de otros compuestos, como carbohidratos y otras proteínas, que dificultan la aplicación exitosa de herramientas analíticas tales como la electroforesis y la zimografía. Es frecuente que cuando se observa que una bacteria tiene una actividad antagonica hacia otras (por ejemplo, por pruebas de difusión en agar) se piense inmediatamente en la posibilidad de que esté produciendo bacteriocinas, sin considerar el

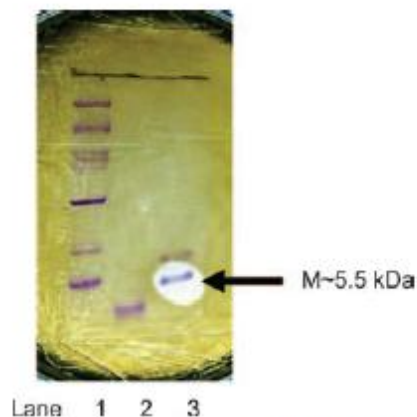


Fig. 7. Técnica de superposición de gel en placa. Tomado de Line *et al.*, 2008.

efecto que pueden producir otros metabolitos, como los ácidos orgánicos o el peróxido de hidrógeno. Generalmente se recurre al análisis de las preparaciones de proteínas a través de SDS-PAGE-Tris-tricina, pero no se toma en cuenta la fracción de mayor peso molecular, por lo que se excluye del análisis a un grupo de enzimas que también puede ser

responsable de la lisis bacteriana. En esta revisión se proporcionan herramientas que han tenido resultados exitosos en diferentes casos para ampliar el espectro de posibilidades que puede presentar una bacteria con actividad antagonista hacia otras.

REFERENCIAS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K & Watson JD (2002) *Biología molecular de la célula*. 3ª edición. Ediciones Omega. Barcelona, España. pp. 176-181.
- Álvarez-Cisneros YM, Fernández FJ, Wachter-Rodarte C, Aguilar MB, Sainz ETR & Ponce-Alquicira E (2010) Biochemical characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* MXVK29, isolated from Mexican traditional sausage. *J. Sci. Food Agric.* 90: 2475–2481.
- Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I & Haertlé T (2003) Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 63-73.
- Berg JM, Stryer L & Tymoczko JL (2008) *Bioquímica*. 6ª edición. Editorial Reverté. Barcelona, España. p. 69.
- Callewaert L, Walmagh M, Michiels CW & Lavigne R (2011) Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Curr. Opin. Biotech.* 22: 164–171.
- Cotter PD, Hill C. & Ross RP (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777-788.
- Dezwaan DC, Mequio MJ, Littell JS, Allen JP, Rossbach S & Pybus V (2007) Purification and characterization of enterocin 62-6, a two-peptide bacteriocin produced by a vaginal strain of *Enterococcus faecium*: Potential significance in bacterial vaginosis. *Microb. Ecol. Health Dis.* 19(4): 241–250.
- Dündar H, Atakay M, Çelikbıçak Ö, Salih B & Bozoğlu F (2014) Comparison of two methods for purification of enterocin B, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* W3. *Prep. Biochem. Biotech.* 45(8): 796-809.
- Eckert C, Lecerf M, Dubost L, Arthur M & Mesnage S (2006) Functional analysis of AtlA, the major *N*-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 188: 8513-8513.
- Elsser-Gravesen D & Elsser-Gravesen A (2014) Biopreservatives. *Adv. Biochem. Eng. Biot.* 143: 29-49.
- García-Cano I, Serrano-Maldonado CE, Olvera-García M, Delgado-Arciniega E, Peña-Montes C, Mendoza-Hernández G & Quirasco M (2014) Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT – Food Sci. Technol.* 59:26-34.
- Götz F, Heilmann C & Stehle T (2014) Functional and structural analysis of the major amidase (Atl) in *Staphylococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 304(2): 156-163.
- Hardt M, Guo Y, Henderson G & Laine RA (2003) Zymogram with Remazol brilliant blue-labeled *Micrococcus lysodeikticus* cells for the detection of lysozymes: example of a

Artículos

- new lysozyme activity in Formosan termite defense secretions. *Anal. Biochem.* 312: 73–76.
- Kang OJ, Laberge S & Simard RE (2003) Detection and localization of a peptidoglycan hydrolase in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 86: 96-104.
- Katla T, Naterstad K, Vancanneyt M, Swings J & Axelsson L (2003) Differences in nisin. *Appl. Environ. Microb.* 69(8): 4431-4437. Kumar JK (2008) Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Appl. Microbiol. Biot.* 80(4): 555-561.
- Layec S, Decaris B & Leblond-Bourget N (2008) Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Res. Microbiol.* 159: 507-515.
- Leclerc D & Asselin A (1989) Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis *Can. J. Microbiol.* 35(8): 749-753.
- Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR & Stern NJ (2008) Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(3): 1094–1100.
- Liu W, Zhang L, Yi H, Shi J, Xue C, Li H, Jiao Y, Shigwedha N, Du M & Han X (2014) Qualitative detection of class IIa bacteriocinogenic lactic acid bacteria from traditional Chinese fermented food using a YGNGV-motif-based assay. *J. Microbiol. Meth.* 100:121-127.
- Lortal S & Chapot-Chartier MP (2005) Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int. Dairy J.* 15: 857-871.
- Magnusson, J. 2003. Antifungal activity of lactic acid bacteria. Ph. D. Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences. Upsala, Suecia. pp. 3-10.
- Martínez-Fernández B (1996) Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: nisina z y lactococina 972. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad de Oviedo. Oviedo, España. pp. 30-31.
- Matsudaira PT (1993) A Practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. 2ª edición. Academic Press, Inc. San Diego, CA. p. 48.
- Mesnage S, Chau F, Dubost L & Arthur M (2008) Role of *N*-acetylglucosaminidase and *N*-acetylmuramidase activities in *Enterococcus faecalis* peptidoglycan metabolism. *J. Biol. Chem.* 283: 19845-19853.
- Moreno MRF, Leisner JJ, Tee LK, Ley C, Radu S, Rusul G, Vancanneyt M & De Vuyst L (2002) Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Appl. Microbiol.* 92: 147-157.
- Nandakumar MP, Shen J, Raman B & Marten MR (2002) Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. *J. Proteome Res.* 2:89-93.

Artículos

- Navarre WW & Schneewind O (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(1):174-229.
- Nelson DL & Cox MM (2008) Lehninger. Principles of Biochemistry. 5ª edición. W. H. Freeman and Company. Nueva York, NY. pp. 85-91.
- Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, Pontes D, Le Loir Y, Costa S, Langella P & Azevedo V (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res.* 2:102-111.
- Olvera-García ME (2013) Evaluación de la inocuidad de *Enterococcus* spp. aislados del queso Cotija. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp. 40-41, 67-68.
- Peterbauer C, Maischberger T & Haltrich D (2011) Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol. J.* 6: 1147-1161.
- Prado-Barragán LA, Huerta-Ochoa S, Rodríguez-Serrano G & Saucedo-Castañeda G (1999) Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. Colección Tópicos en Biotecnología. 1ª edición. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México, DF. pp. 33-87.
- Salminen S, von Wright A & Ouwehand A (2004) Lactic acid bacteria. microbiological and Functional Aspects. 3ª edición. Marcel Dekker Inc. Nueva York, NY. pp. 375-398.
- Savijoki K, Ingmer H & Varmanen P (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 394-406.
- Schägger H (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1(1):16-22.
- Sigma-Aldrich. Enzymatic Assay of Lysozyme (EC 3.2.1.17). Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-lysozyme.html> Unidad de Proteómica, Instituto de Biotecnología, UNAM. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/proteomica/informaciones.pdf>
- Vijay SB, Sood SK, Kumariya R & Garsa AK (2012) Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiol. Res.* 167(9): 544-549.
- Visweswaran GR, Steen A, Leenhouts K, Szeliga M, Ruban B, Hesseling-Meinders A, Dijkstra BW, Kuipers OP, Kok J & Buist G (2013) AcmD, a homolog of the major autolysin AcmA of *Lactococcus lactis*, binds to the cell wall and contributes to cell separation and autolysis. *PLoS One.* 8(8): e72167. doi: 10.1371/journal.pone.0072167.
- Vollmer W, Joris B, Charlier P & Foster S (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(2): 259-86.