



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



Identificación y caracterización de una sustancia inhibidora tipo bacteriocina producida por una cepa nativa de *Lactococcus lactis* aislada de queserías artesanales

Tutora: PhD. Silvana Carro
Co-Tutora: MSc. Karina Cal

Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche
Facultad de Veterinaria, UdelaR

Bach. María del Pilar Hernández

Tesina de Licenciatura en Bioquímica

--

Montevideo, Uruguay
2021

INDICE

Agradecimientos	2
RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN.....	4
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	4
BACTERIOCINAS	6
Clasificación	8
NISINA	15
Métodos para detección e identificación de bacteriocinas	20
2. OBJETIVO GENERAL	23
2.1 Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1 Equipos y Materiales	24
3.2 Cepas bacterianas	24
3.3 Obtención del sobrenadante.....	25
3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	26
3.5 Tratamiento enzimático	28
3.6 Detección del gen estructural de Nisina	28
<i>Control de integridad y pureza</i>	29
<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	29
3.7 Espectrometría de masas.....	30
RESULTADOS	32
4.1 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	32
4.2 Tratamiento con enzimas proteolíticas	33
4.3 Detección del gen estructural de Nisina	36
4.3.1 Control de integridad.....	36
4.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	37
4.4 Espectrometría de Masas.....	38
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFIA.....	50

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerles en primer lugar a mis tutoras, Silvana y Karina, por acompañarme y guiarme durante todo el trabajo de tesina, con mucha paciencia y dedicación. También quiero agradecerle a los integrantes del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la leche de Facultad de Veterinaria, por permitirme trabajar allí en esta línea de investigación. A Álvaro por su gran colaboración, quien siempre estuvo dispuesto ayudarme y orientarme cuando lo necesité y a Aldo por sus grandes aportes.

A Gaby y Maila, que me cubrieron mil veces cuando estuve haciendo el trabajo de mesada. A mis amigos de Ciencias, Jacke, Vale, Giorgi, Grecco, Pili, Ana, Vani, Rafa, que siempre me dieron para adelante y a mis amigas de toda la vida. A Day.

Por último quiero agradecer el apoyo incondicional de mis abuelos y mis padres porque me apoyaron desde el primer día en que decidí comenzar esta carrera, a mis tíos, Claudia y Alfonso por poder contar con ellos, a mi prima Camila y a mis hermanos, Noel, Marco y Andrés.

RESUMEN

Las bacterias ácidas lácticas (BAL), son un grupo heterogéneo de microorganismos compuesto por varios géneros bacterianos (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, entre otros). Las BAL son muy utilizadas en los procesos de fermentación en la industria alimentaria dado que son capaces, entre otras propiedades, de acidificar y preservar los alimentos. Además, pueden presentar actividad antimicrobiana que se atribuye principalmente a la producción de diferentes sustancias, entre las cuales se encuentran péptidos denominados bacteriocinas. El espectro de acción de algunas bacteriocinas producidas por BAL es amplio e incluye microorganismos alterantes y/o patógenos de los alimentos como, por ejemplo, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* entre otros. En trabajos previos realizados en la Unidad Académica Ciencia y Tecnología de la Leche (UACTL) de la Facultad de Veterinaria, UdelaR se logró implementar una técnica de purificación de la/s bacteriocina/s producidas por un *L. lactis* subsp. *lactis* GU 967439, una cepa nativa aislada de quesos artesanales de la región de Colonia-Uruguay. En este trabajo nos propusimos caracterizar e identificar estas sustancia/s inhibitoria/s mediante un abordaje genético y proteómico. Nuestros resultados muestran que *L. lactis* GU 967439 presenta en su genoma, el gen estructural de la nisina, una bacteriocina ampliamente estudiada por su acción sobre diferentes patógenos de importancia en inocuidad de alimentos. A su vez, en fracciones proteicas provenientes de los medios en los que se cultivó *L. lactis* GU 967439, pudimos determinar mediante espectrometría de masa, una señal igual a la reportada para la nisina Z. Si bien los resultados indican que la cepa nativa es productora de nisina Z, los ensayos de actividad antimicrobiana en presencia de enzimas proteolíticas, podrían sugerir la producción conjunta de otra bacteriocina o sustancia antimicrobiana de distinta naturaleza. Estos resultados, sumado a otros estudios realizados por este equipo, contribuye al desarrollo de un cultivo nativo con propiedades bioprotectoras, de interés para la industria láctea.

INTRODUCCIÓN

BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos heterogéneo formado por cocos y bacilos Gram positivos que se caracterizan por ser no esporulados, aerotolerantes, oxidasa y catalasa negativos y ácido-tolerantes, dado que producen ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos (Ramirez et al., 2011). En este sentido, es que son considerados como BAL los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Waters et al., 2015)

Las BAL se localizan frecuentemente en hábitat ricos en nutrientes, a bajas tensiones de oxígeno, en presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas. La leche y los productos lácteos son el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL, aunque también se las puede encontrar en otros tipos de alimentos (Vázquez et al., 2009). Estas bacterias son muy utilizadas en los procesos de fermentación en la industria alimentaria, no sólo por su habilidad para acidificar y preservar los alimentos, sino también por su implicancia en la textura, sabor y desarrollo de aromas en productos fermentados (Adolfo & Huertas, 2010). Por ello, estos microorganismos son generalmente utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos tales como leche acidificada, yogur, quesos, mantecas y cremas (Carro et al., 2005; García et al., 1998).

Actividad antimicrobiana de las BAL

Algunas BAL son capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Esta actividad antimicrobiana se basa principalmente en la producción de ácidos orgánicos (fundamentalmente ácido láctico), derivado de la fermentación de carbohidratos presentes en los diversos hábitats en los que se encuentra, con la consecuente disminución del pH. Estas bacterias también tienen la capacidad de producir otros metabolitos con actividad inhibitoria, como el peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos con actividad antimicrobiana denominados bacteriocinas (Ramirez et al., 2011).

El uso de las BAL y de sus productos metabólicos son considerados por la FDA (Food and Drug Administration) como seguros o GRAS (Generally Recognized as Safe). Por esta razón, en la industria alimentaria, pueden ser utilizadas con el objetivo, entre otros, de inhibir de forma natural el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos para el hombre, sobre una amplia variedad de alimentos. La inhibición de patógenos transmitidos por alimentos mediante el uso de bacterias ácido lácticas es una de las formas de bioconservación, la cual se define como la prolongación de la vida útil que contribuye a la inocuidad de los alimentos mediante la microbiota natural o sus metabolitos (Beristain-Bauza et al., 2012; Favaro et al., 2015; Holzapfel et al., 1995). En este sentido es que las BAL, sus metabolitos o ambos, lo que incluye las BLIS (por sus siglas en inglés: bacteriocin-like inhibitory substances), son considerados candidatos idóneos para formar parte de cultivos bioprotectores que permitan mejorar la calidad de los alimentos (Hernández et al., 1993; Nilsen et al., 1998; Revello, 2016)

BACTERIOCINAS

Varios estudios han demostrado que las bacteriocinas producidas por las BAL tienen efecto antimicrobiano sobre otras bacterias, algunas de las cuales son patógenas. Esta inhibición del crecimiento sobre microorganismos patógenos se ha podido evidenciar mediante ensayos *in vitro*, así como *in situ*. En los primeros, se comprueba su actividad colocando una suspensión de la bacteriocina sobre un cultivo de la bacteria patógena, manifestándose dicha inhibición como halos circundantes entorno a donde se inoculó la bacteriocina; mientras que en los segundos, en general se elabora el alimento en conjunto con la sustancia inhibidora (BAL productora de bacteriocina o la bacteriocina) y se inocula con un microorganismo patógeno en determinada concentración. Luego se realiza el recuento de dicho patógeno y se compara respecto a un control, elaborado sin inhibidor (Victoria-León et al., 2006; Alonso, 2018; Benech et al., 2002).

El uso de bacteriocinas en el control de patógenos es de especial interés en alimentos frescos, en general se aplica a leche pero también a vegetales, carnes, etc. o sobre alimentos mínimamente procesados como quesos y conservas, donde *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum* representan los principales peligros en este tipo de productos. Esto se debe a que estos microorganismos patógenos tienen la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración y/o formar esporas resistentes a procesos térmicos moderados, pudiendo luego germinar y desarrollarse (Schneider, 2007).

Estos y otros patógenos son de gran importancia en Salud Pública por generar Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA), las cuales, según la

Organización Mundial de la Salud (OMS), constituyen uno de los problemas sanitarios más comunes que padecen las personas en el mundo y afectan con mayor severidad a grupos vulnerables como por ejemplo niños, mujeres embarazadas y ancianos. Dentro de las ETA, la listeriosis es la causante de mayor letalidad dentro de estos grupos (20-30%) y si bien la mayoría de los casos relacionados reportados son esporádicos, la distribución de éstos es amplia a nivel mundial (Ocampo Ibañez et al., 2019; Soto Varela et al., 2016).

Por todas estas razones, el empleo de bacteriocinas como una alternativa natural para la preservación de los alimentos ha despertado interés en la industria alimentaria, donde no sólo interesa una reducida carga microbiana, sino la ausencia de patógenos de importancia que constituyen un riesgo para la salud de los consumidores.

Bacteriocinas: definición, estructura y clasificación

La palabra “bacteriocinas” fue utilizada por primera vez por Jacob y colaboradores en 1953, para referirse a las sustancias proteicas que presentaban actividad antimicrobiana. Posteriormente en 1976 Tagg y colaboradores las definieron como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, caracterizadas por poseer un componente activo y tener efecto bactericida (González-Londoño & Rincon-Núñez, 2015).

Las bacteriocinas son péptidos bioactivos antimicrobianos de síntesis ribosomal y de bajo peso molecular, conformadas hasta por 60 aminoácidos en la cadena peptídica y pueden presentar modificaciones postraduccionales.

Son sintetizadas durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano y suelen presentar actividad antimicrobiana con espectros de acción diferentes, teniendo un efecto bactericida o bacteriostático sobre otras bacterias, pudiendo ser éstas de la misma especie, lo que se denomina espectro reducido; o de géneros diferentes o sea: espectro amplio (Balciunas et al., 2013 ; Cotter et al., 2005 ; Del Campo et al., 2007; Moraes et al., 2010 ; Riley & Wertz, 2002; Taranto et al., 2005 ; Yang et al., 2014).

Estructuralmente las bacteriocinas comparten similitudes, generalmente se caracterizan por presentar en el extremo carboxi-terminal una región más hidrofóbica respecto del amino-terminal y ésta última interacciona con la membrana celular conduciendo a la lisis y muerte de la célula (Aguado, 2013 ; Dal Bello et al., 2012 ; Ghrairi et al., 2005). A pesar de ello, presentan una gran heterogeneidad estructural, lo que les confiere diferentes propiedades fisicoquímicas que han permitido su clasificación agrupándolas en distintas clases.

Clasificación

Las bacteriocinas se han clasificado de diversas maneras utilizando distintos criterios, una de ellas es la clasificación de Klaenhammer, 1993. Esta forma de clasificación sirvió como base a otras clasificaciones como la presentada por Drider et al, 2006 que organiza a las bacteriocinas en tres clases diferentes en función de sus propiedades bioquímicas y genéticas.

Clase I o lantibióticos

Aquí se incluyen las bacteriocinas que son modificadas postraduccionalmente en algunos residuos aminoacídicos, dando como resultado algunos compuestos inusuales tales como lantionina, β -metil-lantionina, deshidroalanina y deshidrobutirina. Esto sucede como resultado de una reacción de deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior condensación de la cisteína con los deshidroaminoácidos mediante enlace tioéter (Figura 1) (Arnison et al., 2013; Nissen-Meyer et al., 2009).

Dentro de este grupo la bacteriocina más representativa es la nisina, que ha sido extensamente caracterizada (López et al., 2008).

Clase II

Esta clasificación incluye bacteriocinas que poseen entre 30–60 aminoácidos en su estructura (<10 kDa), son termoestables y no presentan modificaciones postraduccionales. Tienen carga global positiva con puntos isoeléctricos que varían entre pH= 8.3 y 10. Se proponen tres subdivisiones de esta clase, de acuerdo con Drider et al., 2006 que se puntualizan a continuación.

Clase IIa

En este grupo se encuentran las bacteriocinas que presentan en su estructura entre 37 y 48 residuos de aminoácidos con una porción C- terminal que contiene una o dos estructuras en α - hélice. Las más representativas de este grupo son pediocina PA-1 y sakacina-P, con una secuencia consenso

YGNGVXaaC en el extremo N-terminal, donde Xaa representa cualquier residuo aminoacídico (Ahmad et al., 2017; González-Martínez et al., 2003). Esta secuencia se encuentra conservada en otras bacteriocinas producidas por especies bacterianas como *Pediococcus acidilactici*, lo que sugiere que dicha región es importante en el modo de acción de la bacteriocina (Lozano et al., 1992).

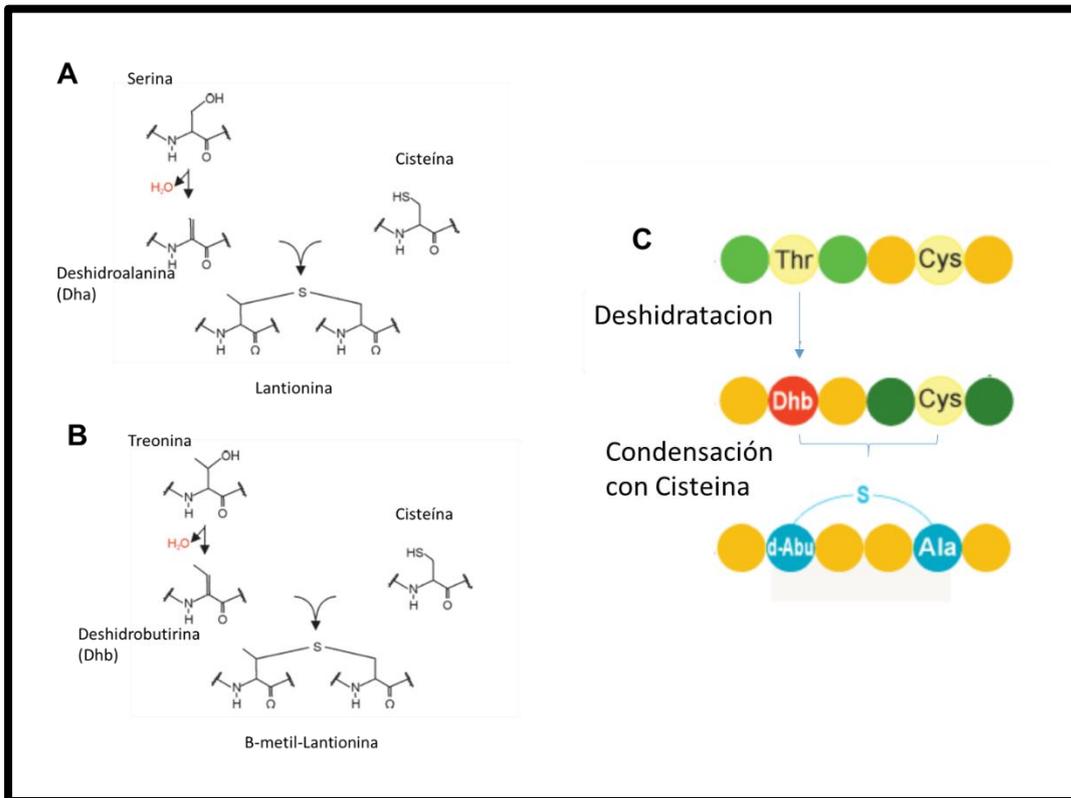


Figura 1. Formación de lantipéptidos. A) Deshidratación de serina para formar deshidroalanina (Dha), la cual reacciona con una cisteína para dar lantionina. B) Deshidratación de treonina, para formar deshidrobutirina (Dhb), la cual reacciona con una cisteína para dar β -metil-lantionina. C) Se esquematiza la formación de β -metil-lantionina (d-Abu – S – Ala) mostrada en B, cuando los aminoácidos precursores treonina (Thr) y cisteína (Cys), forman parte de la misma cadena polipeptídica. Modificado de (Zhao et al., 2020)

Clase IIb

Las bacteriocinas de este grupo son heterodiméricas por lo que requieren la actividad combinada de dos péptidos, teniendo esto un efecto sinérgico sobre su actividad. Bacteriocinas representativas de esta clase son lactococcina G y lactacina F (Woraprayote et al., 2016).

Clase IIc

Aquí se incluyen péptidos que cumplen con la estructura de ciclación cola-cabeza de sus extremos carboxilo y amino terminal mediante enlace covalente. Algunas de las bacteriocinas de esta subclase son enterocina AS48, gassericina A y reuterina 6 (Yang et al., 2014).

Clase III

Dentro de este grupo se encuentran las bacteriocinas termoestables con una masa molecular mayor a 30 KDa. Presentan actividad y estructura proteica más compleja que las bacteriocinas mencionadas anteriormente. La mayoría son producidas por el género *Lactobacillus spp.*, siendo las más representativas helveticina J y lacticina B. En esta clasificación está incluida la clase IV propuesta por Klaenhammer 1993, pero que actualmente se reunió en la clase III (Oscáriz & Pisabarro, 2001; Mondragón Preciado et al., 2013).

Modo de acción

El mecanismo de acción de las diferentes bacteriocinas está íntimamente relacionado con su estructura (Figura 2). Normalmente actúan contra microorganismos Gram positivos, dado que la susceptibilidad de las bacterias Gram negativas es mucho más limitada. Hasta hace poco no se conocían bacteriocinas producidas por bacterias lácticas activas naturalmente frente a Gram negativas (Vásquez et al., 2009), pero se han encontrado algunas cepas como *L. curvatus* y *L. casei* que inhiben el crecimiento de cepas patógenas de *E. coli* y *Salmonella* entérica sin necesidad de tratamiento previo (Rodríguez et al., 2006).

La sensibilidad de los microorganismos a las bacteriocinas se debe a su interacción con la superficie celular bacteriana y con la membrana celular, de manera que la permeabilización de la célula y la formación de poros es el principal mecanismo por el cual las bacteriocinas atacan a sus células diana.

Las bacteriocinas son capaces de asumir configuraciones de manera tal que sus grupos cargados positivamente interactúen electrostáticamente con la superficie de la célula bacteriana cargada negativamente; propiedad conferida por sus componentes de pared (fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, lipopolisacárido, ácido lipoteicoico y cardiolipina); permitiendo su pasaje a través de la pared celular y llegada a la membrana plasmática. Una vez allí, las superficies hidrofóbicas se alinean con la bicapa lipídica ingresando en la misma. Luego de esta perforación de la bicapa, los péptidos se auto asocian o polimerizan para formar complejos de tipo poro. De esta manera, las bacteriocinas inducen la permeabilización de la membrana de la célula diana, probablemente formando poros selectivos de iones que causan disipación del potencial de membrana y por ende agotamiento del ATP intracelular, además

de la fuga de sustratos intracelulares, lo que conlleva a la detención del crecimiento y eventualmente la muerte (Kumariya et al., 2019)

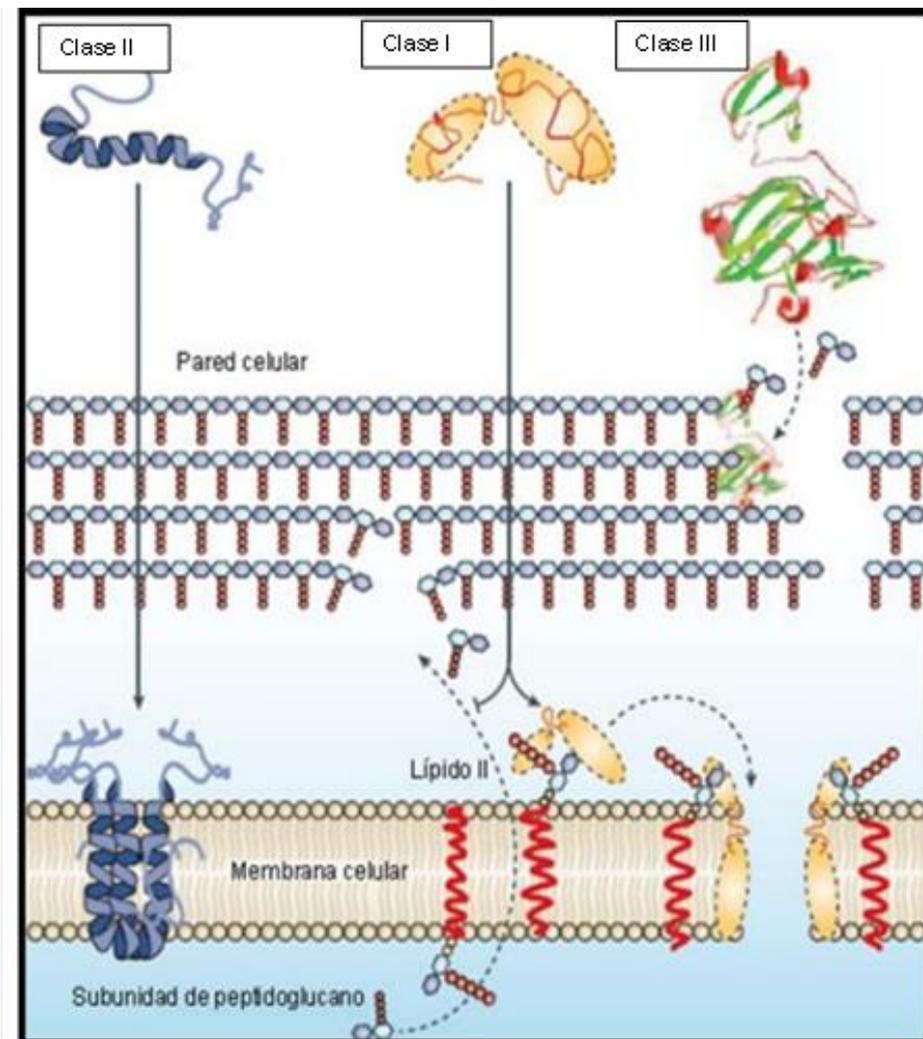


Figura 2. Imagen representativa del modo de acción de diferentes bacteriocinas según su clasificación. Las bacteriocinas de clase II, luego de atravesar la pared celular mediante interacciones electrostáticas (representado por la flecha), pueden insertarse en la membrana celular debido a su estructura helicoidal. Las bacteriocinas de clase I, luego de atravesar la pared celular, se unen al lípido II ubicado en la membrana celular, inhibiendo el transporte de péptidoglucano hacia la pared celular. También pueden utilizar al lípido II como acoplador para la formación de poros. Las bacteriocinas de clase III (bacteriolisinas) actúan directamente sobre la lisis de la pared celular. En todos los casos se genera inestabilidad de la membrana celular, conduciendo a la muerte a celular. Adaptado de (Cotter et al., 2005).

Se ha demostrado que algunos miembros de las bacteriocinas de clase I, como la nisina, tienen un modo de acción dual (Figura 2). Pueden unirse al lípido II, el principal transportador de subunidades de péptidoglicano desde el citoplasma a la pared celular y, por lo tanto, impiden la correcta síntesis de la pared, lo que lleva a muerte celular. Además, pueden utilizar el lípido II como molécula de acoplamiento para iniciar un proceso de inserción de membranas y formación de poros que conduce a una rápida muerte celular (Cotter et al., 2005).

En general, la bacteriocinas de clase II tienen una estructura helicoidal anfifílica, lo que les permite insertarse en la membrana de la célula diana, lo que conduce a la despolarización y la muerte. Mientras que las grandes bacteriocinas de clase III, que poseen actividad bacteriolítica, pueden ejercer su acción directamente sobre la pared celular de la bacteria diana; lisan la pared celular, en general, mediante el dominio catalítico (homólogo a las endopeptidasas) ubicado en el extremo N-terminal, conduciendo a la muerte celular (Figura 2) (Cotter et al., 2005).

Las cepas productoras de bacteriocinas están protegidas de la actividad de sus propios productos por los denominados sistemas de inmunidad. Muchos de estos sistemas suelen depender de la producción de una única proteína que bloquea la entrada de la bacteriocina a nivel de la membrana celular, dado que se ha encontrado anclada en la misma u ocupando gran parte del espacio entre la pared y la membrana celular. En otros casos, la auto-inmunidad resulta de la acción combinada de una proteína de inmunidad análoga, que se une a moléculas de bacteriocina en la membrana celular bacteriana y un transportador de unión a ATP (denominado transportador ABC), bombea la bacteriocina fuera de las células (de Freire Bastos et al., 2015).

NISINA

Desde 1951 la nisina juega un papel importante en la conservación de los alimentos. Reportes indican que la primera preparación comercial de este conservante se obtuvo en Inglaterra en 1953 (Cano-Serna et al., 2015). Dentro de las BAL, *Lactococcus lactis lactis* es una de las especies mejor caracterizada y reconocida por ser productora de la bacteriocina nisina, un antibiótico de clase I mencionado anteriormente (Allam et al., 2017)

El espectro antimicrobiano de la nisina abarca patógenos Gram positivos como *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum*, pero también es efectiva contra algunos Gram negativos como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

Nisina es la bacteriocina mejor caracterizada y mayormente comercializada con *Status* GRAS. Su utilización como aditivo alimentario fue aprobado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) y por la OMS en 1969. Se encuentra documentada como E234 y la concentración máxima a la cual está permitida su utilización es de 12,5 mg de nisina pura por Kg (Codex Stan 283 – 1978) (Sierra et al., 2012).

En la actualidad es utilizada como conservante en más de 50 países y se la puede encontrar en productos cárnicos, lácteos, vegetales y frutas en conserva, huevos y productos de pescado (Kapriniski et al., 2013 ; Sanchez-Martin et., al 2019), En Uruguay, es apta su aplicación en quesos, según el Reglamento Bromatológico Nacional vigente (Uruguay MSP, 1994), siendo la concentración máxima de uso 12,5 mg/kg (Rodríguez, 1996)

Propiedades fisicoquímicas y variantes moleculares de nisina

La nisina es sintetizada a nivel ribosomal como un péptido precursor de 57 aminoácidos denominado prenisina, conformada por 23 residuos aminoacídicos en el extremo N-terminal, lo que se denomina región líder y 34 en la región estructural (prenisina) (Rodríguez et al., 1996). Posteriormente, la región líder es removida por acción enzimática en la fase postraduccional, resultando una molécula con peso molecular de 3.5 kDa (Jozala et al., 2015). Además de la remoción del péptido líder, los aminoácidos de la región estructural, serina y treonina sufren deshidratación formando o dehidroalainina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb) respectivamente. Algunos de estos deshidroaminoácidos, son capaces de reaccionar con cisteínas ubicadas en la propia cadena peptídica, formando puentes tioéter.; lo que resulta en la formación de los aminoácidos lantionina (Figura 3) (Melo et al., 2005)

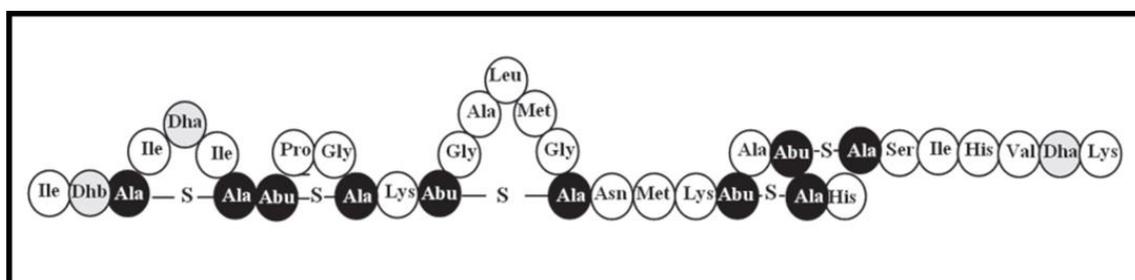


Figura 3. Estructura primaria del lantibiótico nisina A. Se indican los residuos de lantionina en negro como Ala — S — Ala, mientras que los residuos de β-metil-lantionina se muestran en negro como Abu — S — Ala. Dha (**d**ehidro**a**l**a**nina). Dhb (dehidrobutirina) (López et al., 2008).

Se han podido identificar distintas variantes de nisina cuya denominación es: A, Z, F, y Q (Field et al., 2019). Las variantes A y Z son las formas más activas, las más estudiadas y además las que se encuentran comercializadas actualmente. Ambas variantes difieren únicamente en un aminoácido en la posición 27 de la cadena peptídica (Figura 4). En la nisina A se encuentra el aminoácido histidina en dicha posición mientras que en la nisina Z se encuentra el aminoácido asparagina. Esta modificación genera cambios estructurales y fisicoquímicos como diferencias en la resistencia a cambios de pH, estabilidad térmica, sensibilidad a enzimas proteolíticas, que se ve reflejado en el espectro de acción (Shin et al., 2016).

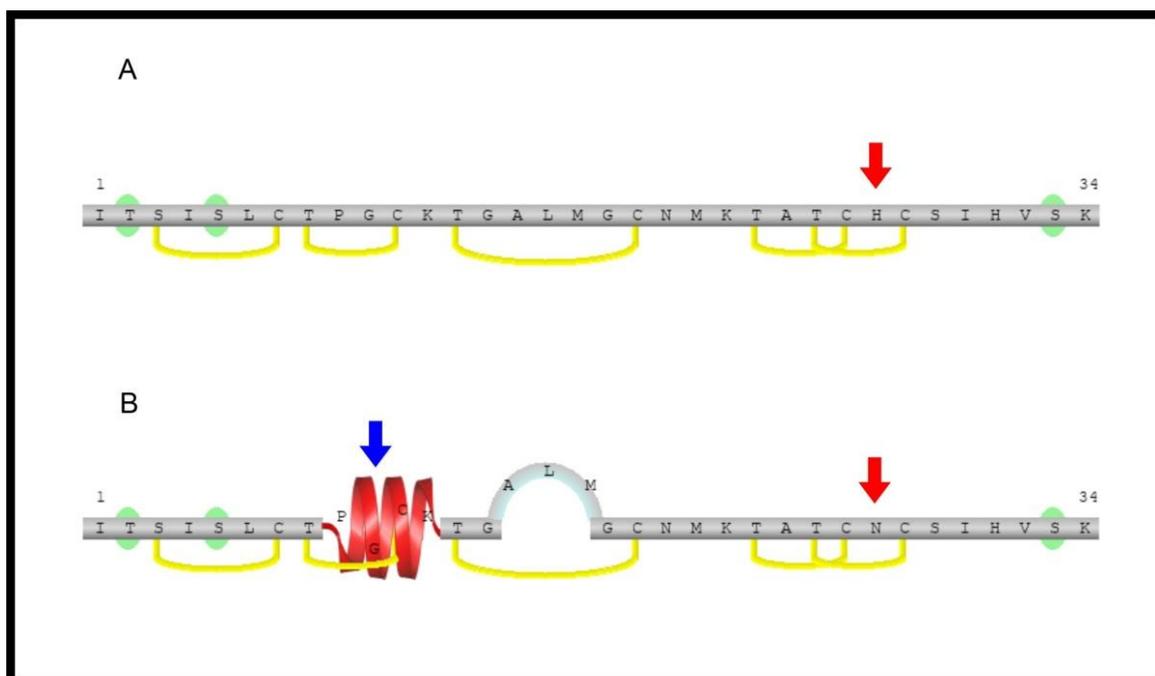


Figura 4. Secuencia aminoacídicas de nisina A (A) y Z (B). En ambas figuras se observan las estructuras primarias de nisina A y Z respectivamente. Con flecha roja se indican en ambas estructuras primarias en la posición 27 el aminoácido que las diferencia. En ambas estructuras aminoacídicas se observan en amarillo los puentes sulfuros de los lantibióticos (Ala — S — Ala y Abu-S-Abu). En la figura B y en azul se observa una estructura secundaria de alfa hélice (<http://bactibase.hammamilab.org/main.php>).

Otra diferencia es el aumento de solubilidad de la variante Z con respecto a la A, cuando se encuentran a un pH cercano a la neutralidad. Esto se explica por la mayor polaridad de la asparagina con respecto a la histidina. Esto no afecta la actividad antimicrobiana de ambas moléculas, sin embargo, la difusión de la nisina Z en alimentos semisólidos es mucho mayor que la variante A (Shin et al., 2016).

Gen estructural de Nisina

En la biosíntesis de bacteriocinas producidas por Gram positivas y en particular los lantibióticos como la nisina, están involucrados un grupo de 11 genes (Figura 5), dentro de los cuales se encuentran los genes responsables de la biosíntesis y los de inmunidad. Dentro del grupo de genes necesarios para la biosíntesis, se incluye un gen para el pre péptido: prenisina (nisA). La prenisina formada es procesada posteriormente en el citoplasma por la maquinaria celular. Los genes que codifican para enzimas que modifican aminoácidos mediante reacciones de deshidratación y formación de la estructura anillada (formación de lantioninas) son nisB y nisC; un gen para la secreción, nisT y otro

para la escisión del péptido líder (*nisP*). Los genes *nisI*, *nisF*, *nisG* y *nisE*, confieren inmunidad a la cepa productora sobre sus propios productos de secreción. La regulación de la expresión de la bacteriocina está dada por los genes *nisR* y *nisK*, los que se encuentran relacionados con la auto-regulación de la expresión de la Nisina, a través de un sistema de regulación de 2 componentes. NisK es un receptor de nisina madura que se encuentra localizado en la membrana citoplasmática. Una vez dada la unión receptor-ligando comienza una cascada de fosforilación, donde el activador de la transcripción NisR, es fosforilado por NisK. NisR fosforilado es capaz de unirse al ADN en la región promotora *PnisA*. La activación de este promotor inicia la expresión de los genes *nisABTCPRK* y *nisFEG*. Estos genes están localizados en cromosomas o en plásmidos (Ben Lagha et al., 2017; Kaufmann 2018; Muñoz-Rojas, 2004).

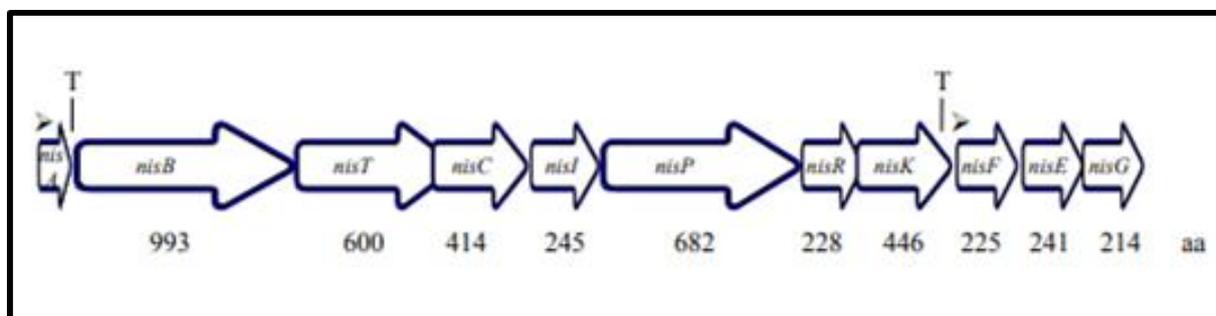


Figura 5. Organización de los genes implicados en la biosíntesis de la nisina, se observan los 11 genes. ▶ Promotor, T: terminador; nisA, gen estructural; nisB, C,

modificación postraduccional; nisT, transporte; nisl, F, E, G, transporte / inmunidad; nisR, K, sistema de regulación de dos componentes (Cano et al., 2015).

Métodos para detección e identificación de bacteriocinas

Existen una gran variedad de estudios publicados en los que se ha utilizado la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar el origen de la actividad antimicrobiana de la bacteria en estudio. En este sentido, se utilizan cebadores específicos para detectar la presencia de genes involucrados en la producción de bacteriocinas (Juturu & Wu, 2018; Martínez, 1996). Esta técnica también se utiliza en conjunto con otras técnicas como la espectrometría de masas, en casos donde se han hallado compuestos antimicrobianos en sobrenadantes libre de células (SLC), provenientes de cultivos del microorganismo productor de dichos agentes antimicrobianos. De esta manera, se busca identificar de forma específica el agente inhibidor (Saraiva et al., 2020a).

La espectrometría de masas se introdujo en el ámbito del análisis de biomoléculas al final de la década de los años 70 del siglo pasado y se reconoció por primera vez en 1988 como un método para examinar moléculas grandes y actualmente la espectrometría de masas MALDI-TOF MS (por sus siglas en inglés: *Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) se ha convertido en una herramienta esencial en proteómica (Khatun et al., 2007; Mingorance et al., 2016 ; Rose et al., 1999). Esta técnica consiste, a grandes rasgos, en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa. Para ello, la muestra introducida en el

espectrómetro es ionizada y los iones generados son sujetos a campos magnéticos y eléctricos a fin de separarlos de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). En este caso, esa separación se realiza mediante el análisis de los tiempos de vuelo de los iones generados (TOF – Time of Fly). Por lo tanto, iones de mayor masa, tendrán tiempos de vuelo mayores, porque son más pesados, mientras que iones de menor masa tendrán tiempos de vuelo más pequeños (Gallegos-Perez, 2009).

Esta técnica presenta varias ventajas que la hacen adecuada para el análisis y caracterización de bacteriocinas, como lo son su facilidad de uso, la sensibilidad (de picomol a femtomoles), $\pm 0,1\%$ y su tolerancia relativa a los contaminantes en la muestra (Rose et al., 1999).

De hecho, se ha demostrado que la espectrometría de masas MALDI-TOF ha sido una técnica apropiada para identificar y diferenciar eficazmente nisina y lacticina 481 en SLC de cepas de *Lactococcus* (Zendo et al., 2008)

En trabajos previos realizados en el laboratorio donde se desarrolló la presente tesis (Unidad Académica Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Veterinaria, UdelaR) se han caracterizado péptidos antimicrobianos producidos por *L. lactis* subsp. *lactis* y se ha estudiado su acción sobre diferentes patógenos de importancia en inocuidad de alimentos. En este sentido, en el trabajo realizado por Rodríguez (2017), se logró implementar una técnica de purificación de la/s bacteriocinas producidas por un *L. lactis* subsp. *lactis* GU 967439 nativo. Esto implicó caracterizar el SLC de un cultivo bacteriano de este microorganismo, determinar su actividad antimicrobiana frente a *Listeria innocua* y el origen peptídico de la misma. Además, fue posible purificar la/s bacteriocina/s producidas mediante un sistema de precipitación con sulfato de

amonio y posterior concentración mediante cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones de esta cromatografía, con actividad antimicrobiana, fueron conservadas a -20°C , para su posterior análisis e identificación de los agentes inhibitorios allí presentes, mediante alguna técnica que lo permita, como ser la espectrometría de masas.

En este contexto y a partir de estos avances, es que se diseñó esta investigación, donde los ensayos realizados fueron enmarcados en esta tesina de grado.

2. OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar mediante aproximaciones génicas y proteómicas, la/s BLIS, producidas por una cepa nativa de *Lactococcus lactis* GU 967439, aislado en queserías artesanales provenientes del Departamento de Colonia, Uruguay.

2.1 Objetivos Específicos

2.1.1. Corroborar la producción y naturaleza de la/s sustancias/s con capacidad antimicrobiana en el sobrenadante libre de células de cultivos de *L. lactis* GU 967439.

2.1. 2. Determinar si el gen estructural de nisina está presente en el genoma de *L. lactis* GU 967439.

2.1.3 Identificar mediante espectrometría de masas el/los péptidos con actividad antimicrobiana presentes en el sobrenadante libre de células de cultivos de *L. lactis* GU 967439.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Equipos y Materiales

Para el desarrollo del trabajo experimental se utilizaron materiales y equipos provistos por el Laboratorio de la UACTL y por el Departamento de Biología Celular y Molecular - Área Biofísica, ambos en Facultad de Veterinaria UdelaR.

3.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizó la cepa nativa *L. lactis* GU 967439.

Este aislamiento se trata de una BAL nativa con efecto inhibidor del crecimiento frente a *Listeria monocytogenes* (*L.monocytogenes*), *Listeria innocua* (*L.innocua*) y *Streptococcus bovis* (*S.bovis*) (Fraga Coteló et al., 2013), posiblemente por producción de BLIS. Como cepa control se utilizó *L. lactis* ATCC 11454, productora de nisina A (Fernández et al., 2013). Ambos *L. lactis* fueron mantenidos a -20°C en caldo M17 Broth (Himedia®) con glicerol (15%, v/v).

Los microorganismos indicadores de actividad antimicrobiana utilizados en los ensayos fueron *Listeria innocua* American Type Culture Collection ATCC 3309 y *Streptococcus bovis* spp. 2.5 WT provisto por el Departamento de Microbiología del IIBCE (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable), el cual fue utilizado como microorganismo indicador por Fraga (2013). Se utilizó *Listeria innocua* debido a que es una especie no patógena y

cercanamente relacionada a la especie patógena *L. monocytogenes* (Milillo et al., 2012)

Para el crecimiento y ensayos de inhibición de *L. innocua* se utilizó el medio de cultivo Brain Heart Infusion (BHI HiMedia®, India) suplementado con 0.6% (p/v) de extracto de levadura (Ye) (HiMedia®, India), a 37°C por 24 h en condición de aerobiosis.

Para el crecimiento y ensayos de inhibición de *S. bovis* 2.5 WT se utilizó medio Mann-Rogosa-Sharpe (MRS, Difco, USA) bajo las mismas condiciones de crecimiento mencionadas para *L. innocua*.

La pureza de todos los cultivos utilizados en este trabajo fue evaluada mediante examen macroscópico de las colonias por tinción de Gram.

3.3 Obtención del sobrenadante libre de células

Considerando que las sustancias inhibitorias del crecimiento son secretadas por las bacterias al medio de cultivo (medio extracelular), fue necesario obtener este medio extracelular pero libre de células bacterianas, al cual denominaremos sobrenadante libre de células (SLC). De esta manera, se procedió a obtener el SLC de cultivos de *L. lactis* GU 967439 y *L. lactis* ATCC 11450 en fase de crecimiento exponencial, dado que, de acuerdo a estudios previos, es cuando son secretadas las sustancias inhibitorias del crecimiento (Rodríguez, 2017). Para ello se partió de un cultivo puro de ambas cepas, se inoculó una colonia aislada en 5mL de caldo M17 Broth (HiMedia®) y se incubó durante 12 h a 30°C en microaerofilia, condiciones óptimas determinadas por

Lorenzo y Raffo (2015), quienes evaluaron mediante curvas de crecimiento la cinética de producción de la/s bacteriocina/s para *L. lactis* nativo GU 967439.

Posteriormente, se realizó una dilución al 1% en caldo M17 Broth (Himedia®) y se re-incubó en idénticas condiciones. Los repiques en cultivos seriados se realizaron con la finalidad de aumentar la biomasa y por tanto el aumento de la producción de BLIS. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 10000xg durante 15 minutos a 4°C (centrífuga SENOVA®) y se recuperó el sobrenadante obtenido.

3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana

Con el objetivo de determinar la presencia de BLIS en el sobrenadante, se ensayó la técnica *well diffusion* (Fraga Coteló et al., 2013 ; Perelmuter et al., 2008). Este es un método que permite cuantificar la capacidad antimicrobiana de una sustancia por medio de la difusión de la misma en un medio semi-sólido (soft agar) y de esta manera inhibir el crecimiento de microorganismos presentes en dicho medio (Bonev et al., 2008). A los microorganismos evaluados se les denomina microorganismos indicadores. Los cultivos de *L. innocua* ATCC 3309 y *S. bovis* spp (indicadores), fueron obtenidos mediante la siembra de colonias aisladas en 5 mL de medio de cultivo (ver punto 3.3) y fueron incubados *over-night* (ON) a 37°C en aerobiosis.

Con la finalidad de obtener una concentración final aproximada a 1×10^6 UFC/mL de microorganismo indicador en cada placa a ensayar con agar semi-sólido, se realizaron diluciones seriadas en base 10 de los cultivos antes mencionados en solución salina estéril (NaCl 0.85%). De la dilución 1/1000 se

tomó 1 mL y se inoculó en medio de cultivo correspondiente para cada microorganismo (ver punto 3.3), conteniendo 1.5 % de agar.

Cada medio fue previamente fundido y templado a 45°C y una vez conteniendo los microorganismos indicadores, fueron volcados en placas de Petri, a las que previamente se les ubicaron cilindros de metal estériles, los que se retiraron una vez solidificado el medio, generando los pocillos de siembra.

En dichos pocillos fue sembrado el SLC proveniente de cultivo de *L. lactis* GU 967439, cuyo pH fue previamente ajustado a 6.5 con NaOH 1M, para descartar el efecto inhibitorio sobre los microorganismos indicadores de los ácidos orgánicos generados durante la fase exponencial de crecimiento de las BAL.

Con la finalidad de observar la mínima concentración a la cual el SLC presenta actividad antimicrobiana, se realizaron diluciones seriadas en base 2 del SLC (pH 6.5), con Solución Buffer Fosfato estéril (PBS 10 mM pH 7).

Por último, 100 µL de estas diluciones fueron inoculados en los pocillos de las placas de agar semi-sólido. Como control positivo se utilizó 100 µL de una solución de Nisina (Nisaplin[®], Danisco) 100 mg/mL en HCl 0.02 N (pH 2, actividad óptima de nisina) y como controles negativos se utilizaron iguales volúmenes de caldo M17, HCl 0.02 N o PBS (10 mM, pH 7), dependiendo del ensayo realizado. Finalmente, la incubación de las placas se realizó a 37°C durante 12 h en aerobiosis. Al cabo de ese tiempo, se realizó la lectura de los halos de inhibición (actividad antimicrobiana) presentes alrededor de los pocillos sembrados. Ésta se expresó en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL), siendo una UA el inverso de la dilución más alta que presentó un halo de inhibición del crecimiento frente al microorganismo indicador

(Schillinger et al., 1991). Por ejemplo: dilución 1/16 del SLC, es la última de las diluciones seriadas que presenta actividad inhibitoria frente al indicador, entonces la actividad antimicrobiana de ese SLC es 16 UA. Este ensayo se realizó por triplicado.

3.5 Tratamiento enzimático

Con el objetivo de corroborar la naturaleza de la sustancia BLIS presente en el SLC de cultivos de *L. lactis* GU 967439 se propuso evaluar la actividad antimicrobiana remanente luego de la incubación con diferentes enzimas proteolíticas. Dichas enzimas fueron: Pepsina, Tripsina, Proteinasa K, α Quimiotripsina y Pronasa E. Las soluciones enzimáticas fueron preparadas a una concentración de 10 mg/mL (Perelmuter et al., 2008). En tubos tipo *ependorf* estériles se colocaron 900 μ L del SLC y 100 μ L de solución de cada enzima. El pH de la mezcla fue ajustado a pH 7 excepto para Pepsina que se ajustó a pH 3. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 1 hs. Finalmente, el pH del SLC tratado enzimáticamente fue nuevamente ajustado a 6.5 y su actividad fue evaluada mediante la técnica de *well diffusion* (Fraga et al., 2008) anteriormente descripta.

3.6 Detección del gen estructural de Nisina

Extracción de ADN

Para cumplir con este objetivo se realizó la extracción de ADN genómico a partir de las cepas de *L. lactis* ATCC 11454 y *L. lactis* GU 967439. A partir de

colonias puras y aisladas, se realizaron cultivos ON en caldo M17 Broth (Himedia®) con un volumen final de 5 mL, a 30°C en condición de microaerofilia. Una alícuota del cultivo (1 mL) fue centrifugada a 5000 xg durante 5 minutos a 4°C. El lavado del *pellet* o sedimento se realizó dos veces con 1 mL de PBS salino (10 mM NaCl pH 7.4). El *pellet* se resuspendió en 100 µL de una solución de PBS 10 mM pH 7.4 y Tween 20 al 0.05 % y se llevó a ebullición durante 10 minutos (Longhi et al., 2003). Posteriormente se centrifugó a 16000xg durante 15 minutos. El sobrenadante, fracción enriquecida en ADN genómico, fue recuperado y se almacenó a -20 °C.

Control de integridad y pureza

Para evaluar la integridad del ADN extraído se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 0.8 % en TBE (Tris-Borato-EDTA). Se sembraron alícuotas de ADN de las cepas de *L. lactis* GU 96743 y *L. lactis* ATCC 11454 puros y en una dilución 1:10.

La concentración y pureza del ADN obtenido fue evaluada mediante espectrofotometría (Nanodrop™ 1000 Spectrophotometer by Thermo Fisher Scientific).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación mediante PCR para detectar el gen estructural que codifica para la nisina se realizó en base al protocolo propuesto por Alegría et al., 2010.

En este trabajo se utilizaron los *primers*:

Nis-F: 5'-CGGCTCTGATTAAATTCTGAAG-3' y

Nis-R: 5'GGATTAGCTAGTAGTAACTGTTC-3'. La mezcla de reacción de PCR, contenía 100 ng de ADN genómico, 0.4 μ M de cada *primer*, 200 μ M de dNTP's, 1.5 mM de MgCl₂ y 1 U/ μ L de Taq polimerasa, el volumen final fue de 25 μ L. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: la desnaturalización inicial se realizó durante 10 minutos a 92°C, seguida de 30 ciclos de 54 segundos para la desnaturalización a 94°C, hibridación durante 45 segundos a 50°C y la extensión durante 45 segundos a 72°C. La extensión final fue por 1 minuto a 72°C.

Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en TBE en presencia de Syber safe®. Las bandas correspondientes al producto de PCR en el gel de agarosa fueron observadas bajo luz UV en un transiluminador (Fisher Scientific®).

3.7 Espectrometría de masas

La identificación de las BLIS en el SLC fue determinada mediante su análisis por Espectrometría de Masas (Maldi Tof/Tof 4800; AB/Sciex; Instituto Pasteur de Montevideo). Las fracciones utilizadas para dichas determinaciones fueron obtenidas por Rodríguez (2017), utilizando la metodología que se describe a continuación. El SLC de cultivos de *L. lactis* GU 967439 se precipitaron con sulfato de amonio y el concentrado proteico fue sometido a cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones generadas en la cromatografía enriquecidas

en proteínas y que presentaron actividad antimicrobiana (evaluada mediante la técnica de *well-diffusion* – ver 3.4), fueron almacenadas a -20°C.

Las fracciones con actividad antimicrobiana (1uL) se depositaron en una placa de MALDI TOF/TOF (Opti-TOF 384 Well insert, AB Sciex), sobre ellas se les depositó 1uL de una suspensión de 10 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 60% y TFA al 0,1% y se mantuvieron en una cámara de flujo laminar horizontal hasta su co-cristalización. Se realizó una medida de masa entera en un rango de m/z 800 - 6000. Los espectros de masa se obtuvieron en un modo reflector positivo con un láser (YAG) a 355 nm hasta un máximo de 3125 disparos por espectro. El voltaje final del detector fue de 2.015 kV. La calibración de los espectros se realizó con una mezcla de calibración comercial (Mass standard kit for calibration Cal Mix 1, AB Sciex)

RESULTADOS

4.1 Determinación de la actividad antimicrobiana

Con el objetivo de confirmar la actividad antimicrobiana de los cultivos de *L. lactis* GU 967439 realizados para este trabajo, se probó la actividad inhibitoria del SLC de estos cultivos, frente a *L. innocua* y *S. bovis*, las cuales ya han sido reportadas (Fraga Cotelo et al., 2013 ; Rodríguez, 2017). Uno de estos ensayos de inhibición se puede observar en la Figura 6.

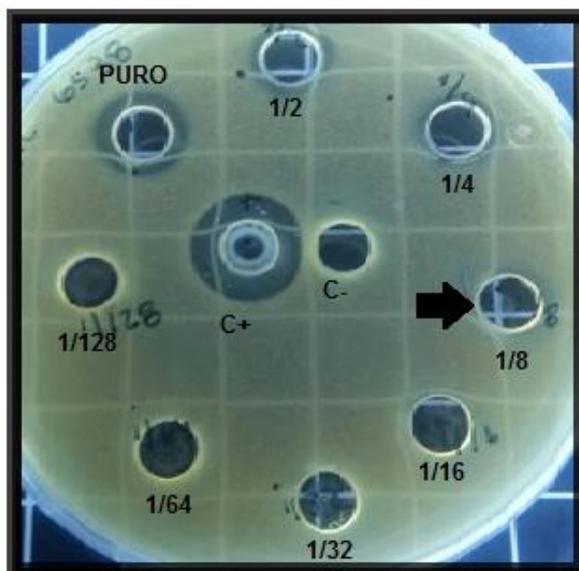


Figura 6: Técnica well diffusion. Actividad antimicrobiana presente en el SLC de *L. lactis* GU967439 frente a *Listeria innocua* ATCC 3309. Las flechas muestran el halo de inhibición. Los símbolos de C+ y C- en los pocillos centrales hacen referencia a los controles positivo nisina (100mg/mL) y negativo HCl (0.02N) respectivamente. El número fraccionario presente en los pocillos circundantes hace referencia a las diluciones en base 2 del SLC sembradas en los mismos.

A partir de estos resultados se determinó la actividad antimicrobiana del SLC de *L. lactis* GU 967439 en UA/mL. El título de actividad antimicrobiana del SLC obtenido para cada microorganismo indicador se muestra en el Cuadro I, siendo mayor la actividad inhibitoria frente a *S. bovis* 2.5 WT que frente a *L. innocua* ATCC 3309.

Cuadro I. Actividad antimicrobiana presente en el SLC de *L. lactis* GU 967439 frente a dos microorganismos indicadores determinada mediante la técnica *well diffusion*.

Microorganismos Indicadores	Actividad inhibitoria (UA/mL)
<i>L.innocua</i> ATCC 330909	80
<i>S. bovis</i> spp.	320
nisina A (Nisaplin®) (control positivo)	presenta
HCl 0.02N pH 2 / M17 (controles negativos)	no presenta

4.2 Tratamiento con enzimas proteolíticas

El tratamiento con enzimas proteolíticas sobre el SLC de *L. lactis* GU 967439 se realizó con el fin de confirmar el carácter peptídico del mismo. Los tratamientos proteolíticos se realizaron en paralelo para ambos microorganismos indicadores con el objetivo de comparar si aún se conservaba el efecto inhibitorio de la/s moléculas presentes en el SLC luego dicho tratamiento.

Frente a ambos microorganismos indicadores el SLC muestra pérdida de actividad cuando es tratado con Pronasa E y Tripsina. Sin embargo el tratamiento con α -Quimiotripsina y Proteinasa K evidenció un comportamiento opuesto sobre uno u otro indicador (Cuadro II). A excepción del tratamiento con Tripsina, el cual fue incorporado en el desarrollo de este trabajo y solo se realizó frente a *S. bovis*, los resultados para los restantes tratamientos enzimáticos ya fueron reportados de manera independiente para *S. bovis spp.* y para *L. innocua* (Fraga et al., 2013 y Rodríguez, 2017, respectivamente), mostrando la reproducibilidad de los resultados en el tratamiento proteolítico del SLC de *L. lactis* GU 967439.

Cuadro II. Tratamiento con enzimas proteolíticas. Ensayo de actividad antimicrobiana remanente (técnica *well diffusion*) del SLC neutralizado frente a dos microorganismos indicadores luego del tratamiento con diferentes enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas					
Indicador	Pepsina	α Quimiotripsina	Proteinasa K	Pronasa E	Tripsina
<i>L. innocua</i>	NR	+#	+#	-#	-
<i>S.bovis spp.</i>	+*	-*	-*	-*	-

(+/-): presencia/ausencia de halo de inhibición en el ensayo de *well diffusion*. NR (no realizado).

Ya reportado por Rodríguez, 2017. * Ya reportado por Fraga et. al, 2013.

Considerando que la nisina A es producida por *Lactococcus lactis lactis*, al igual que el microorganismo motivo de estudio en el presente trabajo, podría esperarse la presencia de esta bacteriocina en el SLC de cultivos de *L. lactis* GU 967439. En este contexto es que se utilizó la nisina A comercial (Nisaplin®), como control del tratamiento enzimático realizado con las enzimas proteolíticas al SLC, frente a los mismos microorganismos indicadores.

Cuadro III Ensayo de actividad antimicrobiana de nisina A (Nisaplin®) (100 mg/ml) frente a dos microorganismos indicadores luego del tratamiento con diferentes enzimas proteolíticas.

Enzimas proteolíticas			
Indicador	Pepsina	α Quimiotripsina	Proteinasa K
<i>L. innocua</i>	-*	-*	-*
<i>S. bovis</i> spp.	-	-	-

-(-): ausencia de halo de inhibición en el ensayo de *well diffusion*. Ya reportado por Rodriguez, 2017.

En el cuadro III se puede apreciar el comportamiento de nisina A luego del tratamiento enzimático realizado con las enzimas proteolíticas: Pepsina, α -Quimiotripsina y Proteinasa K, bajo las mismas condiciones y respecto a los mismos microorganismos indicadores que para el SLC. En todos los casos se

observa que la actividad antimicrobiana remanente de nisina A, resulta en pérdida total de actividad y además exhibe un comportamiento idéntico sobre ambos microorganismos indicadores. La sensibilidad de la nisina A frente a estas enzimas proteolíticas ha sido reportada ampliamente (et al.,1993;Vásquez et al., 2009; Tenea et al., 2018)

4.3 Detección del gen estructural de Nisina

Este procedimiento se realizó para comprobar si la actividad antimicrobiana de carácter peptídico observada en el SLC pos tratamiento enzimático, podría vincularse con la expresión del gen de nisina, la bacteriocina mayormente expresada por *L. lactis spp.* (Cleveland et al., 2001)

4.3.1 Control de integridad

La integridad del ADN genómico (ADNg) extraído de cultivos puros de *L. lactis* GU 967439 se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa. En paralelo también se realizó la extracción de ADNg a partir de cultivos puros de *L. lactis* ATCC 11454, dado que dicho microorganismo será utilizado como control positivo de la PCR, por ser productor de nisina (Dussault et al.,2016).

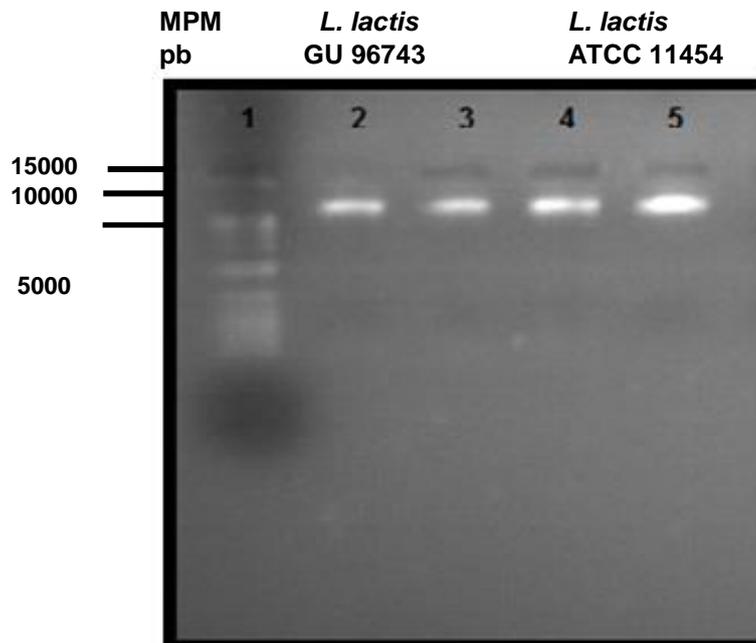


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Se observa la presencia de bandas de alto peso molecular, correspondientes a los ADNg de los microorganismos ensayados. Carril 1: Marcador de peso molecular Invitrogen™ 1Kb Plus DNA Ladder; Carriles 2 y 3: *L. Lactis* GU 967439 (1 µg); Carriles 4 y 5 *L. lactis* ATCC 11454 (1µg).

La electroforesis en gel de agarosa presentó para ambos microorganismos una sola banda de alto peso molecular, con ausencia de bandas de pesos moleculares inferiores, descartando posible degradación y efectivamente confirmando la integridad del ADNg extraído (Figura 7).

4.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir del ADNg obtenido para *L. lactis* GU967439 se realizó PCR utilizando cebadores (*primers*) para el gen de nisina, que da por resultado un amplicón de 513 pb. Los productos de PCR para la cepa control *L. Lactis* ATCC 11454 y la cepa problema *L. Lactis* GU 967439 fueron del tamaño esperado (500 pb),

confirmando la presencia del gen estructural de nisina en el genoma de *L. lactis* GU967439 (Figura 8).

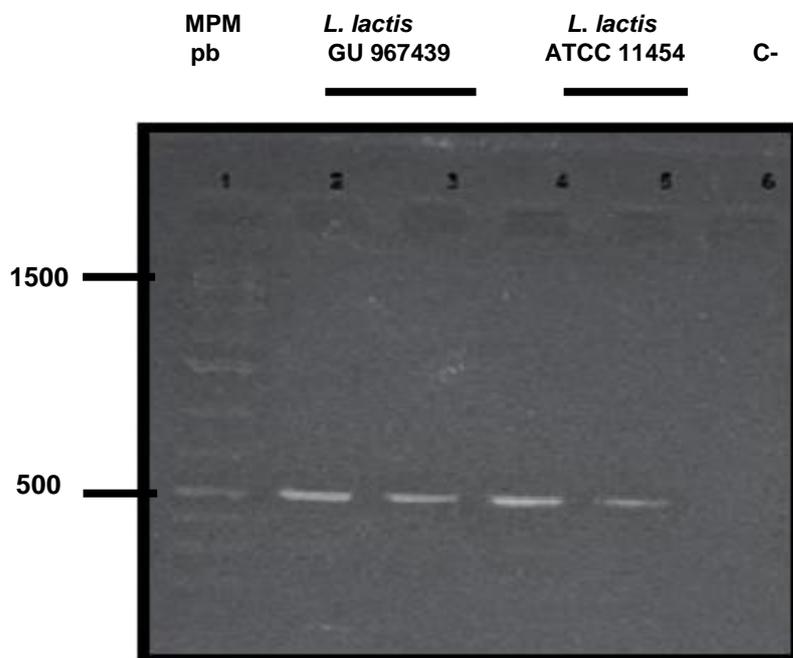


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Se observa el producto de PCR del peso esperado (513 pb) para el gen de nisina, utilizando como molde el ADNg de *L. lactis* GU 967439 (Carriles 2 y 3) y de *L. lactis* ATCC 11454 (Control Positivo , Carriles 4 y 5). Carril 6: control negativo, PCR sin molde.

Considerando que los *primers* utilizados son genéricos para nisina, no es posible confirmar cuál/es tipo/s de nisina (A, Z, Q, F, etc.) es la que se encuentra presente en el genoma *L. lactis* GU 967439.

4.4 Espectrometría de Masas

Con el objetivo de identificar la/s sustancia/s inhibitoria/s de origen proteico presentes en el SLC de los cultivos de *L. lactis* GU 967439, se llevaron

adelante ensayos de espectrometría de masas Maldi-TOF. Es importante resaltar que en esta técnica, los iones generados a partir de la muestra, generalmente son monocargados, por lo tanto, la relación masa/carga de estos iones es prácticamente igual a su masa (Gallegos-Perez, 2009).

La Figura 9-A muestra el espectro de masa (*full scan*) de una de las fracciones proteicas del SLC de cultivos de *L. lactis* GU 967439 obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico y que demostraron conservar actividad inhibitoria frente a *L. innocua* ATCC 3309. Allí se pueden observar picos diferentes en función de la masa de los iones detectados por el equipo (Eje x: masa (m/z)). La altura de esos picos (Eje y: Intensidad (%)) corresponde con la abundancia relativa de cada una de esos iones, en función del ion más abundante detectado por el espectrómetro. En este espectro y a valores de relación m/z comprendidos entre 800 y 2000 (Fig. 4-A flecha negra), se presentan una serie de picos correspondientes a masas repetitivas dado que la diferencia de masa entre picos es siempre la misma (44 Da). Este patrón se asocia habitualmente a la presencia de polímeros (ej: plásticos) o contaminantes (ej: detergentes) en la muestra. Sin embargo, se puede observar una serie de picos a valores de m/z cercanos a 3000 (Fig 9-A flecha roja). Es en esta región del espectro dónde se espera señal, dado que usualmente las bacteriocinas producidas por *L. lactis* lactis son de Clase I (peso molecular menor a 5 kD)(Balciunas et al., 2013). La Figura 9-B muestra esa región del espectro *full scan*, amplificada. La medida de m/z obtenida a 3329, 56 m/z , coincide según la bibliografía con la masa esperada para la nisina Z (3330, 93 Da) (Saraiva et al., 2020b). También se puede observar

derivados oxidados del compuesto de interés ($3345,5 \text{ m/z} = 3329.56 + 16$ (masa de un átomo de oxígeno)).

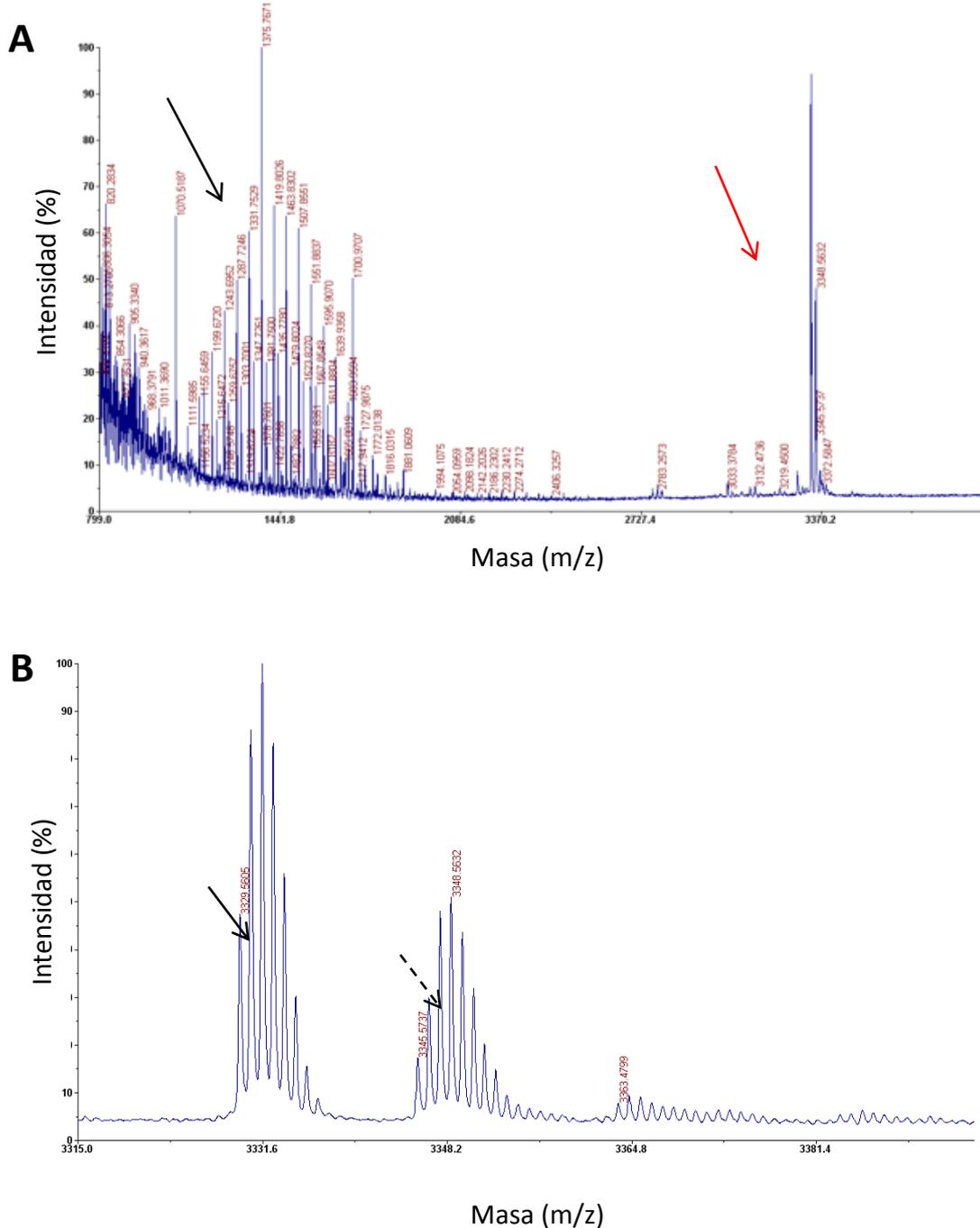


Figura 9. Espectrometría de masa de fracción proteica obtenida a partir de SLC de cultivos de *L. lactis* GU 967439. A.-espectro de masa *full scan*, donde se observan picos correspondientes a masas repetitivas (flecha negra) y picos correspondientes a valores de masa en el entorno de 3000 m/z (flecha roja). B-Ampliación del espectro *full scan* mostrado en A, en la región señalizada por la flecha roja. Se observa pico a una masa de 3329.56 m/z (flecha negra entera) y derivados oxidados de ese compuesto a 3345.5 m/z (flecha negra punteada)

DISCUSIÓN

La producción de las bacteriocinas depende del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora. Por lo tanto, la naturaleza de la cepa, la composición del medio de cultivo (relación entre carbono, nitrógeno y fósforo), las condiciones de fermentación (temperatura, tiempo de crecimiento, pH inicial y final, agitación, aireación, etc.) son factores muy importantes que influyen en la producción de las bacteriocinas (Wu et al., 2004).

En este sentido y como punto de partida de este trabajo fue que nos propusimos chequear la producción de sustancias inhibitoras por parte de *L. lactis* GU 967439, reproduciendo las condiciones de crecimiento y de obtención del SLC puestas a punto por Rodríguez (2017).

En estas condiciones, el SLC obtenido a partir de *L. lactis* GU 967439, demostró tener la capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos indicadores *S. bovis* y *L. innocua* lo cual ya había sido reportado previamente por Fraga et al. (2013) y Rodríguez, (2017). Además, se pudo confirmar que la capacidad de producción de dichas sustancias inhibitorias por *L. lactis* GU 967439 fueron mantenidas a lo largo del tiempo y en condiciones de conservación a bajas temperaturas (20% glicerol, -20°C).

Las sustancias BLIS son segregadas por un gran número de BAL para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores, sin embargo también son capaces de producir otro tipo de sustancias inhibitorias como los ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico y sustancias volátiles como el diacetilo y metabolitos activos del oxígeno, entre otros (Jamili 2008).

En este trabajo los ensayos fueron realizados con el SLC a pH neutro para descartar el efecto inhibitorio proveniente de la producción de ácido láctico, el cual forma parte del SLC. Otras sustancias que podrían encontrarse allí, son el diacetilo y el peróxido de hidrógeno, sin embargo son productos muy volátiles y no fueron considerados como interferentes debido a que si consideramos el volumen de SLC que se coloca dentro del pocillo en los ensayos de *well diffusion*, así como la temperatura y el tiempo de incubación; es probable que estas sustancias, de encontrarse en el SLC se volatilicen y no participen en la inhibición de los indicadores (Martínez-Cuesta et al., 2001).

Esto sugiere que el SLC presenta actividad antimicrobiana debido a la presencia de sustancias tipo BLIS, tal como lo reportaron Fraga et al. (2013) y Rodríguez (2017).

En este ensayo también se observó que ambos microorganismos indicadores presentaron un comportamiento diferente frente al SLC. Esto se manifestó en los títulos de actividad inhibitoria que presentaron ambos microorganismos (Cuadro I), donde un mayor valor de UA/mL reflejaría una mayor sensibilidad frente a las sustancias inhibitorias presentes en el SLC. En el Cuadro I se puede observar que la sensibilidad de *S. bovis* fue mayor con respecto a la de *L. innocua* frente a las misma/s molécula/s tipo BLIS presentes en el SLC y bajo las mismas condiciones experimentales, por lo tanto dicha diferencia de sensibilidad entre ambos podría ser inherente a cada indicador.

En la literatura está ampliamente reportado que las bacteriocinas producidas por microorganismos tienen efecto antimicrobiano frente a especies filogenéticamente cercanas (Juliana & Duque, 2015; Vasquez et al 2009). Esto se debe a cambios en la composición de la membrana y/o pared celular, lo cual

se relaciona con cambios en la resistencia a las sustancias BLIS. En la figura 10, se observa que *Streptococcus* se encuentra más cercano filogenéticamente a *L. lactis* que *Listeria* (Bern et al 2005). Esto podría explicar la mayor sensibilidad de *S. bovis* frente al SLC.

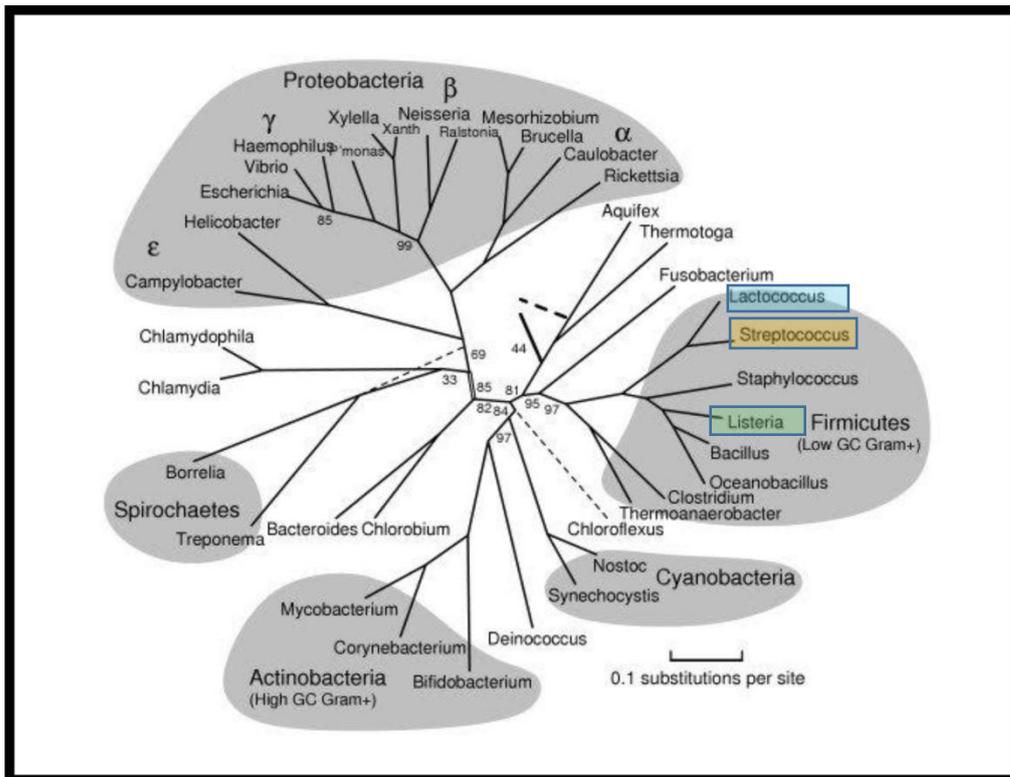


Figura 10. Árbol filogenético de bacterias adaptado y calculado a partir de proteínas representativas. Se puede observar la cercanía de *Lactococcus* spp. (Indicado en color celeste) de *Streptococcus* spp. (en color naranja). Ambos parten de la misma bifurcación, en cambio *Listeria* spp. (Indicado en color verde), se halla en otra rama en un plano inferior. Esta imagen muestra las diferentes distancias filogenéticas entre la especie productora de BLIS y ambos microorganismos indicadores utilizados en los ensayos del presente trabajo. (Bern et al.; 2005)

Siguiendo con los resultados obtenidos y en línea con aproximarnos a la naturaleza del inhibidor, es que se realizaron los ensayos con enzimas

proteolíticas del SLC. Es importante considerar que los ensayos enzimáticos solo aportan información para desarrollar una caracterización preliminar de los SLC con actividad asociada a BLIS y brindan únicamente una aproximación sobre la naturaleza química de los componentes activos presentes en dicho SLC. Sin embargo la sensibilidad a las proteasas es un criterio clave para la caracterización de una sustancia inhibitoria tipo bacteriocina, ya que refleja la composición peptídica/aminoácidos y en algunos casos el estado conformacional específico, estando esto relacionado íntimamente con el modo de acción.

En este trabajo, en los tratamientos de digestión enzimática se utilizó un panel de enzimas que permitió caracterizar a la sustancia inhibidora. A excepción del tratamiento con tripsina, el cual fue incorporado durante el desarrollo de este trabajo, los resultados para los restantes tratamientos enzimáticos ya fueron reportados de manera independiente para los indicadores *L. innocua* y *S. bovis* spp. (Rodríguez, 2017 y Fraga et al., 2013, respectivamente); mostrando la reproducibilidad de los resultados en el tratamiento proteolítico del SLC de *L. lactis* GU 967439 (Cuadro II). En algunos casos la actividad se mantuvo y en otros hubo pérdida total de la misma posterior al tratamiento, sugiriendo que la sustancia/s inhibitoria/s presentes en el SLC son de carácter peptídico. Es importante destacar que el perfil inhibitorio del SLC tratado con las enzimas proteolíticas, sobre los indicadores utilizados, fue diferente. Por ejemplo, cuando el SLC fue tratado con α -Quimiotripsina y Proteinasa K, ambos microorganismos indicadores se comportaron de manera diferente frente al mismo SLC tratado bajo idénticas condiciones. Si bien ambos microorganismos indicadores son Gram positivos, pertenecen a diferentes especies, por lo que la

composición química de su membrana podría variar. Esto es relevante considerando que la molécula de nisina para ejercer su efecto inhibitorio no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula microbiana blanco, ya que reconoce la composición fosfolipídica de la membrana citoplasmática de la célula, uniéndose a ésta a través de interacciones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente. Luego del reconocimiento, las moléculas de nisina se insertan en la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, del pH y la composición fosfolipídica de la membrana diana (González-Martínez et al 2003). Esto podría explicar las diferencias de sensibilidad entre microorganismos indicadores cuando son enfrentados a una misma sustancia inhibidora (Cardoso, 2010 ; Lisboa et al., 2006 ; Willey & Van Der Donk, 2007).

Por otra parte, dependiendo del tipo de enzima proteolítica utilizada, serán los patrones de inhibición que muestre la sustancia tipo BLIS en el SLC. Por ejemplo, cuando se utiliza Tripsina, que escinde en sitios específicos donde se encuentran aminoácidos cargados positivamente principalmente lisina, se obtendrán péptidos de menor tamaño, que podrían o no mantener la actividad antimicrobiana, si es que estos péptidos conservan aminoácidos capaces de unirse a la membrana y de ejercer función antimicrobiana.

Por lo tanto, la función antimicrobiana posterior al tratamiento va a depender de las características del sitio de corte de dichas enzimas y de la secuencia aminoacídica de la BLIS presente en el SLC así como de la nisina. Pero si la actividad de la BLIS depende de la conformación, es necesario que el motivo responsable de la actividad, se encuentre en algún péptido post-proteólisis, que además mantenga dicha estructura tridimensional. De hecho, las estructuras

secundarias de los péptidos con actividad antimicrobiana tienen un rol muy importante en dicha actividad biológica debido a que las α hélices y las láminas β plegadas presentes en las bacteriocinas son anfifílicas, sugiriendo una oligomerización de los monómeros, los cuales se unen en primer lugar a la membrana celular mediante la región N-terminal de la bacteriocina (región hidrofílica). Así es como sobre la membrana diana luego se forma el denominado *barrel-stave* o pentagrama de barril, en donde las caras hidrofóbicas se orientan hacia la parte lipídica de la membrana y las hidrofílicas forman el canal del poro (Araújo, 2015; Heredia- castro et al 2017).

Entonces para que se mantenga la actividad inhibitoria del SLC pos tratamiento proteolítico, es necesario se conserve de alguna manera la secuencia/motivo responsable de dicha actividad en la sustancia tipo BLIS presente. Si bien la resistencia a proteasas es común en algunos compuestos como los lantibióticos, los cuales, luego de sufrir grandes modificaciones postraduccionales, son altamente resistentes a la acción de estas enzimas hidrolíticas (Willey & Van Der Donk, 2007), el mantenimiento de la actividad inhibitoria post-proteólisis también podría deberse a un resultado falso positivo, generado por una proteólisis incompleta de la sustancia tipo BLIS, presente en el SLC. Para evaluar dicha posibilidad, es que con las enzimas que se mantuvo la actividad (Pepsina, α -Quimiotripsina y Proteinasa K), se realizó un ensayo proteolítico sobre ambos indicadores con la nisina comercial, en las mismas condiciones (cuadro III) y con una concentración (100 mg/mL) muy superior a la que posiblemente se pueda encontrar cualquier sustancia inhibitoria tipo BLIS en el SLC. Sin embargo los resultados obtenidos muestran pérdida total de actividad inhibitoria de la nisina, sobre ambos indicadores, cuando son tratadas

con las enzimas antes mencionadas, bajo esas condiciones. Esto permite no sólo validar los resultados obtenidos para el SLC donde se mantuvo la actividad inhibitoria, sino que también muestra un perfil de respuesta totalmente distinto entre el SLC y la nisina A, frente al mismo panel enzimático. Sin embargo, el panel de enzimas utilizado no permite descartar la presencia de la nisina A en el SLC, por lo cual, todos los resultados tomados en su conjunto, sugieren la presencia de otra/s BLIS en el SLC distinta a la nisina A y/o una mezcla de ellas.

Otro abordaje utilizado para identificar las BLIS producidas por *L.lactis* GU 967439 fue mediante la realización de PCR; con el objetivo de verificar si la actividad inhibitoria presente en el SLC podría deberse a la expresión génica de alguna sustancia antimicrobiana de carácter peptídico codificada en su genoma. En este caso, nos propusimos estudiar la presencia del gen estructural de nisina en *L.lactis* GU 967439, considerando que *Lactococcus lactis lactis* es una de las especies mejor caracterizada y reconocida por ser productora de la bacteriocina nisina (Marwa G.M. Allam et al., 2016).

Nuestros resultados ratifican la presencia del gen estructural de nisina en el genoma de *L. lactis* GU 967439. Dado que en este ensayo se utilizaron cebadores genéricos, no fue posible distinguir qué variante de nisina fue la detectada en dicho genoma. De hecho, las variantes de nisina A y Z se diferencian entre sí por sustitución de sólo una base nucleotídica generando un cambio en un aminoácido, (ANDI & SALAZAR., 2021) por lo tanto, la identificación de variantes de nisina utilizando PCR debería complementarse con otro abordaje técnico, como ser la secuenciación del fragmento de interés

(es decir que contenga la/s base/s nucleotídica/s que cambian) amplificado por PCR.

Otra opción para determinar variantes proteicas presentes en una mezcla, es la utilización de la espectrometría de masas. En nuestro caso, este abordaje nos permitiría detectar no solo la variante de nisina expresada por *L. lactis* GU 967439, sino también la posible expresión de otra/s bacteriocinas cuya presencia no fue testada en el genoma bacteriano. Con este propósito, fue que se llevaron adelante los ensayos de proteómica en fracciones cromatográficas con actividad inhibitoria, obtenidas a partir del SLC de cultivos de GU 967439 por Rodríguez (2017) (Ver 3.7).

El análisis de proteómica reveló una señal en masa igual a la reportada para la nisina Z: 3329,5 Da (Margarete et al., 2014), lo cual permitió definir, no solamente que uno de los componentes activos y responsables de la actividad antimicrobiana del SLC es una bacteriocina, sino que además se trata la de la variante de Z de nisina. Estos resultados a su vez apoyan el hallazgo de la presencia del gen estructural de nisina en el genoma de *L. lactis* GU 967439 y confirma las diferencias exhibidas en el perfil de inhibición posterior al tratamiento proteolítico con la cepa control utilizada (*L. lactis* ATCC 11545), la cual es productora de nisina A.

Cabe destacar que este resultado se obtuvo de una fracción cromatográfica, en un total de once fracciones obtenidas luego de realizar la cromatografía de intercambio iónico, que mantenían actividad inhibitoria. Para asegurar que es la única bacteriocina producida por la cepa se tendrían que haber analizado todas las fracciones eluidas, además de confirmar la presencia de las mismas en el genoma bacteriano mediante PCR.

CONCLUSIONES

En relación a los objetivos planteados podemos concluir que fue posible confirmar la producción de sustancias con capacidad antimicrobiana en el SLC de *L. lactis* GU 967439 y conocer su naturaleza que resultó ser de carácter peptídico. También se pudo comprobar que la capacidad de producción de dicha/s sustancias BLIS fueron mantenidas por *L. lactis* GU 967439 a lo largo del tiempo y en las condiciones de conservación en que se mantuvieron. La caracterización de esta/s sustancia/s inhibitorias mediante ensayos de sensibilidad a las proteasas sugieren la presencia de otra/s BLIS en el SLC distinta a la nisina A y/o una mezcla de ellas.

Se pudo determinar la presencia del gen estructural de nisina en el genoma de *L. lactis* GU 967439.

Por último, se pudo identificar la presencia de nisina Z en el SLC lo que permite concluir que *L. lactis lactis* GU 967439 proveniente de queserías artesanales del Departamento de Colonia, Uruguay es una cepa productora de nisina Z, pero no se puede descartar la presencia de otras bacteriocinas.

BIBLIOGRAFIA

- Adolfo, R., & Huertas, P. (2010). Revisión: Microencapsulación De Alimentos Food Microencapsulation: a Review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669–5684.
- Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016>
- Alegría, Á., Delgado, S., Roces, C., López, B., & Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International journal of food microbiology*, 143(1-2), 61-66.
- Allam, M. G. M., Darwish, A. M. G., Ayad, E. H. E., Shokery, E. S., & Darwish, S. M. (2017). *Lactococcus* species for conventional Karish cheese conservation. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.032>
- Alonso, A. (2018). Métodos de detección y control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria. Universidad de Oviedo, 1, 1–57. http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/47625/3/TFM_AnaAlonsoMuniz.pdf
- ANDI, K. M. V., & SALAZAR., J. R. L. (2021). Utilidad De Las Bacteriocinas Producidas Por Bacterias Lácticas Para La Bioconservación De Productos Cárnicos.
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C., Entian, K. D., Fischbach, M. A., Garavelli, J. S., ... Van Der Donk, W. A. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 30(1), 108–160. <https://doi.org/10.1039/c2np20085f>
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. de M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
- Ben Lagha, A., Haas, B., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. En *Veterinary Research* (Vol. 48, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0425-6>
- Benech, R. O., Kheadr, E. E., Lacroix, C., & Fliss, I. (2002). Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during Cheddar cheese ripening. *Applied and Environmental*

- Microbiology, 68(11), 5607–5619. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5607-5619.2002>
- Beristain-Bauza, S. ., Palou, E., & Lopez-Malo, A. (2012). Bacteriocinas : antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 64–78.
- Bern, M., Goldberg, D. Selección automática de proteínas representativas para la filogenia bacteriana. *BMC Evol Biol* 5, 34 (2005). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-5-34>
- Bonev, B., Hooper, J., & Parisot, J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1295–1301. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn090>
- Blanca Edelia González-Martínez¹, Marivel Gómez-Treviño², Zacarias Jiménez-Salas..Facultad de Salud Pública y Nutrición (Universidad Autónoma de Nuevo León), 2. Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Autónoma de Nuevo León)
- Cano-Serna, D., Antonia Gómez-Marín, M., Oviedo-Gallego, V., & Alberto Rios-Osorio, L. (2015). Revisión sistemática Nisina como conservante de alimentos: revisión sistemática de la literatura Nisin as a food preservative: a systematic literature review. *Hechos Microbiol*, 6(2), 28–39. <http://www.udea.edu.co/hm>
- Cardoso, M. de las M. (2010). Caracterización y purificación parcial de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de *Enterococcus*. 1–232.
- Carro, S.; Zocche, F.; Jantzen, M.; Silveira, A.; Rosa, L.; Soares, G.; Da Silva, W. (2005) Actividad anti-*Listeria monocytogenes* de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos artesanales producidos en la región de Pelotas, R.S., Brasil. *Alimentaria* 361:73-76.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Food microbiology: Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Cleveland, J., Montville, TJ, Nes, IF y Chikindas, ML (2001). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y seguros para la conservación de alimentos. *Revista internacional de microbiología alimentaria* , 71 (1), 1-20.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., & Hill, C. (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 58–65.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016>

de Duran, B. J. C. N. Evaluación de Bacterias Ácido Lácticas Comercializadas Como Probióticas.

de Freire Bastos, M. D. C., Varella Coelho, M. L., & da Silva Santos, O. C. (2015). Resistance to bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(4), 683–700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082289-0>

Doctoral, T. (2013). CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GENOMA DE *Lactococcus garvieae*.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, LM y Prévost, H. (2006). La historia continua de las bacteriocinas de clase IIa. *Revisión de microbiología y biología molecular*, 70 (2), 564-582.

Dussault, D., Vu, KD y Lacroix, M. (2016). Mejora de la producción de nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Probióticos y proteínas antimicrobianas, 8 (3), 170-175.

Field, D., Blake, T., Mathur, H., O' Connor, P. M., Cotter, P. D., Paul Ross, R., & Hill, C. (2019). Bioengineering nisin to overcome the nisin resistance protein. *Molecular Microbiology*, 111(3), 717–731. <https://doi.org/10.1111/mmi.14183>

Fraga Coteló, M., Perelmuter Schein, K., Giacaman Salvo, S. S., Zunino Abirad, P. M., & Carro Techera, S. B. (2013). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. *Food Science and Technology*, 33(4), 801–804. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400029>

Fraga, M., Perelmuter, K., Delucchi, L., Cidade, E., & Zunino, P. (2008). Vaginal lactic acid bacteria in the mare: Evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 93(1–2), 71–78. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9180-4>

Gallegos-Perez, J.-L. (2009). Aplicación De La Espectrometría De Masas En Proteómica Para La Búsqueda De Biomarcadores. July 2009, 131–146. https://www.researchgate.net/publication/215651460_APLICACION_DE_LA_ESPECTROMETRIA_DE_MASAS_EN_PROTEMICA_PARA_LA_BSQUEDA_DE_BIOMARCADORES

Ghrai, T., Frère, J., Berjeaud, J. M., & Manai, M. (2005). Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.019>

González-Londoño, I. T., & Rincon-Núñez, A. M. (2015). Optimización para la

- validación de métodos cualitativos en la detección de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos producidos en el departamento de Risaralda. Universidad Libre Seccional Pereira, 54.
<http://repositorio.unilibrepereira.edu.co:8080/pereira/bitstream/handle/123456789/763/OPTIMIZACIÓN PARA LA VALIDACIÓN.pdf?sequence=1>
- González-Martínez, BE, Gómez-Treviño, M., & Jiménez-Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4 (2).
- Hernández, P. E., Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Moreira, W. L., Sobrino, O. J., Fernández, M. F., & Sanz, B. (1993). Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. *Microbiología SEM Sociedad Española de Microbiología*, 9(1), 37–48.
- Holzappel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24(3), 343–362.
[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00036-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00036-6)
- Jozala, A. F., De Lencastre Novaes, L. C., Mazzola, P. G., Oliveira-Nascimento, L., Vessoni Penna, T. C., Teixeira, J. A., Passarinha, L. A., Queiroz, J. A., & Pessoa, A. (2015). Low-cost purification of nisin from milk whey to a highly active product. *Food and Bioprocess Technology*, 93(November 2013), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.003>
- Juliana, A., & Duque, E. (2015). Estado Del Arte Del Aislamiento Y Caracterización De Bacterias Ácido Lácticas Productoras De Bacteriocinas Presentes En La Microbiota Autóctona Del Queso Fresco Producido a Pequeña Estado Del Arte Del Aislamiento Y Caracterización De Bacterias Ácido Lácti.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. En *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Número 8, pp. 2187–2200). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007>
- Kaufmann Viera, V. B. (2018). Puesta a punto de la expresión heteróloga de la enzima transglutaminasa microbiana de grado alimenticio en *Lactococcus lactis*.
- Khatun, J., Ramkissoon, K., & Giddings, M. C. (2007). Fragmentation characteristics of collision-induced dissociation in MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 79(8), 3032–3040.
<https://doi.org/10.1021/ac061455v>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128(October 2018), 171–177.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>

- Lisboa, M. P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J. A. P., & Brandelli, A. (2006). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International Microbiology*, 9(2), 111–118. <https://doi.org/10.2436/im.v9i2.9559>
- López, J., Ochoa, A., Santoyo, G., Anaya, J., Medina, E., Martínez, M., & Loeza-Lara, P. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: Una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 39(3), 49–57.
- Lorenzo Favaro, Ana LÃ°cia Barretto Penna, Svetoslav Dimitrov Todorov, Bacteriocinogenic LAB from cheeses â€“ Application in biopreservation?, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 41, Issue 1, 2015, Pages 37-48, ISSN 0924-2244, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.001>.
- Lozano, J. C. N., Meyer, J. N., Sletten, K., Pelaz, C., & Nes, I. F. (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of General Microbiology*, 138(9), 1985–1990. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-9-1985>
- Margarete, A. F. S., Ingolf, F. N., Maria, C. B.-P., Marisa, V. de Q., Hilrio, C. M., & Clia, A. de M. (2014). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PD6.9. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 6(5), 79–87. <https://doi.org/10.5897/jma2014.0305>
- Martínez-Cuesta, M. C., Requena, T., & Peláez, C. (2001). Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1–2), 79–88. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00516-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00516-5)
- Martínez Fernández, B. (1996). Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: nisina Z y lactococina 972.
- Melo, N. R., Soares, N. D. F. F., & Gonçalves, M. P. J. C. (2005). Nisina: Um Conservante Natural para Alimentos. *Revista Ceres*, 52(303), 921–938. <http://www.ceres.ufv.br/CERES/revistas/V52N304P07405.pdf>
- Milillo, S. R., Friedly, E. C., Saldivar, J. C., Muthaiyan, A., O'Bryan, C., Crandall, P. G., Johnson, M. G., & Ricke, S. C. (2012). A Review of the Ecology, Genomics, and Stress Response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8), 712–725. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.507909>
- Mingorance, J., Regueiro, B., & Muñoz-Bellido, J. L. (2016). Perspectiva histórica de la espectrometría de masas en microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(Supl 2), 3–7. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(16\)30184-7](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(16)30184-7)

- Mondragón Preciado, G., Escalante Minakata, P., Osuna Castro, J., Ibarra Junquera, V., Morlett Chávez, J., Aguilar González, C., & Rodríguez Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64–70.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Tassinari Ortolani, M. B., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1320–1324. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.005>
- Muñoz-Rojas, J. (2004). Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 59, 1–20.
- Nilsen, T., Nes, IF y Holo, H. (1998). Un péptido inductor exportado regula la producción de bacteriocinas en *Enterococcus faecium* CTC492. *Revista de bacteriología*, 180 (7), 1848-1854.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H., & Kristiansen, P. (2009). Structure-Function Relationships of the Non-Lanthionine-Containing Peptide (class II) Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 19–37. <https://doi.org/10.2174/138920109787048661>
- Ocampo Ibañez, I. D., González, C., Moreno, S. L., Calderón, C., Flórez-Elvira, L. J., Olaya, M. B., Rivera Sánchez, S. P., & Lesmes, M. C. (2019). Presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales comercializados en Cali-Colombia. *Acta Agronómica*, 68(2), 108–114. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n2.77185>
- Oscáriz, J. C., & Pisabarro, A. G. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International Microbiology*, 4(1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/s101230100003>
- Perelmuter, K., Fraga, M., & Zunino, P. (2008). In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1718–1725. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03702.x>
- Ramírez, J., Rosas Ulloa, P., Velázquez González, M. Y., Ulloa, José Armando, & Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Repositorio institucional Aramara*, 9, 44–51. <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/handle/123456789/436>
- Revello, G. (2016). *Lactococcus lactis* autóctono: evaluación del efecto antilisterial y de propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartiroló. *Innotec*, 12. <https://doi.org/10.26461/12.02>
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: Ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84(5–6), 357–364. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01421-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01421-9)

- Rodríguez Barreto, I. (2016). Implementación de una técnica de purificación de las bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis* nativo.
- Rodríguez, J. M. (1996). Revisión: Espectro antimicrobiano, estructura, propiedades y modo de acción de la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*/Review: Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Food science and technology international*, 2(2), 61-68.
- Rose, N. L., Sporns, P., & McMullen, L. M. (1999). Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2238–2242. <https://doi.org/10.1128/aem.65.5.2238-2242.1999>
- Sánchez-Martín, M. A., Salgado-Calvo, M. T., San-Miguel-Hernández, Á., Pachón-Julián, J., Rodríguez-Barbero, E., Pastor-Martín, M. R., & Cabrero-Lobato, P. (2019). Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. *Gaceta Médica de Bilbao*, 116(4), 166-173.
- Saraiva, M. A. F., Birri, D. J., Brede, D. A., Baracat-Pereira, M. C., Queiroz, M. V. De, Nes, I. F., & Moraes, C. A. De. (2020a). Nisin Z Production by Wild Strains of *Lactococcus lactis* Isolated from Brazilian (Italian Type) Fermented Sausage. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9309628>
- Saraiva, M. A. F., Birri, D. J., Brede, D. A., Baracat-Pereira, M. C., Queiroz, M. V. De, Nes, I. F., & Moraes, C. A. De. (2020b). Nisin Z Production by Wild Strains of *Lactococcus lactis* Isolated from Brazilian (Italian Type) Fermented Sausage. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9309628>
- Schillinger, U., Kaya, M., & 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(6), 473–478. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02743.x>
- Schneider, R. (2007). Aplicación de bacteriocinas en el control de contaminación de la carne. *Nacameh*, 1, 41–52.
- Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., & Kapila, Y. L. (2016). Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6), 1449–1465. <https://doi.org/10.1111/jam.13033>
- Solórzano, V. T., Minaya, L. C., González, S. Z., & Nevárez, G. C. (2020). Efecto del uso de bacterias ácido lácticas en la inhibición del deterioro microbiológico de filetes de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). 5(December), 363–383. <https://zenodo.org/record/4434700>
- Soto Varela, Z., Lavalle, L. P., & Alvarado, E. (2016). bacterias causantes de ETAS en Colombia. *Barranquilla (Col.)*, 32(1), 105–122. <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v32n1/v32n1a10.pdf>
- Tagg, JR, Dajani, AS y Wannamaker, LW (1976). Bacteriocinas de bacterias

- grampositivas. *Revisiones bacteriológicas*, 40 (3), 722-756.
- Taranto, M., Médici, M., & Font de Valdez, G. (2005). Alimentos funcionales probióticos Dras . María Pía Taranto , Marta Médici y Graciela Font de Valdez * Probiotic functional foods. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 4, 26–34.
- Tenea, G. N., Hurtado, P., & Ortega, C. (2018). Inhibitory effect of substances produced by native lactococcus lactis strains of tropical fruits towards food pathogens. *Preventive Nutrition and Food Science*, 23(3), 260–268. <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.3.260>
- Uruguay. (1994, julio 05). Decreto N.º 315/994: Reglamento Bromatológico Nacional. Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/315-1994>
- Vazquez, S.M., Suarez, H., Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1):64-71.
- Victoria-León, T., Totosa, A., Guerrero, I., & Pérez-Chabela, M. L. (2006). Efecto De Bacterias Ácido Lácticas Termoresistentes En Salchichas Cocidas Thermoresistan Lactic Acid Bacteria Effect on Cooked Sausages. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(2), 135–141. <https://doi.org/10.1080/11358120609487684>
- Waters, D. M., Mauch, A., Coffey, A., Arendt, E. K., & Zannini, E. (2015). Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory for the Delivery of Functional Biomolecules and Ingredients in Cereal-Based Beverages: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 503–520. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.660251>
- Willey, J. M., & Van Der Donk, W. A. (2007). Lantibiotics: Peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology*, 61, 477–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093501>
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sora
- pukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120, 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.004>
- Wu, C. W., Yin, L. J., & Jiang, S. T. (2004). Purification and Characterization of Bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1146–1151. <https://doi.org/10.1021/jf035100d>
- Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., & Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in*

Microbiology, 5(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>

- Zendo, T., Nakayama, J., Fujita, K., & Sonomoto, K. (2008). Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 499–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03575.x>
- Zhao, X., Yin, Z., Breukink, E., Moll, G. N., & Kuipers, O. P. (2020). An Engineered Double Lipid II Binding Motifs-Containing Activity against *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(6), 1–12.