



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“Caracterización y purificación parcial de
sustancias tipo bacteriocinas producidas por
cepas de *Enterococcus*”**

Autora: Bioquímica María de las Mercedes Elisa Cardoso

Director: Doctor Arturo Carlos Simonetta

Codirectora: Doctora Georgina Guadalupe Tonarelli

**Tesis presentada para optar el grado académico de
MAGISTER EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Realizada en la Cátedra de Microbiología (Dto. de Ingeniería en
Alimentos) de la Facultad de Ingeniería Química y en el Departamento de
Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**

Santa Fe

2010

AGRADECIMIENTOS

En estas páginas quiero expresar mi gratitud a todas las personas que de una manera u otra me han ayudado durante la realización de esta tesis:

A mi director de tesis Dr. Arturo Simonetta por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por todo lo que me has enseñado a lo largo de estos años en el laboratorio, por tus consejos y por tu sincera amistad. ¡Infinitas gracias!

A mi co-directora Dra. Georgina Tonarelli por su generosa ayuda e invalorables consejos y por alentarnos siempre a que nos capacitemos.

A mi querida amiga y colega Bioquímica Carolina Rey, ya que juntas comenzamos a cursar esta carrera de post-grado, por su aliento incesante a continuar con este desafío, por toda su ayuda, sin la cual no hubiera podido salir adelante. ¡Gracias de corazón Carolina!

Al Licenciado en Biotecnología Ricardo Manzo, muchas gracias por su inestimable ayuda para la realización de esta tesis, por darme una mano siempre que lo he necesitado, por esos ratitos de charlas, los buenos momentos y las risas. Gracias Ricardo por estar y ser tan buena persona. Deseo en algún momento poder trabajar nuevamente con vos y te despido como lo hacíamos por aquellos años con un...Nos vemos!

A la Bioquímica Liana Moragues por haberme enseñado los primeros pasos en el aprendizaje de la Microbiología en la carrera de grado y luego por su ayuda en la realización de esta tesis.

A la Dra. Marta Carrasco por todo lo que he aprendido de ella tanto a nivel científico como personal y por toda su ayuda, a lo largo de tantos años.

Al Licenciado Hugo Scarinci, por su gran ayuda con los equipos de trabajo, por su humor y su visión de vida.

A mi compañero y amigo Daniel Larpín por su compañía y ayuda en la realización de esta tesis.

A mi amigo y compañero de trabajo Bioquímico Juan Carlos Perín, por reemplazarme en las tareas docentes cuando tenía que rendir las materias de la carrera de Magíster. ¡Mil gracias Juan Carlos!

A mi querida amiga y compañera de trabajo Licenciada María Noemí Santi, por alentarme y disfrutar sinceramente de mis logros.

A todos mis compañeros de los laboratorios de Química Orgánica y de Microbiología, lugares donde fue realizada esta tesis, por haber creado el mejor ambiente de trabajo que se puede tener. Gracias por todos los mates y por compartir conmigo penas y alegrías.

A mis hijos: Jesica, Luciana, Lucrecia y Leopoldo, por acompañarme y comprender mis faltas de tiempo.

A mi esposo César, para el que no existen palabras suficientes que expresen todo mi agradecimiento y amor. Gracias por apoyarme en todo, por tus consejos y ánimo y por estar a mi lado siempre.

¡A todos ellos muchas gracias!

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein

1879-1955.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	9
1.- GENERALIDADES SOBRE LAS BACTERIAS.....	9
DEL ÁCIDO LÁCTICO (BAL)	
1.1.- Género <i>Enterococcus</i>	13
2.- EFECTO BENEFICIOSO DE LAS BACTERIAS.....	14
LÁCTICAS EN LOS ALIMENTOS	
2.1.- Extensión de la vida útil.....	14
2.2.-Sustancias antimicrobianas producidas por las.....	16
bacterias lácticas	
2.2.1.- Ácidos Orgánicos.....	16
2.2.2.- Peróxido de Hidrógeno.....	18
2.2.3.- Diacetilo.....	18
2.2.4.- Compuestos antimicrobianos no proteicos.....	19
2.2.4.1.- Reuterina.....	19
2.2.4.2.- Ácido fenilacético.....	20
2.2.5.- Compuestos antimicrobianos proteicos.....	20
2.2.6.- Bacteriocinas.....	21
2.2.6.1.-Biosíntesis y producción óptima de bacteriocinas.....	23
2.2.6.2.-Inmunidad de la cepa productora.....	29
2.2.6.3.- Clasificación, estructura y propiedades de las.....	31
Bacteriocinas. Criterios para definir las (según	
Tagg, 1976)	
2.2.6.4.-Criterios para definir las.....	32
(según Klaenhammen, 1993)	

2.2.6.5.- Criterios actuales a tener en cuenta.....	35
2.2.7.- Espectro de inhibición de las bacteriocinas.....	36
2.2.8.- Resistencia a las bacteriocinas.....	39
2.2.9.- Propiedades bioquímicas.....	39
2.2.9.1.- Tolerancia de las bacteriocinas al calor,..... acidez y enzimas.	39
2.2.9.2.- Antigenicidad.....	42
2.2.9.3.- Estabilidad.....	42
2.2.10.- Bacteriocinas producidas por cepas de <i>Enterococcus</i>	43
2.2.10.1.- Clasificación de bacteriocinas producidas..... por cepas de <i>Enterococcus</i> .	43
3.- CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS: PURIFICACIÓN.....	44
3.1.- Puntos Importantes a tener en cuenta cuando se purifica..... una bacteriocina.	51
3.1.1.- Producción de la bacteriocina.....	51
3.1.2.- Composición del medio de crecimiento.....	52
3.1.3.- Técnicas de purificación.....	54
3.1.4.- Caracterización de bacteriocinas por electroforesis en..... Geles.	55
3.1.5.- Determinación de la concentración de proteína y de la..... actividad específica.	56
3.1.6.- Pureza y estabilidad.....	57
4.- DETECCIÓN DE BACTERIOCINAS Y DE CEPAS.....	57
BACTERIOCINOGENICAS	
4.1.- Pruebas biológicas.....	57
4.2.- Pruebas genéticas.....	60
4.3.- Pruebas inmunológicas.....	61

4.4.- Otras pruebas.....	64
5.- MODO DE ACCIÓN.....	64
6.- APLICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS.....	69
EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	
6.1.- Formas de aplicación.....	70
6.2.- Factores que afectan la eficacia de las bacteriocinas.....	71
en los alimentos.	
7.- TENDENCIAS ACTUALES Y FUTURAS.....	73
7.1.- Combinación de bacteriocinas.....	73
7.2.- Ingeniería proteica y síntesis química.....	74
7.3.- Producción heteróloga.....	74
OBJETIVOS.....	77
MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
1.- MICROORGANISMOS EMPLEADOS.....	79
1.1.- Bacteria Láctica productora de bacteriocina.....	79
1.2.- Microorganismos indicadores o blancos.....	79
2.- CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS.....	83
2.1.- Conservación de las cepas bacterianas.....	83
2.2.- Conservación de las cepas de levaduras.....	83
2.3.- Conservación de las cepas de hongos filamentosos.....	83
3.- OBTENCIÓN DEL SOBRENADANTE LIBRE DE CELULAS (SLC).....	84

4.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA.....	85
 POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR	
5.- ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LA SUSTANCIA	85
 INHIBITORIA PRODUCIDA POR LA CEPA DE <i>E. faecalis</i> DBFIQ E24	
5.1.- Capacidad inhibitoria frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).....	85
5.2.- Capacidad inhibitoria frente a hongos filamentosos.....	86
5.3.- Capacidad inhibitoria frente a levaduras.....	87
6.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN CRUZADA ENTRE <i>E. faecalis</i> DBFIQ E24	
 Y DISTINTAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	87
7.- CARACTERIZACIÓN PRIMARIA DEL SOBRENADANTE.....	88
 LIBRE DE CÉLULAS DE <i>E. faecalis</i> DBFIQ E24	
7.1.- Ensayos enzimáticos.....	88
7.2.- Determinación de algunos parámetros fisicoquímicos.....	89
7.2.1.- tratamientos térmicos.....	89
7.2.2.- Sensibilidad frente al pH	89
7.2.3.- Determinación del PM aparente de la fracción activa.....	89
7.2.3.1.- Ultrafiltración.....	89
7.2.3.2.- Diálisis.....	90
7.2.4.- Efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento.....	91
sobre la actividad inhibitoria del SLC	
7.2.5.- Acción de los surfactantes sobre la actividad.....	91
Inhibitoria del SLC	
7.3.- Determinación del título del extracto.....	92
7.4.- Determinación del modo de acción y de la capacidad lítica.....	93
7.5.- Ensayos de citotoxicidad mediante lisis de eritrocitos.....	93
7.6.- Resistencia a Vancomicina.....	94

8.- PROTOCOLOS DE PURIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA.....	95
ANTIMICROBIANA PRESENTE EN EL SLC.	
8.1.- Primer protocolo de purificación.....	95
8.1.1.- Cromatografía de intercambio catiónico.....	95
8.1.1.1.- Geles.....	95
8.1.1.2.- Condiciones de trabajo.....	96
8.1.2.- Cromatografía en fase reversa.....	97
8.1.2.1.- Soporte cromatográfico.....	97
8.1.2.2.- Condiciones de trabajo.....	98
8.1.3.- Cromatografía líquida de alta resolución en fase.....	98
reversa (RP-HPLC)	
8.1.3.1.- Condiciones de trabajo.....	99
8.2.- Segundo protocolo de purificación.....	100
8.2.1.- Precipitación salina con sulfato de amonio.....	100
8.2.1.1.- Metodología empleada.....	100
8.2.2.- Cromatografía por filtración por geles.....	101
8.2.2.1.- Geles.....	101
8.2.2.2.- Metodología empleada.....	102
8.2.3.- Cromatografía de intercambio catiónico.....	103
8.2.3.1.- Metodología empleada.....	103
8.2.4.- Cromatografía en fase reversa.....	103
8.2.4.1.- Metodología empleada.....	103
8.2.5.- Cromatografía líquida de alta resolución en fase.....	104
reversa (RP-HPLC)	

9.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	104
EN EL SLC Y EN LAS MUESTRAS PARCIALMENTE PURIFICADAS MEDIANTE EL ENSAYO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)	
9.1.- Procedimiento.....	105
10.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	105
UTILIZANDO TRICINA Y DODECIL SULFATO SÓDICO	
10.1.- armado de los geles.....	107
10.2.- Preparación de las muestras y sembrado en los geles.....	108
ya armados	
10.3.- Condiciones de las determinaciones electroforéticas.....	109
10.4.- Método de tinción con plata.....	109
10.5.- Método de tinción con Coomasie Brilliant Blue R.....	110
10.6.- Método de detección directa de la actividad antimicrobiana en.....	111
geles de poliacrilamida.	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
1.- ESPECTRO ANTIMICROBIANO DEL SLC OBTENIDO.....	113
DE CULTIVOS DE LA CEPA DE <i>Enterococcus faecalis</i> DBFIQ E24	
1.1.- Capacidad inhibitoria frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).....	113
1.2.- Capacidad inhibitoria frente a hongos filamentosos.....	117
1.3.- Capacidad inhibitoria frente a levaduras.....	118
2.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN CRUZADA ENTRE.....	121
<i>Enterococcus faecalis</i> DBFIQ E24 Y DISTINTAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	
3.- CARACTERIZACIÓN DEL SOBRENADANTE LIBRE DE CÉLULAS.....	123
3.1.- Efectos de distintos tratamientos enzimáticos en la actividad.....	123
antimicrobiana del SLC de <i>Enterococcus faecalis</i> DBFIQ E24	
3.2.- Determinación de algunos parámetros fisicoquímicos.....	126
3.2.1.- Tratamientos térmicos.....	126

3.2.2.- Sensibilidad frente al pH.....	128
3.2.3.- Determinación del PM aparente de la fracción activa.....	131
3.2.3.1.- Ultrafiltración.....	131
3.2.3.2.- Diálisis.....	133
a) Membrana con cut off de 1.000 Da	
b) Membrana con cut off de 2.000 Da	
3.2.4.- Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento sobre.....	136
la actividad inhibitoria del SLC	
3.2.5.- Acción de los surfactantes sobre la actividad inhibitoria.....	138
del SLC	
3.3.- Determinación del título del SLC.....	142
3.4.- Determinación del modo de acción y de la actividad lítica.....	143
3.5.- Ensayo de citotoxicidad mediante lisis de eritrocitos.....	149
3.6.- Resistencia a Vancomicina.....	152
4.- PROTOCOLOS DE PURIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS	
EXOCELULARES PRESENTES EN EL SLC.....	155
4.1.- Primer protocolo de purificación.....	155
4.1.1.- Cromatografía de intercambio catiónico.....	155
4.1.2.- Cromatografía en fase reversa.....	161
4.1.3.- Cromatografía líquida en fase reversa de alta resolución.....	166
(RP-HPLC)	
4.2.- Segundo protocolo de purificación.....	174
4.2.1.- Precipitación salina con sulfato de amonio.....	174
4.2.2.- Cromatografía de filtración por geles	178
4.2.3.- Cromatografía de intercambio catiónico.....	182
4.2.4.- Cromatografía en fase reversa.....	186

4.2.5.- Cromatografía líquida en fase reversa de alta resolución.....	189
(RP-HPLC)	
4.2.6.- Comparación de los dos protocolos de purificación.....	191
5.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	195
UTILIZANDO TRICINA Y DODECIL SULFATO SÓDICO	
(Schägger y von Jagow, 1987)	
5.1.- Electroforesis Tricina-SDS-PAGE de la fracción activa.....	195
correspondiente a la primera etapa del segundo protocolo de purificación	
5.2.- Electroforesis Tricina-SDS-PAGE de la fracción activa....	197
correspondiente a la cromatografía en fase reversa C ₁₈ cuarta etapa del proceso del segundo protocolo de purificación	
5.2.1.- Tinción con plata.....	197
5.2.2.- Tinción con Coomassie Blue R	199
5.3.- Método de detección directa de la actividad antimicrobiana en.....	201
geles de poliacrilamida (Bhunja et al., 1992).	
CONCLUSIONES.....	205
ANEXO.....	217
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	232

RESUMEN

RESUMEN

Las bacterias lácticas producen una serie de sustancias antimicrobianas responsables de la estabilidad de los alimentos fermentados. La capacidad de estas bacterias para producir ácidos orgánicos, con el consiguiente descenso de pH, es el principal factor de inhibición de contaminantes en los productos fermentados. Otros componentes del metabolismo de las lactobacterias, como lo son el peróxido de hidrógeno, el diacetilo y la reuterina, pueden contribuir de forma general a la conservación de estos productos. Además, estas bacterias pueden producir sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica, conocidas como bacteriocinas, que cuentan con la notable ventaja de ser potenciales bioconservantes producidos por microorganismos que gozan del status de GRAS (generalmente reconocidas como seguras), otorgado por la Organización Mundial de la Salud.

En los últimos quince o veinte años, las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas han despertado un gran interés científico e industrial debido a su potencial como bioconservantes alimentarios, sobre todo aquellas que poseen un amplio espectro inhibitorio frente a bacterias Gram (+) y Gram (-), agentes etiológicos de enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) y / o alterantes de alimentos. Estos compuestos en general son resistentes a elevadas temperaturas, estables en un amplio rango de pH, y normalmente se seleccionan aquellos sintetizados por cepas bacterianas no hemolíticas y sensibles a antibióticos tales como la vancomicina. Además son inactivados por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimotripsina), y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Estas características los hacen muy interesantes para ser utilizados en productos alimentarios, puesto que serían inactivados durante

su paso por el tracto gastrointestinal humano, sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar, por lo tanto, los riesgos relacionados con el uso de antibióticos.

La acción sinérgica de las bacteriocinas con otras barreras (temperatura, atmósferas modificadas, NaCl, nitratos, etc.), podría contribuir tanto a la obtención de alimentos con una calidad higiénica óptima, como a una reducción en ciertos aditivos químicos o en la intensidad de algunos tratamientos tecnológicos aplicados en procesos de conservación alimentaria.

La contribución de cepas seleccionadas del género *Enterococcus* a las propiedades sensoriales de productos alimentarios fermentados, junto a su capacidad para producir bacteriocinas (enterocinas), son características importantes para su aplicación en tecnología de alimentos. Es por ello que en los últimos años se ha incrementado considerablemente el uso de representantes de *Enterococcus* como co-cultivos iniciadores o starters secundarios para la elaboración de distintos alimentos fermentados.

Por estas razones es que el presente trabajo se focalizó en investigar la capacidad bacteriocinogénica de este género bacteriano, y más específicamente de la cepa de *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24, aislada a partir de leche cruda producida en la región Santa Fe.

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados en la presente investigación, se realizaron los siguientes estudios experimentales:

- Se obtuvo el sobrenadante libre de células (SLC) de la cepa de *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24, el cual fue concentrado 10 veces.
- Se estudiaron algunas propiedades del SLC para proceder a su caracterización primaria, tales como:

- * Actividad inhibitoria frente a distintos microorganismos [bacterias Gram (+) y Gram (-), hongos filamentosos y levaduras].
- * Caracterización mediante ensayos enzimáticos.
- * Caracterización mediante la determinación de algunos parámetros fisicoquímicos tales como resistencia a las altas temperaturas, actividad en un rango determinado de valores de pH, PM aparente de la fracción activa, influencia del tiempo y temperatura de almacenamiento y acción de surfactantes sobre la actividad inhibitoria del SLC.
- * Determinación del título del sobrenadante.
- * Determinación del modo de acción y de la capacidad lítica.
- También se realizaron ensayos para determinar la potencial existencia de aspectos negativos para la salud humana en la cepa bacteriocinogénica:
 - * Ensayos de citotoxicidad mediante lisis de eritrocitos.
 - * Determinación de resistencia a vancomicina.
- Se realizó la purificación parcial de la sustancia antimicrobiana, mediante la ejecución de dos protocolos de purificación:
 - * El primero se realizó en tres pasos, utilizando las siguientes técnicas cromatográficas: 1) Intercambio catiónico; 2) Fase reversa; 3) Líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).
 - * El segundo se realizó en cinco pasos: 1) Precipitación salina con sulfato de amonio; 2) Cromatografía de filtración por geles; 3) Cromatografía de intercambio catiónico; 4) Cromatografía en fase reversa; 5) Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

- Se determinó el PM aproximado y se procedió a la detección directa de la actividad antimicrobiana, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando Tricina y Dodecil Sulfato Sódico (Tricina-SDS-PAGE).

Los resultados obtenidos en las diferentes experiencias llevadas a cabo permiten formular las siguientes apreciaciones:

- ❖ Del examen de la capacidad de generación de compuestos antimicrobianos surge que la cepa estudiada presenta un amplio espectro inhibitorio frente a bacterias Gram (+) (cepas de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*), bacterias Gram (-) (cepas de *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 EL Tor serotipo Inaba y *Salmonella Enteritidis*), hongos filamentosos (cepas de *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium chlamydosporum*, *Mucor circillenioides*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium islandicum* y *Penicillium roquefortii*) y levaduras (cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*) .
- ❖ Los ensayos enzimáticos demostraron que la tripsina inhibió totalmente la actividad antimicrobiana del SLC frente a todas las cepas bacterianas indicadoras, excepto *E. coli*. Por otra parte, Pronasa E y Proteinasa K produjeron una sensible disminución de la actividad antagónica, mientras que catalasa no afectó esta actividad y el resto de las enzimas ensayadas (no proteolíticas) produjeron sólo una disminución parcial de la capacidad antibacteriana.

❖ Con la determinación de algunos parámetros fisicoquímicos del SLC se demostró que:

- La sustancia antimicrobiana presenta una amplia resistencia térmica, no perdiendo su actividad cuando se la somete a tratamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min.

- En lo que respecta a la influencia de un rango predeterminado de valores de pH sobre la capacidad antibacteriana, se comprobó que la misma resultó conservada en un amplio rango de valores, comprendido entre la acidez neta (pH 4.50) y la alcalinidad (pH 9.0), aunque la máxima actividad se manifestó a valores de pH comprendidos entre 6.0 y 7.0.

El PM aparente fue determinado por ultrafiltración y diálisis, técnicas que indicaron un valor mayor a 1000 Da pero menor a 2000 Da.

- Del análisis del tiempo y temperatura de almacenamiento se dedujo que el sobrenadante puede ser almacenado a 4, 25 ó -20 °C, al menos durante 1 mes, sin perder su actividad antimicrobiana.

- Con respecto a la respuesta del SLC al ser expuesto a agentes surfactantes, la acción de éstos sobre la actividad inhibitoria depende mucho de la cepa indicadora y del tipo de surfactante ensayado. Tween 20, Tween 80, dodecil sulfato de sodio (SDS), ácido cólico y ácido taurocólico, no afectaron significativamente la actividad del SLC. Sin embargo, por acción del detergente no iónico Tritón X-100 y del detergente aniónico ácido desoxicólico, el título del SLC se duplicó, sin que ambos surfactantes mostrasen acción inhibitoria del crecimiento bacteriano por sí mismos.

- ❖ El título del extracto fue de 266 AU/mL, y se comprobó que el mismo depende mucho de la cepa indicadora.
- ❖ Los resultados obtenidos al analizar el modo de acción de la sustancia inhibitoria, permiten aseverar que el efecto que provoca el agregado del SLC a poblaciones celulares de *E. coli* y *B. cereus* es netamente bactericida. Se verificó además que tuvo un efecto lítico marcado frente a *E. coli*, y de menor intensidad frente a *B. cereus*.
- ❖ El ensayo de citotoxicidad mediante lisis de eritrocitos no mostró reacción de hemólisis (γ -hemólisis) alrededor de la colonia de *E. faecalis* DBFIQ E24, cuando la misma fue sembrada en agar base sangre.
- ❖ El ensayo para determinar resistencia a vancomicina indicó que la cepa de *E. faecalis* DBFIQ E24 es sensible a este antibiótico.
- ❖ En la etapa de purificación se observó que, en el primer protocolo, la cromatografía de intercambio catiónico produjo una recuperación del 2%, mientras que la misma fue del 2.5% en el segundo protocolo, por lo que este parámetro resultó similar en ambos métodos. La actividad específica aumentó 10.2 veces en el primero y sólo 3.6 veces en el segundo. Con respecto a la cromatografía en fase reversa, el porcentaje de recuperación fue del 0.3% para el primer protocolo y del 0.8% para el segundo. La actividad específica aumentó 7.3 veces para el primero y 14.8 veces para el segundo. Los perfiles cromatográficos obtenidos por RP-HPLC en las muestras provenientes de los diferentes protocolos resultaron prácticamente idénticos.
- ❖ Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando Tricina y Dodecil Sulfato Sódico, se determinó el PM aproximado, el que resultó

estar entre las bandas correspondientes a patrones de PM de 3.5 y 1.06 kDa. Por último, por detección directa de la actividad antimicrobiana, se constató igualmente que la banda activa estaba entre las bandas de 3.5 y 1.06 kDa.

En función de estos resultados generales expuestos en forma resumida, es posible formular las siguientes conclusiones:

- ❖ La cepa de *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24 produjo una sustancia antimicrobiana de naturaleza proteica o peptídica, puesto que su actividad fue anulada en forma total por acción de tripsina y, al menos parcialmente, por otras enzimas proteolíticas.
- ❖ El compuesto activo posee propiedades tecnológicas interesantes para ser utilizado como conservante natural de alimentos. Así lo demuestran su resistencia térmica, su amplio espectro inhibitorio y su gran estabilidad en un extenso rango de valores de pH y en función del tiempo y temperatura de almacenamiento.
- ❖ Las dos condiciones con que cumple la cepa bacteriocinogénica, ser sensible al antibiótico vancomicina y carecer de capacidad hemolítica, agregan otro aspecto favorable relativo a la seguridad del uso tecnológico alimentario de sus metabolitos en general, y de sus péptidos antimicrobianos en particular.
- ❖ Los dos protocolos de purificación fueron comparables en sus resultados, ya que las fracciones activas finales obtenidas mediante ambos presentaron perfiles cromatográficos en RP-HPLC muy similares. Sólo se pudieron obtener cuatro fracciones provenientes de

RP-HPLC del primer protocolo, siendo activas las fracciones I y IV; posiblemente la fracción I contenga el péptido antimicrobiano en forma de agregado, lo que hizo que saliera con las primeras fracciones, de comportamiento hidrofílico. En el presente trabajo se ha logrado un importante nivel de purificación de la sustancia activa, si bien debe hacerse notar que la misma ha sido sólo parcial.

- ❖ La electroforesis en geles de poliacrilamida constituyó una herramienta importante de trabajo, ya que permitió determinar que el PM aproximado de la sustancia activa parcialmente purificada se encuentra entre 3.5 y 1.06 kDa.

Por último y a modo de conclusión general, es posible afirmar que la cepa estudiada presenta un futuro promisorio para ser usada como preservador natural de alimentos. Si bien es necesario profundizar la investigación, los resultados logrados demuestran inequívocamente su potencial tecnológico. El mismo puede ser aprovechado ya sea a través de su incorporación a cultivos starters para elaborar distintos alimentos fermentados, como también mediante su utilización biotecnológica para producir sobrenadantes parcialmente purificados o una bacteriocina pura, los cuales podrán ser utilizados como aditivos específicos para la biopreservación en diferentes tecnologías alimentarias.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- GENERALIDADES SOBRE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO (BAL)

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo de bacterias Gram (+) unidas por un conjunto de características fisiológicas, metabólicas y morfológicas.

La descripción general de las bacterias incluidas en el grupo es la de cocos o bacilos Gram (+), no móviles y no formadores de esporos, los cuales producen ácido láctico como el principal producto final de la fermentación de carbohidratos.

Estos son quimiorganotrofos y sólo crecen en medios de cultivos complejos. Se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes ecosistemas y son comúnmente encontrados en alimentos, plantas y también en los tractos genital, respiratorio e intestinal del hombre y los animales. Los límites de este grupo han estado sujetos a muchas controversias, pero ha existido aceptación general acerca de que los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* forman el núcleo del grupo.

Revisiones taxonómicas más recientes de este grupo sugieren que las bacterias del ácido láctico comprenden los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*. La clasificación de las bacterias del ácido láctico en diferentes géneros ha estado tradicionalmente basada en la morfología, modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, habilidad de crecer a altas concentraciones salinas y tolerancia a los ácidos y álcalis. Para algunos de los géneros recientemente descritos, se usan en la clasificación características adicionales, como composición de ácidos grasos y movilidad. Las medidas de las

verdaderas relaciones filogenéticas a través del secuenciamiento del rRNA han ayudado a la clasificación de las bacterias del ácido láctico y clarificaron la filogenia del grupo (Axelsson, 1993). En reemplazo de los métodos bioquímicos tradicionalmente usados en la clasificación, que resultan tediosos, lentos y poco seguros, se han desarrollado y se utilizan en la actualidad métodos moleculares tales como las ya mencionadas pruebas de hibridización del rRNA, así como PCR en tiempo real, etc. (Ammor, S. et al., 2006; Aymerich, et al., 2006; Bernardeau et al., 2008).

Las BAL gozan de gran importancia económica ya que, bien de forma natural o añadidas intencionadamente, desempeñan un papel importante en la fermentación de una gran variedad de productos lácteos, cárnicos y vegetales. En ellos, sus actividades metabólicas no sólo contribuyen al desarrollo de características organolépticas y reológicas deseables, sino que, además, permiten conservar o aumentar el valor nutritivo y la salubridad de la materia prima, previniendo el desarrollo de microorganismos contaminantes no deseables en tales productos (Martínez Magro et al., 2000).

La reducción del pH y la eliminación de significativas cantidades de carbohidratos por fermentación son las acciones preservadoras primarias de estas bacterias en los productos alimentarios fermentados antes citados. Por lo tanto, la acción antimicrobiana de las BAL ha sido primariamente atribuida a la acumulación de los productos finales de fermentación, tales como ácidos orgánicos (láctico, acético), dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etc., que juegan un papel fundamental en el aseguramiento de la calidad e inocuidad y en la extensión de la vida útil (shelf-life) de los productos alimentarios, en cuyo proceso de

fermentación participan activamente (Piard and Desmazeaud, 1991; Ray and Daeschel, 1992; De Vuyst and Vandamme, 1994).

En años más recientes se ha demostrado la capacidad de las BAL de producir, además de los productos finales de fermentación antes mencionados, otras sustancias inhibitorias del desarrollo microbiano: las bacteriocinas y sustancias tipo bacteriocinas (bacteriocin-like substances) (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1988; Schillinger, 1990; Roller, 1991; Piard and Desmazeaud, 1992; Ray and Daeschel, 1992; De Vuyst and Vandamme, 1994; Malik et al., 1994).

En las últimas dos décadas, el estudio de este aspecto tecnológico de las BAL se ha visto fuertemente incrementado como respuesta a la tendencia del mercado consumidor, que ha demostrado una preferencia cada vez más marcada por los alimentos denominados “naturales”, es decir “libres de aditivos químicos”, y por lo tanto, libres de los compuestos químicos tradicionalmente utilizados como preservadores en la industria alimentaria.

Como resultado del notable interés suscitado en el campo de la investigación científico-tecnológica por este aspecto de las bacterias lácticas, se han descrito cientos de bacteriocinas y sustancias tipo-bacteriocinas producidas por cepas seleccionadas de diverso origen (alimentos fermentados, materias primas alimentarias, medio ambiente, starters artesanales y comerciales, intestinos de animales, etc.) (Tagg et al., 1976; Barefoot and Klaenhammer, 1983; Talarico et al., 1988; Klaenhammer, 1988; Schillinger, 1990; Sobrino et al., 1991; Toba et al., 1991; Roller, 1991; Piard and Desmazeaud, 1992; Ray and Daeschel, 1992; Vignolo et al., 1993; Larsen et al., 1993; Vaughan et al., 1994; Malik et al., 1994; De Vuyst and Vandamme, 1994; Kelly et al., 1996; Tahara et al., 1996a; Revol-Junelles, 1996; Manca de Nadra et al., 1998, Yanagida, et al., 2005).

Algunas de estas sustancias han demostrado poseer un amplio espectro de acción antibacteriana, incluyendo a especies alteradoras de los alimentos o causantes de enfermedades de transmisión alimentaria, tales como: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes*, etc.

También se ha demostrado que las BAL producen compuestos con capacidad antifúngica, ya que pueden inhibir a especies de hongos y levaduras alterantes de alimentos, tales como algunos géneros de hongos productores de micotoxinas: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, y a géneros de levaduras tales como: *Rhodotorula*, *Pichia* y *Kluyveromyces* (Magnusson et al., 2003; Savadogo et al., 2006; Russell-White, 2005).

Todo esto, sumado a que las mencionadas sustancias generalmente son inocuas para el consumidor, pueden ser hidrolizadas en el tracto intestinal humano, son resistentes al calentamiento, activas a pH bajo, resistentes a la acción de algunas enzimas y estables en los alimentos. Por otra parte, tanto las BAL como los productos de su metabolismo han sido consumidos desde tiempos inmemoriales a través de alimentos fermentados y raramente han sido asociados a procesos patológicos. Todo esto ha contribuido a su designación como bacterias “seguras” o GRAS (es decir como generalmente inocuas para su incorporación en alimentos de consumo humano) por la Organización Mundial de la Salud. Esto determina que las mismas presenten un gran interés para su utilización como “biopreservadores naturales” en la industria alimentaria (De Vuyst and Vandamme, 1994; Racach and Geshell, 1995; Roller, 1991; Ray and Daeschel, 1992).

1.1.- Género *Enterococcus*

El género forma parte de la microbiota de vegetales fermentados y de la mayoría de los quesos, no sólo de fabricación artesanal sino también de los elaborados industrialmente con leche pasteurizada. Estas bacterias juegan un rol fundamental en la maduración de dichos alimentos a través de diversos mecanismos metabólicos tales como la proteólisis, lipólisis y la degradación de citrato, contribuyendo, por lo tanto, a su gusto y flavour típico (Foulquié Moreno et al., 2006).

Por otro lado, su presencia en los alimentos y su uso como probióticos están siendo fuertemente debatidos desde el punto de vista clínico, ya que se los ha asociado e identificado como agentes patógenos en ciertas enfermedades humanas y animales, entre las que podemos mencionar: endocarditis e infecciones del tracto urinario, del sistema nervioso central, intra-abdominales y pélvicas. Además, se han caracterizado numerosos factores de virulencia así como también numerosos *Enterococcus* antibiótico-resistentes, especialmente vancomicina-resistentes, lo que ha convertido a este género en el grupo más controversial de BAL (Franz et al., 2003).

La resistencia de los enterococos a las temperaturas de pasteurización, y su adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones de crecimiento (alta y baja temperatura, pH extremos y salinidad), implican que pueden ser encontrados tanto en productos alimentarios manufacturados como en materiales crudos (leche o carne, por ejemplo) y en productos alimentarios tratados por calor. Esto significa que esta bacteria puede soportar las condiciones usuales de producción de un alimento. Además, puede contaminar productos terminados durante el procesado del alimento. Por ende, los enterococos pueden convertirse en una parte importante de la microbiota del alimento fermentado, especialmente en quesos y carnes fermentados.

La contribución de los enterococos a las propiedades organolépticas de los productos alimentarios fermentados y su habilidad de producir bacteriocinas (enterocinas), son características importantes para su aplicación en tecnología de los alimentos. Sin embargo, el hecho de que ciertas cepas puedan poseer ciertos factores de virulencia, multirresistencia a antibióticos y rasgos patogénicos, hace fundamental la adecuada selección de la cepa a ser utilizada como probiótico o como cultivo starter en la elaboración de determinados productos fermentados (De Vuyst et al., 2003; Foulquié Moreno et al., 2006).

2.- EFECTO BENEFICIOSO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LOS ALIMENTOS

2.1.- Extensión de la vida útil

Un aspecto interesante de las bacterias lácticas es su capacidad de prolongar la vida útil de determinados alimentos, al inhibir el desarrollo de los microorganismos causantes de alteraciones. Elliker, et al. (1964) observaron en el queso Cottage, que el aumento de su vida útil se debía a la inhibición de las bacterias alterantes por el desarrollo de las bacterias lácticas; la inhibición estaba directamente relacionada con la concentración de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* en el producto final. Gilliland and Speck (1975) confirmaron y ampliaron estas observaciones, demostrando que en un medio a base de leche desnatada, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* inhibía rápidamente el desarrollo de *P. fragi* y de otras bacterias Gram (-) psicrotrofas.

Otros investigadores han estudiado también la inhibición y el retraso de la alteración de las carnes, especialmente de las frescas, por la acción de las bacterias lácticas. Reddy et al., (1970; 1975) han demostrado una prolongación de la vida útil

de la carne vacuna picada inoculada con *L. lactis* y *Leuconostoc citrovorum*, y almacenada a 7 °C. Gilliland and Speck (1975) han descrito fenómenos de antagonismo frente a *P. fragi*, incluso cuando el inóculo de bacterias lácticas (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Pediococcus cerevisiae*) no se desarrollaba activamente. Roth and Clark (1975) observaron que las bacterias lácticas inhibían el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* en las carnes envasadas al vacío.

Raccach et al., (1979) demostraron que los cultivos iniciadores comerciales de *P. cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum* incrementaban la vida útil de la carne de pollo. No obstante, Smith et al., (1980) han señalado que la inoculación con bacterias lácticas no mejoraba ni extendía la conservación durante el almacenamiento de la carne vacuna.

Las bacterias lácticas prolongan la vida útil de las carnes y productos cárnicos debidos, principalmente, a la acidificación que originan. La acidez del medio inhibe el desarrollo de microorganismos indeseables y permite una buena deshidratación del alimento, con lo que su vida útil no se ve limitada por el deterioro bacteriano, sino por otras alteraciones de naturaleza química o física (Bacus and Brown, 1981). Actualmente se admite que las bacterias lácticas tienen gran interés como agentes que colaboran en asegurar la calidad y en prolongar la vida útil de los alimentos en los que están presentes (Gibbs, 1987).

El crecimiento activo de las bacterias lácticas en los alimentos en que se lleva a cabo una fermentación, asociado con la utilización metabólica de determinados componentes de los mismos, son en parte los responsables de la producción de gran variedad de productos fermentados. Por otra parte, estos microorganismos actúan inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y alterantes, dando lugar a

productos estables y relativamente más seguros (Piard and Desmazeaud, 1992; Ray and Daeschel, 1992).

Las primeras investigaciones sobre la estabilidad de alimentos fermentados confirmaron que la acidificación provocada por la conversión de los azúcares en ácidos orgánicos por las bacterias lácticas era la principal responsable de su acción antimicrobiana, debido al efecto combinado del descenso de pH y al consumo de carbohidratos (Lindgren and Dobrogosz, 1990). Además de la formación de ácidos orgánicos (principalmente láctico y acético), las bacterias lácticas producen otras sustancias antimicrobianas, como lo son los metabolitos del oxígeno (peróxido de hidrógeno) y también algunos productos finales del catabolismo celular (diacetilo, alcoholes, dióxido de carbono, reuterina, etc.). Por otro lado, se ha descrito que algunas especies de bacterias lácticas son capaces de sintetizar y secretar al medio sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica, conocidas como bacteriocinas (Tagg et al., 1976).

2.2.- Sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas

2.2.1.- Ácidos Orgánicos

Las bacterias lácticas fermentan los carbohidratos por diferentes vías metabólicas y durante este proceso se obtienen ácidos orgánicos (principalmente láctico y acético), que no son utilizados por las células y, por lo tanto, son excretados al exterior (Kandler, 1983). Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes. El mecanismo de inhibición se basa, en parte, en la disociación molecular de los ácidos orgánicos en el medio, lo cual da lugar a la aparición de protones y aniones. Se produce un aumento en el gradiente

de protones y las células tienden a transportarlos a su interior mediante bombeo de protones, para evitar la desnaturalización de las enzimas presentes en las estructuras celulares expuestas (pared celular, membrana y espacio periplásmico), pudiendo también ocasionar alteraciones en la permeabilidad de la membrana (Konings and Otto, 1983).

Además, los ácidos acético y láctico en forma no disociada, debido a su naturaleza lipofílica, pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Estas moléculas pueden ejercer dos efectos: por un lado, interfieren con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa (Baird-Parker, 1980); por otro lado, la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se produce el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Piard and Desmazeaud, 1991).

Las bacterias lácticas pueden vivir y desarrollarse en presencia de un pH relativamente bajo, a diferencia de otros grupos microbianos con metabolismo respiratorio (Smulders et al., 1986). Poseen también un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía (Michels et al., 1979; Tseng and Montville, 1993).

2.2.2.-Peróxido de Hidrógeno

Las bacterias lácticas producen peróxido de hidrógeno como mecanismo de protección frente al oxígeno, mediante la acción de oxidasas o NADH peroxidasas (Condon, 1987). El H_2O_2 se acumula en el medio de crecimiento debido a que estos microorganismos son incapaces de producir catalasa. La acción bactericida del H_2O_2 se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura básica molecular de las proteínas celulares (Haugaard, 1968; Dahl et al., 1989).

En la leche cruda, el H_2O_2 generado por las bacterias lácticas puede reaccionar con tiocianato endógeno, reacción catalizada por la lactoperoxidasa, para formar productos de oxidación intermedios como hipotiocianato ($OSCN^-$) u otros oxiácidos (O_2SCN^- , O_3SCN^-) (Pruitt et al., 1982). El principal efecto de estos metabolitos es la oxidación de grupos sulfhidrilos de enzimas metabólicas, tales como las hexoquinasas, las aldolasas y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Thomas and Aune, 1978).

2.2.3.-Diacetilo

El diacetilo (2,3-butanodiona) es un compuesto producido por bacterias lácticas fermentadoras del citrato (Hugenholtz, 1993). Posee efecto antimicrobiano a elevadas concentraciones; en cambio, en bajas concentraciones puede ser metabolizado por algunos microorganismos. Su acción antimicrobiana es mayor frente a microorganismos Gram (-), levaduras y mohos (Jay, 1982a, 1982b). El grupo α , α -dicarbonílico de la molécula reacciona con la porción guanido del aminoácido arginina en enzimas microbianas (alcohol deshidrogenasa, adenilato ciclasa,

glutamato deshidrogenasa, transcetolasa), desactivándolas por bloqueo o por modificación de la zona catalítica (Lindgren and Dobrogosz, 1990).

Aunque el diacetilo se considera sustancia GRAS (generalmente reconocido como seguro), su utilidad es reducida debido a que se requieren cantidades demasiado elevadas para que ejerza un efecto inhibitorio, y a que, además, posee un aroma intenso.

2.2.4.- Compuestos antimicrobianos no proteicos

2.2.4.1.- Reuterina

Algunos estudios han destacado la importancia de ciertas moléculas pequeñas, no proteicas, producidas por bacterias lácticas, para el control de los microorganismos alterantes de los alimentos. Así por ejemplo, Pulusani et al., (1979), señalan que *Streptococcus thermophilus* produce un compuesto, de unos 700 Daltons, que es un antagonista de las bacterias Gram (+) y Gram (-), mientras que Abdel-Bar et al., (1987), han descrito un compuesto similar en *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

De las sustancias hasta ahora descritas se destaca la reuterina (β -hidroxipropionaldehído), que es una sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus reuterii*, microorganismo presente en el tracto gastrointestinal, así como en los productos cárnicos. Es un metabolito neutro asociado directamente con el metabolismo anaeróbico del glicerol; inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa (Talarico and Dobrogosz, 1989), que está involucrada en el primer paso de la síntesis del ADN, lo que determina su amplio espectro antimicrobiano. Algunas especies del género *Klebsiella* producen también reuterina como metabolito intermedio. Sin embargo, *L. reuterii* se caracteriza por producir más reuterina de la

que es capaz de reducir, excretando el exceso al medio (Chung et al., 1989). Este compuesto presenta un amplio espectro de inhibición, ya que es activo frente a microorganismos como *Samonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, y algunos protozoos como *Trypanosoma* (Axelsson et al., 1989). Sin embargo, todavía no se ha estudiado su potencial tóxico, pero dada su naturaleza química existen dudas razonables acerca de su posible utilidad en la industria alimentaria (Talarico and Dobrogosz, 1989).

2.2.4.2.- Ácido fenilacético

Éste y su derivado, el ácido 4-hidroxifenilacético, son compuestos que poseen actividad antifúngica (Magnusson et al., 2003). Además, existen muchos otros compuestos de bajo peso molecular ya caracterizados, que poseen este tipo de capacidad antimicrobiana (Niku-Paavola et al., 1999).

2.2.5.- Compuestos antimicrobianos proteicos

De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente. Debido a su naturaleza proteica (Tagg et al., 1976) son inactivadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal, y además no son tóxicas ni inmunógenas en animales de experimentación (Bhunja et al., 1990), lo que las convierte en candidatas muy adecuadas para ser empleadas como bioconservadores de los alimentos. Debido a la preocupación constante que a la sociedad actual plantea el empleo de conservadores químicos por parte de la industria alimentaria, las bacterias productoras de bacteriocinas o las propias bacteriocinas producidas podrían desempeñar un papel importante en el procesado y conservación de los alimentos.

Tampoco conviene olvidar el buen efecto nutricional derivado de la ingestión de bacterias lácticas viables; se ha hipotetizado, y algunas veces demostrado, que las bacterias lácticas incrementan la calidad nutritiva de los alimentos, controlan las infecciones intestinales, facilitan la digestión de la lactosa, son antimutagénicas, inhiben el desarrollo de algunos tipos de cáncer y reducen el colesterol sanguíneo (Gilliland, 1990).

Es importante aclarar que las bacteriocinas no son las únicas sustancias peptídicas producidas por las bacterias lácticas. Ciertas cepas producen péptidos cíclicos con características antifúngicas, tales como los dipéptidos ciclo (L-Phe-L-Pro) y ciclo (L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) (Magnusson et al., 2001).

2.2.6.- Bacteriocinas

Como ya se ha expresado, la producción de bacteriocinas por bacterias lácticas es un factor importante en la acción inhibitoria frente a microorganismos indeseables, ya sean alteradores o agentes etiológicos de enfermedades. Las principales bacteriocinas caracterizadas procedentes de bacterias lácticas son producidas por cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* y *Pediococcus*.

Las bacteriocinas son péptidos bioactivos, simples o complejos, sintetizados ribosomalmente y que ejercen su acción de modo extracelular, inhibiendo típicamente el crecimiento de bacterias próximas desde el punto de vista taxonómico. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la existencia de bacteriocinas que impiden la proliferación de otras bacterias Gram (+) no relacionadas estrechamente desde un punto de vista taxonómico con la cepa productora (Tagg et al., 1976; Sobrino et al., 1991; Okereke and Montville, 1991;

Lauková et al., 1993; Vignolo et al., 1993; De Vuyst and Vandamme, 1994; Racach and Geshell et al., 1995; Susani et al., 1995).

Las anteriormente denominadas “sustancias tipo bacteriocinas” (denominación ya prácticamente caída en desuso) se diferenciaron de las bacteriocinas por tener un espectro de acción antibacteriano mucho más amplio que éstas, que alcanza también a especies bacterianas Gram (-). La literatura especializada indica que este último tipo de actividad antagónica puede ser la resultante del efecto combinado de varios inhibidores diferentes producidos por las bacterias lácticas, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, sustancias de tipo antibiótico y bacteriocinas; sin embargo, muchos trabajos de investigación también informan acerca de bacteriocinas que son activas por sí mismas frente a bacterias Gram (-) (Tagg et al., 1976; Wiseman and Marth, 1981; Coallier-Ascah and Idziak, 1985; Piard and Desmazeaud, 1992; Ray and Daeschel, 1992; Lauková et al., 1993; Vignolo et al., 1993; De Vuyst and Vandamme, 1994).

También se ha comprobado su acción, no sólo como biopreservadores de alimentos, sino también como complemento de antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, como la mastitis (Broadbent et al., 1989), y como agentes antivirales (Drider et al., 2006 y Wachsman et al., 1999).

Las primeras bacteriocinas descritas fueron las colicinas (1925), producidas por cepas de *Escherichia coli*.

Las producidas por BAL comienzan a estudiarse en 1928, pero el interés investigativo por ellas data de la década del 70, incrementándose notablemente desde los 90 hasta hoy, por su valor potencial como biopreservadores alimentarios.

2.2.6.1.- Biosíntesis y producción óptima de bacteriocinas

La biosíntesis de bacteriocinas ocurre en la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, y en la mayoría de los casos guarda relación con la biomasa producida (Piard and Desmazeaud, 1992), si bien la producción máxima en los medios de cultivo puede ocurrir en diferentes fases del ciclo de crecimiento (Tagg et al., 1976).

Algunos investigadores han señalado que ciertos componentes específicos del medio de cultivo interfieren sensiblemente en la producción de alguna bacteriocina individual. Así, varios trabajos indican la necesidad de algunos nutrientes, como extracto de levadura, aminoácidos, manganeso y manitol, para aumentar, disminuir o suprimir la producción de diversas bacteriocinas (Rogers, 1972; Clarke et al., 1975; Hale and Hinsdill, 1973 y Tagg et al., 1975).

Las variaciones de las condiciones de cultivo, como por ejemplo temperatura, tiempo y pH, ejercen un profundo efecto en la producción de bacteriocinas activas. Generalmente, se produce más bacteriocina cuando la cepa productora se cultiva a su temperatura óptima de crecimiento y, además, cuando el pH se mantiene constante (Tagg et al., 1976). Aquellas condiciones que favorezcan la alta densidad celular permitirán, de igual modo, un aumento en el rendimiento de bacteriocina. Es por ello que la utilización de fermentadores, especialmente del tipo batch y batch alimentado, que admiten realizar controles constantes de temperatura, pH y agregado de nutrientes, conduce a la optimización de las condiciones experimentales que posibilitan obtener una máxima densidad celular y, por lo tanto, un máximo título bacteriocinogénico. El desarrollo de la cepa productora a temperaturas elevadas puede suprimir completamente la producción de bacteriocina (Dajani and Taube 1974; Tagg et al., 1975), y algunas veces eliminar

irreversiblemente esta propiedad (Dajani and Tube 1974; Jetten and Vogels, 1973). Schlegel and Slade (1973) demostraron que la producción de estreptocina era máxima en la fase logarítmica, descendiendo algo cuando el cultivo entraba en la fase estacionaria. Por otro lado, Tagg et al., (1976) observaron que la producción de estreptocina A se iniciaba al final de la fase logarítmica del desarrollo de la cepa productora, y que dicha actividad disminuía lentamente tras un período de incubación prolongado. De modo similar, la producción de estafilococcina C55 comienza en la fase exponencial de desarrollo, alcanzando su máximo entre las 24 y 48 h de crecimiento, para después declinar gradualmente (Dajani and Wannamaker, 1969). Otras investigaciones también han descrito pérdidas sustanciales en la actividad de las bacteriocinas de cultivos incubados durante mucho tiempo. Este efecto puede deberse a la existencia de inactivadores específicos de las mismas, o bien a la digestión enzimática o a la reabsorción de la bacteriocina por la cepa productora, especialmente a su membrana (Tagg et al., 1976).

La mayoría de las bacteriocinas son sintetizadas como prepéptidos biológicamente inactivos que transportan un péptido señal N-terminal, de entre 14 y 30 aminoácidos (Nes et al., 1996), que está unido al propéptido C-terminal. Para los lantibióticos, los residuos de serina, treonina y cisteína en su propéptido experimentan modificaciones post-traduccionales extensivas para formar lantionina y metil-lantionina. La vía biosintética ocurre según el siguiente esquema: formación del prepéptido, reacciones de modificación, clivaje proteolítico del péptido líder (puede ocurrir antes, durante o luego de su exportación de la célula) y translocación del prepéptido modificado o propéptido maduro a través de la membrana citoplasmática.

Las bacteriocinas de clase II son sintetizadas como prepéptidos que poseen una secuencia señal N-terminal y un sitio de procesamiento proteolítico doble glicina

característico, que se encuentra en el extremo C-terminal del péptido señal (Havarstein et al., 1994 y 1995). Luego de la formación del prepéptido, el péptido líder es removido concomitantemente a su exportación fuera de la célula a través del transportador ABC dedicado y su proteína accesoria (Nes et al., 1996; Ennahar et al., 2000a). Por otro lado, las bacteriocinas de la clase II_c (acidocina B, enterocina 31, divergicina A, enterocina P), poseen una secuencia señal N-terminal típica del tipo "sec", y son procesadas y secretadas a través de la vía secretoria general (Leer et al., 1995; Worobo et al., 1995; Tomita et al., 1996; Cintas et al., 1997).

Se han propuesto varias funciones que ejercería el péptido líder. Éste serviría como sitio de reconocimiento que dirige al prepéptido hacia su maduración y hacia las proteínas de transporte; protege a la cepa productora manteniendo a la bacteriocina en un estado inactivo e interactúa con el dominio propeptídico para asegurar una adecuada conformación, la cual es esencial para la interacción enzima-sustrato (Sablon et al., 2000; McAuliffe et al., 2001).

Los determinantes genéticos de la biosíntesis de una bacteriocina se pueden localizar a nivel plasmídico o cromosómico (Jack et al., 1995). Además, pueden residir en transposones insertados de forma estable en el cromosoma de las células hospedadoras, como sucede en el caso de la nisina (Rodríguez and Dodd, 1996).

En lo que respecta a los lantibióticos, sus determinantes genéticos suelen disponerse en forma de agrupaciones de genes organizados en tres operones (Rodríguez and Dodd, 1996); estos contienen genes que codifican para el prepéptido (LanA; esta abreviación se refiere a los genes homólogos de diferentes grupos de genes de lantibióticos), para enzimas responsables de las reacciones de modificación (LanB, C/LanM), para proteasas responsables de la remoción del péptido líder (LanP), para el ABC, para la superfamilia de proteínas de transporte

involucradas en la translocación del péptido (LanT), para las proteínas regulatorias (LanR, K) y para las proteínas envueltas en la autoprotección o inmunidad (LanI, FEG) (Chen and Hoover, 2003) (Figura N° 1).

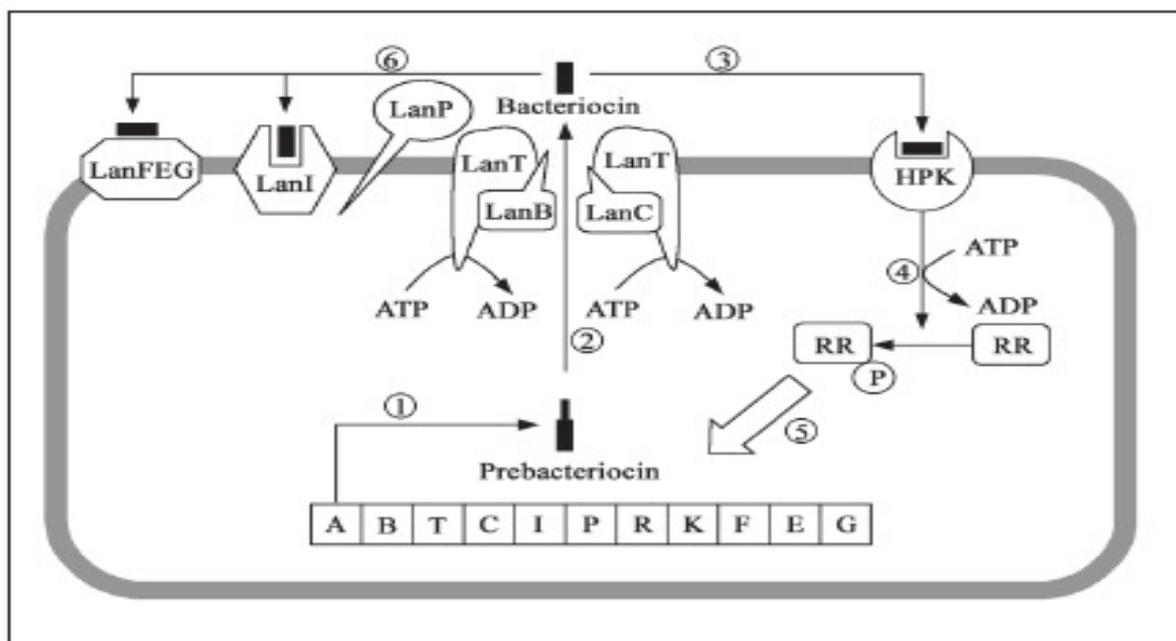


Figura N° 1. Diagrama esquemático de la biosíntesis de lantibióticos: (1) formación de la prebacteriocina; (2) la prebacteriocina es modificada por LanB y LanC, translocada a través del transportador ABC dedicado LanT y procesado por LanP, resultando en la liberación de la bacteriocina madura; (3) la proteína histidín-quinasa (HPK) sensa la presencia de la bacteriocina y se autofosforila; (4) el grupo fosforil es subsecuentemente transferido al regulador de respuesta (RR); (5) RR activa la transcripción de los genes regulados; y (6) inmunidad del productor mediada por proteínas de inmunidad, LanI, y proteínas del transportador ABC dedicado, LanFEG (Extraído de Chen and Hoover, 2003).

La biosíntesis de las bacteriocinas de la clase II no inducibles se basa en una estructura genética general que comprende cuatro o cinco genes organizados en uno o dos operones (Nes et al., 1996; Nissen-Meyer and Nes, 1997). En primer lugar, el gen estructural que codifica la prebacteriocina (dos genes estructurales para

las bacteriocinas que constan de dos péptidos); en segundo lugar, un gen de inmunidad que codifica la proteína que protege a la célula productora frente a su propia bacteriocina. Este gen se localiza próximo al gen estructural y en la misma unidad de transcripción. En tercer lugar, un gen que codifica el transportador ABC, dedicado a la secreción de la bacteriocina en un proceso concomitante con la separación del líder. Finalmente, un gen que codifica una proteína accesoria, esencial para el transporte y exportación de la bacteriocina a través de membrana, pero cuyo papel específico no se conoce todavía (Franke, 1998) (Figura N° 2)

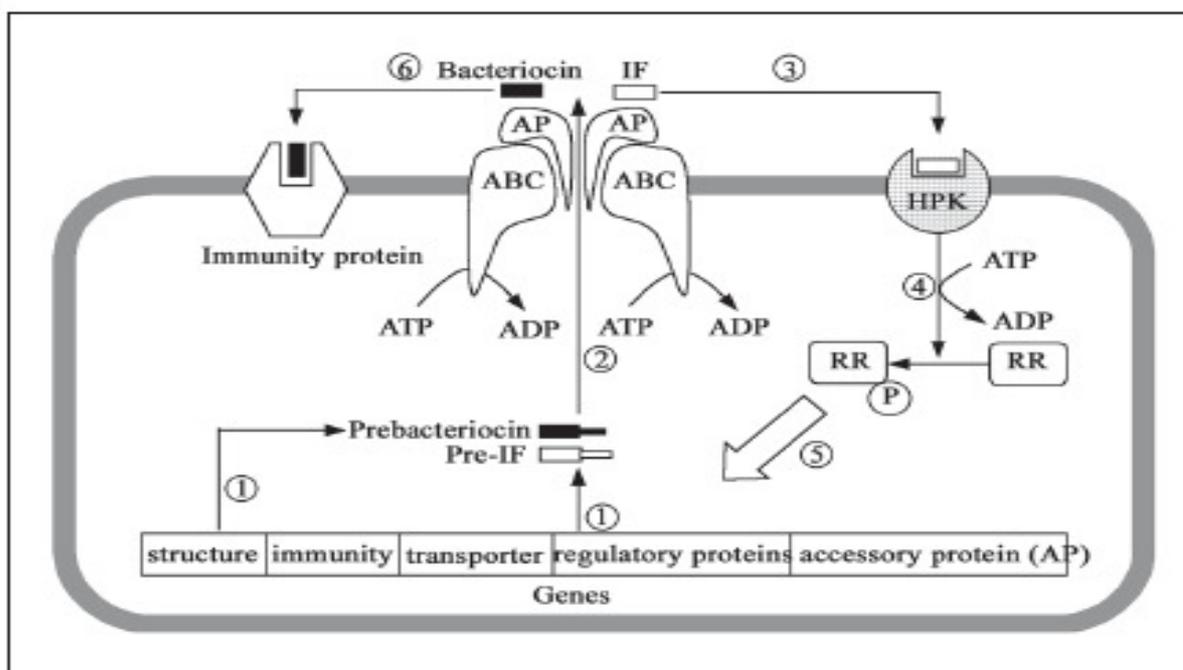


Figura N° 2. Diagrama esquemático de la biosíntesis de las bacteriocinas de clase II: (1) formación de la prebacteriocina y del prepéptido del factor de inducción (IF); (2) la prebacteriocina y el pre-IF son procesados y translocados por el transportador ABC, desembocando en la liberación del IF y la bacteriocina maduros; (3) la proteína histidínquinasa (HPK) sensa la presencia del IF y se autofosforila; (4) el grupo fosforilo (P) es transferido subsecuentemente al regulador de respuesta (RR); (5) RR activa la transcripción de los genes regulados; y (6) inmunidad del productor (Extraído de Chen and Hoover, 2003).

La actividad de ciertas bacteriocinas de la clase II depende de la acción complementaria de dos péptidos. Ambos poseen un líder doble glicina y están codificados en genes individuales, aunque contiguos y pertenecientes a un mismo operón. En algunos casos, es necesaria la presencia de ambos para que exista actividad, como ocurre con la lactococina G (Moll et al., 1996). En otros, aunque uno de los péptidos posee cierta actividad, ésta se ve notablemente aumentada por la presencia del segundo, como sucede con la plantaricina S (Jiménez-Díaz et al., 1995).

La producción de muchos antibióticos y de algunas bacteriocinas de la clase II, está regulada transcripcionalmente mediante un sistema de transducción de señal que consta de tres componentes (Figuras N° 1 y N° 2):

- una proteína histidín-quinasa unida a la membrana (HPK);
- un regulador de respuesta citoplasmático (RR);
- un péptido inductor (Diep et al., 1995; Nes et al., 1996; Nissen-Meyer and Nes, 1997).

Los genes que codifican estos tres componentes se transcriben en una misma molécula de ARN_m y están sujetos a un fenómeno de autorregulación mediado por el péptido inductor y que depende, en última instancia, de la densidad celular (Kleerebezem et al., 1997).

En esta vía de transducción de señal, la HPK autofosforila el residuo de histidina conservado en su dominio intracelular cuando sensa una determinada concentración de bacteriocina en el medio ambiente. Este grupo fosforil es subsecuentemente transferido al residuo conservado de ácido aspártico en el dominio receptor del RR; el cambio intramolecular resultante activa al regulador de respuesta, el que activa la transcripción de los genes regulados. Estos genes

regulados incluyen: los genes estructurales, los genes de exportación, los genes de inmunidad y, en ciertos casos, los propios genes reguladores (Kuipers et al., 1998).

Para la nisina y subtilina, la bacteriocina en sí actúa como una señal externa para autorregular su propia síntesis a través de la transducción de señal (Kuipers et al., 1995; Guder et al., 2000). En oposición a esto, la mayoría de las bacteriocinas de la clase II producen un péptido tipo bacteriocina sin actividad antimicrobiana y lo usan como factor de inducción (IF) para activar la transcripción de los genes regulados. El IF es un péptido pequeño, estable al calor, catiónico e hidrofóbico, que es primariamente sintetizado como un prepéptido con una secuencia líder doble glicina. EL transportador ABC dedicado cliva específicamente el péptido líder del IF simultáneamente con su exportación de la célula. El IF actúa como una señal externa que activa la transcripción de los genes involucrados en la producción de la bacteriocina (Nes et al., 1996; Ennahar et al., 2000a).

Actualmente se sabe que una misma cepa de origen natural puede producir más de una bacteriocina, fenotipo que parece relativamente común entre las bacterias lácticas bacteriocinogénicas (Nes et al., 1996). En este sentido se han aislado diversas cepas (*Lactobacillus plantarum* C11, *Carnobacterium piscicola* LV17B, *C. piscicola* VI y *Enterococcus faecium* T136), capaces de producir más de una bacteriocina de la clase II (Quadri et al., 1994; Quadri et al., 1995; Bhugaloo-Vial et al., 1996; Casaus et al., 1997).

2.2.6.2.- Inmunidad de la cepa productora

Las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas poseen un mecanismo especial de defensa que las protege de la toxicidad de sus propias bacteriocinas. Este mecanismo depende principalmente de una proteína de inmunidad específica

de cada bacteriocina, la cual se expresa concomitantemente a la misma, pero no requiere el sistema de procesamiento y transporte necesario para la liberación al medio exocelular de la bacteriocina (Nes et al., 1996). También, la inmunidad podría estar mediada por la acción de proteasas intracelulares que inactivarían la bacteriocina en la célula productora (Abee, 1995; Jack et al., 1995; Allison and Klaenhammer, 1996).

Se han identificado dos sistemas de la inmunidad hacia los lantibióticos: la protección puede estar mediada por proteínas de inmunidad (LanI) y por proteínas de transporte asociadas al ABC (LanFEG). Ambas trabajan sinérgicamente para proteger a las células productoras contra su propia bacteriocina. LanI, principalmente asociada al exterior de las membranas citoplasmáticas, probablemente confiere inmunidad previniendo la formación de poros por la bacteriocina. LanFEG aparentemente actúa transportando las moléculas de bacteriocinas que se han insertado en la membrana de regreso al medio exocelular y, por tanto, manteniendo la concentración de la bacteriocina en la membrana por debajo de un valor crítico (Klein and Entian, 1994; McAuliffe et al., 2001). Para las bacteriocinas de clase II, el gen que confiere la inmunidad usualmente codifica para una proteína que está débilmente asociada con la membrana citoplasmática; la interacción de esta proteína con la membrana es suficiente para proteger a la cepa productora contra su propia bacteriocina (Venema et al., 1994; Nes and Holo, 2000).

2.2.6.3.- Clasificación, estructura y propiedades de las bacteriocinas. Criterios para definir las (según Tagg, 1976).

- Poseer en su estructura un componente proteico o peptídico activo biológicamente.
- Poseer reducido espectro inhibitorio, especialmente sobre bacterias relacionadas taxonómicamente con la productora.
- Poseer capacidad bactericida frente a cepas sensibles.

Las bacteriocinas (como colicinas) fueron originalmente definidas como proteínas bactericidas caracterizadas por una biosíntesis letal, un rango de actividad inhibitoria muy pequeño, una adsorción a la membrana plasmática específica dependiente de receptores y una biosíntesis mediada por plásmidos.

Cabe aclarar que actualmente se conoce como colicinas a bacteriocinas producidas por variedades de *E. coli* y otras enterobacterias. En orden de incluir a las bacterias Gram (+), Tagg et al. (1976) ampliaron la definición, aclarando que las bacteriocinas de bacterias Gram (+) no poseen un receptor específico por el cual se adsorban, son de menor peso molecular que las colicinas, tienen un mayor espectro inhibitorio con diferentes modos de liberación y transporte intracelular, y poseen secuencias líder clivadas durante la maduración.

Si bien la definición establecida por Tagg et al., (1976) es válida para muchas de las bacteriocinas estudiadas, los resultados obtenidos en la caracterización de estos compuestos han mostrado una gran heterogeneidad en cuanto a propiedades bioquímicas, peso molecular, espectro de actividad, mecanismo de acción, sistemas de producción y secreción, así como la organización genética de los operones que codifican estas funciones.

2.2.6.4.- Criterios para definir las (según Klaenhammer, 1993).

Define cuatro clases diferentes de bacteriocinas de bacterias lácticas:

- **Clase I:** Lantibióticos, péptidos pequeños (menos de 5000 Da, que contienen en su estructura aminoácidos atípicos), como por ejemplo nisina, lacticina 481 y lacticina S. Son termoestables, con aminoácidos modificados, de los cuales los más comunes son dehidroalanina (DHA) y dehidrobutirina (DHB), originados por deshidratación post-traducciona l de la serina y la treonina, respectivamente. La condensación de los residuos DHA y DHB con el grupo sulfidrilo de las cisteínas presentes en la molécula, origina los aminoácidos lantionina y β -metil-lantionina, respectivamente (de Vos et al., 1995). Esta clase es, a su vez, subdividida en lantibiótico tipo A y tipo B, de acuerdo a sus estructuras químicas y a sus propiedades antimicrobianas. Los lantibióticos de tipo A (nisina y lactocina S, por ejemplo) son péptidos formadores de poros, catiónicos y elongados que en algunos casos, como el de la lacticina 3147, constan de dos componentes. El prototipo de esta clase es la nisina, la más estudiada hasta la fecha. Los lantibióticos de tipo B (mersacidina y aconvenina, por ejemplo) son péptidos globulares pequeños con carga neta negativa o neutra, e inmunológicamente activos; su actividad antimicrobiana está asociada a la inhibición de enzimas específicas (Moll et al., 1999).

- **Clase II:** Péptidos pequeños (menos de 10000 Da), termoestables, y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria. La molécula

precursora es procesada después de los residuos de glicina. A su vez, se pueden clasificar en cuatro subclases:

- **Subclase II_a:** Se caracterizan por ser particularmente activas frente a los microorganismos del género *Listeria*. Sus secuencias aminoacídicas muestran un elevado grado de homología (38-55%), que es mucho más pronunciado en la parte N-terminal de los péptidos, la cual es altamente hidrofílica y cargada (Aymerich et al., 1996). Todos los miembros de esta subclase comparten la secuencia consenso N-terminal **Y-G-N-G-V-X-C**. Esta subclase se conoce como “familia pediocina”, en alusión a la bacteriocina más estudiada de este grupo, la pediocina PA-1.
- **Subclase II_b:** Contiene bacteriocinas cuya actividad requiere de la acción complementaria de dos péptidos, como la lactococina G (Nissen-Meyer et al., 1992; Moll et al., 1996).
- **Subclase II_c:** Incluye a las bacteriocinas de la clase II que se transportan utilizando un sistema *sec*-dependiente, a pesar de que algunas, como la enterocina P (Cintas et al., 1997), muestran ciertas características propias de las bacteriocinas de la subclase II_a.
- **Subclase II_d:** Son las bacteriocinas de la clase II que, como sucede con la lactocina A, no se pueden clasificar en ninguno de los subgrupos anteriores. Algunos autores han sugerido la creación de otra subclase para las bacteriocinas que requieren cisteínas reducidas para su actividad, como la lactocina B (Venema et al., 1993). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la

oxidación del grupo sulfidrilo no interfiere con su actividad (Venema et al., 1996), por lo que se trata de una propiedad sin entidad diferencial suficiente como para que las bacteriocinas que la posean constituyan un grupo propio. De este modo, la descripción de esta subclase tiene una connotación meramente histórica, ya que actualmente no se la utiliza más como criterio de clasificación de bacteriocinas.

- **Clase III:** Proteínas termolábiles de peso molecular superior a 30000 Da. (helveticina J, helveticina V-1829, acidofilucina A, caseicina 80 y lactacinas A y B), que no poseen aminoácidos modificados en su estructura primaria. Estas bacteriocinas son las que poseen un menor interés industrial en la actualidad.
- **Clase IV:** Bacteriocinas de estructura compleja (plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27 y pediocina SJ-1), que junto a su estructura peptídica parecen presentar un componente glucídico o lipídico esencial para su actividad biológica. Sin embargo, estas bacteriocinas complejas parecen ser meros artefactos laboratoriales, ya que cuando se purifican correctamente se demuestra su naturaleza exclusivamente peptídica (Jiménez-Díaz et al., 1995). De esta manera, debe completarse la caracterización bioquímica de esta clase de bacteriocinas complejas antes de ser reconocida como tal, por lo que la confirmación de que estas bacteriocinas pertenecen a esta clase permanece pendiente.
- **No clasificables:** No se pueden clasificar en ninguna de las clases citadas, como por ejemplo la enterocina AS-48 (Martínez-Bueno et al.,

1994), o las producidas por *Enterococcus faecium* L50 (Cintas et al., 1998b).

2.2.6.5.- Criterios actuales a tener en cuenta

- Gran heterogeneidad en sus propiedades bioquímicas, peso molecular, espectro de inhibición, mecanismo de acción, sistema de producción y secreción, y organización genética que codifica su síntesis y funciones.
- Espectro de acción amplio frente a bacterias Gram (+) no relacionadas taxonómicamente con la cepa productora, pertenecientes a géneros tales como *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, etc.
- La mayoría sólo actúan sobre especies Gram (-) si previamente se sensibiliza la membrana celular de éstas con algún agente químico (por ej.: EDTA), o si se altera el componente lipolisacárido de la membrana externa de la pared celular Gram (-).
- En los últimos años se han descrito varias bacteriocinas producidas por BAL que han demostrado poseer acción directa sobre especies bacterianas Gram (-), especialmente si la bacteriocina ha sido adecuadamente purificada (Klaenhammer, 1988). Muchos investigadores han informado actividad directa comprobada frente a *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Aeromonas*, entre los principales géneros bacterianos Gram (-) de interés en tecnologías alimentarias.

Las bacteriocinas de la subclase II_a poseen una carga positiva neta (los valores de pI oscilan entre 8 y 10) y sus secuencias de aminoácidos oscilan desde 37 a 48 residuos. Todos los miembros de esta subclase comparten la secuencia

consenso N-terminal **Y-G-N-G-V-(X)-C(X)₄-C-(X)-V-(X)₄-A**, donde **X** denota cualquier aminoácido (Drider et al., 2006). Su dominio C-terminal suele ser más variable, con características hidrofóbicas o, a lo sumo, anfifílicas.

Las bacteriocinas de la clase I y II (especialmente II_a) son las que han recibido mayor atención científica debido, en parte, a que son las de mayor interés industrial. En general se trata de péptidos catiónicos y anfipáticos compuestos por entre 12 y 45 aminoácidos. Sus moléculas no suelen estar estructuradas en soluciones acuosas, pero tienden a formar estructuras α -hélice cuando se exponen a solventes como el trifluoretanol, o cuando se mezclan con membranas compuestas por fosfolípidos aniónicos. Algunas bacteriocinas poseen ciertas restricciones estructurales debido a la presencia de puentes disulfuro (por ejemplo pediocina PA-1) o anillos tioéter intramoleculares (nisina). La estructura de diversos antibióticos ha sido elucidada mediante resonancia magnética nuclear (Moll et al., 1999). La estructura tridimensional de una bacteriocina de clase II, la leucocina A, se ha determinado por este método (Gallagher et al., 1997).

2.2.7.- Espectro de inhibición de las bacteriocinas

La mayoría de las bacteriocinas de clase I poseen un espectro antimicrobiano muy amplio. No sólo inhiben a bacterias relacionadas taxonómicamente, tales como especies de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, sino que también inhiben a bacterias Gram (+) mucho menos relacionadas desde ese punto de vista, como lo son: *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum*.

De este modo la nisina, bacteriocina producida por algunas cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*, presenta amplio espectro de inhibición frente a un extenso rango de

microorganismos Gram (+), que incluye a estreptococos, lactococos, lactobacilos, leuconostocs, pediococos, estafilococos, micrococos y listerias (Carminati et al., 1989; Spelhaug and Harlander, 1989), impidiendo también el desarrollo de esporas de *Clostridium* y *Bacillus*, acción también efectuada por la termofilina 13 (Marciset et al., 1997). La nisina es la bacteriocina de las bacterias lácticas mejor caracterizada y es, hasta el momento, la única que se comercializa para su uso como aditivo alimentario (Parente and Ricciardi, 1999).

La lacticina 481, lantibiótico producido por *L. lactis* subsp. *lactis* CNRS 481, inhibe a *Clostridium tyrobutyricum*, además de ser activa frente a muchas especies de bacterias lácticas (Piard et al., 1990).

Comparadas con las bacteriocinas de clase I, la mayoría de las bacteriocinas de clase II_a tienen un espectro de actividad más reducido y sólo inhiben a bacterias Gram (+) relacionadas filogenéticamente. En general, los miembros de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* son sensibles, mientras que los miembros del género *Lactococcus* son resistentes a las bacteriocinas de la clase II_a. Por ejemplo, la pediocina PA-1 es activa frente a microorganismos Gram (+) como leuconostocs, enterococos, pediococos, propionibacterias, *S. aureus*, *Bacillus* spp. (entre ellas cepas de *B. cereus* y *B. stearothermophilus*), *Brochotrix*, *Clostridium* (entre ellas cepas de *C. botulinum*, *C. perfringens*) y *Listeria* spp. (González and Kunka, 1987; Bhunia et al., 1988), pero sólo una de once cepas de *Lactococcus* ensayadas ha resultado sensible a la misma (Eijsink et al., 1998). Además, las bacteriocinas de clase II_a son generalmente activas contra *Listeria*. Eijsink et al. (1998), encontraron que nueve cepas de *Listeria* probadas, pertenecientes a las especies *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*, fueron muy sensibles a cuatro bacteriocinas de clase II_a (pediocina PA-1, enterocina A, sakacina P y curvacina A).

Este grado de sensibilidad varía de cepa a cepa. Las concentraciones inhibitorias mínimas de las cuatro bacteriocinas arriba descritas frente a *L. monocytogenes* variaron entre 0.1 y 8 ng/mL; sin embargo, ciertas cepas de *Listeria*, como *L. monocytogenes* V7 y *L. innocua* LB1, son resistentes a bacteriocinas de la clase II_a tales como: enterocina A, mesentericina Y105, divercina V41 y pediocina AcH (Ennahar et al., 2000b).

La susceptibilidad de las bacterias Gram (-) a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas es mucho más limitada. De acuerdo con Klaenhammer (1988), en los casos descritos de actividad frente a bacterias Gram (-) se requiere una purificación de la bacteriocina. Se ha informado que la nisina y la pediocina PA-1 presentan actividad inhibitoria frente a microorganismos como *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Aeromonas*, pero el efecto no se observa a menos que se altere el componente lipopolisacárido de la membrana externa de estos microorganismos (Stevens et al., 1991; Bhunia et al., 1991).

Las bacteriocinas que poseen un amplio espectro de inhibición, presentan un importante valor como aditivos alimentarios al ser activas frente a microorganismos alterantes y/o patógenos presentes en los alimentos. Además, la acción combinada de dos o más bacteriocinas puede reforzar considerablemente su acción inhibitoria. Hanlin et al., (1993) observaron que la viabilidad de cepas de bacterias lácticas, *L. monocytogenes* y *Clostridium* spp. disminuía al añadir combinadas pediocina AcH y nisina, en comparación con la adición de cada una de ellas por separado. Por otro lado, la utilización de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas activas frente a microorganismos del mismo grupo, favorecería el desarrollo de estas cepas añadidas en los cultivos iniciadores en competición con la flora láctica presente (Daeschel, 1989).

2.2.8.- Resistencia a las bacteriocinas

Los mecanismos de resistencia bacteriana a las bacteriocinas aún no se han dilucidado, pero pueden deberse a la pérdida o modificación de los receptores específicos de dicha bacteriocina, a variaciones en la fluidez de la membrana plasmática o a la síntesis de una proteína de resistencia (Klaenhammer, 1993). En este contexto, se ha descrito que mutantes espontáneos de *L. monocytogenes* resistentes a la nisina contienen un elevado porcentaje de cadenas hidrocarbonadas lineales y muy pocas cadenas ramificadas, lo que da lugar a una menor fluidez de la membrana plasmática y, de este modo, una menor eficacia antimicrobiana de la bacteriocina (Abee, 1995). Asimismo, se ha observado la capacidad de diversos microorganismos resistentes a la nisina para sintetizar una enzima reductasa, la nisinasa, que destruye a esta bacteriocina (Harris et al., 1992).

2.2.9.- Propiedades bioquímicas

2.2.9.1.- Tolerancia de las bacteriocinas al calor, acidez y enzimas

Las bacteriocinas de bacterias lácticas presentan una serie de propiedades bioquímicas comunes, como lo son la sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas y la tolerancia a elevadas temperaturas y a bajos valores de pH.

La termotolerancia de las bacteriocinas de bacterias lácticas es generalmente elevada, aunque la misma puede depender del grado de purificación, de la presencia de sustancias termoprotectoras y del pH. Así, la termoestabilidad disminuye significativamente cuando los tratamientos térmicos son realizados con fracciones purificadas parcialmente o a homogeneidad; tal es el caso de la lactacina B (Barefoot and Klaenhammer, 1984), la carnocina U-149 (Stoffels et al., 1992) y la

sakacina P (Tichaczek et al., 1992). La nisina purificada, sin embargo, se caracteriza por su elevada termoestabilidad a pH 2.0, permaneciendo activa tras ser sometida a 100 °C durante 10 minutos (Hurst, 1981). Esta característica de termorresistencia parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Otras bacteriocinas, en su mayor parte producidas por lactobacilos, son termolábiles, incluso sin haber sido purificadas; las mismas poseen un mayor peso molecular y probablemente una estructura molecular más compleja. Dentro de este grupo están las bacteriocinas pertenecientes a la clase III definida por Klaenhammer (1993), que incluye a helveticinas J (termosensible a 100 °C, 30 min) y V-1829 (termosensible a 50 °C, 30 min), acidofilucina A (termosensible a 60 °C, 10 min), caseicina 80 (termosensible a 60 °C, 10 min.).

La termoestabilidad de las bacteriocinas, al igual que lo que ocurre con otras proteínas, está íntimamente relacionada con el pH; así se han descrito numerosas bacteriocinas que son más termorresistentes a pH ácido, como la leucocina A-UAL 187 (Hastings et al., 1991) y las enterocinas L50A y L50B (Cintas, 1995; Cintas et al., 1998a), entre otras.

La termorresistencia generalizada de las bacteriocinas permite que permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche (63 °C 30 min; 72 °C 15 s), lo que supone una ventaja adicional para su utilización en productos pasteurizados (Piard and Desmazeaud, 1992).

Las bacteriocinas de bacterias lácticas son generalmente estables a pH ácido o neutro (Piard and Desmazeaud, 1992). La máxima solubilidad y estabilidad de la nisina se logra a pH 2.0, disminuyendo estas propiedades conforme aumenta el pH,

hasta inactivarse reversiblemente a pH 7.0 (Hurst, 1981). Las lactoestreptocinas también son estables a pH entre 4.2 y 5.0, y se inactivan reversiblemente a pH 7.0 u 8.0 (Kozak et al., 1978). Sin embargo, la mayoría de las bacteriocinas son activas en un amplio rango de pH, generalmente entre 3.0 y 9.0, como, por ejemplo, la lacticina 481 (Piard et al., 1990), entre otras. La tolerancia a valores de pH aún más extremos, entre 1.0 y 2.0 y entre 11.0 y 12.0, se ha descrito para la acidocina B (Ten Brink et al., 1994) y la bavaricina A (Larsen et al., 1993).

La estabilidad a pH ácido o neutro de las bacteriocinas indica una adaptación de estas sustancias a las condiciones ambientales de los sustratos en los que se desarrollan las bacterias productoras (Piard and Desmazeaud, 1992; Cintas, 1995).

Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimotripsina), y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Esta característica es bastante interesante con respecto a la utilización de bacteriocinas en productos alimentarios, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidas como compuestos activos y sin causar los efectos relacionados con el uso de antibióticos (Lloyd and Drake, 1975).

La nisina, además de ser inactivada por α -quimotripsina (Jarvis and Mahoney, 1969) y por pancreatina (Heinemann and Williams, 1966), puede también ser inactivada por determinadas enzimas específicas o nisinasa, producidas por algunas cepas de *L. brevis* (Moreira, 1993) y *B. cereus* (Jarvis and Farr, 1971). Sin embargo, tal bacteriocina no es inactivada por tripsina, pepsina, erepsina, elastasa y carboxipeptidasa A (Hurst, 1983).

Se han descrito otras bacteriocinas sensibles a enzimas no proteolíticas, como la plantaricina B, que se inactiva por una lipasa y por una α -amilasa (West and

Warner, 1988), la plantaricina S, que se inactiva por enzimas glicolíticas, lipolíticas y fosfolipolíticas (Jiménez-Díaz et al., 1993) y la leucocina S, que se inactiva por una amilasa (Lewus et al., 1992). Estas observaciones indican que la zona activa de estas bacteriocinas presenta una composición heterogénea (Klaenhammer, 1993).

Actualmente se acepta que la pronasa E y la proteinasa K, proteasas de amplio espectro, inhiben totalmente la actividad antimicrobiana de cualquier bacteriocina. Por ello es que durante los ensayos de screening de actividad tipo bacteriocina es esencial su utilización para confirmar el origen proteico del inhibidor (Ray and Daeschel, 1992).

Por último, las bacteriocinas pueden ser clasificadas de acuerdo a su sensibilidad a enzimas proteolíticas. Esto permitiría eliminar duplicaciones en la caracterización de inhibidores previamente estudiados y caracterizados (Ray and Daeschel, 1992).

2.2.9.2.- Antigenicidad

Dada su estructura proteica, es muy posible que algunas bacteriocinas funcionen como antígenos (Tagg et al., 1976). Se ha visto que las bacteriocinas producidas por algunas bacterias Gram (+), como *Staphylococcus aureus* (Gagliano and Hinsdill, 1970) y *Clostridium perfringens* tipo A (Tubylewicz, 1970), y Gram (-) como *Escherichia coli* (Tzannetis, et al., 1972), son antigénicas en los animales de experimentación.

2.2.9.3.- Estabilidad

La estabilidad de las bacteriocinas disminuye a medida que aumenta su purificación (Ellison and Kautter, 1970; Mahony, 1974; Tagg et al., 1975). La adición

de sero-albúmina bovina protege de la pérdida excesiva de actividad experimentada por algunas bacteriocinas durante su purificación. La mayoría de las bacteriocinas son mucho más tolerantes a valores de pH muy ácidos que a los alcalinos (Barrow, 1963; Ellison and Kauter, 1970). Los criterios de termoestabilidad de las bacteriocinas son difíciles de definir, pues dependen de su purificación y de factores tales como pH, fuerza iónica y presencia de moléculas protectoras.

2.2.10.- Bacteriocinas producidas por cepas de *Enterococcus*

Las bacteriocinas enterocócicas (enterocinas) han adquirido mucha atención en la última década, debido a que las cepas productoras de tales bacteriocinas pueden ser aisladas con facilidad de diversos alimentos fermentados. Además, la mayoría de ellas suelen ser activas hacia patógenos alimentarios tales como *Listeria* spp. y *Clostridium* spp. (Ohmomo et al., 2000; Gálvez et al., 1998). Esta habilidad para inhibir a *Listeria* spp. puede ser explicada por la cercana relación filogenética entre este género y el género *Enterococcus* (Stackebrandt and Teuber, 1988). También se ha detectado actividad frente a bacterias Gram (-) tales como *Vibrio cholerae* (Simonetta et al., 1997) y *E. coli* (Gálvez et al., 1989), y actividad antiviral frente a cepas víricas de *Herpes simplex* tipo I y tipo II, como es el caso de la enterocina CRL 35 (Wachsman et al., 2003).

2.2.10.1.- Clasificación de bacteriocinas producidas por cepas de *Enterococcus*

Las enterocinas se clasifican en: Clase I (enterocina Cyl1 L_L producida por la cepa de *E. faecalis* DS16, Gilmore et al., 1994), Clase II_a (enterocina SE-K4, por la cepa de *E. faecalis* K-4, (Eguchi et al., 2001), Clase II_c (enterocina L50A y L50B,

producidas por la cepa de *E. faecium* L50, Cintas et al., 1998b) y Clase III (enterolisina A, producida por la cepa de *E. faecalis* LMG 2333, Nilsen et al., 2003).

Además, las bacteriocinas producidas por cepas de *E. faecalis* suelen ser clasificadas como:

- **Tipo 1:** citolisina (bacteriocina/hemolisina) proveniente de *E. faecalis* DS16 (Gilmore et al., 1994). Este antibiótico de doble función muestra tanto actividad hemolítica como antimicrobiana.
- **Tipo 2:** el antibiótico cíclico peptídico enterocina AS-48, producido por *E. faecalis* AS-48 (Martínez-Bueno et al., 1994). Éste es un compuesto activo frente a bacterias Gram (-) y Gram (+). En cambio, la idéntica enterocina 4, producida por *E. faecalis* INIA 4, es sólo activa frente a bacterias Gram (+) (Joosten et al., 1996).
- **Tipo 3:** bacteriocina 31, sintetizada por *E. faecalis* Y117 (Tomita et al., 1996), con un espectro antibacteriano reducido.
- **Tipo 4:** enterocina 1071A y enterocina 1071B, provenientes de *E. faecalis* BEF 1071 (Balla et al., 2000). Estas enterocinas presentan un espectro de actividad menor que las enterocinas del tipo 2 y mayor que las del tipo 3.

3.- CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS: PURIFICACIÓN

La caracterización de las bacteriocinas es dependiente de su grado de purificación. La elucidación de su estructura bioquímica requiere tanto una purificación a homogeneidad como una adecuada recuperación de la misma.

Inicialmente, la capacidad bacteriocinogénica de las bacterias lácticas se suele evaluar mediante pruebas biológicas o bioensayos que detectan la actividad antimicrobiana que estos péptidos ejercen en los microorganismos indicadores. El método de difusión en agar, utilizando la técnica de siembra en orificios practicados en una placa de Petri con el correspondiente medio agarizado, y ya inoculada con el microorganismo cuya sensibilidad se pretende determinar, es el de más amplia aplicación en la actualidad (Tagg and Mc Given., 1971). Otro de los métodos también muy utilizados es el de la doble capa; el mismo consiste en sembrar sobre una placa con un medio de cultivo específico agarizado, la supuesta cepa productora de sustancia/s antimicrobiana/s y, transcurrido el tiempo de incubación adecuado, colocar encima un medio de cultivo agarizado, aunque de menor consistencia (agar blando), que contiene la cepa sensible o indicadora. Se vuelve a incubar la placa y se observa la formación de halos (Sobrino et al., 1991; Ray and Daeschel, 1992).

Sin embargo, otros metabolitos de las bacterias lácticas pueden producir halos de inhibición similares a los que originan las bacteriocinas. En este sentido, la acción de los ácidos orgánicos se puede evitar neutralizando la acidez de los cultivos (o sobrenadantes) evaluados, y la del peróxido de hidrógeno añadiendo catalasa al medio o empleando medios de cultivo que posean una marcada actividad catalásica, como el MRS (Rodríguez et al., 1997b).

Para confirmar la naturaleza proteica de los compuestos con actividad antimicrobiana, los sobrenadantes de los cultivos de las cepas presuntamente productoras de bacteriocinas se suelen someter a diversos tratamientos enzimáticos (proteasas, lipasas, amilasas) y térmicos, con el fin de determinar su naturaleza química y su termorresistencia (Sobrino et al., 1992).

Las bacteriocinas son sustancias que se liberan al medio exocelular por lo que, generalmente, el primer paso para su purificación consiste en la obtención y concentración del sobrenadante libre de células (Hoover and Steenson, 1993; Venema et al., 1997). Ciertas bacteriocinas se encuentran en su estado nativo en forma de complejos macromoleculares o agregados inespecíficos, de elevado tamaño molecular (30-300 kDa), que pueden enmascarar total o parcialmente su actividad antimicrobiana durante el proceso de purificación, así como inducir a errores en la determinación de su tamaño molecular. Concretamente, las bacteriocinas de pequeño tamaño molecular y naturaleza altamente apolar interaccionan fácilmente con el material extracelular de las células lisadas (fragmentos de la pared celular y micelas de los ácidos lipoteicoicos) o con otros componentes apolares del medio de cultivo (ej. lípidos y ácidos grasos del agente tensoactivo no iónico Tween 80) (Muriana and Klaenhammer, 1991; Contreras et al., 1997). En estos casos, los complejos macromoleculares se pueden disgregar mediante el empleo de agentes disociantes como la úrea o el SDS (Muriana and Klaenhammer, 1991), por ultrafiltración (Muriana and Klaenhammer, 1987), o eliminando el material lipídico mediante extracciones con metanol-cloroformo o etanol-dietiléter (Contreras et al., 1997). Luego de recuperadas las bacteriocinas del sobrenadante, éstas se pueden concentrar mediante técnicas que permitan la separación de las diversas fracciones en función de su tamaño o naturaleza química, siendo las más empleadas las siguientes:

- I. la separación mediante diálisis (Schillinger and Lücke, 1989; Parente and Hill, 1992) ó la ultrafiltración (Muriana and Klaenhammer, 1991; Ten Brink et al., 1994);

- II. la precipitación de las proteínas empleando sales, como el sulfato de amonio (Herranz et al., 1999), o ácidos, como el ácido clorhídrico 12 N (Hastings et al., 1991) ;
- III. la extracción de las proteínas con solventes orgánicos, como el etanol, isopropanol, n-butanol, cloroformo, entre otros (Burianek and Yousef, 2000).

Asimismo, la concentración puede realizarse mediante liofilización; no obstante, esta técnica no elimina los componentes del medio de cultivo ni aquellos que pueden interferir posteriormente en la purificación (Schillinger and Lücke, 1989). El proceso de concentración, aunque es necesario para reducir el volumen inicial de trabajo y recuperar las bacteriocinas del medio, no es muy selectivo, por lo que para obtener bacteriocinas con un alto grado de pureza, las muestras se han de someter a otras técnicas que permitan separar las bacteriocinas de las restantes fracciones proteicas, basándose en sus propiedades y características fisicoquímicas.

Hasta la fecha, el protocolo de purificación que mayor difusión ha alcanzado en el campo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas se basa en las propiedades generales de muchos de estos agentes antimicrobianos (péptidos de pequeño tamaño molecular, catiónicos a pH 7.0 e hidrófobos), y consta de 4 etapas básicas:

- 1.- precipitación de las proteínas con sulfato de amonio,
- 2.- cromatografía de intercambio catiónico,
- 3.- cromatografía de interacción hidrofóbica,
- 4.- cromatografía de fase reversa en un sistema HPLC o FPLC.

Este protocolo (Figura N° 3) ha sido aplicado con éxito para la purificación a homogeneidad, entre otras, de la lactococcina G (Nissen-Meyer et al., 1992), la pediocina PA-1 (Nieto-Lozano et al., 1992; Cintas, 1995), la sakacina P y la curvacina A (Tichaczek et al., 1992), la bavaricina A (Larsen et al., 1993), las enterocinas L50A y L50B (Cintas et al., 1998a y 1998b) y los lantibióticos nisina A (Cintas, 1995; Cintas et al., 1998a) y carnocina UI49 (Stoffels et al., 1992). Algunos autores han incorporado una etapa de cromatografía de filtración en geles previa a la de intercambio catiónico, y han purificado exitosamente diversas bacteriocinas como el lantibiótico lactocina S (MØrtvedt et al., 1991; Cintas et al., 1998a) y sistemas de dos péptidos, como la lactacina F (Muriana and Klaenhammer, 1991) y la plantaricina S (Jiménez-Díaz et al., 1995).

Hastings et al. (1991) propusieron un protocolo similar que incluye los siguientes pasos: (i) precipitación de las proteínas con HCL 12 N; (ii) cromatografía de interacción hidrofóbica; (iii) cromatografía de filtración en gel; (iv) cromatografía de fase reversa en un sistema de HPLC. Estos autores observaron que el empleo de cromatografía de intercambio catiónico y diálisis, así como condiciones de alcalinidad, reducían considerablemente la actividad durante el proceso de purificación de la leucocina A-UAL187.

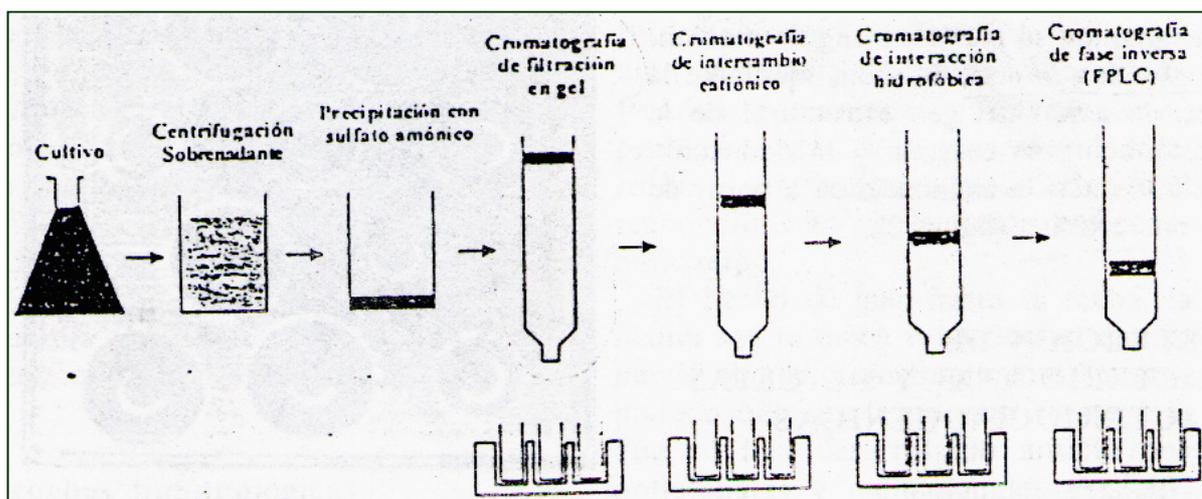


Figura N° 3. Representación esquemática de uno de los protocolos más empleados para la purificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas (Extraída de Martínez Magro et al., 2000).

Alternativamente se han desarrollado métodos basados en la capacidad de ciertas bacteriocinas de adsorberse a las membranas externas de las células productoras (Yang et al., 1992). En general esta metodología implica el ajuste del pH de los cultivos al valor (alrededor de 6.0) en el que se produzca la máxima adsorción de moléculas de bacteriocina; a continuación se recogen las células por centrifugación y se reajusta el pH de la suspensión celular resultante a aproximadamente 2.0, valor en que se suele conseguir la máxima liberación de moléculas de bacteriocina. Una vez obtenida la suspensión con las bacteriocinas, ésta se dializa, se concentra por liofilización y se aplica a una columna de fase inversa acoplada a un sistema HPLC. Con esta metodología sus autores purificaron la pediocina PA-1, la leucocina Lcm 1, la nisina y la sakacina A, obteniendo una recuperación al final del proceso de 106, 96.2, 93.3 y 44.3%, respectivamente.

Se ha desarrollado también otro método alternativo para la purificación a homogeneidad de las bacteriocinas lactococcina A y pediocina PA-1 (Venema et al., 1997). El protocolo consta de tres etapas:

1. Precipitación de las proteínas del sobrenadante con etanol frío
2. Isoelectroenfoque
3. Ultrafiltración.

Aunque este método evita las técnicas cromatográficas, la eficacia del proceso no resulta mejorada.

Tras la purificación a homogeneidad de una bacteriocina, se suele proceder a la determinación de su peso molecular por espectrometría de masas y de su composición y secuencia de aminoácidos. Sin embargo, ciertas bacteriocinas, especialmente las de la clase I, poseen aminoácidos modificados que pueden originar el bloqueo de la reacción de secuenciación. En algunos casos, se puede obtener una secuencia parcial mediante digestión con bromuro de cianógeno u otros agentes químicos. En estas situaciones, la identificación de la bacteriocina se puede conseguir mediante genética inversa, es decir, mediante la secuenciación del gen estructural de la bacteriocina en cuestión y la de la secuencia aminoacídica a partir de la nucleotídica (Figura N° 4).

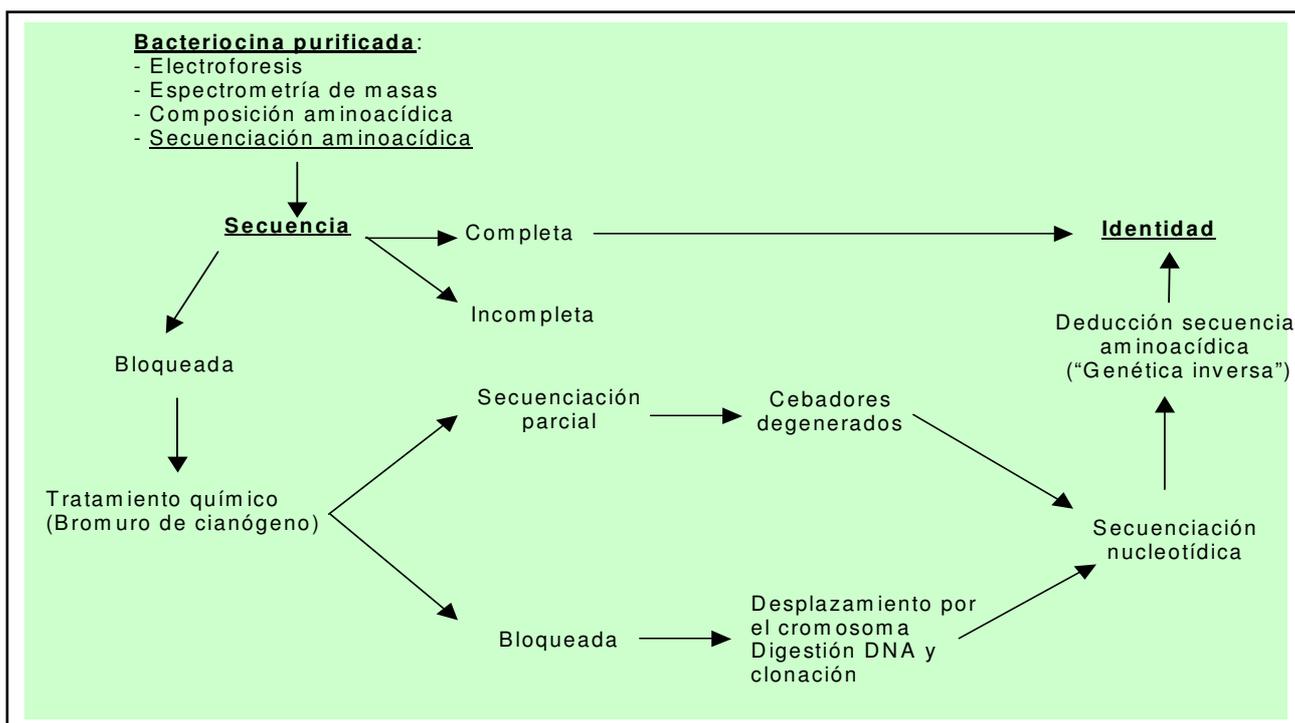


Figura Nº 4. Estrategias que se pueden adoptar para conocer la secuencia aminoacídica de una bacteriocina purificada a homogeneidad. (Extraída de Martínez Magro et al., 2000).

3.1.- Puntos importantes a tener en cuenta cuando se purifica una bacteriocina

3.1.1.- Producción de la bacteriocina.

La misma no es inducible y además, luego de la obtención de los sobrenadantes de cultivo, se observan bajos títulos de actividad bacteriocinogénica. Por lo tanto, es necesario efectuar estudios de producción y comenzar con grandes cantidades de cultivo, antes de purificar estos péptidos. Las condiciones de

incubación, particularmente temperatura, pH y tiempo, influyen fuertemente en la obtención de un buen rendimiento de bacteriocina activa.

Una determinada bacteriocina puede ser producida por varias cepas o especies bacterianas, por lo que su adecuada selección es fundamental con vistas a obtener un mayor título en los sobrenadantes de cultivo. Estas diferencias entre cepas y especies se atribuyen a los niveles de expresión y de actividad de las enzimas encargadas de su biosíntesis, así como también a la inmunidad hacia su propia bacteriocina (Parente and Ricciardi, 1999).

Asimismo, las condiciones de cultivo óptimas deben ser determinadas empíricamente para cada cepa u organismo productor.

3.1.2.- Composición del medio de crecimiento.

Éste afecta significativamente tanto la producción como la purificación de una bacteriocina. En general, las bacterias lácticas son cultivadas en medios de cultivo complejos, tales como MRS, M17, ELB y APT (Parente and Hill, 1992). Todos ellos contienen cantidades significativas de péptidos (10-30 g/L) en el rango de peso molecular de la mayoría de las bacteriocinas (3000-6000 Da), mientras que la concentración de bacteriocinas es baja (10-100 mg/L de medio de cultivo) (Carolissen-Mackay et al., 1997). Este alto contenido de péptidos en el MRS, inicialmente utilizado para la purificación de la lactacina B, interfirió con el proceso de purificación (Barefoot and Klaenhammer, 1984). Un medio semidefinido en el cual la triptona fue sustituida por un digerido pancreático de caseína, eliminó los niveles excesivos de contaminantes del medio y probó ser más exitoso (Joerger and Klaenhammer, 1986; Hastings et al, 1991). Por otro lado, Rammelsberg et al. (1990) reportaron que el medio complejo es inadecuado para la purificación de la caseicina

80 debido a componentes macromoleculares desconocidos, pero parece ser que el medio debe contener una complejidad de nutrientes para lograr la producción óptima de la bacteriocina. Yang and Ray (1994) demostraron que el medio complejo era necesario para la producción de altos niveles de bacteriocina, mientras que en cambio resulta crítico para la purificación.

Otros constituyentes del medio pueden tanto estimular como interferir en la producción y purificación de las bacteriocinas. Por ejemplo, se ha informado que el Tween 80 interfiere con las subsecuentes etapas de purificación (Muriana and Klaenhammer, 1991; van Laack et al., 1992). Además, la presencia de Tween 80 al 0.01% disminuye la actividad antimicrobiana de la pediocina A (Piva and Headon, 1994) y de la lactocina S (MØrtvedt et al., 1991). Sin embargo, el agregado tanto de Tween 80 como de otros surfactantes, tales como Nonidet P-40 y SDS, llevaron a un aumento en la actividad de hasta 400% en el extracto crudo de la lactacina F (Muriana and Klaenhammer, 1991). Se ha descrito que el Tween 80 formaría micelas con las proteínas en el medio y esto resultaría en una estabilización de la actividad. Por el contrario, la carnosina LA44a se produjo en menor concentración cuando *Leuconostoc carnosum* LA44a creció en MRS con concentración disminuida de Tween 80 (van Laack et al., 1992). Efectos similares se observaron para la mesenterocina 5 cuando el Tween 80 se incluyó en varios medios comerciales (Daba et al., 1993).

El tratamiento de mesenterocina 5 con SDS resultó en un incremento notable en la actividad bacteriocinogénica; por otro lado, el agregado de extracto de levadura a varios medios, principalmente MRS, Elliker, suero y permeado de suero, llevó a un aumento notable en la actividad de esta bacteriocina producida por

L. mesenteroides subsp. *mesenteroides* UL5 (Daba et al., 1991). Stoffels et al. (1992) reportaron que el Tween 20 estimula la actividad lítica de la carnocina U149.

Dializados de medios complejos, conteniendo sólo fracciones de bajo peso molecular, fueron efectivos en la producción de pediocina AcH (Bhunja et al., 1988), pero no para bacteriocinas lactocócicas (Geis et al., 1983). Por último, la adición de NaCl 4% (p/v) al caldo MRS resultó en un aumento significativo de la actividad de la plantaricina S, y también promovió la detección de una segunda bacteriocina, plantaricina T, ambas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPCO10 (Jiménez-Díaz et al., 1993).

3.1.3.- Técnicas de purificación.

La utilización de ciertas técnicas de purificación conlleva grandes pérdidas de actividad. Sin embargo, este comportamiento depende de cada bacteriocina en particular. Así, se detectaron grandes mermas en la actividad de la caseicina 80 cuando se utilizó ultrafiltración (Rammelsberg et al., 1990), pero, por otro lado, esta técnica fue exitosa en el caso de la lactacina F (Muriana and Klaenhammer, 1991). La diálisis con una membrana de 2000 Da de cut-off ocasionó grandes pérdidas en la actividad. También técnicas que introducían grandes cambios en el pH generalmente reflejaban grandes pérdidas en la actividad, mientras que procedimientos en donde el pH se mantenía constante, aunque bajo (pH 2.0-4.0), resultaban en buenos rendimientos (Hastings et al., 1991).

3.1.4.- Caracterización de bacteriocinas por electroforesis en geles.

Existen problemas de visualización de muchas bacteriocinas luego de someterlas a SDS-PAGE. Debido a sus características hidrofóbicas y de tamaño molecular pequeño, las bacteriocinas suelen difundirse fuera del gel de poliacrilamida durante la tinción. El fijador normal (ácido acético-metanol) es reemplazado así por uno más activo (como formaldehído o glutaraldehído), de modo tal que las bandas puedan ser vistas. El método de tinción suele ejercer también una profunda influencia en la detección de estos inhibidores proteicos. Es así como la lactacina F sólo pudo ser detectada mediante tinción con plata y no con el colorante Coomassie Blue R-250 (Muriana and Klaenhammer, 1991). La masa molecular de la lactacina B fue determinada por el método descrito por Bhunia et al. (1987); sin embargo no pudo ser detectada por tinción con plata, probablemente debido a su baja concentración. Jiménez-Díaz et al. (1993) no pudieron determinar el tamaño actual de la plantaricina T debido a la errática migración de péptidos más pequeños de 2.5 kDa en el gel de separación del SDS-PAGE por el método de Schägger and von Jagow (1987). Sin embargo, la plantaricina S fue detectada en el mismo gel a un tamaño de 2.5 kDa. Debido a la presencia de proteínas contaminantes, una preparación cruda concentrada de mesenterocina 5 reveló una mancha en vez de una banda específica, luego del SDS-PAGE (Daba et al., 1991). Al analizar los geles de SDS-PAGE, Garver and Muriana (1994) observaron que los complejos Tween 80-curvaticina FS47 comigraban con la bacteriocina y que, luego de su detección por el método directo, la banda antimicrobiana tenía un peso molecular cercano al monómero de Tween 80 (PM: 1300 Da). Por otro lado, al teñir el gel, la banda era de color amarillo; esto es debido a que el Tween 80 en geles de

SDS-PAGE inhibe la tinción con plata de las proteínas que están unidas al mismo, generando tal coloración.

Piva and Headon (1994) reportaron que el análisis directo por SDS-PAGE descrito por Bhunia et al. (1988) es difícil de llevar a cabo. Le atribuyen la complejidad del estudio a dos factores principales: (i) la cepa indicadora es sensible al SDS, y (ii) el SDS inhibe la actividad de la bacteriocina. Sin embargo, este método ha sido exitosamente utilizado para la identificación de la mesentericina Y105, bavaricina A y acidocina B (Hécharad et al., 1992; Larsen et al., 1993; Van der Vossen et al., 1994).

3.1.5.- Determinación de la concentración de proteína y de la actividad específica.

Varios factores suelen impactar en la determinación de la actividad específica, y por ende en la medida del número de veces en que se ha logrado purificar la proteína/péptido, siguiendo un protocolo determinado. La sensibilidad del ensayo cuantitativo de proteínas y de los ensayos de actividad antagonística son importantes factores a tener en cuenta cuando se evalúa el grado de pureza y la actividad específica.

De este modo, los ensayos inhibitorios dependen de las condiciones en que se realizaron las pruebas y de la susceptibilidad de los organismos indicadores utilizados. También la densidad del inóculo es un factor determinante en la sensibilidad del método (Tagg et al., 1976).

Una variedad de ensayos están disponibles para la determinación de la concentración de proteínas: Folin-Lowry, Biuret, Bradford, Ácido bicinconínico y la determinación espectrofotométrica directa a 220 y a 280 nm. Cada método posee

diferentes sensibilidades y limitaciones, por lo que debe seleccionarse cuidadosamente el más adecuado (Carolissen-Mackay et al., 1997).

3.1.6- Pureza y estabilidad

Se sabe que a medida que la bacteriocina está más pura es menos estable. La mesentericina Y105 (Hécharde et al., 1992) y la leucocina A-UAL 187 (Hastings et al., 1991) puras, son altamente inestables, o sea, pierden con facilidad su capacidad antimicrobiana. El problema con la inestabilidad no es debido a la proteólisis, sino que puede deberse a modificaciones estructurales. Además, la estabilidad es mayor con bajos valores de pH que con valores altos. El agregado de otras proteínas (como BSA) a la bacteriocina pura ha permitido lograr una mayor estabilidad (Tagg et al., 1976; Hastings et al., 1991).

4.- DETECCIÓN DE BACTERIOCINAS Y DE CEPAS BACTERIOCINOGÉNICAS

4.1.- Pruebas biológicas

Normalmente, el primer indicio de la actividad bacteriocinogénica de las bacterias lácticas se obtiene mediante pruebas biológicas o bioensayos que detectan la actividad antimicrobiana que estos péptidos ejercen en los microorganismos indicadores (Figura N° 5).

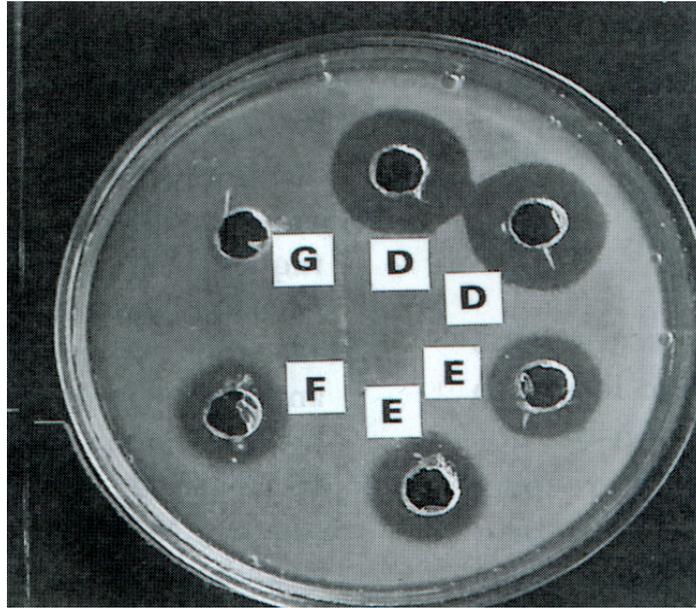


Figura Nº 5. Detección de la actividad bacteriocinogénica presentes en los sobrenadantes de diversas bacterias lácticas mediante la prueba de difusión en agar.

Sin embargo, sólo en el caso de la nisina se dispone de una unidad internacional de actividad, referida a la actividad de una cantidad determinada de una preparación internacional de referencia. La existencia de unidades similares de otras bacteriocinas permitiría no sólo la estandarización de las preparaciones y los métodos de análisis empleados en los laboratorios, sino también la comparación de la sensibilidad relativa de distintas especies y cepas. La ausencia de unidades internacionales ha propiciado la proliferación de diversas unidades arbitrarias de actividad, lo que imposibilita la extrapolación de los resultados obtenidos por los distintos grupos de investigación.

La prueba de difusión en agar es probablemente el bioensayo más utilizado para la detección de actividad bacteriocinogénica. En este caso, una “Unidad arbitraria” (UA) se suele definir como la recíproca de la dilución más alta de una muestra que produce una zona de inhibición definida en una placa de agar inoculada con un microorganismo indicador sensible (Pucci et al., 1988; Bhunia et al., 1991; Henderson et al., 1992). Por otra parte, la actividad antimicrobiana de las fracciones que se obtienen en las distintas etapas de purificación de una bacteriocina se suele determinar mediante métodos turbidimétricos, utilizando placas microtituladoras. En este caso, una “Unidad bacteriocina” (BU) se define como la recíproca de la dilución más alta que inhibe en un 50% el crecimiento de un indicador (Geis et al., 1983; Holo et al., 1991).

Las pruebas biológicas han sido, y siguen siendo, muy útiles en el campo de las bacteriocinas, debido a su sencillez y sensibilidad. De hecho, hasta hace pocos años han sido las únicas pruebas disponibles. Lamentablemente se trata de pruebas inespecíficas y difícilmente reproducibles, ya que los resultados pueden variar notablemente en función de los numerosos parámetros que conforman las condiciones del ensayo (Blom et al., 1997). La inespecificidad de los bioensayos ha propiciado que diversos grupos de investigación hayan aislado, caracterizado y purificado de forma simultánea e independiente la misma bacteriocina, como la lactocina S (Mortvedt and Nes, 1990; Rodríguez et al., 1995) o la Pediocina PA-1 (Henderson et al., 1992; Nieto-Lozano et al., 1992; Daba et al., 1994; Ennahar et al., 1996; Rodríguez et al., 1997a), a partir de cepas diferentes. Dado que los protocolos de purificación y secuenciación de bacteriocinas requieren el empleo de técnicas caras, complejas y/o laboriosas, sería deseable disponer de técnicas y métodos

alternativos que detecten (y si es posible cuantifiquen) de una forma rápida y específica a aquellas bacteriocinas previamente identificadas.

4.2.- Pruebas genéticas

Diversas técnicas genéticas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la hibridación DNA-DNA, posibilitan la detección específica y rápida de secuencias pertenecientes a los genes estructurales de aquellas bacteriocinas ya caracterizadas. Es decir, permiten conocer si una cepa tiene el potencial genético necesario para producir una bacteriocina dada. Obviamente los oligonucleótidos que se empleen como cebadores o sondas deben ser cuidadosamente diseñados, comprobando que no existan homologías significativas entre sus secuencias y las correspondientes a los genes estructurales de otras bacteriocinas depositados en las bases de datos de uso habitual (GenBank, EMBL).

La PCR ha sido empleada con éxito para la detección de cepas de bacterias lácticas que producen bacteriocinas previamente caracterizadas (Martínez et al., 1995). Es conveniente secuenciar los amplicones obtenidos mediante esta técnica para dilucidar si la secuencia detectada codifica a la bacteriocina investigada o bien a una variante distinta. Se han descrito variantes de una misma bacteriocina, como la nisina A y la nisina Z, que se diferencian en un solo aminoácido, fruto de la sustitución de un único nucleótido, una diferencia que no puede ser detectada mediante la PCR.

En cuanto a la hibridación DNA-DNA, las sondas para detectar genes estructurales de bacteriocinas pueden estar constituidas por amplicones purificados o por oligonucleótidos específicamente diseñados para tal fin. Las sondas se deben marcar (con radioactividad, digoxigenina, quimioluminiscencia, etc.) para que la

hibridación con las secuencias complementarias que existan en las muestras problema se pueda detectar de forma sencilla e inequívoca. Las tres modalidades de hibridación DNA-DNA más utilizadas en el campo de las bacteriocinas son la técnica “*dot-blot*” (Rodríguez et al., 1997a), la técnica “*Southern blot*” (Rodríguez et al., 1995) y la hibridación en colonia (Martínez et al., 1998; Rodríguez et al., 1998).

4.3.- Pruebas inmunológicas

La generación de anticuerpos específicos frente a las bacteriocinas permite su detección y cuantificación en los sobrenadantes de las cepas productoras y en los alimentos. Adicionalmente, posibilita la creación de columnas para su purificación específica y sencilla mediante cromatografía de inmunoafinidad. Finalmente, facilita la investigación en diversos aspectos de las bacteriocinas, como por ejemplo en el esclarecimiento de las relaciones estructura –función.

A pesar de ello, los anticuerpos y las técnicas inmunológicas han tenido una repercusión muy limitada como herramientas analíticas para la detección y cuantificación de bacteriocinas. Este hecho se debe, en primer lugar, a las dificultades para obtener la cantidad de bacteriocina purificada necesaria para el desarrollo de protocolos de inmunización en animales de experimentación. Actualmente, no existen bacteriocinas disponibles comercialmente (a excepción de la nisina) y los protocolos de purificación a homogeneidad no permiten la obtención de las cantidades necesarias en un tiempo y/o con un gasto razonable. En segundo lugar, el pequeño tamaño de gran parte de las bacteriocinas de interés industrial hace que probablemente se comporten como haptenos. Por lo tanto, no es de extrañar que los intentos realizados para generar anticuerpos específicos frente a la nisina (Stringer et al., 1995) y a la pediocina PA-1 (Moreira, 1993; Bhunia, 1994) sin

conjugar hayan fracasado o proporcionado resultados insatisfactorios. De hecho, la elección de las moléculas portadoras y de los métodos de conjugación puede influir decisivamente en el éxito de la inmunización. Finalmente, ciertas características de las bacteriocinas (hidrofobicidad, tendencia a la agregación, presencia de aminoácidos modificados postraduccionalmente, etc.) pueden afectar negativamente al desarrollo de anticuerpos específicos y/o al reconocimiento de la unión antígeno-anticuerpo.

El hecho de que hasta la fecha la nisina sea la única bacteriocina que se puede obtener comercialmente, ha propiciado que sea la primera frente a la que se han desarrollado anticuerpos policlonales y monoclonales específicos y sensibles (Suárez et al., 1996a; Suárez et al., 1996b; Bouksaim et al., 1998; Bouksaim et al., 1999). El límite de detección de nisina empleando un ELISA directo competitivo es de entre 1 y 100 ng/mL, en el caso de los anticuerpos policlonales, y de aproximadamente 10 ng/mL en el de los monoclonales (Suárez et al., 1996b). Estos anticuerpos han permitido la detección y cuantificación de nisina en quesos y sueros lácteos (Suárez et al., 1996b; Bouksaim et al., 1998) y la construcción de columnas para su purificación a homogeneidad mediante cromatografía de inmunoafinidad (Suárez et al., 1997). Los anticuerpos anti-nisina, combinados con la microscopía de transmisión de electrones, posibilitan la inmunolocalización celular de esta bacteriocina y la observación de su acción bactericida en las células sensibles (Bouksaim et al., 1999).

Una estrategia que se ha utilizado con éxito en los últimos años para obtener anticuerpos policlonales frente a otras bacteriocinas no disponibles comercialmente consiste en el empleo como inmunógeno de fragmentos sintéticos deducidos de la secuencia aminoacídica de la bacteriocina de interés, previamente conjugados a

moléculas portadoras (Martínez et al., 1997). Es decir, se generan anticuerpos antipeptídicos con actividad predeterminada frente a la bacteriocina de la que deriva el fragmento sintetizado químicamente. Previamente es recomendable evaluar el potencial inmunogénico de las distintas regiones de la bacteriocina, analizando parámetros teóricos como los índices de hidrofiliidad y antigenicidad mediante diferentes programas informáticos, (Devereux et al., 1984).

En este contexto, se han empleado los fragmentos sintéticos PH1 y PH2, formados por los 9 aminoácidos N-terminales y los 11 carboxi-terminales de la pediocina PA-1, respectivamente, para la generación en conejos de anticuerpos de especificidad predeterminada frente a esta bacteriocina (Martínez et al., 1998; Martínez et al., 1999). Tras la conjugación de los péptidos, se inició la inmunización de los animales, que condujo a la obtención de anticuerpos séricos de elevada afinidad relativa, que reconocían no sólo a los fragmentos sino también a la pediocina PA-1. Respecto de los anticuerpos generados frente al fragmento PH2, los límites de detección de pediocina en caldo MRS fueron de 2500, 1000, 25 y <25 ng/mL, en inmunoensayos tipo *protein slot-blot*, ELISA indirecto no competitivo, ELISA indirecto competitivo y ELISA directo competitivo, respectivamente. Los límites de detección de los anticuerpos generados frente al fragmento PH1 fueron inferiores. Los anticuerpos anti-PH1 y anti-PH2 permitieron la detección de pediocina PA-1 en los sobrenadantes de cultivos de las cepas productoras, mostrando una inmunorreactividad nula o insignificante con los sobrenadantes de bacterias lácticas productoras de otras bacteriocinas.

4.4.- Otras pruebas

El potencial de la espectrometría de masas para la detección de bacteriocinas en sobrenadantes de cultivos bacterianos y en fracciones obtenidas durante su proceso de purificación, ha sido puesto de manifiesto por Rose et al., (1999). Se trata de un método rápido y sensible, pero cuyo uso rutinario está fuera del alcance de muchos laboratorios.

Recientemente, Wahlstrom and Saris (1999) han desarrollado un ensayo basado en el fenómeno de quimioluminiscencia, que permite la cuantificación de nisina en medios de cultivo líquidos y en leche, con un límite de detección de 0.0125 y 0.075 ng/mL, respectivamente.

5.- MODO DE ACCIÓN

En general, la acción antimicrobiana de las bacteriocinas se debe a la desestabilización funcional de las membranas citoplasmáticas de las células sensibles. Las bacteriocinas actúan sobre sus dianas primarias, las membranas, a través de un proceso que consta de tres etapas básicas:

- unión a la membrana
- Inserción en la membrana
- formación de poros

Este fenómeno conduce, en última instancia, a la muerte celular (Figura N° 6).

Se trata de un mecanismo compartido por la mayoría de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (Abee, 1995; Hildeng-Hauge et al., 1998; Moll et al., 1999).

La unión inicial de las bacteriocinas a las membranas está gobernada por interacciones electrostáticas entre los residuos cargados positivamente de los péptidos y los grupos negativos de los fosfolípidos de las membranas (Driessen et al., 1995; Demel et al., 1996; Chen et al., 1997a; Chen et al., 1997b; El-Jastimi and Lafleur, 1997; Chen et al., 1998). Las regiones de las bacteriocinas que determinan la especificidad, deben reconocer e interactuar de una forma específica con entidades localizadas en las membranas de las células diana. No obstante, en el caso de las bacteriocinas de amplio espectro, como lo son las pertenecientes a la clase I, parece más probable que sea un componente determinado de la membrana, y no un receptor como tal, el que reaccione con la región de la bacteriocina que determina la especificidad; se propone que la conductividad y estabilidad de los poros inducidos por estas bacteriocinas estarían estimuladas por el lípido II, el precursor del peptidoglicano (Brötz et al., 1998; Fimland et al., 1996). La interacción no sería estereoespecífica, ya que la especificidad de cepa que muestran las bacteriocinas no depende de interacciones de este tipo (Fimland et al., 1998).

En cambio, para las bacteriocinas de clase II, existirían receptores en la membrana objetivo que determinarían la especificidad (Venema et al., 1995a y 1995b).

Actualmente existen dos grandes modelos que explican el mecanismo por el que las bacteriocinas generan poros en las membranas plasmáticas: el modelo de cuña (wedge-like model), aplicable a la nisina y otros antibióticos, y el modelo de duela de barril (barrelstave-like model), aplicable a diversas bacteriocinas de la clase II (Moll et al., 1999) (Figura N° 6). En cualquier caso, la formación del complejo de poración en las membranas provoca la disipación de la fuerza protón-motriz (PMF) y, en última instancia, la muerte celular (Jack et al., 1995). La PMF es un gradiente

electroquímico necesario para que se efectúen gran parte de los procesos metabólicos dependientes de energía que tienen lugar en las células; consta de dos componentes:

- un potencial de membrana ($\Delta\Psi$);
- un gradiente de pH (ΔpH) (Montville and Bruno, 1994).

En los últimos dos años, el desarrollo de técnicas para estudiar por separado ambos componentes, y de sistemas de membranas artificiales, ha permitido evaluar el efecto de diversas bacteriocinas sobre la PMF, un parámetro clave para comprender su mecanismo de acción.

En general, el colapso de la PMF conduce a una reducción significativa del contenido de ATP intracelular, inhabilita el transporte activo de nutrientes e impide el mantenimiento de concentraciones adecuadas de ciertos iones, como K^+ y Mg^{2+} . En este sentido, los resultados obtenidos con diversas bacteriocinas, como la nisina (Bruno et al., 1992; Gao et al., 1991; Okereke and Montville, 1992; Ruhr and Sahl, 1985), la pediocina PA-1 (Christensen and Hutkins, 1992; Chikidans et al., 1993), la lactocina A (van Belkum et al., 1991) y la lactocina B (Venema et al., 1993), condujeron a Bruno y Montville (1993) a la conclusión de que las bacteriocinas de las bacterias lácticas compartían un mecanismo de acción común: la disipación de la PMF en las células sensibles (Figura N° 6)

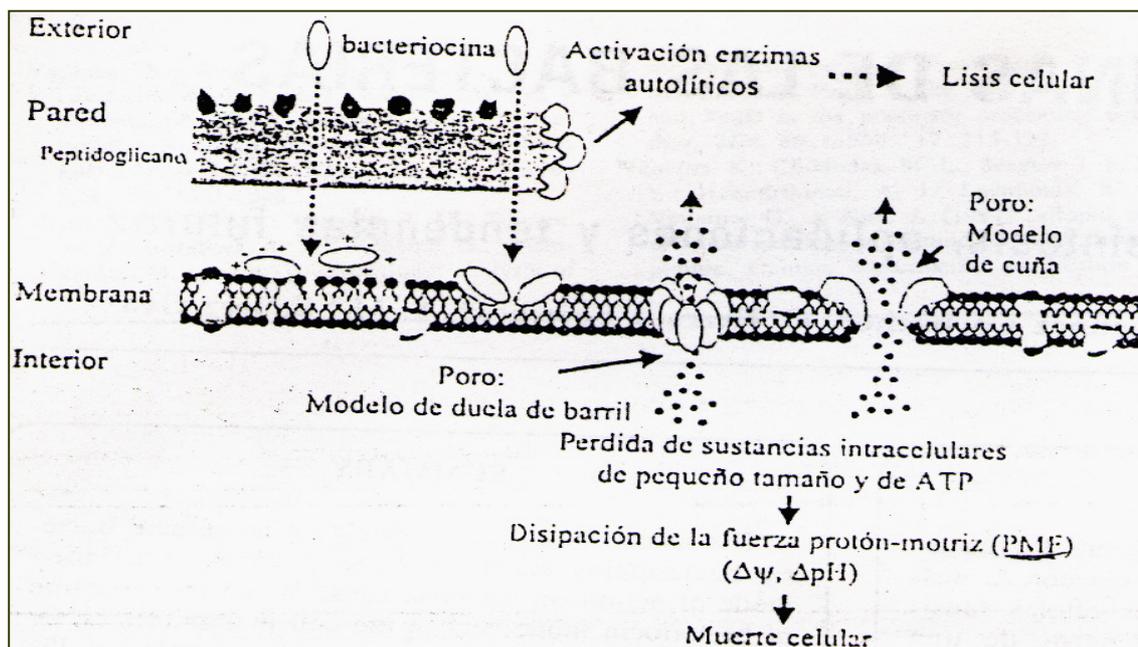


Figura Nº 6 . Mecanismo general de acción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas en las células Gram (+) sensibles (Extraído de Martínez Magro et al., 2000).

También se ha sugerido que la constitución global de las membranas, y no sólo su composición lipídica, podría ejercer una marcada influencia en la actividad formadora de poros de una bacteriocina, ya que las proteínas de membranas podrían intervenir decisivamente en el ordenamiento lipídico de esta estructura (Bennik et al., 1997). En este sentido, aunque las bacterias naturalmente resistentes a una bacteriocina no pueden evitar la inserción de monómeros de una bacteriocina, la composición global de sus membranas impediría que se formaran poros de suficiente duración y diámetro como para causar la muerte celular. Es así como cepas patógenas (entre ellas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. marcescens*) y resistentes Gram (-), pueden volverse sensibles a la acción de bacteriocinas de bacterias Gram (+), mediante el uso de agentes quelantes (como EDTA), cuya

función reside en disminuir las propiedades protectoras provistas por la membrana lipopolisacáridica externa de las bacterias Gram (-) (Helander et al., 1997; Scanell et al., 1997). Esto sugiere que diferentes combinaciones de bacteriocinas, otros aditivos y procesos tecnológicos aplicados de la manera adecuada, de modo que permitan convertir a una cepa resistente en sensible mediante la alteración de su membrana externa, podrían convertirse en una excelente estrategia de control de microorganismos patógenos y contaminantes de alimentos, en especial de bacterias Gram (-).

Una vez que las moléculas de bacteriocinas han formado un complejo de poración, la muerte de las células sensibles puede ir acompañada o no de un proceso de lisis celular (Pucci et al., 1988; Bhunia et al., 1991; Motlagh et al., 1991). Bhunia et al., (1991) sugirieron que la muerte celular puede activar sistemas autolíticos que, a su vez, serían responsables de la lisis en algunas cepas. En este sentido se ha observado que los lantibióticos nisina y Pep5 son capaces de liberar y activar las enzimas autolíticas normalmente unidas a los ácidos teicoicos, lipoteicoicos y teicurónicos de la pared celular de *Staphylococcus simulans* 22 (Bierbaum and Sahl, 1988).

A pesar de que muchas bacteriocinas de bacterias lácticas poseen estructuras primarias similares, su espectro antimicrobiano varía mucho más de lo que se podría esperar de una mera interacción entre un péptido catiónico y los lípidos de la membrana celular (Eijsink et al., 1998). Este hecho sugiere que diferencias muy sutiles en la estructura de los péptidos pueden provocar diferencias notables en su especificidad. El análisis de las relaciones entre la estructura primaria y la especificidad celular podría permitir la identificación de interacciones péptido-célula claves para determinar si una célula es sensible o no a un péptido

antimicrobiano (Fimland et al., 1998). Por este motivo, el establecimiento de las relaciones estructura-función constituye actualmente uno de los grandes retos en el campo de las bacteriocinas.

6.- APLICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

En las últimas décadas, las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas de origen alimentario han despertado un gran interés científico-tecnológico por su potencial como agentes bioconservantes de alimentos. Ello se debe a que, en primer lugar, son sustancias producidas por microorganismos que gozan del estatus de GRAS (*"Generally Recognized as Safe"*). En segundo lugar, a que debido a su naturaleza peptídica son degradadas e inactivadas enzimáticamente en el tracto digestivo, por lo que no originan disbiosis intestinales ni trastornos de tipo alérgico. Finalmente, a que la mayor parte de las bacteriocinas de interés industrial tienen un amplio espectro antimicrobiano y actúan sinérgicamente con otros sistemas de conservación.

Esta última característica es particularmente relevante desde un punto de vista práctico. Frecuentemente se ha observado que la aplicación de bacteriocinas en sistemas alimentarios provoca reducciones típicas de entre 1 y 4 ciclos logarítmicos en las poblaciones de los microorganismos sensibles (Muriana, 1996; Stiles, 1996). Aunque estos niveles de inhibición pueden considerarse inaceptables como método de conservación único o primario, resultarían muy útiles como factor de seguridad adicional en un sistema de barreras (Leistner, 1992). La acción sinérgica de las bacteriocinas con otras barreras (temperatura, atmósferas modificadas, NaCl, nitratos, etc.) podría contribuir tanto a la obtención de alimentos

con una calidad higiénica óptima, como a una reducción en las concentraciones de ciertos aditivos químicos o en la intensidad de algunos tratamientos tecnológicos.

La adopción de un sistema de barreras es especialmente recomendable para evitar la presencia en los alimentos de microorganismos que, como *Listeria monocytogenes*, son difíciles de erradicar por medio de sistemas de conservación clásicos como la acidificación o la refrigeración. Por otra parte, dado que las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas no sólo se encuentran de forma natural en muchos alimentos sino que son percibidas positivamente por los consumidores, podrían ser útiles como agentes que confieran cierta protección a aquellos alimentos que son particularmente susceptibles al crecimiento microbiano, como los mínimamente procesados.

6.1.- Formas de aplicación

Existen tres estrategias principales para la aplicación de las bacteriocinas en la conservación de los alimentos (Abee et al., 1995; Holzapfel et al., 1995; Schillinger et al., 1996; Aymerich and Hugas, 1998):

- 1- Inoculación del alimento con la bacteria láctica, la cual produce la bacteriocina *in situ*.
- 2- Empleo, como ingrediente alimentario, de un medio previamente fermentado con una cepa bacteriocinogénica.
- 3- Adición de la bacteriocina purificada o semipurificada.

Prácticamente cualquier bacteria láctica bacteriocinogénica y/o cualquier bacteriocina se pueden emplear en la industria alimentaria bajo las dos primeras formas de aplicación. De hecho, las bacterias lácticas bacteriocinogénicas se han

utilizado de forma empírica o inadvertidamente durante siglos en las fermentaciones alimentarias (Stiles, 1996). En la tercera forma de aplicación, la acción está más controlada, ya que la cantidad de bacteriocina aplicada es conocida; sin embargo, tiene el inconveniente de estar sujeta a la regulación de la lista positiva de aditivos alimentarios.

Hasta la fecha, la nisina es la única bacteriocina autorizada como conservante alimentario. Actualmente su empleo está aceptado en más de 50 países, existiendo notables diferencias en cuanto a qué alimentos y en qué concentraciones se puede añadir (Vandenbergh, 1993). La Unión Europea (UE) otorgó a esta bacteriocina el número de aditivo alimentario E-234. Recientemente se ha aprobado en Estados Unidos el uso como ingrediente alimentario de un fermentado (*ALTA 2341*) que contiene pediocina PA-1. A pesar de que la presencia de la bacteriocina es el hecho más remarcado publicitariamente, el producto no está sujeto a las restricciones de los aditivos alimentarios al comercializarse en forma de fermentado. Actualmente existen algunas patentes europeas y estadounidenses que cubren el empleo de la pediocina PA-1 en productos lácteos (González, 1989) y cárnicos (Vandenbergh et al., 1989; Bourdreaux and Matrozza, 1992).

6.2.- Factores que afectan la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos

A pesar del innegable potencial práctico de las bacteriocinas, no es conveniente extraer conclusiones directas de resultados obtenidos en experimentos *in vitro* para predecir la eficacia de las bacteriocinas en sistemas *in vivo*. Ello se debe a que existe una serie de factores que pueden comprometer la eficacia de las bacteriocinas y / o de las cepas productoras en aplicaciones industriales (Holzapfel et al., 1995; Schillinger et al., 1996; Stiles, 1996).

Entre los factores que afectan la eficacia de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas se destacan los siguientes:

- 1.- La existencia de un ambiente inadecuado (pH, temperatura, nutrientes, etc.) para la síntesis de bacteriocinas.
- 2.- La pérdida espontánea de la bacteriocinogenicidad, lo cual puede suceder, por ejemplo, cuando los determinantes genéticos para la biosíntesis de las bacteriocinas se encuentran localizados en plásmidos inestables.
- 3.- La existencia de fagos que destruyan o impidan el crecimiento normal de las cepas bacteriocinogénicas.
- 4.- Los fenómenos de antagonismo con otros microorganismos presentes en el alimento.

En lo que respecta a los factores que pueden influir negativamente en la acción de las bacteriocinas, los principales son:

- 1.- La aparición de microorganismos resistentes. Se trata de un problema particularmente preocupante, ya que las células que adquieren resistencia frente a una bacteriocina suelen mostrar resistencias cruzadas frente a otras bacteriocinas de la misma clase (Rekhif et al., 1994).
- 2.- La existencia en el alimento de condiciones (por ejemplo, pH, proteasas, procesos oxidativos, aditivos alimentarios) que alteren la estructura y / o función de las bacteriocinas.

- 3.- La posible unión de las bacteriocinas a ciertos componentes alimentarios tales como grasas o proteínas.
- 4.- La dificultad para lograr que la bacteriocina se solubilice o se distribuya uniformemente en la matriz alimentaria, especialmente en alimentos que se elaboran con materias primas sólidas y / o semisólidas.

7.- TENDENCIAS ACTUALES Y FUTURAS

Gran parte de las investigaciones actuales en el campo de las bacteriocinas se dirigen a eliminar o reducir al máximo los problemas que plantean los factores anteriormente expuestos, y que suponen una seria limitación para la generalización del empleo de estos péptidos antimicrobianos como agentes bioconservantes. A continuación se exponen algunas de las estrategias seguidas para tal fin, junto con otras que persiguen la obtención de herramientas que permitan la cuantificación de estos péptidos antimicrobianos.

7.1.- Combinación de bacteriocinas

La actividad y el espectro antimicrobiano de una bacteriocina se pueden aumentar si se combina con otras bacteriocinas. Se ha observado que una combinación de sakacina A y nisina A inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* de una forma más acusada que cualquiera de las dos bacteriocinas por separado (Schillinger et al., 1996). De forma similar, Hanlin et al. (1993) demostraron la mayor actividad de una combinación de nisina A y pediocina PA-1 cuando se la comparaba con ambas bacteriocinas por separado.

Mulet-Powell et al. (1998) también han mostrado el efecto sinérgico de diversas combinaciones de bacteriocinas pertenecientes a clases distintas.

La emergencia de microorganismos resistentes a las bacteriocinas, particularmente a las de la clase II, parece un hecho bastante común. En este sentido, la combinación de bacteriocinas pertenecientes a clases distintas puede tener consecuencias prácticas muy positivas. Rekhif et al., (1994) observaron que los mutantes de *L. monocytogenes* que habían adquirido resistencia cruzada frente a diversas bacteriocinas de la clase II, mantenían su sensibilidad intacta frente a los antibióticos.

7.2.- Ingeniería proteica y síntesis química

Los espectaculares avances en la genética de las bacterias lácticas han conducido al desarrollo de estrategias de ingeniería proteica que permiten introducir un gran número de modificaciones en las moléculas de bacteriocinas (Dodd et al., 1992; Kuipers et al., 1992; Dodd et al., 1995; Dodd et al., 1996; Quadri et al., 1997). Este enfoque ha abierto la posibilidad de producir variantes de bacteriocinas con propiedades ventajosas, como una mayor actividad biológica, un mayor espectro de inhibición o una mejor estabilidad y / o solubilidad. Alternativamente, y dado que la mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas son péptidos de pequeño tamaño, también se pueden obtener variantes de bacteriocinas de composición conocida mediante los procedimientos de síntesis química de péptidos (Fimland et al., 1996; Fimland et al., 1998).

7.3.- Producción heteróloga

En ocasiones, sería interesante disponer de cultivos iniciadores lácticos que produjeran *in situ* una bacteriocina con actividad frente a microorganismos indeseables en los alimentos en los que habitualmente se aplican esos cultivos. Sin

embargo, muchas bacteriocinas son producidas de forma natural por especies adaptadas a unos sustratos alimenticios pero incapaces de crecer en otros. Por este motivo, en los últimos años se está prestando mucha atención a la producción heteróloga de bacteriocinas de interés, por parte de bacterias lácticas no bacteriocinogénicas pero bien adaptadas al alimento en el que se desea aplicar y / o con propiedades tecnológicas relevantes.

Por ejemplo, los pediococos son microorganismos normalmente asociados con productos vegetales y cárnicos, y se emplean frecuentemente en la fermentación comercial de este tipo de alimentos. Algunas cepas, la mayoría pertenecientes a la especie *Pediococcus acidilactici*, producen pediocina PA-1, una bacteriocina de amplio espectro antimicrobiano y particularmente activa frente a *L. monocytogenes*. Sin embargo, los pediococos están escasamente adaptados para la colonización de alimentos en los que no residen de forma natural. En este sentido, su capacidad para fermentar la lactosa es escasa y su actividad proteolítica en leche es irrelevante (Caldwell et al., 1996). Por lo tanto, no son los candidatos ideales para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en leche y productos lácteos. *L. monocytogenes* es uno de los microorganismos que más preocupan actualmente a las industrias lácteas ya que, aunque la listeriosis no es una enfermedad frecuente, los brotes típicos tienen un gran impacto socio-económico, debido a que se acompañan de las tasas de mortalidad más elevadas provocadas por patógenos de transmisión alimentaria en los países desarrollados.

En este contexto, se han obtenido cepas de *Lactococcus lactis*, un microorganismo bien adaptado a los ambientes lácteos, que producen pediocina PA-1 u otras bacteriocinas de la clase II (Chikidans et al., 1995; Horn et al., 1998; Buyong et al., 1998). En algunos casos se ha logrado incluso que la

producción heteróloga de dichas bacteriocinas alcance un nivel similar al de las cepas naturalmente productoras (Horn et al., 1999). Adicionalmente, se han desarrollado cepas de lactococos capaces de producir heterológamente nisina A y pediocina PA-1 (Horn et al., 1999), dos bacteriocinas de amplio espectro pero que pertenecen a clases distintas, con estructuras y modos de acción diferentes. Este hecho supone un primer paso para afrontar el problema de los microorganismos resistentes ya que, en el caso de que aparecieran resistentes a una bacteriocina, éstos podrían ser inhibidos por la segunda. Finalmente, también se han desarrollado cepas de levaduras que producen pediocina PA-1 (Schoeman et al., 1999). En este caso, el objetivo es la inhibición de las bacterias lácticas alterantes del vino y de otras bebidas alcohólicas obtenidas mediante procesos fermentativos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La utilización de starters de bacterias lácticas para la producción “in situ” de sustancias antimicrobianas, o el empleo de esos compuestos total o parcialmente purificados como biopreservadores alimentarios, se traduce en un incremento del “shelf-life” y de la seguridad de los alimentos. Por ello su estudio y desarrollo ocupa y ocupará en el futuro inmediato un espacio económico relevante, teniendo en consideración los daños causados en las industrias alimentarias por defectos microbiológicos de variada naturaleza, así como el aspecto social relacionado con las exigencias del público consumidor, que muestra una marcada preferencia por los aditivos alimentarios naturales. En consecuencia, la sostenida investigación en estos aspectos formará la base de futuras estrategias para desarrollar alimentos más estables y seguros, y más acordes con las exigencias sociales del mercado. Si bien el tema ha recibido destacada atención en los últimos años, quedan aún muchas cuestiones por aclarar en función de la notable complejidad del sistema antagonístico generado por las bacterias lácticas, que además es variable de cepa a cepa.

En función de lo expuesto, el **objetivo general** de esta investigación ha sido lograr una adecuada purificación de los péptidos antimicrobianos producidos por cepas de *Enterococcus* aisladas de ecosistemas alimentarios regionales, de composición y estructura aún desconocidas. De este modo se pretende contribuir al desarrollo de una temática de gran interés tecnológico, teniendo en cuenta la tendencia actualmente imperante en la industria alimentaria mundial.

Para tender al logro de este objetivo general, se plantea la investigación y estudio de los siguientes **objetivos parciales o específicos**:

- ❖ Selección de las cepas silvestres de *Enterococcus*, de colección propia, mejores productoras de sustancias antimicrobianas tipo bacteriocinas.
- ❖ Obtención de sobrenadantes libres de células a partir de cultivos de esas cepas, donde se encuentren presentes las sustancias antimicrobianas a estudiar.
- ❖ Purificación parcial de las sustancias tipo bacteriocinas integrantes de los sobrenadantes de cultivos antes mencionados.
- ❖ Caracterización de esas sustancias, que permitan determinar su composición y naturaleza química y su espectro de acción.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MICROORGANISMOS EMPLEADOS

1.1.- Bacteria láctica productora de bacteriocina

La bacteria láctica productora de bacteriocina empleada en este trabajo es la cepa de *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24, perteneciente a la colección propia de las Cátedras de Microbiología y Biotecnología de la FIQ-UNL, y fue aislada a partir de leche cruda producida en la región Santa Fe (Argentina).

1.2.- Microorganismos indicadores o blancos

Las cepas empleadas como microorganismos indicadores para evaluar la actividad bacteriocinogénica de la cepa de *E. faecalis* DBFIQ E24 se detallan en las Tablas Nº 1, 2 y 3:

Tabla N° 1: Bacterias indicadoras utilizadas para ensayar la actividad antagonística de la cepa productora de bacteriocina (*Enterococcus faecalis* DBFIQ E24).

Bacterias indicadoras	Sigla identificatoria de cada cepa	Colección de origen
<i>Bacillus cereus</i>	Bc 28	DBFIQ
<i>Bacillus megaterium</i>	Bm 17	DBFIQ
<i>Bacillus subtilis</i>	Bs 33	DBFIQ
<i>Enterococcus faecalis</i>	E13	DBFIQ
<i>Enterococcus faecium</i>	E2	DBFIQ
<i>Enterococcus faecium</i>	E3	DBFIQ
<i>Escherichia coli</i>	E. c. 9	DBFIQ
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LB 42	DBFIQ
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP 7	DBFIQ
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP 25	DBFIQ
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP 31	DBFIQ
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CRL 63	CERELA
<i>Lactococcus lactis</i>	SF 1-1	DBFIQ
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lm 2	DBFIQ
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ps 5	DBFIQ
<i>Salmonella Enteritidis</i>	SE 8	DBFIQ
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Sa 22	DBFIQ
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SF 1-1	DBFIQ
<i>Vibrio cholerae</i> O1 EL Tor serotipo <i>Inaba</i>	Vch 7	DBFIQ

DBFIQ: Cátedras de Microbiología y Biotecnología de la FIQ-UNL

CERELA: Centro de Referencia para Lactobacilos – CONICET-U.N. de Tucumán

Tabla Nº 2: Hongos filamentosos utilizados para ensayar la actividad antagonística de la cepa productora de bacteriocina (*Enterococcus faecalis* DBFIQ E24).

Especies indicadoras	Sigla identificatoria de cada cepa	Colección de origen
<i>Aspergillus clavatus</i>	AC-1	DBFIQ
<i>Aspergillus flavus</i>	AF-25	DBFIQ
<i>Aspergillus flavus</i>	AF-58	DBFIQ
<i>Aspergillus flavus</i>	AF-21	DBFIQ
<i>Aspergillus niger</i>	AN-7	DBFIQ
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	F-9	DBFIQ
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	F-13	DBFIQ
<i>Fusarium</i> sp.	F-15	DBFIQ
<i>Geotrichum candidum</i>	GC-10	DBFIQ
<i>Mucor circillenioides</i>	MC-10	DBFIQ
<i>Penicillium camemberti</i>	PC-6	DBFIQ
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PCh-4	DBFIQ
<i>Penicillium citrinum</i>	PC-85	DBFIQ
<i>Penicillium commune</i>	PCo-11	DBFIQ
<i>Penicillium islandicum</i>	PI-13	DBFIQ
<i>Penicillium roquefortii</i>	PR-22	DBFIQ
<i>Rhizopus oryzae</i>	RO-3	DBFIQ
<i>Rhizopus stolonifer</i>	RS-1	DBFIQ

DBFIQ: Cátedras de Microbiología y Biotecnología de la FIQ-UNL

Tabla N° 3: Levaduras utilizadas para ensayar la actividad antagonística de la cepa productora de bacteriocina (*Enterococcus faecalis* DBFIQ E24).

Especies indicadoras	Sigla identificatoria de cada cepa	Colección de origen
<i>Candida albicans</i>	10231	ATCC
<i>Candida albicans</i>	64548	ATCC
<i>Candida parasilopsis</i>	22019	ATCC
<i>Candida tropicalis</i>	Ct 8	DBFIQ
<i>Candida tropicalis</i>	Ct 9	DBFIQ
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Km 1	DBFIQ
<i>Rhodotorula rubra</i>	Rr 12	DBFIQ
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc 1	DBFIQ
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	SchO 1	DBFIQ
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SchP 2	DBFIQ

DBFIQ: Cátedras de Microbiología y Biotecnología de la FIQ-UNL

ATCC: American Type Culture Collection – USA

2.- CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

2.1.- Conservación de las cepas bacterianas

A 5 mL de cultivo líquido de la bacteria a conservar, propagada a 37 °C por un período de 18 h, se los centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante en condiciones de esterilidad. A continuación se resuspendieron las células en 5 mL de agua estéril y se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm, descartando nuevamente el sobrenadante en condiciones de esterilidad. Este proceso se repitió dos veces. Por otro lado, se preparó el medio de cultivo líquido con 15% (v/v) de glicerol estéril. Se resuspendieron las células en 5 mL de este medio, en cada tubo de conservación estéril se dispensaron 2.5 mL de la suspensión y se los conservó a -20 °C (Heckly, 1978). Todas las cepas se conservaron en los medios de cultivos más adecuados para cada una de ellas.

2.2.- Conservación de las cepas de levaduras

Se aplicó el mismo método de conservación utilizado para las diferentes cepas bacterianas, con la única diferencia de que se utilizó el caldo de crecimiento YM, adecuado para estos microorganismos.

2.3.- Conservación de las cepas de hongos filamentosos

Las diferentes cepas fúngicas fueron sembradas en estría de agar extracto de malta (MEA) e incubadas a 25 °C durante 7 a 10 días. Posteriormente se adicionaron 10 mL de vaselina esterilizada por calor seco a estos cultivos y se los conservó en la oscuridad a temperatura ambiente. La vaselina evita la excesiva

deseccación de los cultivos y facilita la toma de material fúngico con la ayuda de un ansa de aguja, para la reactivación del hongo.

Para disponer de un stock de referencia seguro y estable en el tiempo, todas las cepas bacterianas, de hongos y levaduras se conservaron también por liofilización y por ultracongelamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.- OBTENCIÓN DEL SOBRENADANTE LIBRE DE CÉLULAS (SLC)

A partir del conservado, la cepa de *E. faecalis* DBFIQ E24 se activó mediante tres siembras sucesivas en Caldo M17 (Biokar), incubando cada cultivo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. El cultivo final se obtuvo sembrando 30 mL del último precultivo en 1000 mL de Caldo M17 (Biokar), e incubándolo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

Las concentraciones de las poblaciones celulares logradas en estos cultivos estuvieron comprendidas entre 1.0×10^9 y 7.4×10^9 ufc/mL. El sobrenadante libre de células se obtuvo centrifugando el cultivo final a 6000 rpm durante 15 minutos, a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se lo concentró 10 veces por evaporación a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un evaporador rotatorio BÜCHI RE 111 (utilizando una bomba de vacío "Büchi" Mod. Vac V-500), se ajustó el pH a 6.0 con NaOH 1 N y posteriormente se lo esterilizó por filtración en un equipo Millipore, utilizando membranas de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro (Simonetta et al., 1997).

4.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Esta técnica consiste en sembrar 0.1 mL del cultivo del microorganismo indicador, con una concentración celular de 10^6 ufc/mL, en 15 mL del medio de cultivo correspondiente, vertiéndolos luego en una placa de Petri. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que se solidifique el medio de cultivo y en el agar se hicieron pocillos de 7 mm de diámetro, en los que se vertieron 60 μ L del sobrenadante libre de células. Posteriormente las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La actividad inhibitoria del sobrenadante se determinó midiendo las zonas de inhibición alrededor de los pocillos. Para ello se utilizó la expresión:

Diámetro del halo de inhibición = [Radio de la zona de inhibición x 2 + diámetro del pocillo (7mm)].

5.- ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LA SUSTANCIA INHIBITORIA PRODUCIDA POR LA CEPA DE *E. faecalis* DBFIQ E24

El espectro antimicrobiano de la sustancia inhibitoria producida por la cepa de *E. faecalis* DBFIQ E24, se determinó evaluando la actividad inhibitoria de su sobrenadante concentrado libre de células, frente a los microorganismos indicadores citados en las Tablas N° 1, 2, 3.

5.1.- Capacidad inhibitoria frente a bacterias Gram (+) y Gram (-)

Para determinar la capacidad inhibitoria se utilizó el método de difusión en agar, 60 μ L del extracto a ensayar se colocaron en cada uno de los orificios de 7 mm de diámetro, practicados en placas de Agar Nutritivo (Merck) ya inoculada con el microorganismo cuya sensibilidad se pretende determinar. Las placas se incubaron

a 37 °C durante 24 h, procediendo luego a medir el diámetro de los halos de inhibición. En todos los casos se utilizó como control Caldo M17 (Biokar) concentrado diez veces, esterilizado por filtración y acidificado con ácido láctico hasta un valor de pH coincidente con el del sobrenadante. Además, para las muestras parcialmente purificadas y liofilizadas, se utilizaron como controles las soluciones en que se las resuspendió, cuyo pH fue ajustado al mismo valor que el de las muestras en ensayo (Tagg and McGiven, 1971; Benkerroum et al., 1993).

5.2.- Capacidad inhibitoria frente a hongos filamentosos

Se cultivó cada cepa fúngica blanco en estría de Medio MEA (Difco) durante 7 días a 25 °C. Luego se realizó una suspensión de los esporos del hongo, agregando al tubo 10 mL de agua de peptona al 0.1% (p/v) y agitando. Para los cultivos de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, a la suspensión de esporos se le agregó Tween 80 [concentración final 0.1% (v/v)]. Éste impide que los conidios asciendan a la superficie al disminuir la tensión superficial del agua, ya que los mismos son hidrofóbicos. Se inocularon 0.3 mL de la suspensión de esporos sobre una placa con 15 mL de Medio MEA (Difco), que se distribuyeron sobre la placa utilizando una espátula de Digralsky. Se realizaron pozos en la placa de Medio MEA (Difco) y se sembraron 60 µL del SLC en cada pozo. El desarrollo del hongo y la formación de halos se siguieron durante 7 días de incubación a 25 °C.

5.3.- Capacidad inhibitoria frente a levaduras

Para levaduras se aplicó la misma técnica, pero reemplazando el medio MEA (Difco) por medio YM Agar (Difco), e incubando durante un período de 24 a 48 h a 25 °C.

En ambos casos se utilizó como control (no generador de halo) al medio de cultivo M17 (Difco) concentrado 10 veces, esterilizado por filtración y llevado a pH 7 (Russell-White, 2005).

6.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN CRUZADA ENTRE *E. faecalis* DBFIQ E24 Y DISTINTAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Se determinó la inhibición cruzada entre distintas cepas de bacterias ácido lácticas y la de *E. faecalis* DBFIQ E24 mediante el ensayo de la doble capa de agar. Para determinar la actividad inhibitoria de las cepas de bacterias ácido lácticas frente a la de *E. faecalis* DBFIQ E24, en placas de Petri con 15 mL de Agar MRS (Difco) se inocularon por toques 6 a 8 cepas de las bacterias ácido lácticas cuya actividad inhibitoria se pretende detectar. Las mismas se incubaron durante 24 h a 37 °C. A continuación, se colocó sobre la capa de Agar MRS (Difco) con las bacterias lácticas ya desarrolladas, una capa de Agar MRS semisólido [0.8% (p/p) de agar] conteniendo la cepa de *E. faecalis* DBFIQ E24 (0.1 mL de un cultivo de la misma, con una concentración celular de 10^6 ufc/mL). Se incubó 24 h a 37 °C y se observó la formación de halos generados en el césped de bacteria blanco (*E. faecalis* DBFIQ E24) por las cepas que pueden inhibirla.

Se aplicó la misma técnica descrita para determinar la capacidad inhibitoria de *E. faecalis* DBFIQ E24 frente a las otras bacterias ácido lácticas, pero en estos ensayos la cepa mencionada se hizo desarrollar en las placas de MRS Agar (Difco) y

las cepas de las bacterias ácido lácticas cuya sensibilidad se pretende determinar se desarrollaron en Agar MRS semisólido a fin de generar la doble capa (Foulquié Moreno et al., 2003).

7.- CARACTERIZACIÓN PRIMARIA DEL SOBRENADANTE LIBRE DE CÉLULAS DE *E. faecalis* DBFIQ E24

7.1.- Ensayos enzimáticos

Se determinó la sensibilidad del SLC en estudio frente a la acción de las siguientes enzimas: Catalasa, Lipasa tipo I, Lisozima, Papaína, Pepsina, Pronasa E, Proteinasa K y Tripsina (todas ellas de la marca Sigma). Las soluciones enzimáticas se prepararon en buffer fosfato de potasio ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$), a fin de lograr el pH óptimo de acción de cada una de ellas. La fuerza iónica del mismo varió dependiendo de la enzima: con Catalasa, Pepsina, Lipasa y Tripsina se usó una concentración salina de 0.2 M; con Lisozima se trabajó a una concentración de 0.066 M; y con Pronasa E, Proteinasa K y Papaína se usó una concentración 0.01 M.

La técnica aplicada fue la siguiente:

En un tubo de ensayo estéril se colocó 1 mL del SLC estéril y 1 mL de la solución de enzima esterilizada por filtración, con una concentración de 1 mg/mL, de manera de lograr una concentración final de 0.5 mg/mL de la enzima en el medio de reacción. La mezcla reaccionante se incubó en estufa durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente se evaluó la actividad inhibitoria remanente por el método de difusión en agar (Strasser de Saad et al., 1993; Vignolo et al., 1993).

7.2.- Determinación de algunos parámetros fisicoquímicos

7.2.1.- Tratamientos térmicos

El SLC estéril se calentó en baño de María a 100 °C durante 10 y 30 minutos; también fue tratado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, ensayándose luego la actividad inhibitoria por el método de difusión en agar (Simonetta et al., 1997).

7.2.2.- Sensibilidad frente al pH

Se ajustó el valor del pH del SLC concentrado estéril a distintos valores en el rango comprendido entre 4.50 y 9.00. Se usó como testigo el medio de cultivo (Caldo M17, Difco) concentrado 10 veces, esterilizado y llevado a los mismos valores de pH.

Para disminuir el pH se utilizó ácido láctico concentrado (Cicarelli), y para aumentarlo se trabajó con una solución de NaOH 1N. Posteriormente se evaluó la actividad inhibitoria por el método de difusión en agar (Schillinger and Lücke, 1989; Park et al., 2003).

7.2.3.- Determinación del PM aparente de la fracción activa

7.2.3.1.- Ultrafiltración

Se utilizó un equipo de ultrafiltración (Centriprep-3, Amicon) con membrana de corte (cut-off) de 3000 Da. Se colocaron en el equipo 2 mL del SLC concentrado, a los que se agregaron 8 mL de agua Milli Q. Se centrifugó a 3000 x g a 25 °C durante 65 minutos. Luego se evaluó la actividad inhibitoria y el título, tanto en la fracción filtrada del SLC como en la retenida. Como cepas indicadoras para evaluar la

actividad inhibitoria se utilizaron: *B. cereus* DBFIQ Bc 28, *E. coli* DBFIQ E.c. 9, *Pseudomonas* sp. DBFIQ P 55 y *B. subtilis* DBFIQ B 11.

7.2.3.2.- Diálisis

La diálisis del SLC se realizó con el fin de eliminar las sales y otros componentes de bajo peso molecular que contuvieran, y poder estimar más aproximadamente el peso molecular de la sustancia activa.

El proceso de diálisis consiste en un intercambio molecular a través de una membrana semipermeable con un tamaño de poro inferior al tamaño de la proteína. De esta forma, si se introduce en una disolución con el tampón final deseado o H₂O desionizada una membrana de diálisis rellena de la disolución de proteína, el tampón y las sales se intercambiarán entre el interior y el exterior de la bolsa, mientras que la proteína permanecerá en el interior, siempre que el PM de la misma sea mayor que el cut off de la membrana utilizada. La muestra se sometió a diálisis a través de una membrana con un límite de exclusión de 1000 Da (Sigma), durante 24 horas a 4 °C y en agitación, frente a agua desionizada (un volumen 1000 veces mayor al de la disolución de proteína).

Tras ese tiempo, se realizó un segundo cambio de la disolución externa que se mantuvo al menos 6 h más a 4 °C. Luego a las fracciones retenida y no retenida, se les determinó la actividad frente a los microorganismos indicadores por el método de difusión en agar (Yamamoto et al., 2003).

A la fracción activa de la diálisis anterior, se la dializó nuevamente utilizando una membrana con un límite de exclusión de 2000 Da (Sigma), en las mismas condiciones descriptas anteriormente. Luego a las fracciones retenidas y no retenidas,

se les determinó la actividad frente a los microorganismos indicadores por el método de difusión en agar.

7.2.4.- Efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento sobre la actividad inhibitoria del SLC

Alícuotas del SLC concentrado estéril fueron almacenadas a las siguientes temperaturas: -20, 4, 25 y 37 °C, durante cinco meses. Mes a mes se les determinó la actividad inhibitoria remanente a través del ensayo de inhibición en agar (Benkerroum et al., 1993).

7.2.5.- Acción de los surfactantes sobre la actividad inhibitoria del SLC

Para la realización de este ensayo se utilizaron los siguientes detergentes:

Detergentes no iónicos

- Tritón X-100 (Sigma)
- Tween 20 (Sigma)
- Tween 80 (Sigma)

Detergentes aniónicos

- Dodecil Sulfato sódico (J. T. Baker)
- Ácido glicólico (Fluka)
- Ácido cólico (BDH)
- Ácido desoxicólico (Fluka)
- Ácido taurocólico (Biochem)

Detergentes catiónicos

- Bromuro de cetil trimetilamonio (BDH)

El ensayo se efectuó agregando a 1 mL de muestra 10 μ L de detergente (si es líquido) o 10 μ L de una solución saturada del surfactante (si el mismo es sólido), de modo de obtener una concentración final del 1% (v/v). A continuación, todas las muestras y controles se incubaron a 37 °C durante 6 horas. Luego del tiempo de incubación se efectuaron diluciones sucesivas al $\frac{1}{2}$, tanto de las muestras como de los controles. Luego se procedió según la metodología correspondiente al ensayo de difusión en agar. Se midieron los títulos (en AU/mL) para cada muestra. Las cepas indicadoras utilizadas fueron *B. cereus* DBFIQ B 28 y *E. coli* DBFIQ E.c. 9. Cabe aclarar que el ensayo completo se realizó en condiciones de esterilidad.

Los controles utilizados fueron: el SLC concentrado estéril sin el agregado de detergentes y las soluciones de cada detergente al 1% (v/v), realizadas en Caldo M17 (Difco) con su pH ajustado a un valor de 7.0 (Muriana y Klaenhammer, 1991).

7.3.- Determinación del título del extracto

Al SLC se le realizaron diluciones sucesivas al $\frac{1}{2}$. Luego, para determinar la capacidad inhibitoria de las mismas, se utilizó el método de difusión en agar

El título se definió como la inversa de la máxima dilución efectuada sobre la muestra, que generó un halo de inhibición de 7.5 mm (diámetro del pozo: 7 mm) multiplicado por el volumen de la muestra, en mL, utilizado en el ensayo. El título se expresó en Unidades Arbitrarias por mL (AU/mL) (Strasser de Saad et al., 1993; Vignolo et al., 1993; Tagg y McGiven, 1971).

7.4.- Determinación del modo de acción y de la capacidad lítica

Como confirmación de la actividad antagonística del SLC, se determinó el efecto del mismo sobre la evolución de poblaciones celulares proliferantes de cepas sensibles. Para ello se agregaron 2 mL del SLC concentrado a 18 mL de cultivos en fase logarítmica de *E. coli* DBFIQ E.c. 9 y de *B. cereus* DBFIQ B 28, desarrollados en Caldo Nutritivo (Merck), y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. A intervalos apropiados (horas: 0, 3, 6, 9, 12 y 24), se determinó el número de células viables presentes en cada cultivo mediante conteos microbiológicos en Agar Nutritivo (Merck) (Schillinger and Lücke, 1989).

Como control se realizó una experiencia idéntica con cada microorganismo blanco utilizado, sólo que al cultivo de los mismos no se añadió el SLC.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Para la determinación de la capacidad lítica, a los tubos de ensayo conteniendo la cepa indicadora con y sin el agregado del SLC concentrado se les midió, a los mismos tiempos detallados previamente, la densidad óptica a $\lambda=525$ nm, utilizando como blanco de lectura Caldo Nutritivo (Merck) no inoculado.

7.5.- Ensayos de citotoxicidad mediante lisis de eritrocitos

Se activó la cepa de *E. faecalis* DBFIQ E24 mediante tres siembras sucesivas en Caldo MRS (Difco), incubando a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se sembró por estriado sobre placas de Petri conteniendo Agar Base Sangre (Merck) con el agregado de sangre humana al 7% (v/v). Las placas fueron incubadas a 37 °C toda la noche. La reacción hemolítica se determinó por observación de una zona clara de hidrólisis alrededor de las colonias (β -hemólisis), una zona verdosa de hidrólisis parcial

(α -hemólisis), o la ausencia de zona de hidrólisis alrededor de la colonia (γ -hemólisis) (Foulquié Moreno et al., 2003).

7.6.- Resistencia a Vancomicina

La resistencia antibiótica al glicopéptido fue determinada mediante la técnica de dilución en caldo. La solución standard fue preparada adicionando 6.4 mg de Vancomicina (Laboratorio Lilly) a 100 mL del Caldo Trypticasa Soya - Extracto de Levadura (TSYE) (Biokar), que contiene 3 g de tripteína de soya y 0.3 g de extracto de levadura por 100 mL de agua destilada, y cuyo pH debe ser ajustado a 7. Se realizaron diluciones sucesivas al $\frac{1}{2}$ del antibiótico, para lo que se transfirieron 5 mL de la solución standard a un tubo conteniendo 5 mL de TSYE estéril, y así sucesivamente hasta obtener concentraciones de antibiótico de 64, 32, 16, 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g/mL}$. A cada tubo se agregó 1 μL de un cultivo de la cepa de *E. faecalis* DBFIQ E24 propagada en Caldo TSYE (Biokar) a 37 °C durante toda la noche. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), como la concentración más baja de antibiótico que no permitió el crecimiento de la cepa analizada (Foulquié Moreno et al., 2003).

8.- PROTOCOLOS DE PURIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA ANTIMICROBIANA PRESENTE EN EL SLC

8.1.- Primer protocolo de purificación

8.1.1.- Cromatografía de intercambio catiónico

La técnica cromatográfica de intercambio iónico (aniónico y catiónico) permite separar moléculas en disolución de acuerdo a su carga eléctrica superficial, por lo que su eficacia depende del pH del sistema y del punto isoeléctrico (pI) de las biomoléculas. Cuando el pH de los tampones supera el pI de las biomoléculas se emplea un intercambiador aniónico; en cambio, cuando el pH de los tampones es inferior al pI de las biomoléculas se emplea un intercambiador catiónico. La cromatografía de intercambio catiónico se basa en la adsorción selectiva y reversible de las moléculas con carga neta positiva a una matriz cromatográfica de carga eléctrica neta negativa.

8.1.1.1.- Geles

Se empleó el gel SP-Sepharosa Fast Flow (Amersham Biosciences), que es un intercambiador catiónico fuerte, activo en un rango de pH ente 4.00 y 13.00, y que permite separar moléculas de hasta 10^6 Dalton (límite de exclusión). La sepharosa es un gel formado por microesferas de agarosa [6% (p/v)], a la que se le han suprimido los polisacáridos cargados eléctricamente, por lo que se obtiene un gel que carece prácticamente de grupos residuales cargados. A la sepharosa se ligan covalentemente un gran número de radicales sulfopropilo (-SP) de carga negativa. Los grupos cargados se encuentran asociados a cationes "móviles" (Na^+) suministrados por el buffer de equilibrado, que serán reversiblemente reemplazados por iones del mismo

signo de las proteínas, sin alterar la conformación de la matriz cromatográfica. Las proteínas permanecen retenidas electrostáticamente en el lecho cromatográfico hasta que se aumenta la fuerza iónica [se introduce un gran número de cargas positivas que compiten por los radicales (-SP) y/o se varía el pH del sistema hacia o sobre el pI de las proteínas].

8.1.1.2.- Condiciones de trabajo

La columna de intercambio iónico (2.5 cm de diámetro por 35 cm de alto), que contiene 50 mL de la resina SP-Sepharosa Fast Flow (Amersham Biosciences), se equilibró con una solución de acetato de amonio 50 mM, pH=4.50. Luego, teniendo en cuenta la concentración de proteína, se aplicaron 25 mL del SLC concentrado. Se lavó con la misma solución de equilibrado y se procedió a eluir con soluciones de acetato de amonio a igual pH, en modo de gradiente escalonado desde 0.1 a 0.4 M (Guyonnet et al., 2000). El flujo utilizado fue de 2.5 mL/min y se mantuvo constante durante toda la experiencia. Se juntaron fracciones de 5 mL y se les midió la absorbancia a 230 y 280 nm. La cantidad de SLC procesado fue de 100 mL. Se colectaron las fracciones correspondientes a las diferentes molaridades de buffer, se concentraron en rotavapor y se liofilizaron en un equipo de la marca Rificor (modelo L-M10-A-E50-CRT), equipado con bomba de vacío Dosivac (modelo DVR 140). A las muestras resuspendidas en agua y llevadas a pH=7.0 se les determinó la actividad antimicrobiana, utilizando el método de difusión en agar. Las cepas indicadoras utilizadas fueron *B. cereus* DBFIQ B 28 y *E. coli* DBFIQ E.c. 9.

Las cromatografías en columnas se efectuaron utilizando una bomba peristáltica Econo Gradient Pump, de Bio-Rad. Las fracciones se recolectaron utilizando un colector de fracciones de la marca Bio-Rad (modelo 2110).

8.1.2.- Cromatografía en fase reversa

La cromatografía líquida de fase reversa se basa en la separación de solutos en función de su distribución entre una fase móvil polar y una fase estacionaria constituida por sílica químicamente modificada con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipo. Las columnas cromatográficas más ampliamente utilizadas para la separación de péptidos y proteínas son las de C2, C4, C8 y C18. La fase móvil es polar, compuesta principalmente por agua con adición de solventes orgánicos polares tales como: metanol, propanol, etanol y acetonitrilo, para promover el desplazamiento del soluto desde la fase estacionaria a la fase móvil (Harris and Angal, 1989).

Las moléculas del soluto se retienen en la matriz en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas, es siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente, para lo cual se va incrementando la concentración del solvente orgánico en la mezcla de elución.

8.1.2.1.- Soporte cromatográfico

En la separación de aminoácidos y péptidos mediante fase reversa el soporte más comúnmente empleado posee una cadena lineal de 18 carbonos y se denomina como $C_{18} \text{ |SiO}_2\text{ |-(CH}_2\text{)}_{17}\text{-CH}_3$. La matriz está formada por partículas de sílica de 55-105 μm y tamaño de poro de 125 Å, permaneciendo el soporte activo en un rango de pH entre 2.0 y 8.0.

8.1.2.2.- Condiciones de trabajo

A la fracción activa proveniente de la cromatografía de intercambio catiónico se le agregó ácido trifluoroacético (TFA) de manera de lograr una concentración final del 0.1% (v/v), de modo de proveer un pH ácido y evitar las interacciones iónicas de los péptidos con los silanoles cargados negativamente; el TFA aumenta la hidrofobicidad de los péptidos porque los grupos carboxílicos están protonados y los residuos básicos forman pares iónicos con TFA (Herraiz and Casal,1995). Posteriormente se la aplicó a una columna de fase reversa de C₁₈ (Waters, 35 c.c.) equilibrada con agua; luego se lavó la columna con una solución de agua más TFA al 0.1% (v/v), y la elución se efectuó de modo escalonada con soluciones acuosas con porcentajes crecientes de acetonitrilo (ACN) desde el 20% al 100%, también con una concentración final de TFA del 0.1% (v/v). El flujo utilizado fue de 2.0 mL/min y se mantuvo constante durante toda la experiencia. Las muestras fueron concentradas, liofilizadas, reconstituidas en agua y llevadas a pH=7.0 antes de testear su actividad antagonística por el ensayo de inhibición en agar con las bacterias indicadoras previamente mencionadas en la sección **8.1.1.2.**

8.1.3.- Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

La muestra se aplicó a la columna en solución acuosa acidificada con TFA. Para mejorar la solubilidad de los péptidos constituidos por aminoácidos muy hidrofóbicos se añade al solvente un 10 a 20% (v/v) de ACN. Aunque se han reportado otros sistemas de solventes, este último sigue siendo el más empleado a pesar de la toxicidad del acetonitrilo.

A fin de eluir de la columna los péptidos más hidrofóbicos es necesario aumentar la concentración de ACN en el sistema. Esto se hace en forma gradual mediante un programa de elución, lo cual permite una gran resolución en la separación de las moléculas.

8.1.3.1.- Condiciones de trabajo

La fracción activa proveniente de la cromatografía en fase reversa fue calentada a 37 °C durante 30 minutos, enfriada a temperatura ambiente y purificada parcialmente por HPLC, utilizando un equipo Gilson modelo 811C, con columna analítica (90 Å, tamaño de partícula 4 µ, dimensiones 250 x 4,60 mm, Júpiter Proteo, marca Phenomenex). El volumen sembrado por corrida cromatográfica fue de 10 µL. Las condiciones de corrida fueron: gradiente de 2% a 80% de solvente B [ACN grado HPLC conteniendo 0.1% (v/v) de TFA] en A [agua Milli Q conteniendo 0.1% (v/v) de TFA]; tiempo de corrida de 30 minutos, a un flujo de 0.8 mL/min y con una sensibilidad de 0.2 unidades de absorbancia. La detección se realizó a $\lambda=280$ nm y a $\lambda=220$ nm. Se utilizó también una columna semipreparativa (90 Å, tamaño de partícula 10 µ, dimensiones 250 x 10 mm, Júpiter Proteo, marca Phenomenex) para realizar la separación de las distintas fracciones. Las condiciones cromatográficas aplicadas fueron las mismas que para la corrida analítica; sólo se diferenció en el flujo aplicado, que fue de 3 mL/min.

En función del perfil cromatográfico obtenido de la muestra a $\lambda=280$ nm, se optó por recolectar 4 fracciones, cuyos respectivos tiempos de retención en minutos se indican a continuación: I: de 0.0 a 10.60, II: de 10.60 a 12.16, III: de 12.16 a 15.60, IV: de 15.60 a 30.

Las fracciones recolectadas se concentraron, liofilizaron y equilibraron a pH=7.0. A continuación se les evaluó la actividad inhibitoria frente a las cepas indicadoras mediante el ensayo de difusión en agar.

8.2.- Segundo protocolo de purificación

8.2.1.- Precipitación salina con sulfato de amonio

Las proteínas son moléculas anfipáticas que en disolución se encuentran solvatadas por moléculas de agua, exponiendo hacia el exterior (fase acuosa) sus porciones hidrofílicas y permaneciendo los grupos hidrofóbicos en el interior. El sulfato amónico en concentraciones bajas (poca fuerza iónica) aumenta la solubilidad de las proteínas (solubilización por salado); sin embargo, cuando se añade a altas concentraciones (elevada fuerza iónica) se consigue la precipitación por salado de las mismas. Las moléculas de sulfato amónico, entre otras acciones, disminuyen la solvatación (hidratación) de las proteínas, al competir exitosamente por las moléculas de agua, por lo que aquéllas exponen sus grupos hidrofóbicos, que interaccionan entre sí mediante fuerzas de Van der Waals, lo que provoca su precipitación.

8.2.1.1.- Metodología empleada

El SLC sin concentrar y esterilizado por filtración se calentó a 70 °C durante 45 minutos en baño de María, de modo de inactivar cualquier enzima proteolítica presente en el mismo. Posteriormente se realizó una precipitación salina usando como agente precipitante sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Burianek and Yousef, 2000; Herranz et al., 1999; Yang et al., 1992). Para ello se pesó la cantidad de sal necesaria para lograr un porcentaje de saturación de la solución de un 80% (p/v). A continuación, la sal fue agregándose por etapas mientras se mezclaba la solución

continuamente. Terminado este paso, se incubó la solución a 4 °C durante dos horas y se la agitó suavemente cada 15 minutos. Luego, la muestra fue centrifugada a 12000 x g durante 30 minutos, a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se solubilizó con la menor cantidad posible de buffer fosfato 40 mM, pH=7.0 (Cutler, 2004).

8.2.2.- Cromatografía de filtración por geles

La cromatografía de filtración por geles permite separar moléculas en disolución de acuerdo con su tamaño molecular.

8.2.2.1.- Geles

El gel Sephadex G-10 empleado como matriz cromatográfica es un polímero resultante de la formación de enlaces cruzados entre las moléculas de dextrano y epiclorhidrina. Este polímero es muy hidrofílico debido a su gran número de grupos hidroxilo, por lo que aumenta de volumen en presencia de agua o de soluciones electrolíticas. El gel hidratado está formado por un sistema de microesferas de Sephadex con un gran número de poros de diámetro comparable al de las moléculas que se pretende separar; así las moléculas relativamente pequeñas, como las de sulfato amónico, difunden por las esferas del gel y quedan retenidas; sin embargo, las moléculas mayores, por encima del límite de exclusión, como las bacteriocinas, no difunden por las esferas y por lo tanto abandonan rápidamente el gel. El gel Sephadex G-10 permite separar partículas con un tamaño molecular menor a 700 Da.

8.2.2.2.- Metodología empleada

Para eliminar las sales remanentes y aquellas moléculas de bajo peso molecular presentes en el SLC, se realizó una cromatografía de filtración por geles con Sephadex G-10 (MWCO<700 Da). Para ello, 100 mL del gel húmedo se colocaron en una columna de 2.5 cm de diámetro por 35 cm de alto, se procedió a su equilibrado y, a continuación, se aplicaron a la columna 10 mL de la muestra activa y equilibrada a pH=5.0. Tanto para el equilibrado de la columna como para la elución isocrática se empleó el buffer acetato de amonio 0.05 M, pH=5.0. El flujo utilizado fue de 4.0 mL/min y se mantuvo constante durante toda la experiencia.

Se juntaron fracciones de 5 mL y se les midió la absorbancia a 230 y 280 nm. Esta cromatografía se repitió hasta procesar la totalidad de la muestra activa (siete veces más). Con estos datos se construyó la curva de absorbancia vs. número de fracción, la que permitió seleccionar y recolectar los volúmenes en tres fracciones A, B y C. Estas se concentraron, se liofilizaron, se resuspendieron en agua Milli-Q, se les equilibró el pH=7.0 y se les determinó la actividad inhibitoria mediante el ensayo de difusión en agar. Se determinó el volumen muerto de la columna (VO), sembrando 10 mL de una solución de 20 mg/mL de Albúmina 96% (Sigma), y se eluyó con el mismo buffer usado para la equilibración, a una velocidad de flujo de 4 mL/min. Se recolectaron fracciones de 5 mL, las cuales fueron leídas a 230 y 280 nm. Se determinó el volumen de buffer necesario para la elución de compuestos de peso molecular menor a 1000 Da sembrando una muestra diluída de azul de bromofenol $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ (PM: 669.96 g/mol). Todas las columnas se procesaron a 25 °C.

8.2.3.- Cromatografía de intercambio catiónico

8.2.3.1.- Metodología empleada

La fracción activa proveniente de la cromatografía de filtración por geles fue equilibrada a pH=5.0 y aplicada a una columna de intercambio iónico (2.5 cm de diámetro por 35 cm de alto), que contiene 50 mL de la resina SP-Sepharosa Fast Flow (Amersham Biosciences), la cual se equilibró con una solución de acetato de amonio 50 mM, pH=5.00. Además, el resto de las condiciones con las que se trabajó se mantuvieron idénticas a la cromatografía de intercambio catiónico del primer protocolo (ítem 8.1.1.2). Luego de efectuada la cromatografía se construyó la curva de absorbancia vs. número de fracción, la que permitió seleccionar y recolectar los volúmenes en tres fracciones A, B y C. Éstas se concentraron, se liofilizaron, se resuspendieron en agua Milli-Q, se les equilibró el pH=7.0 y se les determinó la actividad inhibitoria mediante el ensayo de difusión en agar.

8.2.4.- Cromatografía en fase reversa

8.2.4.1.- Metodología empleada

A la fracción activa de la cromatografía de intercambio catiónico se le agregó TFA en una concentración final del 0.1% (v/v). Posteriormente se la aplicó a una columna de fase reversa de C₁₈ (Waters, 35 cc.) equilibrada con agua; luego se lavó la columna con una solución de agua más TFA al 0.1% (v/v), y la elución se realizó de igual manera que en la cromatografía en fase reversa de primer protocolo (ítem 8.1.2.2). A las fracciones recolectadas, concentradas y liofilizadas, se las resuspendió con agua Milli-Q y se las llevó a pH=7.0. Luego se les evaluó la

actividad antagonística frente a las cepas indicadoras mediante el método de difusión en agar.

8.2.5.- Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

La metodología empleada es igual que la utilizada en el primer protocolo de purificación (item 8.1.3.1).

9.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL SLC Y EN LAS MUESTRAS PARCIALMENTE PURIFICADAS MEDIANTE EL ENSAYO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

La técnica se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por acción de las proteínas o péptidos, cuyos enlaces peptídicos se acomplejan con Cu^{2+} , para luego oxidarse bajo condiciones alcalinas. Posteriormente el ión Cu^+ forma un quelato con dos moléculas de BCA, desarrollando un color púrpura intenso con un máximo de absorbancia a $\lambda=562$ nm. Este complejo soluble en agua presenta una absorbancia lineal en un rango entre (20 a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como el BCA es estable con estas condiciones alcalinas, el ensayo puede ser efectuado en un solo paso. La estructura macromolecular de la proteína, el número de enlaces peptídicos y la presencia de cuatro aminoácidos particulares (cisteína, cistina, triptofano y tirosina) son los responsables de la formación del color con BCA. Otra ventaja de este ensayo es que el mismo es tolerante a componentes que suelen interferir con otros ensayos de determinación de proteínas, tal como el ensayo de Lowry. En particular, no resulta afectado por un conjunto de detergentes y agentes desnaturizantes tales como urea y cloruro de guanidinio. Sin embargo, es mucho más sensible a la presencia de azúcares reductores. Además, como la generación de Cu^+ es dependiente de la

concentración de proteína y del tiempo de incubación, el contenido proteico de las muestras incógnitas debe determinarse espectrofotométricamente mediante la extrapolación en curvas realizadas con estándares de proteínas conocidas (Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988). El patrón utilizado para construir la curva fue: Albúmina Bovina Standard (BSA) (Sigma), como proteína estándar.

9.1.- Procedimiento

Se mezclaron 100 μ L de muestra con 2 mL de SWR (Reactivo de trabajo standard) (Ver Anexo). Se homogeneizó la mezcla y se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se midió el incremento de la absorbancia en espectrofotómetro Metrolab (modelo 21700) a una $\lambda=562$ nm, utilizando como blanco de reactivo la solución SWR incubada en las mismas condiciones, aunque sin el agregado de muestra. El color es estable durante 1 hora (Walker, 2002).

10.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA UTILIZANDO TRICINA Y DODECIL SULFATO SÓDICO

Esta técnica, descrita por (Schägger and von Jagow, 1987), permite separar mezclas complejas de proteínas y polipéptidos en función de su tamaño molecular. El dodecilsulfato sódico es un detergente aniónico que se acompleja por absorción inespecífica a las proteínas y péptidos (aproximadamente una molécula de SDS cada dos aminoácidos, con una relación máxima de 1.41 g de SDS/g de proteína) y las desnaturaliza completamente, rompiendo las interacciones no covalentes que determinan las estructuras terciarias y cuaternarias. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie, y todos los

complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). Las proteínas reaccionan con SDS a relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0.4% de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína, sin embargo, se emplea 1% para lograr un margen de seguridad. La utilización de agentes reductores, como el β -mercaptoetanol, desnaturalizan las proteínas rompiendo los enlaces disulfuro y separándolas en las subunidades proteicas que las constituyen. Por último, la aplicación de calor permite la formación de enlaces estables SDS-proteína/péptido y, además, proporciona a las cadenas polipeptídicas una densidad de carga similar. De esta forma, cuando el complejo SDS-polipéptido se somete a electroforesis en un gel que contiene SDS, su velocidad de migración estará determinada principalmente por la masa de la partícula SDS-polipéptido, según el principio de exclusión molecular. El campo eléctrico sólo suministra la fuerza impulsora.

Por otro lado la tricina, funcionando como ión de arrastre, permite la separación de proteínas y péptidos de bajo peso molecular (0.5-30 kDa), en detrimento de las de elevado peso molecular, debido a que tiene una movilidad electroforética mucho mayor que la glicina (ión de arrastre utilizado en el sistema de SDS-PAGE propuesto por Laemmli, 1970). Esto permite la adecuada separación (des-apilamiento) de los péptidos de bajo peso molecular del conjunto de proteínas, SDS y de los complejos proteína-SDS y, además, cambia el límite de apilamiento de las proteínas de bajo peso molecular.

La concentración de acrilamida (%T) representa el porcentaje en peso del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador bis-acrilamida en gramos por 100 mL) y determina la longitud promedio de la cadena del polímero. A mayor % T disminuye el tamaño del poro.

La concentración de bis-acrilamida (%C) representa el porcentaje de este monómero en el gel y determina el grado de entrecruzamiento.

El persulfato de amonio (APS) es el agente oxidante y la N,N,N,N'-tetrametilen-diamina (TEMED) es el agente reductor.

10.1.- Armado de los geles

Los cálculos para el armado de los geles, que se aprecian en la Tabla N° 4, se efectuaron para 5 mL de volumen final de solución de cada gel. El orden de armado de los geles es el siguiente: primero, el gel separador (parte inferior del gel), que es, en general, aproximadamente el 60% del total del gel; segundo, el gel espaciador (parte media del gel), que es aproximadamente el 25% del total del gel; y tercero, el gel de apilamiento (parte superior del gel), que constituye el 15% restante. En este último se introdujo el peine, de modo de formar los pocillos en los que luego se dispusieron las diferentes muestras. Los porcentajes establecidos para cada gel son determinados en función del grado de resolución deseado para las proteínas y péptidos de bajo peso molecular, en detrimento de las de mayor tamaño molecular.

Tabla N° 4. Armado de los diferentes geles utilizados en la electroforesis en geles de poliacrilamida con tricina y SDS.

Soluciones	Gel de Apilamiento (4% T, 3% C)	Gel Espaciador (10% T, 3% C)	Gel Separador (16.5% T, 3% C)
Solución Madre de Acrilamida:Bisacrilamida (30% T, 3% C)	0.65 mL	1.70 mL	2.80 mL
Buffer del Gel 3X	1.70 mL	1.70 mL	1.70 mL
Glicerol	-	-	0.5 mL
Persulfato de Amonio [10% (p/v)]	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL
Agua	2.63 mL	1.60 mL	-

10.2.- Preparación de las muestras y sembrado en los geles ya armados

Se mezclaron, en relación 1:1 (v/v), el buffer de muestra y la muestra propiamente dicha. Se colocaron las muestras en Baño de María a ebullición durante dos minutos y luego se las dejó enfriar a temperatura ambiente.

El volumen de sembrado dependerá de la cantidad de proteína de cada muestra, del volumen máximo que puede colocarse en cada pocillo, del método de tinción seleccionado y de la utilidad final que se le dará al gel. Teniendo en cuenta estos factores, durante el sembrado de los geles se depositaron 5 µL de muestra en cada pocillo para la determinación del patrón proteico de las diferentes muestras y, para detectar en forma directa la actividad antimicrobiana, se trabajó con 20 µL de muestra por pocillo.

Como marcadores de peso molecular en esta técnica se utilizaron los siguientes péptidos:

péptidos standards marca (Sigma), formados por:

(Triosafosfato isomerasa: 26.6 kDa, Mioglobina: 17 kDa, α -lactoalbúmina: 14.2 kDa, Aprotinina: 6.5 kDa, Insulina cadena B: 3.5 kDa, Bradiquinina: 1.060 kDa.).

10.3.- Condiciones de las determinaciones electroforéticas

La electroforesis se llevó a cabo con un equipo "Bio-Rad" modelo Mini-PROTEAN 3 Cell, con una fuente de poder "BIO-Rad" PowerPac Basic Power Suply. La misma se desarrolló durante 210 minutos a temperatura ambiente y a voltaje constante, comenzando con 80 V y 55 mA para finalizar con 80 V y 22 mA por cada gel. Esto significa que cuando se trabajó con dos geles, la corriente inicial fue del doble del valor antes especificado. Finalizada la electroforesis, el gel se extrajo de los vidrios de soporte.

10.4.- Método de tinción con plata

La tinción argéntica de los geles se llevó a cabo utilizando el método propuesto por Blum et al., 1987. Las soluciones utilizadas están descriptas en el Anexo. El procedimiento empleado se detalla a continuación:

- 1- El gel extraído de los vidrios de soporte se lavó con agua destilada.
- 2- Luego se fijó con glutaraldehído al 5% (v/v) durante 1 hora.
- 3- A continuación se lavó nuevamente con agua destilada.
- 4- Luego se fijó con solución fijadora compuesta por Metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 12% (v/v) y formaldehído 37% (v/v), durante 1 hora.

- 5- Se realizaron 3 lavados con metanol al 30% (v/v), de una duración de 20 minutos cada uno.
- 6- Después se sumergió en solución de pretratamiento (0.02% p/v de tiosulfato de sodio pentahidratado).
- 7- Se realizaron 3 lavados con agua destilada, de 20 segundos cada uno.
- 8- El gel se sumergió en solución de plata, durante 20 minutos.
- 9- Se realizaron 2 lavados con agua destilada, de 20 segundos cada uno.
- 10- Luego se lo sumergió en la solución de desarrollo, hasta que comenzó a teñirse y no aparecieron más manchas.
- 11- A continuación se lo sumergió en solución de Stopping compuesta por metanol:ácido acético (10:12) en 100 mL de agua destilada, durante 10 minutos, para detener la reacción.
- 12- Por último se lo sumergió en solución de metanol al 30% (v/v), durante 20 minutos.
- 13- Para secar el gel se procedió del siguiente modo:
 - a- se lo agitó en solución de metanol al 30% (v/v) a 4 °C, durante 30 min.
 - b- se lo agitó en solución de glicerol al 3% (v/v), durante 30 min.
 - c- se lo secó entre papeles de celofán en un secador de geles a 80 °C, durante 1 hora.

10.5.- Método de tinción con Coomasie Brilliant Blue R

La tinción de los geles se llevó a cabo utilizando el colorante Coomasie Brilliant Blue R (Sigma). Las soluciones utilizadas están descritas en el Anexo. El procedimiento empleado se detalla a continuación:

- 1- El gel extraído de los vidrios de soporte se lavó con agua destilada, durante 5 a 10 minutos, para ayudar a disminuir el background.
- 2- Luego se fijó con glutaraldehído al 5% (v/v) durante 1 hora.
- 3- A continuación se colocó el gel en una solución de 40% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético, durante 30 minutos.
- 4- Se realizaron 3 lavados con agua destilada, de 5 minutos cada uno cada uno.
- 5- El gel se sumergió en solución de 0.025% de Coomassie Brilliant Blue R, en 10% de ácido acético, durante 1 hora.
- 6- Por último se sumergió en solución decolorante ácido acético al 10% (v/v), agitando y cambiando la solución durante aproximadamente 1 hora, hasta que se observaron las bandas de proteínas sobre fondo claro.

10.6.- Método de detección directa de la actividad antimicrobiana en geles de poliacrilamida

La detección directa de la actividad antimicrobiana en los geles de poliacrilamida se realizó según la metodología propuesta por Bhunia y Johnson, 1992. Para ello se realizó el siguiente procedimiento:

- 1- El gel extraído de los vidrios de soporte se lavó con agua destilada.
- 2- Luego se lo fijó durante 2 horas con solución de isopropanol: ácido acético: agua en proporción 20:10:70 (v/v).
- 3- A continuación se realizaron 3 lavados con agua destilada, de 10 minutos cada uno.

4- Por último, el gel se colocó dentro de una caja de Petri estéril a la que se agregó Agar Nutritivo (Merck) blando (0.8% de agar) inoculado con *B. cereus* DBFIQ Bc 28 como microorganismo indicador.

5- La placa se incubó a 37 °C durante 18 horas, al cabo de las cuales se la examinó para comprobar la aparición de zonas claras debidas a la inhibición del crecimiento del microorganismo indicador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- ESPECTRO ANTIMICROBIANO DEL SLC OBTENIDO DE CULTIVOS DE LA CEPA DE *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24

1.1.- Capacidad inhibitoria frente a bacterias Gram (+) y Gram (-)

En la Tabla Nº 5 se observan los resultados del efecto del SLC en estudio frente a bacterias Gram (+) o Gram (-) causantes de enfermedades de transmisión alimentaria y/o alterantes de alimentos.

Tabla Nº 5: actividad antimicrobiana (expresada como diámetros de los halos de inhibición, medidos en mm) del SLC proveniente de cultivos de la cepa *E. faecalis* DBFIQ E24 frente a diversas cepas bacterianas indicadoras, Gram (+) y Gram (-).

	Cepas indicadoras utilizadas							
	Gram (+)				Gram (-)			
	L. m.	S. a.	B. c.	B. s.	P. sp.	E. c.	V. ch.	S. E.
SLC de <i>E. faecalis</i> DBFIQ E24	10	-----	16	15	15	16	23	16

L. m.: *Listeria monocytogenes* - **S. a.:** *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* - **B. c.:** *Bacillus cereus* - **B. s.:** *Bacillus subtilis* - **P. sp.:** *Pseudomonas* sp. - **E. c.:** *Escherichia coli* - **V. ch.:** *Vibrio cholerae* O1 EL Tor serotipo Inaba - **S. E.:** *Salmonella Enteritidis*.

Halos de inhibición (en mm).

----- Actividad inhibitoria no detectada.

Puede apreciarse que todas las cepas blanco utilizadas en el ensayo resultaron susceptibles al efecto antimicrobiano del SLC, excepto *S. aureus* subsp. *aureus*. También se aprecia que todas las cepas sensibles, tanto Gram (-) como Gram (+), mostraron halos de inhibición de diámetros muy similares, con excepción de *V. cholerae* O1 EL Tor serotipo Inaba, que fue la cepa que mostró una inhibición mayor, y de *L. monocytogenes*, que resultó ser la menos inhibida.

El SLC de una cepa de *Enterococcus* aislada por Diop et al. (2007), experimentó el mismo comportamiento frente a *S. aureus* subsp. *aureus* y *L. monocytogenes*, en tanto que dicho comportamiento no resultó coincidente con lo observado para las cepas de *B. cereus* y *B. subtilis*, las cuales no resultaron inhibidas por ese sobrenadante.

La enterocina MRR 10-3, aislada por Martín-Platero et al. (2006), mostró una gran actividad antagonística contra bacterias Gram (+), incluyendo a *S. aureus*, y escasa actividad frente a cepas de *E. coli*.

Otros investigadores como Sparo et al. (2006) aislaron la enterocina MR99, producida por la cepa *Enterococcus faecalis* MR99, la cual presentó un amplio espectro inhibitorio frente a cepas de *Enterococcus faecium* (ATCC 35667, MR950, MR856, MR807, MR812, MR823) y *E. faecalis* (ATCC 29212, ATCC 33186, ATCC 33550), reportándose también inhibición frente a otras bacterias Gram (+) tales como *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp. Su comportamiento inhibitorio frente a bacterias Gram (-) fue de un espectro más reducido y de menor intensidad, aunque presentó actividad inhibitoria frente a algunas cepas de *E. coli*, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*. No se observó inhibición frente a otras bacterias Gram (+) tales como *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, y Gram (-) tales como *Pseudomonas* y *Salmonella*.

La enterocina 4, una bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* INIA 4, no sólo mostró una importante actividad antimicrobiana frente a diferentes especies de *Listeria*, sino también frente a otras especies bacterianas Gram (+) tales como *Clostridium tyrobutyricum*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*, pero no presentó efecto inhibitorio frente a bacterias Gram (-) tales como diferentes cepas de *E. coli* y *Salmonella* (Joosten et al., 1.996).

Cintas et al. (1997), reportaron la producción de enterocina P a partir de la cepa de *Enterococcus faecium* P13, una bacteriocina con un amplio espectro antimicrobiano que inhibió a cepas bacterianas que provocan alteraciones en los alimentos, tales como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus carnosus*, *Clostridium sporogenes*, *C. tyrobutyricum* y *Propionibacterium* spp. También resultó inhibitoria de cepas de bacterias patógenas alimentarias tales como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, y *Staphylococcus aureus*.

El SLC de la cepa de *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, aislada por Sabia et al. (2002) a partir de salchichas italianas, produjo una bacteriocina antilistérica de escaso espectro antibacteriano. La misma inhibió sólo a algunas cepas de *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*, y resultó inactiva frente a *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrofila*, *Yersinia enterocolitica* y *Salmonella* sp.

Yanagida et al. (2005), aislaron la bacteriocina duracina L28-1A a partir de la cepa de *Enterococcus durans* L28-1, cuyo espectro antimicrobiano resultó restringido y similar al reportado por Sabia et al. (2002), ya que sólo resultó activa frente a algunas especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, y no mostró inhibición frente a *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* y *E. coli*.

Estos reportes indican que la capacidad inhibitoria depende tanto de la cepa productora de enterocina como de las cepas de bacterias indicadoras empleadas en los ensayos (Strompfová et al., 2007).

Resultados similares se encuentran en la vasta bibliografía correspondiente a aislamientos y caracterización de bacteriocinas provenientes de otros géneros bacterianos diferentes de *Enterococcus*.

Con respecto al espectro antimicrobiano, no se puede asegurar que el mismo será amplio o estrecho según el origen de la bacteriocina, ni que ésta será más o menos activa frente a cepas de bacterias Gram (+) o Gram (-). Se pueden citar, a modo de ejemplo, otros estudios que avalan lo mencionado, como los correspondientes a pediocina L50, producida por *Pediococcus acidilactici* L50, que demostró inhibir a 42 cepas bacterianas Gram (+) pertenecientes a especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Propionibacterium*, mientras que no resultó activa frente a cepas bacterianas Gram (-) de interés en la industria alimentaria (Cintas et al., 1995). Suma et al. (1998) reportaron el aislamiento y caracterización de plantaricina LPS4, una bacteriocina de amplio espectro antibacteriano activa frente a cepas Gram (+) y Gram (-), proveniente de la cepa de *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084; la misma resultó activa frente a cepas de *B. cereus*, *S. aureus*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Lactobacillus amylovorus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Millette et al. (2007) observaron que la bacteriocina lactacina MM19, producida por la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM19, resultó activa frente a cepas de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *S. aureus*, pero fue inactiva frente a *E. coli* 0157:H7, *E. faecalis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* y *Salmonella*.

1.2.- Capacidad inhibitoria frente a hongos filamentosos

En la Tabla Nº 6 se aprecian los resultados de la inhibición del SLC DBFIQ E24 frente a diferentes cepas de hongos filamentosos.

Los ensayos realizados mostraron que todas las cepas de *Penicillium* estudiadas, excepto las de *P. citrinum* y *P. commune*, fueron inhibidas por el SLC. Esto resulta coincidente con las experiencias realizadas por Magnusson et al. (2003) frente a una cepa de *P. commune* J238, la cual no fue inhibida por *Enterococcus hirae* MiLAB 026 ni por la cepa de *Enterococcus durans* MiLAB 069. Sin embargo, estos autores no observaron resultados coincidentes con los aquí expuestos con distintas cepas de *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* frente a *P. roquefortii*, ya que el mismo no fue inhibido por las cepas ensayadas.

Además, se comprobó efecto inhibitorio del SLC DBFIQ E24 sobre tres cepas del género *Aspergillus*, una de *F. chlamyosporum* y una de *M. circillenooides*. Los autores antes mencionados (Magnusson et al. 2003) reportaron inhibición de cepas de *Aspergillus*, *A. fumigatus* J9 y *A. nidulans*, por cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, y también que cepas de *Enterococcus* inhibieron a las cepas de *A. fumigatus* J9 y *F. sporotrichoides* J304.

Las BAL poseen una larga historia como agentes preservantes de alimentos, dado que se las considera seguras, y en algunos casos han sido bien estudiadas las sustancias antibacterianas que ellas producen; a pesar de ello, hay pocos reportes relativos a su actividad inhibitoria frente a hongos.

Valerio et al. (2009), constataron que cepas de *Lactobacillus*, *Weissella*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* inhibieron a especies fúngicas contaminantes de productos de panadería tales como *Aspergillus niger*, *Penicillium roquefortii* y *Endomyces fibuliger*.

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* 1.7 y 1.9 fueron testeadas como microorganismos antifúngicos, con el fin de extender la vida útil de productos de panadería. Las mismas resultaron activas frente a cepas de *A. niger*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium expansum* y *P. roquefortii* (Ryan et al., 2008).

Geres et al. (2009), estudiaron la capacidad inhibitoria de las BAL frente a hongos como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, principales contaminantes del pan, encontrando que solamente 4 cepas (*Lactobacillus plantarum* CRL 778, *Lactobacillus reuteri* CRL 1100 y *Lactobacillus brevis* CRL 722 y CRL 796), de un total de 95 estudiadas, mostraron actividad antifúngica.

Los resultados obtenidos por estos investigadores evidencian que la capacidad antifúngica de las BAL depende de la cepa de BAL y de la especie fúngica. La germinación conidial es la etapa de crecimiento que presenta mayor sensibilidad a la inhibición, siendo ésta superior a la observada durante el crecimiento miceliar.

Reportes recientes consideran que los compuestos de naturaleza peptídica o proteica producidos por algunas cepas de BAL, son los responsables de la actividad antifúngica, ya que la misma se pierde después del tratamiento con enzimas proteolíticas (Corsetti et al., 2007).

1.3.- Capacidad inhibitoria frente a levaduras

En la Tabla N° 6 se aprecian los resultados de la inhibición del SLC DBFIQ E24 frente a diferentes cepas de levaduras.

Se observa que el sobrenadante inhibió a la mayoría de ellas, excepto a dos especies del género *Candida* y a una del género *Schizosaccharomyces*. En general,

los halos de inhibición fueron pequeños, excepto para *Schizosaccharomyces pombe* DBFIQ Sp 4 y para *Rhodotorula rubra* DBFIQ R 16.

También se aprecia que la cepa de *Kluyveromyces marxianus* DBFIQ KM 1 resultó inhibida por el SLC, lo que difiere del trabajo de Magnusson et al. (2003), quienes comprobaron que dicha especie no resultó inhibida por ninguna cepa de *Enterococcus*. Los mismos autores constataron que especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* no inhibieron el crecimiento de levaduras tales como *Pichia anomala* J121, *K. marxianus* J186 y *Rhodotorula mucilaginosa* J350.

Lactobacillus coryniformis subsp. *coryniformis* Si3 tuvo un amplio espectro inhibitorio frente a levaduras, resultando activo frente a *Saccharomyces cerevisiae* J122, *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* J136 y J187 y *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* J186, mientras que no lo fue frente a *Pichia anomala* J121 y *Zygosaccharomyces rouxii* J107. Generalmente, los hongos parecen ser más sensibles que las levaduras frente a alguna cepas de BAL (Magnusson et al., 2001).

Tabla Nº 6: actividad antagonística (expresada como diámetros de los halos de inhibición, medidos en mm) del SLC DBFIQ E24 frente a diferentes hongos filamentosos y levaduras.

Cepas blanco	Diámetros de los halos de inhibición (en mm)
Hongos Filamentosos	
<i>Aspergillus clavatus</i> DBFIQ AC-7	10
<i>Aspergillus flavus</i> DBFIQ AF-14	7.5
<i>A. flavus</i> DBFIQ AF-25	-
<i>A. flavus</i> DBFIQ AF-11	9
<i>Aspergillus niger</i> DBFIQ A. n. 21	-
<i>Fusarium chlamydosporum</i> DBFIQ F-13	-
<i>F. chlamydosporum</i> DBFIQ F-9	8
<i>Fusarium</i> sp. DBFIQ F2	-
<i>Geotrichum candidum</i> DBFIQ GC 10	-
<i>Mucor circillenioides</i> DBFIQ MC 3	8
<i>Penicillium camemberti</i> DBFIQ PC 9	8
<i>Penicillium chrysogenum</i> DBFIQ PC 5	7.5
<i>Penicillium citrinum</i> 85 DBFIQ PC 1	-
<i>Penicillium commune</i> DBFIQ PC 17	-
<i>Penicillium islandicum</i> DBFIQ PI 9	10
<i>Penicillium roquefortii</i> DBFIQ PR 1	9
<i>Rhizopus oryzae</i> DBFIQ RO 8	-
<i>Rhizopus stolonifer</i> DBFIQ RS 4	-
Levaduras	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	9
<i>Candida parasilopsis</i> ATCC 22019	-
<i>Candida tropicalis</i> DBFIQ Ct 8	7.5
<i>C. tropicalis</i> DBFIQ Ct 9	9
<i>Kluyveromyces marxianus</i> DBFIQ KM 1	7.5
<i>Rhodotorula rubra</i> DBFIQ R 16	15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBFIQ Sc 5	8
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i> DBFIQ SO 14	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> DBFIQ Sp 4	11

Diámetro de los pozos: 7 mm.

DBFIQ: colección propia

2.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN CRUZADA ENTRE *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24 Y DISTINTAS CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Los valores de los halos de inhibición obtenidos en estos ensayos se muestran en la Tabla N° 7. Se observa que *E. faecalis* DBFIQ E24 produce sustancias antimicrobianas que inhiben a la mayoría de las bacterias lácticas estudiadas, con excepción de *L. plantarum* LP7 y de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB42. Puede también apreciarse que se comprobó un gran efecto inhibitorio, con un diámetro de halo de 30 mm, frente a *L. plantarum* LP25, y que la cepa menos inhibida fue *L. plantarum* LP31, con un halo de inhibición de 9 mm de diámetro.

Cuando la cepa *E. faecalis* DBFIQ E24 actuó como cepa blanco, los microorganismos que más la inhibieron fueron *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB42 y *L. plantarum* LP31, con diámetros de halos de 20 y 19 mm respectivamente. Cabe aclarar que la cepa de *L. plantarum* LP31 ha sido caracterizada previamente como productora de una bacteriocina de amplio espectro antibacteriano (Müller D., 2007; Müller D. et al., 2009).

Otros investigadores, como Foulquié Moreno et al. (2003), reportaron que diferentes cepas de *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* fueron ensayadas como cepas productoras de sustancias antimicrobianas frente a 50 cepas de bacterias Gram (+), pertenecientes a los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Los resultados obtenidos evidencian que las cepas de *E. faecium* SF 68 y *E. faecalis* Y no produjeron inhibición de ningunas de las cepas antes mencionadas. En cambio, las cepas de *E. faecium* RZS C5 y RZS C13 fueron las de mayor potencia inhibitoria frente a las cepas blanco ensayadas. Existe una gran variabilidad de respuesta inhibitoria, la que, como

ya se ha expresado en párrafos anteriores, depende fundamentalmente de la cepa productora y de la cepa indicadora.

Tabla Nº 7: Ensayos de inhibición cruzada entre *E. faecalis* DBFIQ E24 y diferentes cepas de bacterias ácido lácticas (los diámetros de los halos de inhibición se informan medidos en mm).

Microorganismos Indicadores	<i>E. faecalis</i> DBFIQ E24 (como microorganismo productor de sustancia antimicrobiana)	<i>E. faecalis</i> DBFIQ E24 (como microorganismo sensible)
<i>E. faecium</i> E2	15	13
<i>E. faecalis</i> E13	14	11
<i>E. faecium</i> E3	14	15
<i>L. lactis</i> SF 1-1	14	14
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CRL 63	13	14
<i>S. thermophilus</i> SF 1-1	19	18
<i>L. plantarum</i> LP7	-	18
<i>L. plantarum</i> LP25	30	-
<i>L. plantarum</i> LP31	9	19
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LB 42	-	20

3.- CARACTERIZACIÓN DEL SOBRENADANTE LIBRE DE CÉLULAS**3.1.- Efecto de distintos tratamientos enzimáticos en la actividad antimicrobiana del SLC de *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24**

Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en la Tabla N° 8.

Tabla N° 8: Actividad antimicrobiana (expresada como diámetros de los halos de inhibición, medidos en mm) del SLC proveniente de cultivos de la cepa *E. faecalis* DBFIQ E24 frente a diversas cepas bacterianas indicadoras, Gram (+) y Gram (-), antes y después de ser sometido a diferentes tratamientos enzimáticos.

	Cepas indicadoras utilizadas							
	Gram (+)				Gram (-)			
	L. m.	S. a	B. c.	B. s.	P.sp.	E. c.	V.ch.	S. E.
SLC de <i>E. faecalis</i> DBFIQ E24	10	-----	16	15	15	16	23	16
Sensibilidad del SLC frente a tratamientos con diferentes enzimas								
Catalasa	9	-----	16	15	15	16	23	16
Lipasa	NE	NE	13	NE	NE	11	NE	NE
Lisozima	8	-----	16	12	14	15	18	11
Papaína	NE	NE	10	NE	NE	10	NE	NE
Pepsina	9	-----	11	10	-----	16	15	12
Pronasa E	NE	NE	10	NE	NE	11	NE	NE
Proteinasa K	NE	NE	8	NE	NE	10	NE	NE
Tripsina	-----	-----	-----	-----	-----	9	-----	-----
Blanco de las diferentes enzimas	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

L. m.: *Listeria monocytogenes* - **S. a.:** *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* - **B. c.:** *Bacillus cereus* - **B. s.:** *Bacillus subtilis* - **P. sp.:** *Pseudomonas* sp. - **E. c.:** *Escherichia coli* - **V. ch.:** *Vibrio cholerae* O1 EL Tor serotipo Inaba - **S. E.:** *Salmonella Enteritidis*.

Diámetro de los pozos: 7 mm.

-----: Actividad inhibitoria no detectada.

NE: no ensayado.

En esta Tabla se puede apreciar que se ha producido una desaparición total de la actividad antimicrobiana luego de someter al SLC a la acción de tripsina, excepto frente a la cepa blanco de *E. coli*, frente a la cual se ha comprobado la existencia de actividad antimicrobiana residual luego del tratamiento enzimático.

Frente a *E. coli* y *B. cereus* (únicos microorganismos que se sometieron a estos ensayos), los tratamientos del SLC tanto con Pronasa E como con Proteinasa K produjeron una sensible disminución de la actividad antagonística, pero no la hicieron desaparecer totalmente.

Las otras dos enzimas proteolíticas ensayadas, pepsina y papaína, inactivaron parcialmente la capacidad inhibitoria del SLC frente a las distintas cepas estudiadas. Sólo se observó una desaparición total de la capacidad inhibitoria cuando el SLC tratado con pepsina se ensayó frente a la cepa de *Pseudomonas* sp. Además, el tratamiento con esta enzima no modificó la actividad del SLC frente a las cepas de *L. monocytogenes* y *E. coli*.

En lo que respecta al tratamiento del SLC con catalasa, puede apreciarse que el sobrenadante no modificó su actividad antimicrobiana luego de ser sometido a la acción de esta enzima.

Luego del tratamiento del SLC con lisozima se observó solamente inactivación parcial de la actividad frente a algunos de los microorganismos blanco, siendo esta inactivación parcial poco significativa frente a *Pseudomonas* sp. y a *E. coli*, e inexistente frente a *B. cereus*.

Por último, al ensayar el efecto de lipasa sobre la actividad antagonística del SLC, se detectó una disminución considerable pero sólo parcial del halo de inhibición generado frente a *E. coli* y *B. cereus* (únicas cepas blanco ensayadas).

Estos resultados indicarían que la actividad antimicrobiana detectada en el sobrenadante DBFIQ E24 no se debería exclusivamente a compuestos con características proteicas o peptídicas, aunque también pueden atribuirse a diferentes comportamientos de las diversas proteasas frente al SLC en estudio. Los compuestos no proteicos probablemente presentes podrían ejercer su acción inhibitoria independientemente de las proteínas o péptidos, o podrían estar asociados a las mismas ejerciendo una acción sinérgica, lo que podría explicar la inactivación sólo parcial debida a algunas de las enzimas proteolíticas ensayadas. De todos modos, debe tenerse en cuenta que los ensayos enzimáticos sólo contribuyen a efectuar una caracterización preliminar de los sobrenadantes libres de células con actividad bacteriocinogénica obtenidos de cultivos de BAL, y brindan únicamente una primera aproximación al conocimiento de la naturaleza química de los compuestos activos presentes en ellos.

Foulquié Moreno et al. (2003), obtuvieron comportamientos similares de varios sobrenadantes libres de células de cepas de *Enterococcus* utilizando las mismas enzimas pero distintas cepas indicadoras; la excepción la constituyen lipasa y lisozima, cuya acción no modificó la actividad de los sobrenadantes estudiados.

Según Millette et al. (2007), cuando el tratamiento con lipasa reduce la actividad antimicrobiana del SLC, esto podría deberse a que los ácidos grasos están involucrados en la adsorción de la bacteriocina a la membrana bacteriana.

3.2.- Determinación de algunos parámetros fisicoquímicos

3.2.1- Tratamientos térmicos

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla N° 9.

Tabla N° 9: Actividad antimicrobiana (expresada como diámetros de los halos de inhibición, medidos en mm) del SLC proveniente de cultivos de la cepa *E. faecalis* DBFIQ E24 frente a diversas cepas bacterianas indicadoras, Gram (+) y Gram (-), antes y después de ser sometido a diferentes tratamientos térmicos.

	Cepas indicadoras utilizadas							
	Gram (+)				Gram (-)			
	L. m.	S. a.	B. c.	B. s.	P.sp.	E. c.	V. ch.	S. E.
SLC de <i>E. faecalis</i> DBFIQ E24	10	-----	16	15	15	16	23	16
Sensibilidad del sobrenadante a diversos tratamientos térmicos								
10 min. a 100 °C	9	-----	12	14	13	14	20	16
30 min. a 100 °C	8	-----	11	12	11	12	19	13
15 min. a 121 °C	8	-----	10	12	11	12	18	12

L. m.: *Listeria monocytogenes* - **S. a.:** *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* - **B. c.:** *Bacillus cereus* - **B. s.:** *Bacillus subtilis* - **P. sp.:** *Pseudomonas* sp. - **E. c.:** *Escherichia coli* - **V. ch.:** *Vibrio cholerae* O1 EL Tor serotipo Inaba - **S. E.:** *Salmonella Enteritidis*.

Diámetro de los pozos: 7 mm.

----- Actividad inhibitoria no detectada.

En la Tabla precedente se puede comprobar que la actividad antibacteriana del sobrenadante sólo se modificó de manera poco significativa con los distintos tratamientos térmicos, lo que comprueba su elevada termorresistencia. Las variaciones en la actividad han sido mínimas frente al tratamiento térmico más suave, y si bien se incrementaron levemente al aumentar la intensidad de dicho tratamiento, siempre se mantuvo una actividad residual elevada y similar a la del sobrenadante no tratado.

En general, la mayoría de las bacteriocinas y sustancias tipo bacteriocinas de bajo peso molecular presentan este comportamiento (Park et al., 2003; Muriana and Klaenhammer, 1991, Martín-Platero et al., 2006).

Strompfová et al. (2007), encontraron similares resultados en un estudio in vitro sobre producción de bacteriocinas de *Enterococcus*, cuya actividad fue estable después del calentamiento (30 °C, 60 °C, durante 1 h, 80 °C durante 20 minutos y 100 °C durante 10 minutos), no detectándose diferencias en los diámetros de los halos inhibitorios a las temperaturas y tiempos de tratamiento ensayados.

Otros autores como Pascual et al. (2008), reportaron que la actividad inhibitoria del SLC proveniente de la cepa de *Lactobacillus fermentum* L23 no fue alterada significativamente por tratamiento con calor. Luego de someter al SLC a 100 °C durante 60 min., la actividad fue de 640 AU/mL, y la misma actividad se observó después de 10 min a 121 °C. Estos resultados demuestran que la sustancia antibacteriana producida por la cepa L23 es resistente al calor.

Similares resultados obtuvieron Anastasiadou et al. (2008), quienes aislaron el péptido antimicrobiano pediocina SA-1 proveniente de *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. Cuando este péptido fue expuesto a diferentes tratamientos térmicos

(100 °C y 121 °C durante 60 min y 20 min respectivamente), mostró estabilidad frente a los mismos.

La estabilidad al calor puede ser debida a la formación de pequeñas estructuras globulares con regiones fuertemente hidrofóbicas, como así también a la presencia de entrecruzamientos estables y a un elevado contenido de glicina (Hun-Joo et al., 1999).

La estabilidad al calor es una característica muy útil de algunas bacteriocinas para su empleo como bioconservantes alimentarios, ya que muchos procesos de elaboración de alimentos involucran procesos de calentamiento.

3.2.2.- Sensibilidad frente al pH

Los resultados de los ensayos realizados se observan en la Tabla Nº 10.

La misma muestra que, para la gran mayoría de las cepas sensibles, en el rango de valores de pH comprendido entre 4.50 y 5.0 la actividad inhibitoria se ve incrementada por efecto de la acidez láctica. Esto se confirma con los resultados obtenidos en los ensayos blancos realizados con el medio de cultivo con su pH ajustado entre los valores mencionados.

Con valores de pH comprendidos entre 6.0 y 7.0 la capacidad antagonística es máxima, y disminuye levemente en el rango comprendido entre pH 8.0 y 9.0.

Estos resultados concuerdan sólo parcialmente con los de Martín-Platero et al. (2006) y de Sparo et al. (2006), quienes no observaron modificaciones de actividad antimicrobiana en el rango de pH comprendido entre 4.0 y 8.0.

Tabla Nº 10: Actividad antimicrobiana (expresada como diámetros de los halos de inhibición, medidos en mm) del SLC proveniente de cultivos de la cepa *E. faecalis* DBFIQ E24 frente a diversas cepas bacterianas indicadoras, Gram (+) y Gram (-), antes y después de ser sometido a diferentes pH.

	Cepas indicadoras utilizadas							
	Gram (+)				Gram (-)			
	L. m.	S. a.	B. c.	B. s.	P.sp.	E. c.	V. ch.	S. E.
SLC de <i>E. faecalis</i> DBFIQ E24	10	-----	16	15	15	16	23	16
Sensibilidad del sobrenadante frente a diferentes pH								
pH=4.50	15	14	25	19	18	25	25	25
pH=5.00	9	-----	20	16	13	25	25	20
pH=6.00	9	-----	18	14	14	20	23	19
pH=7.00	10	-----	16	15	15	16	23	16
pH=8.00	8	-----	14	13	13	14	21	14
pH=9.00	8	-----	14	13	13	14	21	14
Control M17 pH=4.50	10	14	15	14	14	16	21	16
Control M17 pH=5	8	12	11	12	11	12	17	14
Control M17 pH= 6.0 a 9.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

L. m.: *Listeria monocytogenes* - **S. a.:** *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* - **B. c.:** *Bacillus cereus* - **B. s.:** *Bacillus subtilis* - **P. sp.:** *Pseudomonas* sp. - **E. c.:** *Escherichia coli* - **V. ch.:** *Vibrio cholerae* O1 EL Tor serotipo Inaba - **S. E.:** *Salmonella Enteritidis*.

Diámetro de los pozos: 7 mm.

----- Actividad inhibitoria no detectada.

Por su parte, Strompfová et al. (2007), determinaron para la cepa de *E. faecium* EF55, que la mayor actividad inhibitoria se observaba a pH 5.0, y que la misma disminuía a pH entre 7.0 y 9.0, y también resultaba sumamente escasa a pH 3.0.

Shin et al. (2008), aislaron y caracterizaron una bacteriocina producida por *Pediococcus pentosaceus* K23-2, la que resultó ser estable desde pH 2.0 a 8.0, mientras que a pH 9.0 y 10.0 perdió totalmente su actividad.

El hecho de que el SLC en estudio presente su mayor efecto inhibitorio a valores de pH comprendidos entre 6.0 y 7.0, le confiere ventajas frente a la nisina, que es muy estable, activa y soluble a pH 2.0, mientras que estas propiedades disminuyen significativamente con el incremento de pH (Hun-Joo et al., 1999).

El estudio del efecto de distintos factores físico-químicos sobre la actividad de una bacteriocina no sólo tiene el fin de caracterizarla, sino que, además, es útil para inferir su posible aplicación industrial. Esto se debe a que las altas temperaturas y las amplias variaciones de pH son, entre otras cosas, algunas de las condiciones que debe resistir una bacteriocina para ser considerada como potencial agente inhibidor de microorganismos no deseados en diferentes tecnologías alimentarias, tales como producción de leches fermentadas, maduración de quesos, elaboración de alimentos cárnicos fermentados, curado de encurtidos, etc.

3.2.3.- Determinación del PM aparente de la fracción activa**3.2.3.1.- Ultrafiltración**

La técnica aplicada para determinar el peso molecular aparente del compuesto activo presente en el sobrenadante permitió detectar la presencia de dos fracciones con actividad antimicrobiana: una retenida (PM mayor a 3000 Da), de escasa actividad, y otra filtrada (PM menor a 3000 Da), con marcada capacidad inhibitoria frente a *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *Pseudomonas* sp. Estos datos se muestran en la Tabla N° 11.

Tabla N° 11: Actividad antagonística frente a las cepas indicadoras de las fracciones filtrada y retenida luego de la ultrafiltración del SLC. Los diámetros de los halos de inhibición se informan en mm.

	Cepas indicadoras utilizadas			
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
E24 concentrado 10 veces	11	18	20	18
Filtrado de la ultrafiltración	10	17	18	16
Retenido de la ultrafiltración	-	15	15	15

Diámetro de los pozos: 7 mm

La actividad residual presente en la fracción retenida podría deberse a que los compuestos de bajo peso molecular no trasvasaron la membrana por encontrarse agregados, dado que el agregado de las bacteriocinas de bajo PM es un fenómeno muy común entre estas sustancias.

A este respecto, es abundante la información bibliográfica que coincide con esta hipótesis, e incluso logra demostrarla. Así por ejemplo:

- Gálvez et al. (1998) aislaron una bacteriocina denominada enterocina EJ97, la que posee regiones hidrofóbicas que juegan un rol importante en la actividad biológica de la molécula y en su tendencia a formar agregados en soluciones acuosas.
- Aktypis et al. (1998) encontraron que durante el proceso de purificación de termofilina T se produjo pérdida de actividad en cada paso del proceso, y lo relacionaron con la tendencia a formar agregados con ella misma o con otras especies moleculares.
- Yamamoto et al. (2003) encontraron resultados similares de formación de agregados que fueron detectados durante la etapa de elución del proceso cromatográfico con Sephadex G-50, ya que todas las proteínas con actividad antimicrobiana eluyeron en el volumen muerto de la columna, las cuales tenían un PM mayor a 30000 Da. Con el agregado de Tween 80, estos autores lograron desagregar las proteínas activas, y determinaron que el PM de las unidades monoméricas era de 5000 Da.

Estos ejemplos ponen en evidencia la gran tendencia a formar agregados comprobada en muchas bacteriocinas, los cuales están constituidos por varios péptidos monoméricos.

En función de lo expuesto y teniendo en cuenta las experiencias de los otros autores citados a modo de ejemplo, se puede inferir que el compuesto

antimicrobiano en estudio en la presente investigación posee un peso molecular menor a 3000 Da.

3.2.3.2.- Diálisis

a) Membrana con cut off de 1000 Da.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla N° 12.

Tabla N° 12: Actividad antagonística frente a las cepas indicadoras de las fracciones filtrada y retenida por la membrana dialítica con cut off de 1000 Da. Los diámetros de los halos de inhibición se informan en mm.

	Cepas indicadoras utilizadas			
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
E24 concentrado 10 veces	11	18	20	18
Filtrado de la diálisis	-	-	-	-
Retenido de la diálisis	13	11	13	12

Diámetro de los pozos: 7 mm

Los resultados expuestos en esta Tabla muestran claramente que la fracción activa es la que resultó retenida por la membrana dialítica. De ello se deduce en forma inequívoca que la sustancia antimicrobiana en estudio posee un PM mayor a 1000 Da.

Shin et al. (2008), utilizaron diálisis con membrana de cut-off de 1000 Da para caracterizar a una bacteriocina proveniente de *Pediococcus pentosaceus* K23-2, demostrando que la sustancia estudiada tenía un PM mayor a 1000 Da.

Riazi et al. (2009), dializaron la muestra del SLC proveniente de *Bacillus coagulans* ATCC 7050 con membrana de cut-off de 1000 Da, con el propósito de purificar parcialmente la muestra, y lograron aislar una sustancia antimicrobiana (lactosporina) de PM comprendido entre 25 y 30 kDa.

b) Membrana con cut off de 2000 Da.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla N° 13.

Tabla N° 13: Actividad antagonística frente a las cepas indicadoras de las fracciones filtrada y retenida por la membrana dialítica con cut off de 2.000 Da. Los diámetros de los halos de inhibición se informan en mm.

	Cepas indicadoras utilizadas			
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
E24 concentrado 10 veces	11	18	20	18
Filtrado de la diálisis	15	11	16	14
Retenido de la diálisis	-	-	-	-

Diámetro del pozo: 7 mm

Los valores detallados en la Tabla demuestran que la fracción activa no resultó retenida por la membrana dialítica. Ello indica que la sustancia antimicrobiana en estudio posee un PM menor a 2000 Da.

Resultados similares fueron publicados por Franz et al. (2007), quienes determinaron que la enterocina citolisina L_s (CylL_s) presentó un PM de 2037 Da.

Pascual et al. (2008), estimaron el PM de la bacteriocina L23, producida por *Lactobacillus fermentum* L23, utilizando membranas dialíticas de cut-off entre 10000 y 7000 Da; estos investigadores obtuvieron un PM menor a 7000 Da para la bacteriocina en estudio.

Tiwari et al. (2008), utilizaron membranas de cut-off de 5000 Da para caracterizar y purificar a plantaricin LR14, una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* LR/14; el PM de la misma resultó ser menor de 5000 Da, ya que la actividad antibacteriana se encontró en la fracción de permeado.

Jamuna et al. (2004) utilizaron, a fin de estimar el PM de bacteriocinas de varias especies de *Pediococcus*, ultrafiltración con membranas de cut-off de 5000 Da, y posteriormente dializaron la muestra con membranas dialíticas de cut-off de 2000 Da; los resultados obtenidos demostraron que esas bacteriocinas presentaron pesos moleculares comprendidos entre 3500 y 5000 Da.

Sabia et al. (2002), estimaron el PM de enterocina 416K1, proveniente de *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, combinando diálisis y ultrafiltración, y obtuvieron un PM correspondiente a la enterocina menor de 5000 Da.

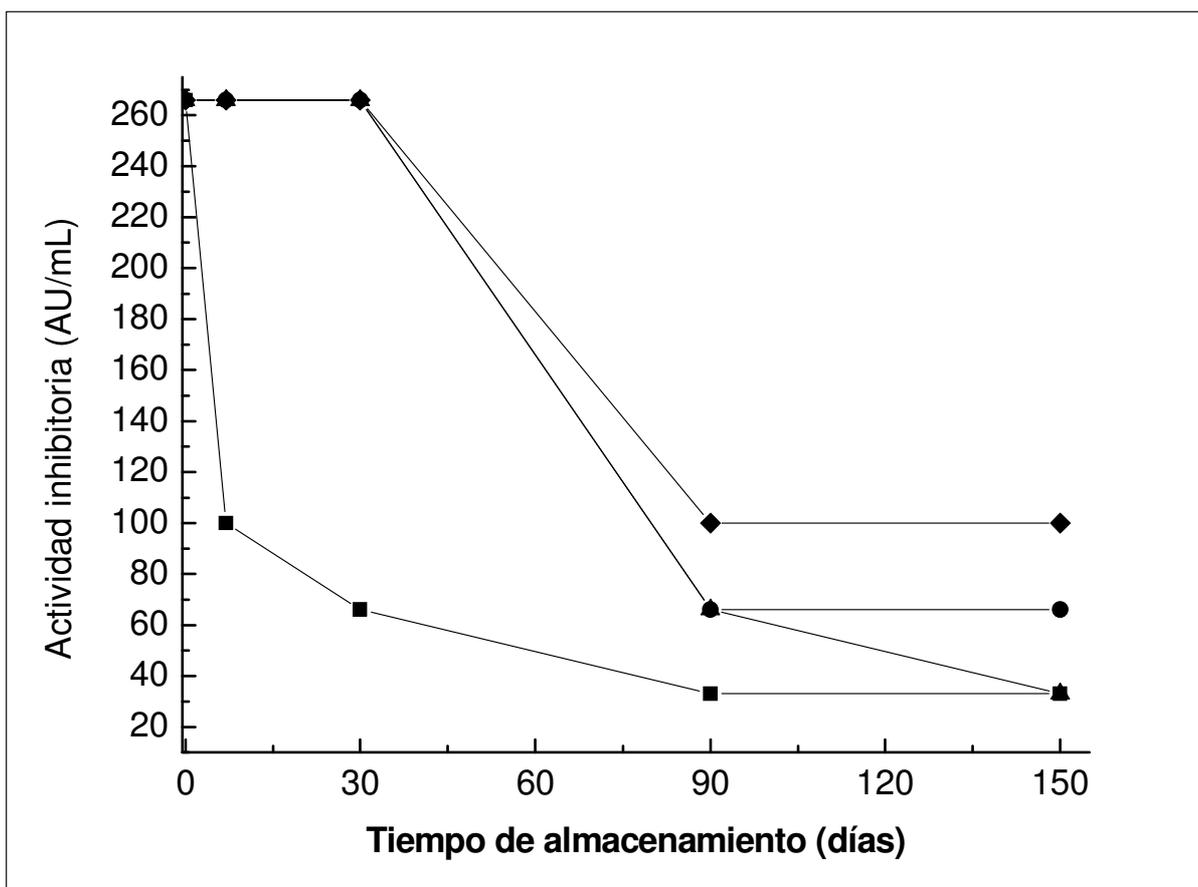
Otros investigadores han utilizado la diálisis como metodología para acotar las fracciones activas de los sobrenadantes libres de células, como lo hicieron Ohmomo et al. (2000), quienes utilizaron membranas dialíticas de cut-off entre 6000 y 8000 Da, antes de llevar a cabo el proceso de purificación propiamente dicho de la enterocina ON-157, producida por *Enterococcus faecium* NIAI 157, cuyo PM resultó ser de 2500 Da, siendo este valor determinado mediante la técnica SDS-PAGE.

Por otra parte, la mayoría de las enterocinas descritas hasta la actualidad presentan bajos PM, los que oscilan entre menos de 2000 y 8000 Da.

3.2.4.- Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento sobre la actividad inhibitoria del SLC

Los resultados de los ensayos efectuados para determinar el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento sobre la actividad inhibitoria del SLC obtenido de cultivos de *E. faecalis* DBFIQ E24 puede observarse en la Figura N° 7.

Figura N° 7: Efecto del tiempo y de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad inhibitoria del SLC de *E. faecalis* DBFIQ E24.



Temperaturas de almacenamiento: 37 °C (■), 25 °C (▲), 4 °C (●) y -20 °C (◆).

En esta Figura se aprecia que el sobrenadante puede ser almacenado a 4 °C, 25 °C ó -20 °C al menos durante 1 mes sin perder su actividad antimicrobiana. A partir de este tiempo de almacenamiento se verificó una importante disminución de la actividad, que resultó mucho mayor a 4 y 25 °C que a -20 °C. Se puede apreciar también una gran pérdida de actividad a 37 °C, que ya se verificó durante los primeros 7 días de almacenamiento, probablemente debido a que esta temperatura es ideal para la acción de determinadas enzimas proteolíticas que podrían encontrarse presentes en el sobrenadante.

Por su parte, Simonová y Lauková (2007) encontraron que enterocina EF2019, almacenada durante tres meses a -20 °C, 4 °C y a temperatura ambiente, no modificó su actividad inhibitoria.

De igual modo, la sustancia antimicrobiana proveniente de la cepa de *E. faecium* EF55 fue caracterizada en detalle por Stropfová et al. (2007), quienes también informaron que la actividad inhibitoria no se modificó cuando se la almacenó a -20 °C durante 12 meses, aunque dicha actividad disminuyó cuando se la almacenó a 21 °C y 4 °C durante 1 y 6 meses respectivamente.

Aktypis et al. (1998), encontraron que el SLC conteniendo termofilina T almacenado a -30 °C y a 4 °C no perdió la actividad durante 2 y 1 mes respectivamente, pero cuando se almacenó a 25 °C la actividad se perdió en 5 días.

Basanta et al. (2008), estudiaron la estabilidad de la actividad de dos enterocinas (enterocina L50A y enterocina L50B), ambas provenientes de *Enterococcus faecium* L50. En relación a su almacenamiento a 8 °C y 25 °C durante 30 días, encontraron que la actividad residual fue de 88 y 52% respectivamente.

Anastasiadou et al. (2008), aislaron pediocina SA-1 proveniente de *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627; la bacteriocina purificada fue almacenada durante 4 semanas a -80, -20, 4 y 30 °C, no detectándose cambios de su actividad en estos ensayos.

Cintas et al. (1997), encontraron que enterocina P, bacteriocina obtenida de la cepa de *Enterococcus faecium* P13, no perdió su actividad cuando fue almacenada a 4 y -20 °C durante largo tiempo.

De estos resultados se deduce que la mayoría de las bacteriocinas provenientes de cepas de *Enterococcus* soportan el almacenamiento a temperaturas de refrigeración por períodos largos de tiempo sin modificar su actividad antimicrobiana, lo que las hace excelentes para ser usadas como conservantes naturales de alimentos.

3.2.5.- Acción de los surfactantes sobre la actividad inhibitoria del SLC

Los resultados correspondientes al efecto de los surfactantes sobre la actividad inhibitoria del SLC de *E. faecalis* DBFIQ E24 se aprecian en la Tabla N° 14.

Tabla N° 14: Efecto del agregado de surfactantes sobre la actividad del SLC de *E. faecalis* DBFIQ E24.

Surfactantes	Título del sobrenadante (AU/mL)		Título control del detergente (AU/mL)	
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
	267	267		
No iónicos				
Tritón X-100	533	533	-	133
Tween 20	267	267	-	133
Tween 80	267	267	-	-
Aniónicos				
SDS	267	133	-	33
Ácido glicólico	533	267	67	67
Ácido cólico	267	33	-	-
Ácido desoxicólico	533	267	-	-
Ácido taurocólico	267	67	-	133
Catiónicos				
Bromuro de cetil trimetilamonio	533	533	133	133

Del análisis de los resultados expuestos en esta Tabla surgen las siguientes deducciones:

- Para la cepa blanco de *E. coli*, el agregado de la mayoría de los surfactantes al SLC no afectó la actividad antimicrobiana del mismo. Sin embargo, para el Tritón X-100 y para el detergente aniónico ácido desoxicólico, el título del sobrenadante se duplicó, sin que el control de ambos surfactantes resultase positivo.
- Para *B. cereus* los resultados son más dispares: la actividad antimicrobiana del sobrenadante no cambió con cuatro de los surfactantes ensayados, se duplicó con dos de ellos (aunque éstos por sí mismos produjeron inhibición), y disminuyó sensiblemente con otros tres.
- Se aprecia también que la bacteria blanco Gram (-) es mucho más resistente a los surfactantes solos utilizados como controles que la bacteria Gram (+), ya que su crecimiento no fue inhibido por éstos, excepto por ácido glicólico y bromuro de cetil trimetilamonio. Estas diferencias podrían atribuirse a las diferentes estructuras de pared celular que poseen ambos tipos de microorganismos.
- Los surfactantes no iónicos Tween 20 y Tween 80 no produjeron cambios en la actividad inhibitoria. A diferencia de estos resultados, Muriana y Klaenhammer (1991) observaron un aumento en la actividad antimicrobiana, y Sparo et al. (2006) constataron un efecto inverso en la actividad de los SLC estudiados por ellos frente al tratamiento con los mismos detergentes.

La consecuencia del agregado al sobrenadante de diferentes surfactantes es favorecer la desagregación de los complejos de bacteriocina. De esta manera, un mayor número de unidades de bacteriocina se encontrarán disponibles para actuar sobre los microorganismos sensibles, aumentando así el título antimicrobiano del SLC.

Esto también refuerza la hipótesis planteada previamente en la presente investigación, relativa a la detección de dos fracciones activas, una de peso molecular mayor de 3000 Da y otra de peso molecular menor de 3000 Da, en el ensayo de determinación del peso molecular aparente.

En coincidencia con esta hipótesis, Yamamoto et al. (2003), detectaron que el agregado de Tween 80 al 1% (v/v) produjo la disociación de agregados en sus formas monoméricas, aumentando la actividad antimicrobiana de enterocina RJ-11.

Messens et al. (2002), estudiaron la acción que ejercen los surfactantes sobre la actividad de algunas bacteriocinas y encontraron que la actividad de plantaricina ST31 no fue afectada al adicionar al SLC agentes surfactantes tales como SDS, Tween 20 y Tween 80, en una concentración del 1% (v/v). Por otra parte, también lograron determinar que el agregado de iones divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2}) conjuntamente con agentes emulsificantes, produjo disminución de la actividad antimicrobiana.

Bonadè et al. (2001), demostraron la desagregación de una bacteriocina producida por *Lactobacillus helveticus*, en presencia de SDS agregado al determinar el PM utilizando la técnica SDS-PAGE; los resultados obtenidos permitieron determinar un PM de 12.5 kDa para la bacteriocina en estudio, en contraposición con los 60 kDa obtenidos por filtración por gel, en ausencia de surfactantes.

Ganzle et al. (2000), estudiaron el efecto de los surfactantes en la producción de reuteriicina por *Lactobacillus reuteri* LTH2584, y observaron que el Tween 80, además de ser un factor de crecimiento para la bacteria láctica productora, también afectaba la solubilidad y la actividad de antimicrobianos hidrofóbicos, debido a su propiedad emulsificante.

Otros investigadores como Chumchalová et al. (2004), estudiaron el efecto de surfactantes para detectar la naturaleza hidrofóbica de acidocina CH5, agregándolos al SLC en una concentración de 1% (p/v). La adición de detergentes aniónicos (SDS y deoxicolato de sodio) elevó el efecto antimicrobiano de la bacteriocina, mientras que la adición de detergentes no iónicos (Tween 20, Tween 80, Tritón X-100, Nonidet P-40) no afectó la actividad antimicrobiana, y con detergentes catiónicos (bromuro de hexadecil-trimetilamonio) no lograron precisar el efecto sobre la actividad, ya que el control del surfactante dio el mismo valor que la muestra tratada con el mismo.

Millette et al. (2007), observaron que surfactantes tales como Tween 80, Tritón X-100 y SDS no produjeron aumento en la actividad antimicrobiana del SLC de *Lactococcus lactis* MM19, cuando los mismos fueron agregados en una concentración del 1% (v/v); sin embargo, los mismos detergentes y en la misma concentración, aumentaron al doble la actividad antimicrobiana del SLC de *Pediococcus acidilactici* MM33.

La acción de los detergentes en general es aumentar la actividad inhibitoria como consecuencia de la desagregación de péptidos y proteínas antibacterianas, pero tal como puede apreciarse en la reseña expuesta, existe una gran diversidad de resultados en los trabajos publicados, lo que indica que para cada caso hay que ensayar cuál es el detergente apropiado para ejercer la acción antiagregante buscada.

3.3.- Determinación del título del SLC

El título del sobrenadante libre de células E24 concentrado 10 veces resultó ser de 267 AU/ mL frente a *Bacillus cereus* DBFIQ B 28 y a *E. coli* DBFIQ E. c. 9.

Strompfová et al. (2007), estudiaron la variación del título del SLC de *Enterococcus faecium* EF55 con treinta cepas indicadoras diferentes. En este trabajo

se puede apreciar la gran variación del título del SLC en ensayo. A modo de ejemplo se detallan los siguientes valores: 51200 AU/mL cuando se lo enfrentó con la cepa de *Enterococcus avium* EA5; 25600 AU/mL con *S. aureus* CB44; 400 AU/mL con *S. aureus* SA5; 6400 AU/mL con *Listeria innocua* LMG 13568; 100 AU/mL con *Listeria monocytogenes* LM9; 0 AU/mL con *E. coli* 6295 y *Enterobacter cloacae* 19259. Considerando estos datos se puede concluir que si un SLC inhibe el crecimiento de una cepa determinada de *S. aureus* con un buen título, esto no significa que haga lo mismo con todas las cepas de ese microorganismo, de lo que resulta evidente que el título de cualquier SLC con actividad antimicrobiana dependerá mucho de la cepa indicadora frente a la cual deberá ejercer su acción.

Foulquié Moreno et al. (2003), constataron que los SLC de cepas de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* ensayados frente a diferentes cepas de *Listeria* produjeron títulos muy diferentes, que variaron entre 0 AU/mL y 3200 AU/mL.

Otros autores reportaron un título de 130 AU/mL para el SLC de *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627 (elegida entre diez cepas estudiadas de *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*) frente a la cepa de *Micrococcus luteus* CECT 241 (Anastasiadou et al., 2008).

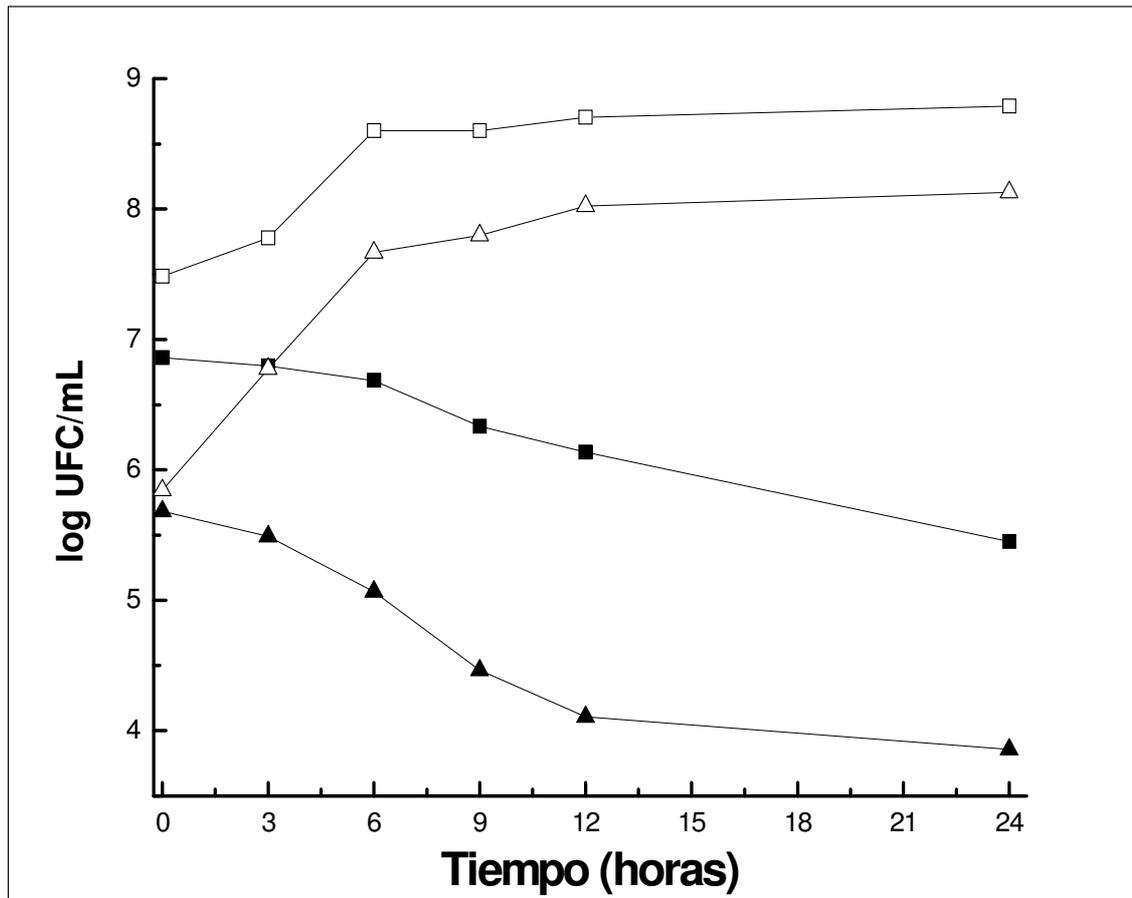
3.4.- Determinación del modo de acción y de la actividad lítica

El modo de acción de una sustancia inhibidora frente a una célula sensible puede ser bacteriolítico, bactericida o bacteriostático. El primero implica muerte celular seguida de lisis, con la concomitante disminución de las densidades ópticas o turbidez del cultivo del microorganismo sensible. El modo de acción bactericida produce también muerte celular, que se manifiesta en la disminución en el conteo de

colonias, pero sin lisis, con lo que el valor de densidades ópticas del cultivo de la cepa blanco se mantiene constante. El modo de acción bacteriostático no produce muerte celular pero detiene el crecimiento; en este caso, sin muerte celular, el conteo de colonias y la densidad óptica del cultivo de la cepa blanco se mantienen constantes.

En lo que respecta al modo de acción del sobrenadante en estudio, en la Figura N° 8 se observa la evolución de las poblaciones de *E. coli* y *B. cereus* en Caldo Nutritivo (Biokar), con y sin el agregado de un 10% (v/v) del SLC.

Figura N° 8: Modo de acción del sobrenadante libre de células de *E. faecalis* DBFIQ E24.

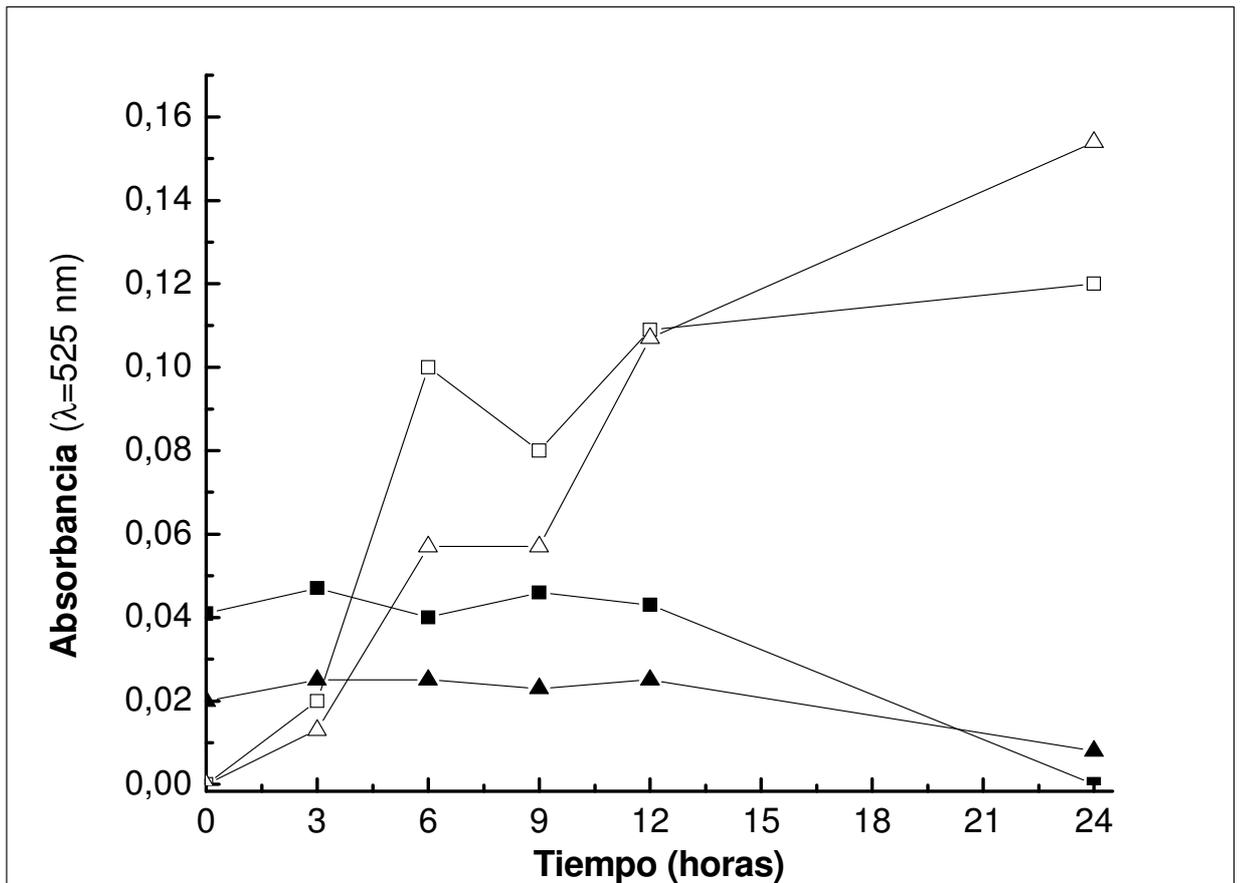


- *E. coli* en Caldo Nutritivo sin el agregado del sobrenadante (control)
- *E. coli* en Caldo Nutritivo con adición del sobrenadante E24
- △- *B. cereus* en Caldo Nutritivo sin el agregado del sobrenadante (control)
- ▲- *B. cereus* en Caldo Nutritivo con adición del sobrenadante E24

Para la cepa Gram (-), la presencia del sobrenadante E24 produjo un importante descenso en los niveles poblacionales, llegando a una disminución de los mismos de casi tres ciclos logarítmicos al cabo de 24 horas de cultivo. Para la cepa Gram (+), el sobrenadante E24 produjo una disminución aún mayor de las concentraciones celulares, alcanzando ésta a cuatro ciclos logarítmicos al cabo de 24 horas de incubación. Estos resultados permiten aseverar que el efecto que provoca el agregado del sobrenadante concentrado a las poblaciones celulares de *E. coli* y *B. cereus* es netamente bactericida.

Los resultados obtenidos al medir las absorbancias o densidades ópticas de los cultivos de las mismas cepas blanco, a fin de determinar la actividad lítica del sobrenadante E24 sobre ellas, se observan en la Figura Nº 9.

Figura N° 9: Actividad lítica del sobrenadante libre de células de *E. faecalis* DBFIQ E24.



- *E. coli* en Caldo Nutritivo sin el agregado del sobrenadante (control)
- *E. coli* en Caldo Nutritivo con adición del sobrenadante E24
- △- *B. cereus* en Caldo Nutritivo sin el agregado del sobrenadante (control)
- ▲- *B. cereus* en Caldo Nutritivo con adición del sobrenadante E24

Puede apreciarse en la Figura que el sobrenadante mostró un marcado efecto lítico sobre la cepa de *E. coli* a partir de las 9 horas de cultivo, y que dicho efecto también se verificó frente a la cepa de *B. cereus*, aunque con menor intensidad.

Sparo et al. (2006), observaron el mismo comportamiento bactericida y lítico del sobrenadante libre de células de una cepa de *Enterococcus faecalis* productora de enterocina MR99, frente a una cepa sensible de *L. monocytogenes*.

Sabia et al. (2004), estudiaron dos bacteriocinas de *Enterococcus*, encontrando que el modo de acción fue bactericida, pero no detectaron disminución en las densidades ópticas de la suspensión celular sensible durante todo el experimento. Por lo tanto, esta experiencia indica que la actividad de las dos bacteriocinas resultó ser bactericida, pero no estuvo acompañada de lisis celular.

Resultados similares publicaron Bonadé et al. (2001), quienes obtuvieron una bacteriocina proveniente de *Lactobacillus helveticus* G51, cuyo modo de acción fue bactericida sin lisis celular, siendo la cepa blanco *Lactobacillus helveticus* CNRS 328.

Basanta et al. (2008), constataron que las enterocinas presentes en el SLC proveniente de la cepa de *Enterococcus faecium* L50, disminuyeron en cinco ciclos logarítmicos, al cabo de 24 horas, los niveles poblacionales de cultivos de *Pediococcus damnosus* y *Lactobacillus brevis*; estos resultados indican que el SLC posee una acción netamente bactericida.

Gálvez et al. (1998), constataron que la bacteriocina purificada enterocina EJ97 mostró un modo de acción bactericida y bacteriolítico sobre un cultivo de *Enterococcus faecalis* S-47, al ser agregada en diferentes concentraciones.

Motta et al. (2007), aislaron la cepa de *Bacillus* P34, productora de una sustancia antimicrobiana, la que tuvo un comportamiento bactericida y bacteriolítico

frente a cepas indicadoras de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*, con un título de 160 AU/mL.

Joosten et al. (1996), estudiaron el modo de acción de enterocina 4, bacteriocina proveniente de la cepa de *Enterococcus faecalis* INIA 4, constatando que la misma tuvo un efecto bactericida frente a *Lactobacillus buchneri* St2A.

Balla et al. (2000), estudiaron dos bacteriocinas producidas por la cepa de *Enterococcus faecalis* BFE 1071, encontrando que el modo de acción de las mismas fue bactericida pero no bacteriolítico, ya que las densidades ópticas de los cultivos blanco permanecieron constantes en todo el experimento. Resultados similares fueron descritos por Ohmomo et al. (2000), quienes aislaron y purificaron la bacteriocina enterocina ON-157, producida por *Enterococcus faecium* NIAI 157, cuyo modo de acción fue bactericida y no bacteriolítico frente a *Enterococcus faecium* IFO 13712.

Foulquié Moreno et al. (2003), constataron que enterocinas provenientes de *Enterococcus* obtenidos de distintas fuentes, tuvieron un modo de acción tanto bactericida como bacteriolítico.

3.5.- Ensayos de citotoxicidad mediante lisis de eritrocitos

Es importante poder establecer la ausencia de citolisina generada por la cepa productora del SLC en estudio, a fin de descartar el riesgo potencial de enfermedad asociado con el uso de *Enterococcus*. Este es un aspecto sumamente importante para poder evaluar el potencial tecnológico y el uso práctico como biopreservador alimentario del sobrenadante E24.

E. faecalis DBFIQ E24 no presentó reacción de hemólisis alrededor de la colonia (γ -hemólisis) cuando fue sembrada en agar base sangre con el agregado de 7% (v/v) de sangre humana.

Este resultado descarta la posibilidad de presencia de citolisina en el SLC obtenido de la cepa en estudio, y refuerza la seguridad de su aplicación potencial en diferentes tecnologías alimentarias. También brinda certeza acerca de la ausencia de este riesgo en el caso de que la cepa bacteriocinogénica fuese incorporada a algún alimento fermentado a fin de que produzca la bacteriocina *in situ*.

Resultados similares fueron encontrados por otros investigadores, tales como Foulquié Moreno et al. (2003), al estudiar 6 cepas de *E. faecium* y 1 cepa de *E. faecalis*. Estos microorganismos presentaron actividad γ -hemolítica, es decir sin reacción de hemólisis alrededor de las colonias, lo que le infiere un comportamiento no hemolítico y, por lo tanto, ausencia de citolisina.

Balla et al. (2000), estudiaron la cepa de *Enterococcus faecalis* BFE 1071, constatando que la misma no presentó actividad hemolítica cuando fue sembrada en agar base sangre con el agregado de 5% (v/v) de sangre humana.

De Vuyst et al. (2003), realizaron un estudio con 122 cepas de *Enterococcus* de diferentes fuentes (alimentos, animales, humanos), constatando que 8 cepas de *Enterococcus faecalis* y 5 cepas de *Enterococcus faecium* presentaron β -hemólisis cuando fueron sembrados en agar base sangre con el agregado de 7% (v/v) de sangre humana. El resto de las cepas ensayadas no presentaron actividad hemolítica. La β -hemólisis no estuvo restringida a las cepas de *E. faecalis*, como suele indicarse en la bibliografía referida a cepas testigo de enterococos integrantes de distintas colecciones, sino que también la presentaron las cepas de *E. faecium*, hecho que puede atribuirse al carácter silvestre de los microorganismos estudiados.

Basanta et al. (2008), demostraron que la cepa de *Enterococcus faecium* L50 no presentó actividad hemolítica al ser ensayada en agar base sangre con el agregado de 5% (v/v) de sangre equina.

Pangallo et al. (2008), también evaluaron como factor de virulencia la actividad hemolítica de distintas cepas de *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. faecium* y *E. casseliflavus*. Las mismas fueron estudiadas cultivándolas en agar base sangre con el agregado de 3% (v/v) de eritrocitos humanos, y ninguna presentó actividad hemolítica.

Lemos Miguel et al. (2008), tampoco detectaron ningún marcador de patogenicidad relacionado con la actividad hemolítica para la cepa de *Enterococcus faecium* E86.

Sabia et al. (2008), aislaron 302 cepas de *Enterococcus* de diferentes orígenes, de las cuales presentaron actividad antimicrobiana 13 aislados clínicos, 5 aislados de alimentos y 9 aislados de animales; del total de los aislados sólo dos tuvieron actividad β -hemolítica (*E. faecalis* B10 y C1), cinco actividad α -hemolítica (cuatro *E. faecium*, B03, B06, B08 y C3, y un *E. casseliflavus*, M11), y el resto no tuvo actividad hemolítica.

De las referencias bibliográficas sumariamente expuestas hasta aquí puede deducirse claramente que la proporción de cepas salvajes β -hemolíticas detectadas en el género *Enterococcus* resultó siempre sumamente baja. Sin embargo, estos datos bibliográficos no implican que no deba darse importancia a esta característica cuando se pretende seleccionar cepas de enterococos para ser aplicadas en tecnologías alimentarias. Por el contrario, es indispensable realizar ensayos de citotoxicidad a fin de descartar el riesgo potencial de enfermedad asociado con el uso de *Enterococcus*, siendo éste un aspecto sumamente importante para poder evaluar el potencial tecnológico y el uso práctico como biopreservador alimentario de cepas específicas de estos microorganismos.

3.6.- Resistencia a vancomicina

La no resistencia a vancomicina es importante para poder aplicar la cepa de *Enterococcus* en estudio en la industria alimentaria o en la elaboración de productos veterinarios, como microorganismo seguro para ser aprovechado por su actividad productora de agentes antimicrobianos.

En la presente investigación, el valor de la MIC (concentración inhibitoria mínima) obtenido para el antibiótico glicopeptídico vancomicina frente a la cepa en estudio fue de 2 µg/mL, indicando que la cepa de *E. faecalis* DBFIQ E24 es sensible a este antibiótico.

Sabia et al. (2008), detectaron la producción de bacteriocinas de diferentes cepas de *Enterococcus* de diversos orígenes, y constataron que de 302 aislados, 27 presentaron resistencia a vancomicina, de las cuales 13 correspondieron a la especie *E. faecium*, 8 a *E. faecalis* y 6 a *E. casseliflavus*. La concentración inhibitoria mínima (MIC) considerada como punto de corte para presentar resistencia a vancomicina fue ≥ 32 µg/mL. La incidencia de resistencia a vancomicina no mostró correlación evidente con la procedencia de los aislamientos.

De Vuyst et al. (2003), estudiaron 122 cepas de *Enterococcus* de diferentes fuentes (alimentos, animales, humanos), todas productoras de bacteriocinas. Estos autores constataron que sólo 8 cepas (7 de *E. faecium* y 1 de *E. durans*) resultaron resistentes a vancomicina con valores de MIC mayores a 64 µg/mL. Por otra parte, también determinaron que ninguna de las 41 cepas de *E. faecalis* integrantes del grupo en estudio fue resistente a vancomicina.

Basanta et al. (2008), midieron la capacidad de resistencia a vancomicina de la cepa de *Enterococcus faecium* L50, utilizando discos conteniendo 30 µg del antibiótico colocados sobre un césped del microorganismo en estudio

(1×10^5 UFC/mL) desarrollado en placas de Petri e incubado a 37 °C durante 24 horas. Como resultado de este estudio observaron que la cepa fue sensible a vancomicina, ya que se formó un halo inhibitorio alrededor del disco que contenía el antibiótico. Esta técnica resulta práctica cuando se investiga resistencia a varios tipos de antibióticos, como es el caso de estos investigadores.

Gomes et al. (2008), caracterizaron cepas de *Enterococcus* aislados de 120 muestras de alimentos brasileños, siendo la especie predominante *E. faecium*, seguida por *E. faecalis*, *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*. Tres de las cepas de *E. faecium* aisladas fueron resistentes a vancomicina (MIC \geq 256 μ g/mL), mientras que ninguna de las especies de *E. faecalis* presentó resistencia. Sin embargo y en contraposición con estos resultados, se ha reportado que especies de *E. faecalis* han producido multi-resistencia, debido a la capacidad de adquirir y transferir genes resistentes a antibióticos.

Lemos Miguel et al. (2008), estudiaron la cepa de *Enterococcus faecium* E86, productora de bacteriocina, y encontraron que la misma fue sensible a vancomicina, lo que hace que tenga un potencial uso en tecnología de alimentos.

Pangallo et al. (2008), evaluaron como factor de virulencia la resistencia a antibióticos de distintas cepas de *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. faecium* y *E. casseliflavus*, constatando que sólo dos cepas (*E. hirae* y *E. casseliflavus*) fueron resistentes a vancomicina.

Los resultados encontrados por otros investigadores tales como Foulquié Moreno et al. (2003), al estudiar 6 cepas de *E. faecium* y 1 cepa de *E. faecalis*, demostraron que las mismas fueron sensibles a vancomicina, ya que se determinaron valores de MIC de 2 μ g/mL.

Foulquié Moreno et al. (2006), consideran que por razones de seguridad se debe determinar en los enterococos su capacidad de resistencia a antibióticos, especialmente a vancomicina, así como su actividad hemolítica, para poder establecer su aptitud para ser usados como cultivos starter en alimentos. La contribución de los *Enterococcus* a las propiedades organolépticas y su capacidad para producir bacteriocinas (enterocinas) son características importantes para su aplicación en tecnologías alimentarias, pero es indispensable determinar que las cepas a ser utilizadas sean totalmente seguras para la salud del consumidor.

En coincidencia con lo previamente manifestado para los ensayos de citotoxicidad, de las referencias bibliográficas comentadas se deduce que el porcentaje de cepas silvestres de enterococos resistentes a vancomicina resultó siempre bajo. Pero como en el caso de aquella característica, los datos bibliográficos no implican que no deba dársele importancia a ésta a la hora de seleccionar cepas para usos alimentarios. Por el contrario, también es indispensable realizar ensayos de resistencia a antibióticos, y en especial a vancomicina, a fin de descartar este riesgo para la salud del consumidor.

El hecho de que la cepa objeto de estudio en la presente investigación sea sensible a vancomicina, asociado a la ausencia en la misma de capacidad hemolítica, posibilita que sea buena candidata para ser usada en alimentos como cepa segura, y que cumpla así con la condición de GRAS otorgada por la OMS para las bacterias ácido lácticas en general.

4.- PROTOCOLOS DE PURIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EXOCELULARES PRESENTES EN EL SLC

Debido a la heterogeneidad de las bacteriocinas, es difícil generalizar y establecer un método de purificación unificado, por lo que los protocolos se han diseñado empíricamente para cada una de ellas y para cada caso en particular. Por ello, la purificación del/los compuesto/s responsable/s de la actividad antimicrobiana del SLC obtenido de cultivos de *E. faecalis* DBFIQ E24, se realizó inicialmente concentrando el SLC y, posteriormente, separando las proteínas por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía en fase reversa (C₁₈), a presión atmosférica, y finalmente por cromatografía líquida en fase reversa de alta resolución (RP-HPLC).

4.1.- Primer protocolo de purificación

4.1.1.- Cromatografía de intercambio catiónico

Se recolectaron cinco fracciones en función del perfil cromatográfico obtenido al realizar el intercambio catiónico con SP-Sepharosa [Figura N^o 10: lavado (0.05 M de AcNH₄), A (0.1M de AcNH₄), B (0.2 M de AcNH₄), C (0.3 M de AcNH₄) y D (0.4 M de AcNH₄)]. Las fracciones fueron seleccionadas en función de la molaridad de los distintos solventes de elución utilizados.

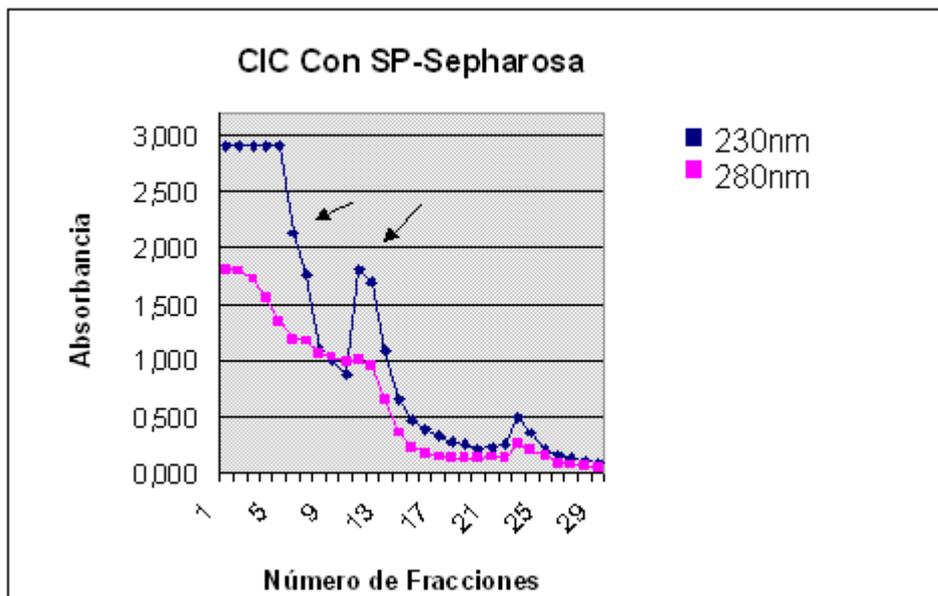
En la Tabla N^o 15 se detallan los diámetros de los halos de inhibición generados por las distintas fracciones sobre los microorganismos indicadores utilizados. Puede apreciarse en la misma que las fracciones activas fueron las correspondientes al lavado y a la fracción A. Es probable que la fracción de lavado posea actividad debido a la formación de agregados peptídicos, los cuales no son

retenidos por la columna de intercambio catiónico y son eluidos con la solución de lavado.

La fracción A, resultante de la elución con 0.1 M de AcNH_4 , y cuya actividad expresada en Unidades Arbitrarias fue de 266 AU/mL (Tabla N° 16), resultó ser la más activa de ambas, dado que la fracción de lavado presentó un título inhibitorio menor. Por ello se optó por continuar purificando solamente la fracción más activa.

El resumen de los procesos de purificación parcial se detalla en la Tabla N° 16. En esta etapa de purificación se observó una actividad específica de 30.6 (AU/mg) y un aumento de 10.2 veces en la actividad específica inicial. No obstante, la recuperación fue baja (2%), ya que una parte activa se perdió en el proceso de lavado de la columna.

Figura N° 10: Perfil cromatográfico del intercambio catiónico con SP-Sepharosa a pH=4.50 y utilizando como solventes de elución buffers de acetato de amonio desde 0.1 M a 0.4 M. Las fracciones activas corresponden a las dos primeras (→).



Fracción de lavado: desde 1 a 9, se eluyó con AcNH_4 0.05 M; es la solución de lavado y con la que se preparó la muestra. Esta fracción es activa.

Fracción A: desde 10 a 16, se eluyó con AcNH_4 0.1 M, fracción activa con un título de 266 AU/mL.

Fracción B: desde 17 a 21, se eluyó con AcNH_4 0.2 M, fracción no activa.

Fracción C: desde 22 a 25, se eluyó con AcNH_4 0.3 M, fracción no activa.

Fracción D: desde 26 a 29, se eluyó con AcNH_4 0.4 M, fracción no activa.

Tabla N° 15: Actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico con SP-Sepharosa.

Fracciones	Microorganismos	
	<i>B. cereus</i> DBFIQ B 28	<i>E. coli</i> DBFIQ E.c. 9
	Diámetros de halos de inhibición (medidos en mm)	
Fracción Lavado	14	16
Fracción A	20	28
Diluida al 1/2	17	24
Diluida al 1/4	15	18
Diluida al 1/8	13	14
Diluida al 1/16	8	8
Fracción B	-	8
Diluida al 1/2	-	-
Fracción C	-	11
Diluida al 1/2	-	-
Fracción D	-	-
SLC E24 concentrado 10 veces (referencia)	21	22
Diluida al 1/2	16	19
Diluida al 1/4	15	16
Diluida al 1/8	12	14
Diluida al 1/16	10	10
Caldo M17 concentrado 10 veces (blanco)	-	-

- no inhibió; Diámetro del pozo: 7 mm

Como referencias se incluyen los datos de actividad inhibitoria correspondientes al SLC DBFIQ E24 y al medio de cultivo utilizado.

Tabla N° 16: Resumen del proceso de purificación parcial del primer protocolo. La actividad antimicrobiana se determinó utilizando la cepa indicadora *B. cereus* DBFIQ B 28.

Fracción	Vol. (mL)	Act. (AU/mL)	Act. total (AU)	[P] (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Act. Esp. (AU/mg)	Recup. (%)	Purif. (veces)
SLC concentrado 10 veces	100	266	26600	89	8900	3	100	1
SP-Sepharosa (0.1 M de AcNH₄)	2	266	532	8.7	17.4	30.6	2	10.2

Vol.: volumen (mL); **Act.:** actividad; **[P]:** concentración de proteína; **Act. Esp.:** actividad específica; **Recup.:** recuperación; **Purif.:** purificación.

Actividad (AU/mL): En unidades arbitrarias (AU) por mL, que corresponden al inverso de la mayor dilución que produce un halo de 7.5 mm (Diámetro del pozo: 7 mm).

Actividad total (AU): Volumen (mL) de la fracción por actividad (AU/mL). En unidades arbitrarias (AU).

[P] (concentración de proteína) (mg/mL): Su determinación se realizó por el método del ácido bicinconínico.

Actividad específica (AU/mg): Actividad (AU/mL) / concentración de proteína (mg/mL).

Porcentaje de recuperación: Es la relación en porcentaje entre la actividad total de la fracción en cuestión (AU) y la actividad total inicial (AU).

Purificación: Número de veces en la que se aumenta la actividad específica inicial: Actividad específica (AU/mg) de la fracción / Actividad específica inicial (AU/mg).

Si bien se obtuvo un aumento de la actividad específica y de la purificación en esta etapa, el recupero fue bajo (2%). Estos resultados coinciden con los reportados por Herranz et al. (1999), quienes obtuvieron valores de 1.6% y 3.8% de recuperación de la sustancia antimicrobiana en la misma etapa de purificación, y utilizando el mismo gel, así como un aumento de actividad específica de 86 y 194 para *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, respectivamente. Otros autores tales como Aktypis et al. (1998) lograron similares resultados en la purificación de termofilina T, proveniente de la cepa de *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040, utilizando cromatografía de intercambio aniónico con DEAE celulosa (dietilaminoetil celulosa), con una actividad específica de 32 y un 6% de recupero.

Chumchalová et al. (2004) realizaron la purificación de acidocina CH5, obtenida a partir de *Lactobacillus acidophilus* CH5, utilizando SP-Sepharosa en la cromatografía de intercambio catiónico, como una de las etapas de la purificación. Los resultados obtenidos revelaron un 4% de recuperación de la sustancia antimicrobiana, y un aumento de 66 en la actividad específica inicial.

La utilización de S-Sepharosa como matriz de intercambio catiónico por parte de Gálvez et al. (1998) en la purificación de enterocina EJ97, una bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* EJ97, produjo un aumento de la actividad específica inicial de la sustancia antimicrobiana de 21.2 y un 62% de recuperación.

Martín-Platero et al. (2006) reportaron el uso de carboximetil-Sephadex CM-25 en la cromatografía de intercambio catiónico, como una de las etapas de purificación en la obtención de sustancias antimicrobianas producidas por *Enterococcus faecalis* MRR 10-3; estos autores obtuvieron un 56.05% de recuperación y un aumento de 0.79 veces en la actividad específica inicial.

Cintas et al. (1997) purificaron la enterocina P, proveniente de *Enterococcus faecium* P13. Para ello utilizaron, en la etapa cromatográfica de intercambio catiónico, SP-Sepharosa Fast Flow, mediante la cual obtuvieron un porcentaje de recuperación del 61%, con un aumento de 106 veces en la actividad específica inicial.

Como se puede apreciar, los resultados son muy dispares, ya que dependen de la estructura de la sustancia antimicrobiana y de la interacción entre ésta y el tipo de matriz utilizada.

4.1.2.- Cromatografía en fase reversa

La fracción activa A, proveniente de la cromatografía de intercambio catiónico, se procesó por cromatografía en fase reversa en una columna de C₁₈. En este ensayo la actividad antimicrobiana se detectó en las fracciones no retenida, de lavado y al 20% de acetonitrilo (ACN).

Los valores de actividad inhibitoria obtenidos se aprecian en la Tabla N° 17. La fracción de elución al 20% de ACN presentó un título antimicrobiano de 33 AU/mL (Tabla N° 18). El resto de las fracciones de elución con ACN no resultaron activas.

Las fracciones no retenida y de lavado fueron mucho más activas frente a *E. coli* DBFIQ E.c. 9 que frente a *B. cereus* DBFIQ B 28. En cambio, la fracción retenida por la columna presentó un comportamiento diferente (Tabla N° 17). Esto indicaría la presencia de al menos dos sustancias antimicrobianas con capacidades de retención diferentes en la columna de C₁₈, de las cuales una prácticamente no se retendría en la columna y la otra lo haría más firmemente, de modo de que es eluida con el 20% de ACN. Sin embargo, la formación de agregados proteicos con una

deficiente retención podría también influir en la detección de estas dos fracciones antimicrobianas.

En función de ello y de los datos existentes en la información bibliográfica disponible, se decidió no unir ambas fracciones y continuar purificando solamente la fracción eluida con el 20% de ACN.

En esta etapa del proceso de purificación se evidenció una caída importante en la actividad antimicrobiana y en la recuperación de la misma, que sólo resultó ser del 0.3% (Tabla N° 18). La pérdida de actividad antimicrobiana durante el proceso de purificación podría estar relacionada con la tendencia a asociarse que presentan este tipo de moléculas peptídicas, tanto entre ellas mismas como con otras proteínas, debido a la elevada hidrofobicidad natural de los péptidos (Aktypis et al., 1998; Motta et al., 2007).

Tabla Nº 17: Actividad antimicrobiana de las diferentes muestras provenientes de la cromatografía en fase reversa (C₁₈).

Fracciones	Microorganismos	
	<i>B. cereus</i> DBFIQ B 28	<i>E. coli</i> DBFIQ E.c. 9
	Diámetros de halos de inhibición (medidos en mm)	
Fracción no retenida	11	15
Fracción Lavado	13	20
Fracción 20% ACN	11	10
Diluida al 1/2	8	-
Diluida al 1/4	-	-
Fracción 50% ACN	-	-
Fracción 80% ACN	-	-
Fracción 100% ACN	-	-
Caldo M17 concentrado 10 veces (blanco)	-	-

- no inhibió; Diámetro del pozo: 7 mm; **ACN:** acetonitrilo

Tabla N° 18: Resumen del proceso de purificación parcial del primer protocolo. La actividad antimicrobiana se determinó utilizando la cepa indicadora *B. cereus* DBFIQ B 28.

Fracción	Vol. (mL)	Act. (AU/mL)	Act. total (AU)	[P] (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Act. Esp. (AU/mg)	Recup. (%)	Purif. (veces)
SLC concentrado 10 veces	100	266	26600	89	8900	3	100	1
C. fase reversa (C₁₈); fracción 20% ACN	2	33	66	1.5	3	22	0.3	7.3

ACN: acetonitrilo

Vol.: volumen (mL); **Act.:** actividad; **[P]:** concentración de proteína; **Act. Esp.:** actividad específica; **Recup.:** recuperación; **Purif.:** purificación.

Actividad (AU/mL): En unidades arbitrarias (AU) por mL, que corresponden al inverso de la mayor dilución que produce un halo de 7.5 mm (Diámetro del pozo: 7 mm).

Actividad total (AU): Volumen (mL) de la fracción por actividad (AU/mL). En unidades arbitrarias (AU).

[P] (concentración de proteína) (mg/mL): Su determinación se realizó por el método del ácido bicinconínico.

Actividad específica (AU/mg): Actividad (AU/mL) / concentración de proteína (mg/mL).

Porcentaje de recuperación: Es la relación en porcentaje entre la actividad total de la fracción en cuestión (AU) y la actividad total inicial (AU).

Purificación: Número de veces en la que se aumenta la actividad específica inicial: Actividad específica (AU/mg) de la fracción / Actividad específica inicial (AU/mg).

Martín-Platero et al. (2006) constataron un aumento de 4.01 y 300% en la actividad específica inicial y en el porcentaje de recuperación respectivamente; esto se encuentra en contraposición con los resultados aquí detallados, dado que se verificó una disminución en ambos parámetros. Según los autores mencionados, ese marcado aumento de la actividad podría deberse a cambios conformacionales en la estructura de la bacteriocina, debidos a la acción de los solventes orgánicos usados durante el proceso cromatográfico de fase reversa con columna de C₁₈. La purificación posterior de esta fracción activa, mediante cromatografía de alta resolución en fase reversa, mostró la existencia de dos picos distintos con actividad antimicrobiana, indicando una acción antibacteriana sinérgica. Este tipo de cooperación puede explicar el incremento progresivo en la actividad total de la bacteriocina, observado a través del proceso de purificación, el cual se tornó favorable mediante la concentración de ambas moléculas.

Cintas et al. (1997) purificaron la enterocina P, proveniente de la cepa de *Enterococcus faecium* P13, observando un incremento en la actividad de la bacteriocina luego de la cromatografía de interacción hidrofóbica. El mismo puede ser debido a la eliminación de inhibidores de la actividad bacteriocínica durante el proceso de purificación, o a cambios conformacionales de la molécula a una forma más activa, por acción de los solventes hidrofóbicos. Estos incrementos en la actividad biológica han sido reportados también para pediocina L50 y para algunas bacteriocinas tipo pediocinas, tales como pediocina PA-1 y enterocina A.

Herranz et al. (1999) obtuvieron un porcentaje bajo de recupero de la actividad luego del proceso cromatográfico de interacción hidrofóbica (3.8 y 5.9%) en la purificación de enterocinas producidas por *E. faecium* AA13 y *E. faecium* G16, respectivamente.

Stoffels et al. (1992) purificaron carnocina U149, obteniendo una reducción de la actividad específica debido a la pérdida sustancial de la actividad bactericida, y un porcentaje de recupero del 1%.

4.1.3.- Cromatografía líquida en fase reversa de alta resolución (RP-HPLC)

La muestra activa eluida con el 20% de ACN procedente de la cromatografía en fase reversa sobre soporte sólido, fue a continuación purificada mediante cromatografía RP-HPLC, en las condiciones ya descritas en la Sección **8.1.3**.

Los resultados obtenidos se observan en la Tabla N° 19.

Puede apreciarse en dicha Tabla que, de las cinco fracciones separadas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, sólo las identificadas como I y IV resultaron activas frente a las dos cepas blanco utilizadas en el ensayo.

Tabla N° 19: Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas por RP-HPLC

Fracción N°	Microorganismos	
	<i>E. coli</i> DBFIQ E.c. 9	<i>B. cereus</i> DBFIQ B 28
	Diámetros de halos de inhibición (medidos en mm)	
I	8.5	7.5
II	-	-
III	-	-
IV	8	10.5
R	8	11

Diámetro de los pozos: 7 mm.

En esta Tabla se observa el mismo comportamiento inhibitorio producido en la cromatografía en fase reversa en columna de C₁₈, donde la muestra menos retenida (I) en la columna inhibe más a la bacteria Gram (-), y la más retenida (IV) a la Gram (+).

“R” (residuo) corresponde a todas las muestras que no fueron retenidas durante el proceso cromatográfico, debido a la agregación que sufren este tipo de sustancias peptídicas, entre las mismas moléculas o con otras moléculas peptídicas o proteicas del medio. Por lo tanto se probó si esta fracción retenía la actividad o si

la misma resultaría modificada. Tal como lo muestran las Figuras N° 11 y 12, se observó que tenía actividad antimicrobiana frente a las cepas indicadoras.

En estas mismas Figuras se observan también los halos de inhibición generados por ambas fracciones retenidas frente a *B. cereus* DBFIQ B 28 y a *E. coli* DBFIQ E.c.9.

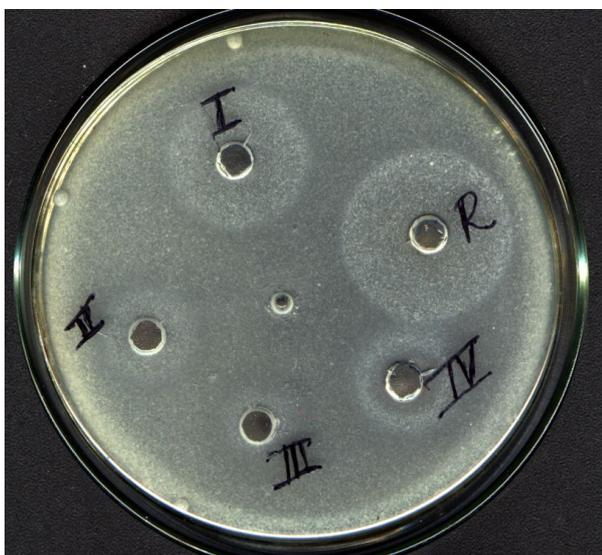


Figura N° 11: Halos de inhibición generados frente a *B. cereus* DBFIQ B 28 por las fracciones provenientes de RP-HPLC. Sólo las fracciones I y IV generaron halos de inhibición. La fracción R (residuo) corresponde a aquéllas corridas cromatográficas que resultaron infructuosas. El diámetro de los pozos es de 7 mm.



Figura N° 12: Halos de inhibición generados frente a *E. coli* DBFIQ E.c. 9 por las fracciones provenientes de RP-HPLC. Sólo las fracciones I y IV generaron halos de inhibición. La fracción R (residuo) corresponde a aquéllas corridas cromatográficas que resultaron infructuosas. El diámetro de los pozos es de 7 mm.

Los resultados obtenidos concuerdan parcialmente con abundantes datos bibliográficos que destacan que las bacteriocinas son péptidos relativamente hidrofóbicos, activos preferentemente contra bacterias Gram (+) (Pascual et al., 2008).

Gálvez et al. (1998) también constataron que la enterocina EJ97, producida por *Enterococcus faecalis* EJ97, fue activa en bajas concentraciones y solamente inhibió el crecimiento de bacterias Gram (+).

Joosten et al. (1996) demostraron que enterocina 4, bacteriocina obtenida de *Enterococcus faecalis* INIA 4, presentó actividad antagonística frente a bacterias Gram (+), mientras que todas las bacterias Gram (-) ensayadas fueron resistentes a este compuesto antibacteriano.

Cintas et al. (1997) informaron que enterocina P, bacteriocina aislada y purificada de cultivos de la cepa de *Enterococcus faecium* P13, resultó ser activa contra bacterias Gram (+), y no presentó actividad antagonística frente a las bacterias Gram (-) ensayadas, tales como *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Yersinia enterocolítica*.

Otros autores tales como Ohmomo et al. (2000), obtuvieron a partir de la cepa de *Enterococcus faecium* NIAI 157 la enterocina ON-157, la cual fue activa frente a bacterias Gram (+) y no frente a Gram (-). Sabia et al. (2002) determinaron la actividad inhibitoria de la enterocina 416K1, una bacteriocina obtenida de la cepa de *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, concluyendo que sólo resultó activa frente a bacterias Gram (+). Sabia et al. (2004) encontraron que dos bacteriocinas producidas por *Enterococcus casseliflavus* y por *Enterococcus faecalis*, sólo fueron activas contra bacterias Gram (+).

Yamamoto et al. (2003) purificaron una bacteriocina proveniente de una cepa de *Enterococcus faecalis* RJ-11, la cual fue activa frente a bacterias Gram (+) y no presentó actividad frente a las bacterias Gram (-) ensayadas (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*).

Pediocina SA-1, péptido antimicrobiano producido por *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627, purificado por Anastasiadou et al. (2008), presentó actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+), pero no fue activa frente a Gram (-) como *Salmonella* spp.

Sin embargo, otros autores han verificado actividad antagónica de ciertas bacteriocinas tanto frente a bacterias Gram (+) como a Gram (-). Así por ejemplo, Strompfová et al. (2006), reportaron que la enterocina A, proveniente de una cepa de *Enterococcus faecium* EK13, resultó activa contra bacterias Gram (+) y Gram (-), tales como *Listeria* spp, *Salmonella* spp y *E. coli*.

Strompfová et al. (2007), estudiaron varias cepas de *Enterococcus faecium* EF 55, EF 3S1, EF 2S3, EF 2S1, EF H31, las cuales presentaron un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra cepas Gram (+) como *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis* y cepas Gram (-) tales como *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella*, *Yersinia* sp.

Pascual et al. (2008), purificaron y caracterizaron una bacteriocina producida por *Lactobacillus fermentum* L23, cuya actividad antimicrobiana fue antagonista hacia bacterias Gram (+) como *Staphylococcus aureus*, *saprophyticus*, *epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y Gram (-) como *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca*.

Tiwari et al. (2008), purificaron y caracterizaron plantaricina LR14, una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* LR/14, la cual presentó un amplio espectro antimicrobiano contra bacterias Gram (+) y Gram (-).

Suma et al., (1998), quienes aislaron plantaricina LP84, una bacteriocina producida por la cepa de *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084, encontraron que dicha bacteriocina era activa contra microorganismos Gram (+) como *Bacillus cereus*,

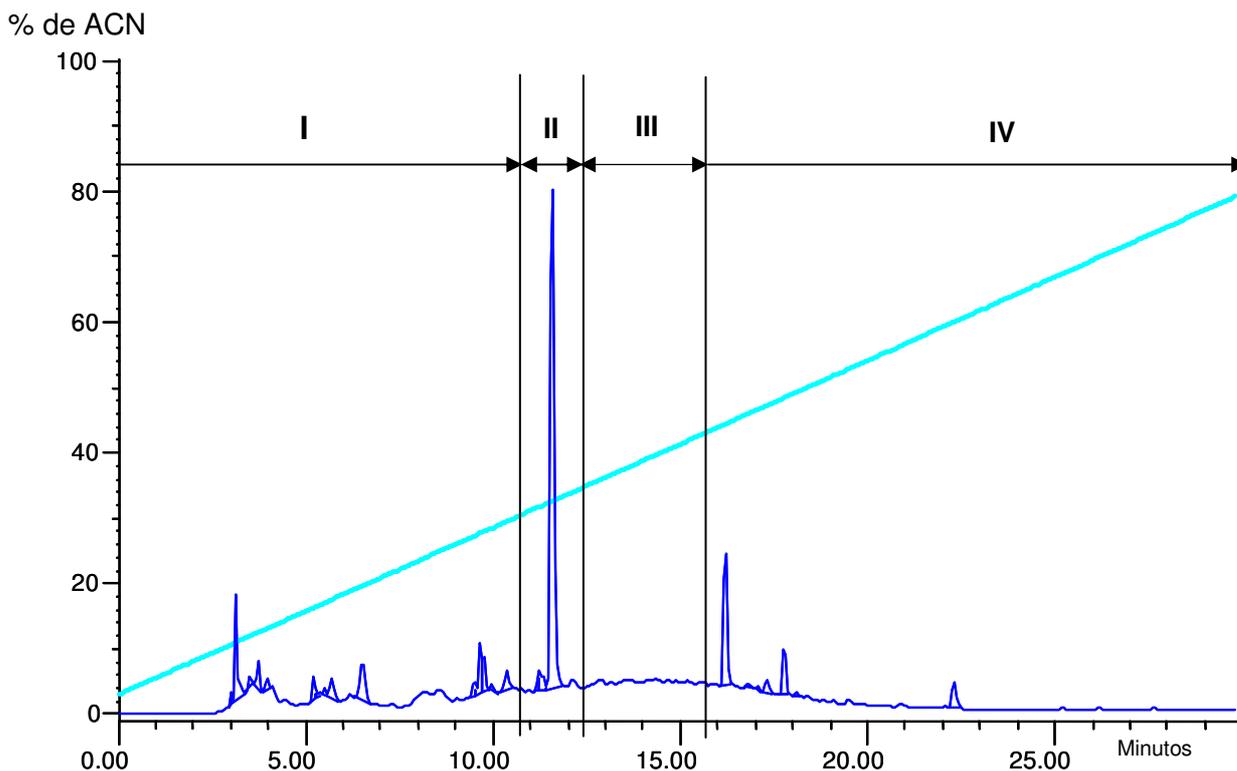
Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus amylovarus* y contra cepas Gram (-) como *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Otros investigadores como Zamfir et al., (1999), verificaron que la cepa de *Lactobacillus acidophilus* IBB 801, produjo una bacteriocina llamada acidofilina 801, activa contra bacterias Gram (+) como hacia diferentes especies de *Lactobacillus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y bacterias Gram (-) tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella panama*.

Jamuna et al., (2004), aislaron y caracterizaron distintas bacteriocinas provenientes de diferentes especies de *Pediococcus*, los que constataron que las mismas eran activas contra cepas Gram (+) como *Lactococcus*, *B. cereus*, *Clostridium*, *Listeria* y *Staphylococcus* y dentro de las Gram (-) *Aeromonas*, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Vibrio parahaemolyticus*.

En la Figura N° 13 se detalla el perfil cromatográfico obtenido por RP-HPLC de la fracción activa eluida con el 20% ACN.

Figura N° 13: Perfil cromatográfico obtenido por RP-HPLC de la fracción eluida con el 20% de ACN.



Detección UV a $\lambda=280$ nm. Las fracciones recolectadas fueron las siguientes:

I) 0.00 a 10.60 min., II) 10.60 a 12.16 min., III) 12.16 a 15.60 min., IV) 15.60 a 30.00 min.

Al analizar el perfil cromatográfico de elución proveniente de la fracción de ACN al 20% (Figura N° 13), se observa que la fracción I está compuesta por numerosos picos, de los cuales ninguno es mayoritario. Se trataría de péptidos con características hidrofílicas, ya que eluyen con 5% de ACN, o bien podría tratarse de sustancias antimicrobianas que no son retenidas por la columna cromatográfica. En este último caso, el hecho de que no sean retenidas sería debido a la formación de agregados por las macromoléculas peptídicas, cuyo corazón es hidrofóbico,

exponiendo las zonas hidrofílicas hacia el solvente de elución, que en esta zona contiene un gran porcentaje de agua.

La fracción II está compuesta prácticamente por un solo péptido o proteína que eluye aproximadamente al 30% de ACN y que no presenta actividad antimicrobiana.

La fracción III no presentó actividad antimicrobiana.

Por último, en la fracción IV se detectan pocos componentes, de los cuales uno es mayoritario con relación a los demás. El mismo eluye a un 43% de ACN. Dado que esta última fracción posee actividad antimicrobiana, corresponde averiguar el peso molecular de al menos el péptido mayoritario que la constituye.

Las proteínas y péptidos son un grupo de biomoléculas marcadamente heterogéneo en cuanto a composición, estructura y propiedades, lo que hace imposible unificar criterios de purificación, más aún cuando se trata de moléculas cuya actividad biológica debe ser conservada durante el proceso. No obstante, la mayor parte de las bacteriocinas descritas poseen algunas propiedades que permiten adoptar procesos generales de purificación. Así, debido a su pequeño tamaño, la mayoría presentan una alta tolerancia al pH ácido y a los disolventes orgánicos, lo que permite su purificación mediante cromatografía de fase reversa. No obstante, este pequeño tamaño hace que a veces sea muy difícil su separación de los componentes de los medios de cultivo. Además, gran parte de las bacteriocinas descritas presentan carga neta positiva, lo que permite su recuperación mediante cromatografía de intercambio catiónico, etapa que posibilita la eliminación de una gran parte de los componentes del medio de cultivo. La combinación de cromatografía de intercambio catiónico con cromatografía en fase reversa puede ser un método útil para la purificación a homogeneidad de muchas bacteriocinas.

4.2.- Segundo protocolo de purificación

4.2.1.- Precipitación salina con sulfato de amonio

El título antimicrobiano de la muestra correspondiente a este segundo protocolo fue de 133 AU/mL, menor que el obtenido con el primer protocolo, que fue de 266 AU/mL.

La actividad antimicrobiana del precipitado obtenido y de diferentes diluciones del mismo, determinada por el método de difusión en agar y expresada como diámetro (medido en mm) de la zona de inhibición, se detalla en la Tabla N° 20. Como control aproximado de la sal remanente que pudiese haber arrastrado la precipitación de las proteínas se utilizó una solución de sulfato de amonio al 80% de saturación equilibrada a pH=7.0.

Tabla N° 20: Actividad antimicrobiana de la muestra proveniente de la primera etapa de purificación parcial del segundo protocolo.

Muestras	Microorganismos	
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
Precipitado solubilizado al 80% de saturación pH=7.0	16	17
Diluido al 1/2	12	12
Diluido al 1/4	10	10
Diluido al 1/8	8.5	8.5
Diluido al 1/16	-	-
M17 concentrado 10 veces	-	-
Control: (NH₄)₂SO₄ al 80% de saturación, pH=7.0	8	8

- Control de la influencia de la sal: solución al 80% de sulfato de amonio.
- Cepas indicadoras utilizadas: *B. cereus* DBFIQ B 28 y *E. coli* DBFIQ E. c. 9.
- Diámetro de los pozos: 7 mm.

La Tabla N° 21 indica que tras la precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación, una buena parte de la actividad antimicrobiana total, proveniente del sobrenadante sin concentrar, se recuperó (32%). De esta manera, la actividad inhibidora específica de la sustancia antimicrobiana se incrementó 3.3 veces en relación al sobrenadante libre de células.

Tabla N° 21: Resumen del proceso de purificación parcial con sulfato de amonio al 80% de saturación.

Fracción	Vol. (mL)	Act. (AU/mL)	Act. total (AU)	[P] (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Act. Esp. (AU/mg)	Recup. (%)	Purif. (veces)
Sobrenadante concentrado 10 veces	100	266	26600	89	8900	3	100	1
Precipitación salina	64	133	8512	13.6	870.4	9.8	32	3.3

Vol.: volumen (mL); **Act.:** actividad; **[P]:** concentración de proteína; **Act. Esp.:** actividad específica; **Recup.:** recuperación; **Purif.:** purificación.

Actividad (AU/mL): En unidades arbitrarias (AU) por mL, que corresponden al inverso de la mayor dilución que produce un halo de 7.5 mm (Diámetro del pozo: 7 mm).

Actividad total (AU): Volumen (mL) de la fracción por actividad (AU/mL). En unidades arbitrarias (AU).

[P] (concentración de proteína) (mg/mL): Su determinación se realizó por el método del ácido bicinconínico.

Actividad específica (AU/mg): Actividad (AU/mL) / concentración de proteína (mg/mL).

Porcentaje de recuperación: Es la relación en porcentaje entre la actividad total de la fracción en cuestión (AU) y la actividad total inicial (AU).

Purificación: Número de veces en el que se aumenta la actividad específica inicial: Actividad específica (AU/mg) de la fracción / Actividad específica inicial (AU/mg).

Muriana et al. (1991) purificaron lactacina F, bacteriocina proveniente de *Lactobacillus acidophilus* 11088, obteniendo una recuperación de la actividad antimicrobiana del 64% luego del proceso de precipitación, con un muy buen aumento en la actividad específica (320 veces respecto de la inicial).

Cintas et al. (1995) utilizaron la precipitación salina como primer paso del protocolo de purificación de pediocina L50, bacteriocina obtenida de una cepa de *Pediococcus acidilactici*. Ellos obtuvieron una recuperación del 90% de la actividad antimicrobiana y un aumento de 9 veces respecto de la actividad específica inicial.

Tahara et al. (1996b) informaron que en el proceso de purificación de acidocina J1132, proveniente de *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132, se obtuvo un porcentaje de recupero de sustancia antimicrobiana del 79%, con un muy bajo aumento en la actividad específica (0.98 veces).

Aktypis et al. (1998) obtuvieron resultados similares a los logrados en el presente trabajo, dado que en el proceso de purificación mediante precipitación con sulfato de amonio, el porcentaje de recupero de sustancia antimicrobiana fue de 22%, y se verificó un aumento de 12 veces de la actividad específica inicial.

Hun-Joo, et al. (1999) purificaron una bacteriocina de la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559, aplicando la misma metodología que en este trabajo de investigación. Obtuvieron resultados similares a los aquí expuestos en lo que respecta a los porcentajes de recupero de la sustancia antimicrobiana (22%), y un aumento de 1.2 veces de la actividad específica inicial, o sea menor al obtenido en este trabajo.

Otros autores tales como Ohmomo et al. (2000) obtuvieron un mediano grado de recuperación, del 61%, y un aumento de la actividad específica inicial de 2.87, en

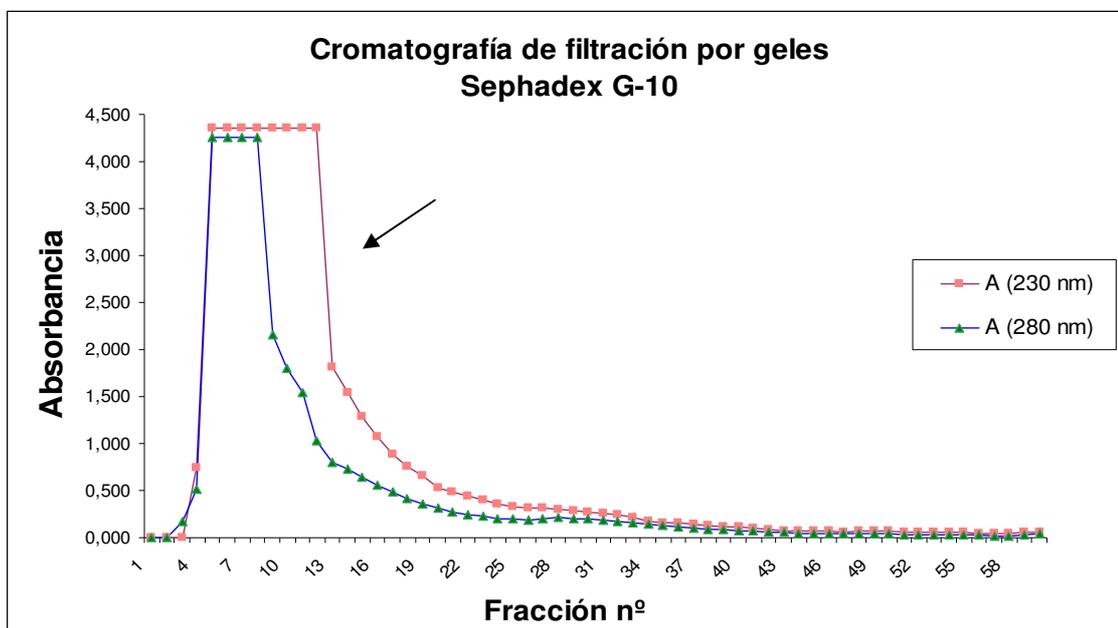
el proceso de purificación de la enterocina ON-157, producida por la cepa de *Enterococcus faecium* NIAI 157.

4.2.2.- Cromatografía de filtración por geles

Esta etapa de purificación se realizó para eliminar las sales remanentes y compuestos de peso molecular menor a 700 Da (provenientes de la precipitación salina) presentes en la muestra activa.

En la Figura N° 14 se observa el perfil de la cromatografía de filtración por geles utilizando Sephadex G-10.

Figura N° 14: Perfil de la cromatografía de filtración por geles utilizando Sephadex G-10.



Fracciones: A (3 a 13), B (14 a 24) y C (25 a 60).

Buffer de elución utilizado: AcNH₄ 0.05 M, pH=5.0.

Sólo la fracción A (indicada con una flecha) resultó ser activa.

De las tres fracciones recogidas (A, B y C), sólo la fracción A demostró poseer actividad antimicrobiana, eluyendo con el frente cromatográfico con un título de 67 AU/mL, ya que la más alta dilución que dio actividad antimicrobiana fue 1/4. Estos resultados se detallan en la Tabla N° 22.

Tabla N° 22: Actividad antimicrobiana, expresada como diámetro (medido en mm) de la zona de inhibición, de las fracciones provenientes de la cromatografía de filtración por geles utilizando Sephadex G-10.

Actividad antimicrobiana de las diferentes muestras	Microorganismos	
	<i>B. cereus</i> DBFIQ B 28	<i>E. coli</i> DBFIQ E. c. 9
Fracción A	12	14
Diluida al 1/2	10	11
Diluida al 1/4	8	8
Diluida al 1/8	-	-
Fracción B	-	-
Fracción C	-	-
M17 concentrado 10 veces	-	-

En la Tabla N° 23 se observan los resultados del proceso de cromatografía de exclusión por geles, el cual arrojó una buena actividad inhibitoria (67 AU/mL), a la vez que disminuyó sensiblemente la cantidad de proteína (624 mg), por lo que la actividad específica sólo se incrementó levemente (4.3 AU/mg). Se aprecia también que el porcentaje de recuperación fue del 10% y que la actividad específica aumentó 1.4 veces.

Tabla N° 23: Resumen del proceso de purificación parcial del segundo protocolo, mediante cromatografía de filtración por geles.

Fracción	Vol. (mL)	Act. (AU/mL)	Act. total (AU)	[P] (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Act. Esp. (AU/mg)	Recup. (%)	Purif. (veces)
<i>Sobrenadante concentrado 10 veces</i>	100	266	26600	89	8900	3	100	1
<i>C. filtración por geles (Sephadex G-10)</i>	40	67	2680	15.6	624	4.3	10	1.4

Vol.: volumen (mL); **Act.:** actividad; **[P]:** concentración de proteína; **Act. Esp.:** actividad específica; **Recup.:** recuperación; **Purif.:** purificación.

Actividad (AU/mL): En unidades arbitrarias (AU) por mL, que corresponden al inverso de la mayor dilución que produce un halo de 7.5 mm (Diámetro del pozo: 7 mm).

Actividad total (AU): Volumen (mL) de la fracción por actividad (AU/mL). En unidades arbitrarias (AU).

[P] (concentración de proteína) (mg/mL): Su determinación se realizó por el método del ácido bicinonínico.

Actividad específica (AU/mg): Actividad (AU/mL) / concentración de proteína (mg/mL).

Porcentaje de recuperación: Es la relación en porcentaje entre la actividad total de la fracción en cuestión (AU) y la actividad total inicial (AU).

Purificación: Número de veces en el que se aumenta la actividad específica inicial: Actividad específica (AU/mg) de la fracción / Actividad específica inicial (AU/mg).

Autores como Yamamoto et al. (2003) utilizaron este tipo de cromatografía, no para eliminar sales, sino para realizar un fraccionamiento proteico en función del tamaño de las proteínas o péptidos presentes en la muestra. Estos investigadores observaron la formación de agregados por parte de las sustancias antimicrobianas, ya que al utilizar Sephadex G-50 las sustancias antimicrobianas eluían en el volumen muerto de la columna, con un PM mayor a 30 kDa. El agregado de Tween 80 a la muestra, en una concentración del 0.1%, produjo la salida de una segunda fracción activa con un PM aproximado en 4000 Da (estimado mediante comparación con proteínas estándar procesadas en la misma columna). Análisis posteriores indicaron que este comportamiento se debió a la presencia de agregados proteicos y no a la presencia de dos sustancias diferentes.

Cintas et al. (1997) realizaron cromatografía de filtración en gel como segundo paso del protocolo de purificación, luego de la precipitación salina, obteniendo un porcentaje de recuperación del 77% y un aumento en la actividad específica de 8 veces.

Herranz et al. (1999) utilizaron la cromatografía de filtración por geles como pasos intermedios para purificar bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* AA13 y *Enterococcus faecium* G 16. Para el compuesto activo producido por la primera de las cepas mencionadas obtuvieron un bajo porcentaje de recuperación (17%), pero con un aumento de actividad específica de 4 veces. En el segundo caso lograron un porcentaje de recuperación del 56%, con un aumento de actividad específica de 34 veces. En ambos casos utilizaron el mismo gel e idénticos método y cepa indicadora. En función de lo expuesto se puede observar que los resultados son muy dispares, aún cuando se trata de cepas bacteriocinogénicas pertenecientes a la misma especie.

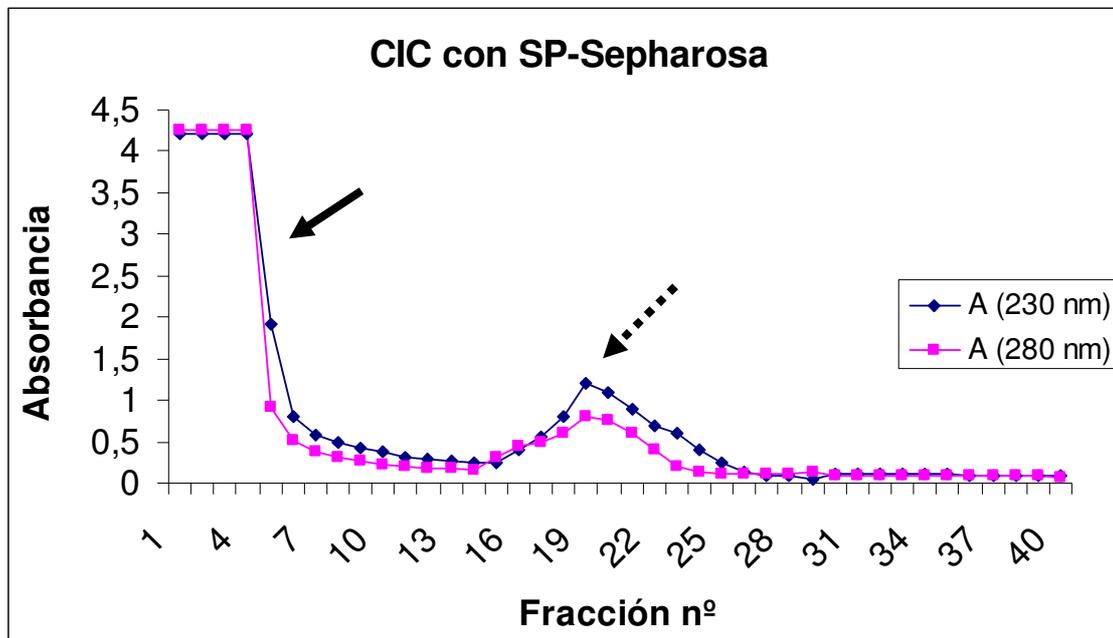
Aktypis et al. (1998) utilizaron cromatografía de filtración en geles y constataron la agregación de termofilina T. Esta sustancia eluyó en el volumen muerto de la columna, lo que indicó que el PM de la bacteriocina era mayor a 150 kDa. Sin embargo finalmente se pudo verificar (aplicando SDS-Page) que su PM era estimativamente de 2500 Da, lo que demuestra la facilidad de agregación que poseen este tipo de moléculas.

4.2.3.- Cromatografía de intercambio catiónico

En la Figura N° 15 se detallan los resultados obtenidos al implementar la cromatografía de intercambio catiónico con SP-Sepharosa, pH=4.50, y utilizando como solventes de elución buffers de acetato de amonio desde 0.1 M a 0.4 M.

Al analizar el perfil cromatográfico de esta Figura, se aprecia la presencia de dos picos, uno al comienzo de la cromatografía, que eluye con el buffer de AcNH₄ 0.05 M, pH=4.50 (flecha continua), y que corresponde a la fracción A, y otro que eluye con el buffer de AcNH₄ 0.1 M, pH=4.50 (flecha discontinua) que se ha denominado fracción C. Sólo la fracción A (0.05 M de AcNH₄), proveniente del lavado de la columna, resultó ser activa. Parte de la actividad antimicrobiana permaneció en la fracción no retenida, a pesar de que la muestra se pasó varias veces por la columna cromatográfica.

Figura N° 15: Perfil cromatográfico del intercambio catiónico con SP-Sepharosa pH=4.50 y utilizando como solventes de elución buffers de acetato de amonio desde 0.1 M a 0.4 M.



Fracción A (1 a 7), activa, se indica con una flecha continua; fracción B (8 a 15), no activa; pico cromatográfico no activo, fracción C (16 a 26), se muestra con una flecha discontinua; fracción D (27 a 40), no activa.

En la Tabla N° 24 se observan los resultados obtenidos, correspondientes a las fracciones provenientes del proceso cromatográfico de purificación parcial de intercambio catiónico con SP-Sepharosa. Del análisis de los datos se deduce que el título de la fracción A fue de 133 AU/mL, y que el resto de las fracciones no fueron activas. La fracción no retenida es la que se obtiene luego de pasar varias veces la muestra por la columna, y se aprecia que la misma retuvo actividad, con un título de 67 AU/mL. En este proceso se detectó que la muestra no se fijaba a la columna, razón por la cual salió con la fracción de lavado, posiblemente debido a la formación de agregados proteicos, como ya fuera descrito oportunamente.

Tabla N° 24: Actividad antimicrobiana, expresada como diámetro (medido en mm) de la zona de inhibición, de las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio catiónico.

Actividad antimicrobiana de las diferentes muestras	Microorganismos	
	<i>B. cereus</i> DBFIQ Bc 28	<i>E. coli</i> DBFIQ E. c. 9
Fracción A	14	19
Diluida al 1/2	12	16
Diluída al 1/4	10	12
Diluida al 1/8	8	10
Diluida al 1/16	-	-
Fracción B	-	-
Fracción C	-	-
Fracción D	-	-
Fracción no retenida	11	18
Diluida al 1/2	9	10
Diluída al 1/4	-	8
M17 concentrado 10 veces	-	-

En la Tabla N° 25 se aprecian los datos obtenidos del proceso de purificación parcial, los cuales muestran que se logró un porcentaje de recuperación del 2.5% y un aumento de la actividad específica de 3.6 veces.

Tabla N° 25: Resumen del proceso de purificación parcial del segundo protocolo, mediante cromatografía de intercambio catiónico con SP-Sepharosa.

Fracción	Vol. (mL)	Act. (AU/mL)	Act. total (AU)	[P] (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Act. Esp. (AU/mg)	Recup. (%)	Purif. (veces)
Sobrenadante concentrado 10 veces	100	266	26600	89	8900	3	100	1
SP-Sepharosa (0.05 M AcNH₄)	5	133	665	12.3	61.3	10.8	2.5	3.6

Vol.: volumen (mL); **Act.:** actividad; **[P]:** concentración de proteína; **Act. Esp.:** actividad específica; **Recup.:** recuperación; **Purif.:** purificación.

Actividad (AU/mL): En unidades arbitrarias (AU) por mL, que corresponden al inverso de la mayor dilución que produce un halo de 7.5 mm (Diámetro del pozo: 7 mm).

Actividad total (AU): Volumen (mL) de la fracción por actividad (AU/mL). En unidades arbitrarias (AU).

[P] (concentración de proteína) (mg/mL): Su determinación se realizó por el método del ácido bicinconínico.

Actividad específica (AU/mg): Actividad (AU/mL) / concentración de proteína (mg/mL).

Porcentaje de recuperación: Es la relación en porcentaje entre la actividad total de la fracción en cuestión (AU) y la actividad total inicial (AU).

Purificación: Número de veces en el que se aumenta la actividad específica inicial: Actividad específica (AU/mg) de la fracción / Actividad específica inicial (AU/mg).

4.2.4.- Cromatografía en fase reversa

En este paso cromatográfico, sólo la fracción de lavado presentó actividad antimicrobiana. Si bien no hubo retención de la sustancia antimicrobiana, esta técnica permitió realizar un clean-up de la muestra, de modo que se logró eliminar los pigmentos coloreados relativamente hidrofóbicos presentes, los cuales interfieren con los métodos de determinación de proteínas, ya sean directos o colorimétricos. El título de esta fracción activa fue de 133 AU/mL.

Estos resultados pueden apreciarse en la Tabla N° 26.

Tabla Nº 26: Actividad antimicrobiana, expresada como diámetro (medido en mm) de la zona de inhibición, de las diferentes fracciones provenientes de la cromatografía en fase reversa C₁₈.

Actividad antimicrobiana de las diferentes muestras	Microorganismos	
	<i>B. cereus</i> DBFIQ Bc 28	<i>E. coli</i> DBFIQ E. c. 9
Fracción Lavado	15	22
Diluido al 1/2	11	17
Diluido al 1/4	9	10
Diluido al 1/8	8	8.5
Fracción 10% ACN	-	-
Fracción 20% ACN	-	-
Fracción 30% ACN	-	-
Fracción 50% ACN	-	-
Fracción 80% ACN	-	-
Fracción 100% ACN	-	-
M17 concentrado 10 veces	-	-

La Tabla Nº 27 muestra el resumen del proceso de purificación parcial con cromatografía en fase reversa C₁₈. En ella se aprecia que el porcentaje de recuperación fue de 0.8% y el aumento de actividad específica fue de 14.8 veces.

Tabla Nº 27: Resumen del proceso de purificación parcial del segundo protocolo, mediante cromatografía en fase reversa C₁₈.

Fracción	Vol. (mL)	Act. (AU/mL)	Act. total (AU)	[P] (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Act. Esp. (AU/mg)	Recup. (%)	Purif. (veces)
Sobrenadante concentrado 10 veces	100	266	26600	89	8900	3	100	1
C. Fase Reversa Fracción (0% ACN)	1.5	133	199.5	3	4.5	44.3	0.8	14.8

Vol.: volumen (mL); **Act.:** actividad; **[P]:** concentración de proteína; **Act. Esp.:** actividad específica; **Recup.:** recuperación; **Purif.:** purificación.

Actividad (AU/mL): En unidades arbitrarias (AU) por mL, que corresponden al inverso de la mayor dilución que produce un halo de 7.5 mm (Diámetro del pozo: 7 mm).

Actividad total (AU): Volumen (mL) de la fracción por actividad (AU/mL). En unidades arbitrarias (AU).

[P] (concentración de proteína) (mg/mL): Su determinación se realizó por el método del ácido bicinconínico.

Actividad específica (AU/mg): Actividad (AU/mL) / concentración de proteína (mg/mL).

Porcentaje de recuperación: Es la relación en porcentaje entre la actividad total de la fracción en cuestión (AU) y la actividad total inicial (AU).

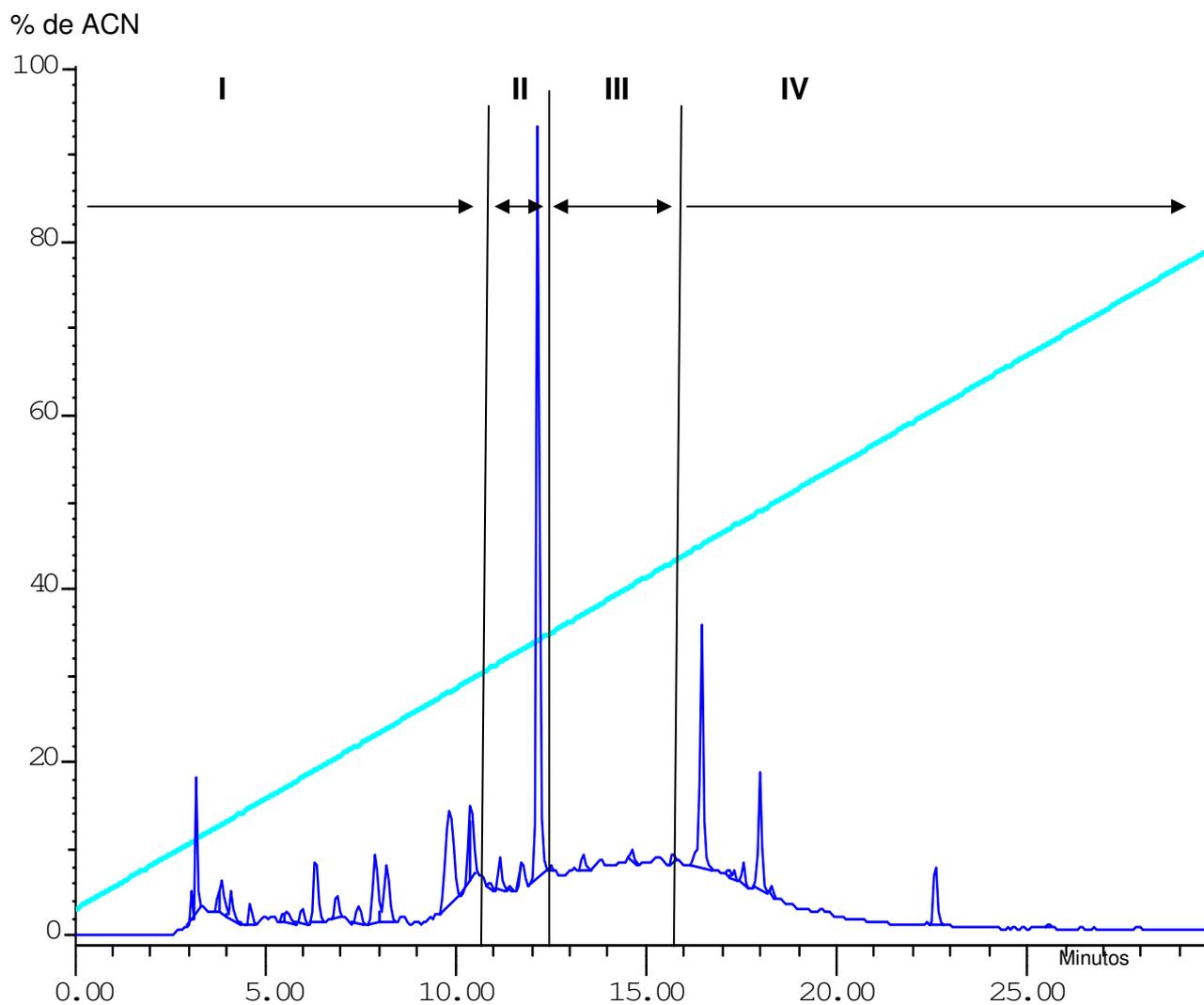
Purificación: Número de veces en el que se aumenta la actividad específica inicial: Actividad específica (AU/mg) de la fracción / Actividad específica inicial (AU/mg).

4.2.5.- Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

La muestra activa eluida con el lavado de la columna procedente de la cromatografía en fase reversa sobre soporte sólido, fue a continuación analizada mediante cromatografía RP-HPLC, en las condiciones ya descritas en la sección 8.1.3. del capítulo correspondiente a Materiales y Métodos.

Al analizar el perfil cromatográfico de elución proveniente de la fracción activa de lavado de la cromatografía en fase reversa C_{18} (Figura N° 16), se observa que la fracción I, comprendida entre 0 y 10.60 minutos, está compuesta por numerosos picos, de los cuales ninguno es mayoritario. Se trataría de péptidos con características hidrofílicas, ya que eluyen con 5% de ACN, o bien podría tratarse de sustancias antimicrobianas que no son retenidas por la columna cromatográfica. En este último caso, el hecho de que no sean retenidas sería debido a la formación de agregados por las macromoléculas peptídicas, cuyo interior es hidrofóbico, exponiendo las zonas hidrofílicas hacia el solvente de elución, que en esta zona contiene un gran porcentaje de agua. La fracción II, comprendida entre 10.60 y 12.16 minutos, está compuesta prácticamente por un solo péptido o proteína que eluye aproximadamente al 30% de ACN. En la fracción III, comprendida entre 12.16 y 15.60 minutos, no se detecta la presencia de compuestos que absorban a 280 nm. Por último, en la fracción IV, comprendida entre 15.60 y 30 minutos, se detectan pocos péptidos, de los cuales uno es mayoritario con relación al resto y eluye aproximadamente al 43% de ACN.

Figura Nº 16: Perfil cromatográfico de la fracción eluida con el lavado de la columna de C₁₈, obtenido por RP-HPLC.



Detección UV a $\lambda=280$ nm.

Las condiciones de corrida son las mismas que las utilizadas para realizar el ensayo del primer protocolo.

Las fracciones recolectadas fueron las siguientes: I) 0,00 a 10,60 min., II) 10,60 a 12,16 min., III) 12,16 a 15,60 min., IV) 15,60 a 30,00 min.

No fue determinada la actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones obtenidas mediante este protocolo de purificación, pero se observa que los perfiles cromatográficos en ambos protocolos son prácticamente idénticos, por lo que se puede inferir que su comportamiento frente a las cepas indicadoras debería ser similar.

4.2.6.- Comparación de los dos protocolos de purificación

Si comparamos las Tablas donde se resumen las purificaciones parciales logradas mediante la implementación de los dos protocolos ensayados, se puede apreciar que hay diferencias en las distintas etapas. En el primer protocolo la cromatografía de intercambio catiónico produjo una recuperación del 2%, siendo ésta del 2.5% en el segundo protocolo, lo que demuestra que este porcentaje es similar en ambos métodos. La actividad específica aumentó 10.2 veces en el primero, y sólo 3.6 veces en el segundo. Con respecto a la cromatografía en fase reversa, el porcentaje de recuperación es de 0.3% para el primer protocolo y de 0.8 % para el segundo. La actividad específica aumentó 7.3 veces para el primero y 14.8 veces para el segundo. Los perfiles cromatográficos obtenidos por RP-HPLC en las muestras provenientes de los diferentes protocolos son prácticamente idénticos.

Todorov et al. (2004) compararon dos métodos de purificación de plantaricina ST31, una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* ST31. Para ello utilizaron dos protocolos de purificación del SLC. El primero consistió en precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, extracción en fase sólida con columna Sep-Pack C₁₈ y RP-HPLC, con porcentajes de recupero de 40%, 4% y 0.8% respectivamente. En el segundo se realizó cromatografía de intercambio catiónico con SP-Sepharosa, obteniéndose un porcentaje de recuperación del

5.94%, y luego RP-HPLC. A pesar de las diferencias entre las dos metodologías de purificación, las plantaricinas purificadas fueron idénticas. Por lo tanto, los autores concluyeron que, en términos de pureza, no hubo diferencias significativas entre los dos métodos de purificación ensayados y que eran igualmente confiables.

Del estudio realizado en el presente trabajo, con respecto a las dos metodologías empleadas, los resultados fueron similares a los obtenidos por Todorovov et al. (2004), ya que si bien los porcentajes de recupero fueron diferentes, los productos finales fueron prácticamente iguales, si tenemos en cuenta los perfiles cromatográficos obtenidos por RP-HPLC, que representan las purificaciones parciales del SLC de las dos metodologías empleadas (Figuras N° 13 y N° 16).

Para evitar la pérdida de sustancia activa y por una cuestión de costos, siempre es conveniente utilizar el protocolo que posea menor cantidad de procesos de purificación.

Resulta impracticable estandarizar un protocolo de purificación para sustancias proteicas o peptídicas producidas por bacterias del ácido láctico, ya que aunque sean producidas por cepas de la misma especie, pueden tener un comportamiento muy diferente con respecto al proceso de purificación. Por ejemplo, Guyonnet et al. (2000) purificaron bacteriocinas sintetizadas por dos cepas de *Lactobacillus sakei*, la 2675 y la 2525, mediante el mismo protocolo de purificación, y obtuvieron un porcentaje de recupero de 10% y 50% respectivamente. Con este mismo protocolo purificaron un péptido activo producido por la cepa de *E. faecalis* 336, obteniendo un 66% de recuperación.

Otro inconveniente importante que se presenta al momento de purificar una bacteriocina contenida en un cultivo microbiano, es la pequeña cantidad de ésta que

se encuentra en el mismo. Parte de las dificultades relacionadas con estas etapas de purificación pueden estar, por lo tanto, asociadas con las muy bajas concentraciones en que se encuentran los péptidos o proteínas antimicrobianos en los SLC provenientes de cultivos de bacterias ácido lácticas bacteriocinogénicas. Al respecto existe amplia información bibliográfica, parte de la cual se detalla a continuación, a modo de ejemplo:

- Guyonnet et al. (2000) constataron que las cantidades de bacteriocinas encontradas oscilan entre el 35 y 160 μg de bacteriocina purificada por 100 mL del SLC, lo que implica que su concentración inicial, calculada de acuerdo al rendimiento de la purificación, se encontraba entre 0.75 y 16 mg/L.
- Hänninen et al. (1997) informaron que la bacteriocina leucocina A-UAL 187, proveniente de *Leuconostoc gelidum* A-UAL 187, fue purificada a partir de 5 litros de medio de cultivo, obteniéndose 2.06 mg de bacteriocina y en la purificación de acidocina A se necesitaron 2 litros de medio de cultivo para producir 1.5 mg de proteína activa, y 18 μg / mL de mesentericina Y105 se obtuvieron a partir de 540 mL de medio de cultivo.
- Bhunia et al. (1988) purificaron pediocina AcH, producida por *Pediococcus acidilactici* H, mediante precipitación con sulfato de amonio, filtración por gel e intercambio iónico. Este protocolo produjo un rendimiento de 0.112 mg de proteína a partir de 1500 mL de medio de cultivo. La purificación de pediocina A produjo 0.086 mg de proteína a partir de 1 litro de SLC.

Un importante número de factores pueden impactar, al aplicar protocolos de purificación específicos, en la determinación de la actividad específica y en la medida de las veces en la que se aumenta la actividad específica inicial. La sensibilidad del método de cuantificación de proteína y de los ensayos que

determinan la actividad antimicrobiana son factores importantes que influyen en la determinación del grado de pureza y de la actividad específica. Tagg et al. (1976) indicaron que la actividad de la bacteriocina analizada depende de las condiciones de los test de ensayos y de la susceptibilidad del organismo indicador utilizado. La densidad del césped donde se siembra la cepa indicadora es un determinante importante en la sensibilidad del método. La difusión de la bacteriocina durante el ensayo es un factor crucial a considerar, como lo es también la cepa indicadora, pudiéndose producir diferentes actividades específicas en función de las mismas.

Se han empleado numerosas variantes en los métodos de purificación de bacteriocinas, todos ellos evaluados a través del número de veces en que se aumenta la actividad específica, el porcentaje de recuperación de la actividad y la actividad específica, los que varían ampliamente, aún para proteínas similares. Por ello es que a pesar de que se utilizan diferentes procesos, no es muy conveniente usarlos para comparar protocolos de purificación de proteínas distintas. Hay muy poca información sobre estructura terciaria de las bacteriocinas, posiblemente porque los rendimientos de los procesos de purificación son muy bajos. Mejorar estos procesos ayudaría a comprender más ampliamente las relaciones estructura-actividad de estos péptidos antimicrobianos.

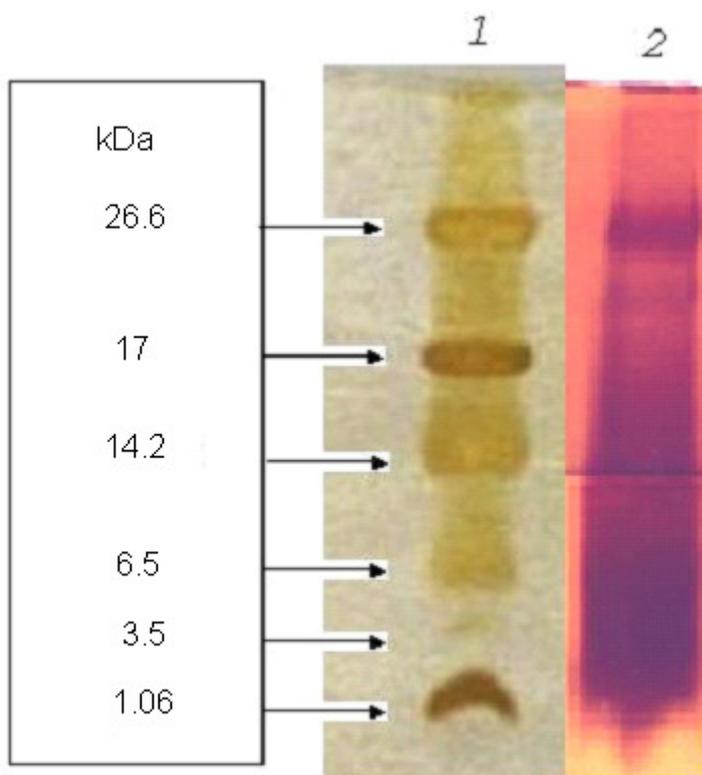
5.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA UTILIZANDO TRICINA Y DODECIL SULFATO SÓDICO (Schägger y von Jagow, 1987)

Tricina-SDS-PAGE es una técnica comúnmente usada para separar proteínas de masa molecular en el rango de 1 a 100 kDa. Es el sistema electroforético preferido para la resolución de proteínas de PM menor a 30 kDa. La concentración de acrilamida usada en los geles es mucho más baja que en otros sistemas electroforéticos (Schägger, 2006).

5.1.- Electroforesis Tricina-SDS-PAGE de la fracción activa correspondiente a la primera etapa del segundo protocolo de purificación.

Mediante esta técnica se procedió a caracterizar la muestra parcialmente purificada, luego de la etapa de precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación, correspondiente al segundo protocolo de purificación. Los resultados obtenidos se observan en la Figura N° 17 (línea 2), en la cual aparecen 4 bandas. La de mayor PM aparece a la altura del patrón de PM igual a 26.6 kDa, y es la de menor migración; luego aparece una segunda banda entre los patrones de 26.6 y 17 kDa; la tercera se ubica entre los patrones cuyos PM son 17 y 14.2 kDa; y se observa una cuarta banda muy ancha que se extiende entre los marcadores de 6.5 a 1.06 kDa. Por lo tanto, esta experiencia demostró la presencia de proteínas y péptidos de PM que varían entre 26.6 y 1.06 kDa, algunos de ellos provenientes del medio de cultivo y otros producidos por la bacteria en estudio, *E. faecalis* DBFIQ E24.

Figura Nº 17: Corrida electroforética Tricina-SDS-PAGE de patrones y de la disolución del precipitado del SLC con sulfato de amonio al 80% de saturación.



1- Marcadores moleculares: Triosafosfato isomerasa: 26.6 kDa; Mioglobina: 17 kDa; α -lactoalbúmina: 14.2 kDa; Aprotinina: 6.5 kDa; Insulina cadena B: 3.5 kDa; Bradiquinina: 1.06 kDa.

2- Muestra (2 μ L) de la disolución del precipitado del SLC con sulfato de amonio al 80% de saturación.

- Tinción con plata.

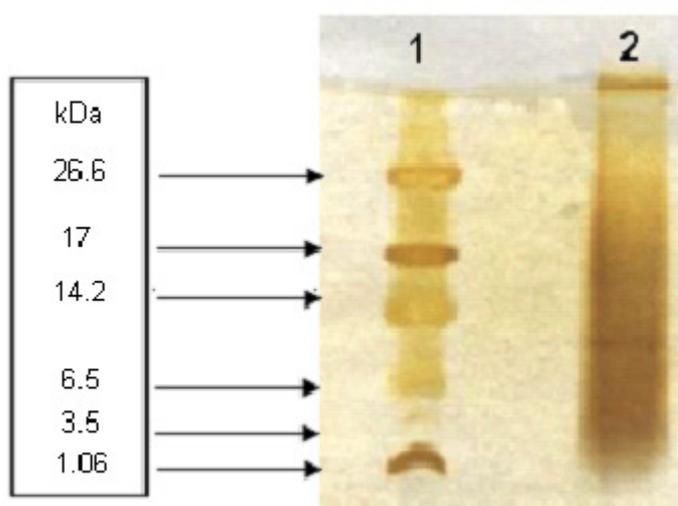
5.2.- Electroforesis Tricina-SDS-PAGE de la fracción activa correspondiente a la cromatografía en fase reversa C₁₈, cuarta etapa del proceso del segundo protocolo de purificación.

5.2.1.- Tinción con plata

El cromatograma electroforético se muestra en la Figura N° 18. En la calle 2, donde se sembró la muestra parcialmente purificada luego de la cromatografía en fase reversa C₁₈, se aprecia una banda muy difusa, con mucha cola, posiblemente debido a la presencia de demasiada muestra, y como la tinción con plata es muy sensible exagera aún más la no homogeneidad de la banda. Otra posibilidad para disminuir las colas en las bandas sería aumentar el tiempo de corrida; de este modo, parte de la banda que se encuentra retrasada podría equipararse con el resto, resultando una banda más estrecha.

A pesar de los resultados no definidos adecuadamente que se obtuvieron en esta experiencia, si se compara el cromatograma de la muestra parcialmente purificada luego de la precipitación con sulfato de amonio al 80% (Fig. N° 17) con el correspondiente a la Figura. N° 18, se observa que las bandas de PM mayores a 14 kDa han desaparecido, es decir que las mismas fueron eliminadas mediante el proceso de purificación parcial realizado.

Figura Nº 18: Corrida electroforética Tricina-SDS-PAGE de patrones y de la muestra activa parcialmente purificada, luego de la fase reversa C₁₈.



1- Marcadores moleculares: Triosafosfato isomerasa: 26.6 kDa; Mioglobina: 17 kDa; α -lactoalbúmina: 14.2 kDa; Aprotinina: 6.5 kDa; Insulina cadena B: 3.5 kDa; Bradiquinina: 1.06 kDa.

2- Muestra (5 μ L) de la fracción activa correspondiente a la cromatografía en fase reversa C₁₈ del segundo protocolo de purificación.

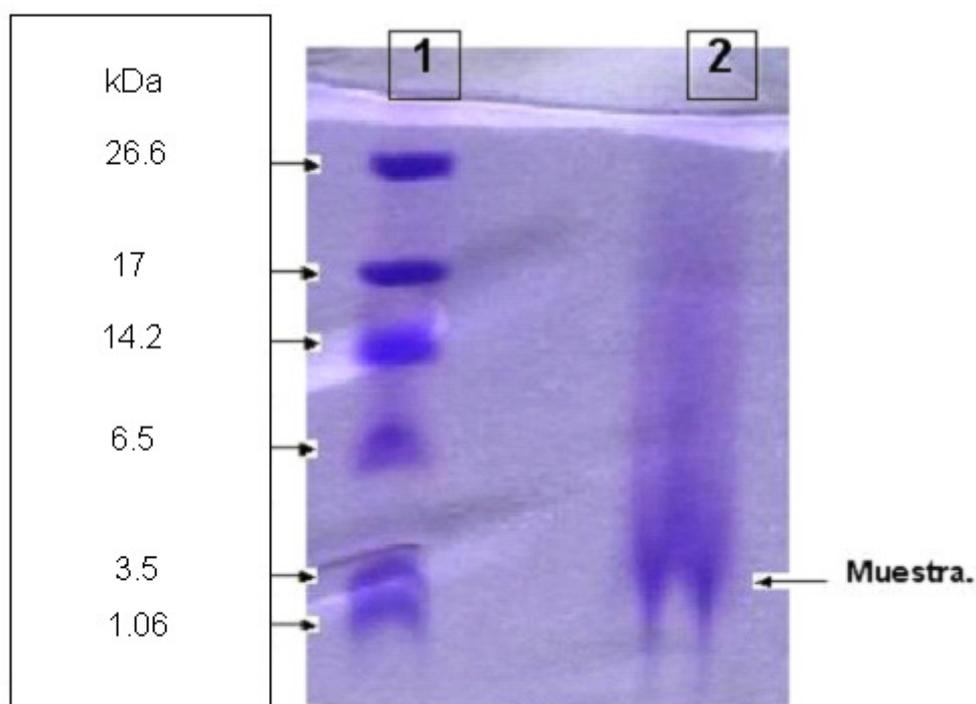
- Tinción con plata.

5.2.2.- Tinción con Coomassie Brilliant Blue R

En la Figura N° 19 se muestra el electroferograma de la muestra activa parcialmente purificada, luego de la fase reversa C₁₈, empleando en este caso Coomassie Brilliant blue R para la tinción, en lugar de plata (ver Figura N° 18). Comparando las figuras se aprecia que, al ser este colorante menos sensible que la plata, tiñe menos y la imagen es más nítida. En la última de estas dos Figuras se observa una banda neta a la altura de los patrones de PM entre 3.05 y 1.06 kDa, dato que está en concordancia con el obtenido cuando fue determinado el PM aparente por ultrafiltración, experiencia que arrojó un valor menor de 3 kDa.

Para determinar con mayor exactitud el PM de la muestra mediante este método, hubiese sido necesaria una mayor purificación de la misma, llegando a la homogeneidad.

Figura Nº 19: Corrida electroforética Tricina-SDS-PAGE de patrones y de la muestra activa parcialmente purificada, luego de la fase reversa C₁₈.



1- Marcadores moleculares: Triosafosfato isomerasa: 26.6 kDa; Mioglobina: 17 kDa; α -lactoalbúmina: 14.2 kDa; Aprotinina: 6.5 kDa; Insulina cadena B: 3.5 kDa; Bradiquinina: 1.06 kDa.

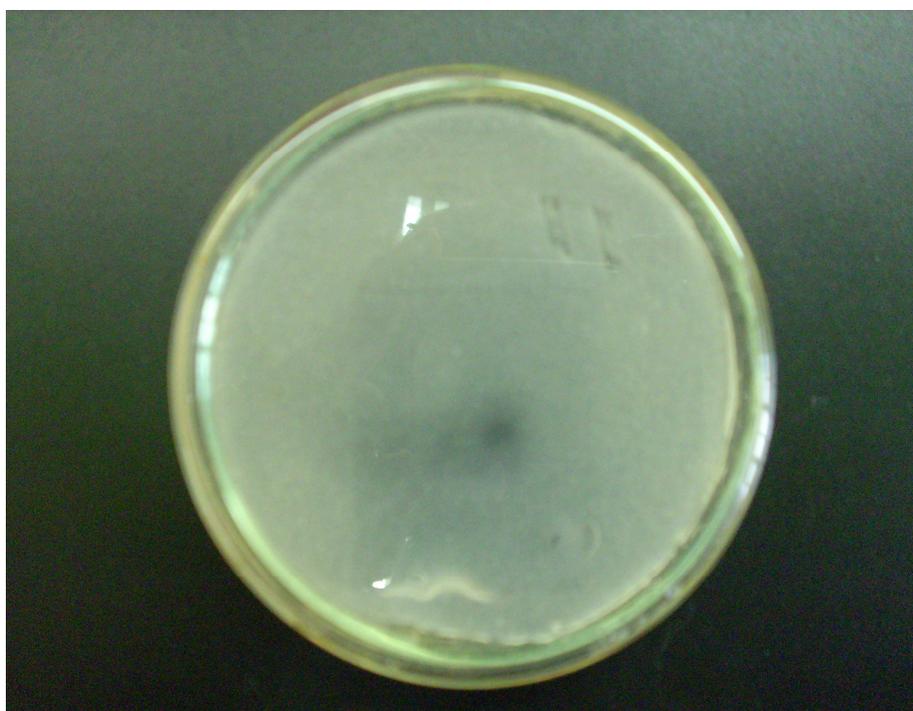
2- Muestra (5 μ L) de la fracción activa correspondiente a la cromatografía en fase reversa C₁₈ del segundo protocolo de purificación.

- Tinción con Coomassie Brilliant blue R

5.3.- Método de detección directa de la actividad antimicrobiana en geles de poliacrilamida (Bhunia et al., 1992).

En la Figura N° 20 se aprecia la inhibición generada por el SLC DBFIQ E24 concentrado 33 veces, sobre la cepa de *B. cereus* DBFIQ B 28. El efecto antagónico es específico de las proteínas alojadas en el gel, debido a que otras partes del mismo no provocaron una inhibición en la cepa indicadora. Además, luego de la fijación por dos horas, los geles se lavaron durante 30 minutos, cambiando adecuadamente el agua cada 10 minutos y agitando, lo que aseguró aún más que el efecto sea específico.

Figura N° 20: Método de detección directa de la actividad antimicrobiana del SLC concentrado, aplicando la técnica de Bhunia et al. (1992).

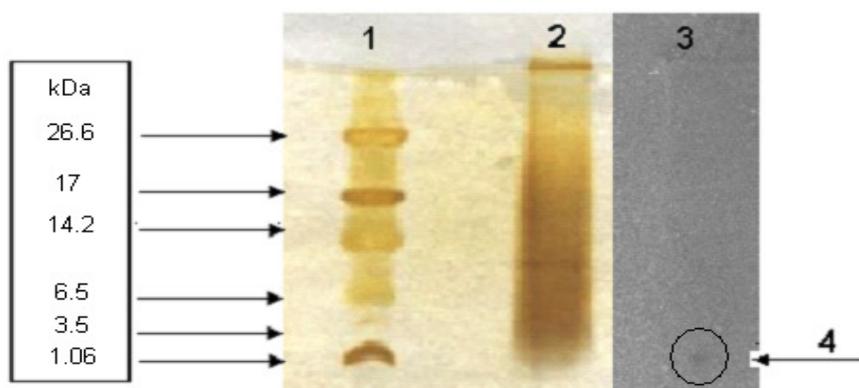


Volumen de siembra: 25 μ L del SLC DBFIQ E24 concentrado 33 veces.
Cepa indicadora: *B. cereus* DBFIQ B 28.

Esta técnica se usó para estimar el PM de la banda peptídica con actividad antimicrobiana.

En la Figura N° 21 se observa que el PM correspondiente a la banda con capacidad inhibitoria comprobada frente a *B. cereus* DBFIQ B 28, está entre los marcadores de 3.5 y 1.06 kDa, valor que coincide con los resultados de los ensayos preliminares realizados para la determinación del PM aparente utilizando las técnicas de ultrafiltración y diálisis. Mediante estas técnicas se determinó que el valor del PM de la sustancia activa es menor a 2 kDa.

Figura N° 21: Método de detección directa de la banda con actividad antimicrobiana, aplicando la técnica de Bhunia et al. (1992).



1- Marcadores moleculares: Triosafosfato isomerasa: 26.6 kDa; Mioglobina: 17 kDa; α -lactoalbúmina: 14.2 kDa; Aprotinina: 6.5 kDa; Insulina cadena B: 3.5 kDa; Bradiquinina: 1.06 kDa.

2- Muestra (5 μ L) de la fracción activa correspondiente a la cromatografía en fase reversa C_{18} del segundo protocolo de purificación.

3- Muestra (10 μ L) de la fracción activa correspondiente a la cromatografía en fase reversa C_{18} del segundo protocolo de purificación.

4- Indica la banda con actividad antimicrobiana.

Anastasiadou et al. (2008) utilizaron Tricina-SDS PAGE para determinar el PM aproximado y la presencia de la banda con actividad antimicrobiana de pediocina SA-1, constatando que el PM obtenido por Tricina-SDS PAGE estuvo en el rango comprendido entre 3 y 4 kDa. Este resultado fue concordante con el obtenido para el mismo compuesto por Espectrometría de masas (3.66 kDa).

Tiwari et al. (2008) purificaron plantaricina LR14 α y β , bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LR/14, y utilizaron Tricina-SDS PAGE para determinar el PM aproximado. También en este caso los valores obtenidos fueron concordantes con los determinados por Espectrometría de masas.

Aktypis et al. (1998) utilizaron la técnica Tricina-SDS-PAGE para determinar el PM aproximado de la banda correspondiente al péptido antimicrobiano termofilina T, el cual presentó un PM de 2500 Da. La tinción fue realizada con plata y mostró una banda difusa con cola.

Otros autores como Gálvez et al. (1998) no obtuvieron concordancia entre SDS-PAGE y Espectrometría de masas, cuando analizaron enterocina EJ97. Con la primera técnica obtuvieron una banda de PM estimado en 4800 Da, y con Espectrometría de masas observaron señales de PM 5327.7 Da, 10679.6 Da, 16053.9 Da y 21385.4 Da, las que correspondieron a los agregados de dos, tres y cuatro subunidades monoméricas, respectivamente. Con estos datos determinaron que el PM real de la bacteriocina en estudio era de 5340 Da.

Balla et al. (2000) obtuvieron mediante Tricina-SDS-PAGE sólo una banda peptídica activa. Sin embargo, cuando la misma fracción fue analizada por Espectrometría de masas constataron la presencia de dos péptidos de PM 4285 y 3899 Da, correspondientes a las enterocinas 1071A y 1071B, respectivamente.

Ohmomo et al. (2000), utilizando la técnica SDS-PAGE, obtuvieron una banda simple de PM de aproximadamente 2.500 Da para la enterocina ON-157. Sin embargo, cuando determinaron la actividad bacteriocinogénica del SLC luego de ser ultrafiltrado a través de membranas con cut-off de 50 y 20 kDa, escasamente el 60% de la sustancia con actividad pudo ser ultrafiltrada. Por otra parte, cuando la muestra fue tratada con SDS y calentada, la totalidad de la sustancia activa fue obtenida luego de la ultrafiltración a través de membranas de cut-off de 10 kDa. Estos resultados sugieren que esta bacteriocina pudo agregarse, y que la desagregación se produjo por la acción detergente del SDS y del calor.

Foulquié Moreno et al. (2003a) utilizaron la técnica Tricina-SDS-PAGE para estimar los PM de varias enterocinas, las que oscilaron entre 3.9 y 4.0 kDa. Luego de la electroforesis realizaron el bioensayo, observando bandas simples de inhibición.

Aunque SDS-PAGE no es una técnica exacta para calcular la masa molecular de pequeñas bacteriocinas hidrofóbicas tipo enterocinas, nos da una valorable información acerca de la presencia de uno o varios péptidos.

También se puede citar a modo de ejemplo que Yanagida et al. (2005), determinaron mediante Tricina SDS-PAGE el PM del extracto activo que contenía a la bacteriocina durancina L28-1A, luego de que la misma fue purificada parcialmente con cromatografía en fase reversa de C18A posteriori confirmaron la actividad de la misma mediante la técnica de Bhunia et al. (1992).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En primer lugar y teniendo en cuenta la finalidad central de la ejecución de la presente investigación, se puede afirmar que se llevó a cabo el trabajo experimental que permitió dar cumplimiento a los objetivos oportunamente planteados para el desarrollo de esta Tesis:

- Selección de una cepa silvestre de *Enterococcus*, de colección propia y aislada a partir de ecosistemas alimentarios de la región, productora de sustancias antimicrobianas tipo bacteriocinas.
- Obtención del sobrenadante libre de células (SLC) a partir de cultivos de esa cepa, donde se encuentren presentes las sustancias antimicrobianas a estudiar.
- Caracterización primaria de esas sustancias, que permitan determinar su naturaleza química y su espectro de acción.
- Purificación parcial de las sustancias tipo bacteriocinas integrantes del sobrenadante libre de células antes mencionados.
- Obtención y purificación de distintas fracciones peptídicas a partir del SLC de cultivos de la cepa seleccionada, a fin de avanzar en la purificación y caracterización de la sustancia activa.

Por otra parte, mediante la concreción de la labor experimental necesaria para dar cumplimiento a los objetivos planteados, también se han obtenido resultados que implican una contribución de relevancia para el avance de un aspecto importante de las tecnologías aplicadas en la industria alimentaria. Desde este punto de vista es posible afirmar que se ha efectuado un aporte interesante relacionado con una temática en creciente auge, la biopreservación de alimentos. Dicho aporte puede llevarse a la práctica mediante la implementación de dos estrategias diferentes: a través de la incorporación a starters alimentarios específicos de la cepa bacteriana bacteriocinogénica estudiada, o bien mediante la utilización de la bacteriocina sintetizada por ella, parcialmente purificada, como agente natural para la conservación de alimentos.

Analizando los resultados logrados en cada una de las etapas cumplidas para concretar la labor experimental, se pueden deducir las conclusiones parciales que se detallan a continuación.

- En lo que respecta a la caracterización preliminar del SLC en estudio, es importante destacar que los resultados empíricos obtenidos permiten formular las siguientes apreciaciones:

- El SLC posee un amplio y heterogéneo espectro inhibitorio, que se manifiesta frente a diversas bacterias, levaduras y hongos filamentosos alterantes de alimentos o causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs). Esta confirmación experimental indica que esta cepa del género *Enterococcus* podría producir más de una sustancia con características antimicrobianas, ya que en la mayoría de los casos los péptidos inhibidores de levaduras y

hongos filamentosos son distintos de los que reciben la denominación de bacteriocinas, los que ejercen su actividad antagónica frente a bacterias. Además, el espectro inhibitorio amplio ha sido comprobado también específicamente frente a bacterias, ya que la sustancia activa ha demostrado serlo frente a diversos géneros y especies Gram (+) y Gram (-). Esto es sumamente beneficioso si la cepa bacteriocinogénica misma o el SLC de sus cultivos, ya sea crudo o parcial o totalmente purificado, son adicionados a ciertos alimentos con vistas a su biopreservación. En cualquiera de estos casos se lograría una acción antagónica extendida, que no sólo se limitaría a las bacterias Gram (+) tradicionalmente inhibidas por la acción de bacteriocinas, sino que también se manifestaría frente a bacterias Gram (-), levaduras y hongos filamentosos indeseables en alimentos. En función de esto se puede afirmar que la cepa bacteriocinogénica en estudio y su SLC cumplen sobradamente con una de las premisas fundamentales exigidas a cualquier biopreservador alimentario, la que consiste en poseer un espectro antibacteriano amplio. En este caso, esta propiedad fundamental se extiende también a otros tipos de microorganismos cuya presencia debe ser convenientemente controlada en distintos tipos de alimentos, aumentando así las ventajas potenciales para el uso tecnológico de la cepa y de su SLC.

- La actividad del SLC frente a una cepa de *E. coli* convierte a la bacteria bacteriocinogénica en una de las pocas del género *Enterococcus* que son efectivas en el control de esta bacteria Gram (-). Adicionalmente, también ha demostrado un efecto antagónico similar frente a una cepa de *Salmonella Enteritidis*, y una acción muy intensa frente a una de *Vibrio cholerae* 01. Si se considera la importancia que tiene el control de estas bacterias Gram (-) en la

industria alimentaria, resulta incrementado el interés tecnológico de la cepa en estudio y de su SLC. En el mismo sentido debe tenerse en cuenta la actividad comprobada, aunque no de intensidad destacable, frente a *Listeria monocytogenes*, uno de los contaminantes Gram (+) más difíciles de controlar con los métodos tradicionales aplicados para asegurar la inocuidad de los alimentos. En contraposición a estos resultados favorables, no se puede dejar de mencionar un aspecto negativo detectado, el que consiste en la ausencia de actividad frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ensayada, siendo esta especie uno de los agentes causantes de ETAs más comunes y extendidos en la industria alimentaria mundial.

- Los tratamientos enzimáticos indican que la sustancia inhibitoria presente en el SLC obtenido de cultivos de *E. faecalis* DBFIQ E24 está integrada por proteínas o péptidos, pudiendo también estar presentes otras sustancias inhibitorias del crecimiento, tales como lípidos y carbohidratos. Si bien los tratamientos enzimáticos no son concluyentes por sí mismos, sino que sólo brindan información valedera para una caracterización primaria del sobrenadante, la comprobación mediante estos ensayos preliminares de la presencia de péptidos o proteínas en el SLC permite aseverar que en el mismo está presente una bacteriocina, aunque no pueda descartarse la presencia simultánea de otras sustancias antimicrobianas.
- La demostración de que el SLC es térmicamente estable, inclusive frente a un tratamiento en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, es de gran interés tecnológico. De igual modo lo es el hecho de que pueda ser conservado al menos durante 1 mes a -20 °C y por 3 meses a 4 °C, sin que resulte afectada su actividad antimicrobiana. Estas propiedades garantizan la posibilidad de

aplicación del SLC sin pérdida de efectividad en alimentos que deban ser sometidos a tratamientos térmicos o conservados bajo refrigeración o congelamiento. Por lo tanto, el SLC investigado cumple con los requisitos necesarios para ser integrado a un sistema de barreras que garantice la inocuidad alimentaria, dado que su efectividad no sería afectada por otros tratamientos que integren dicho sistema. Incluso el empleo del SLC como biopreservador permitiría reducir la intensidad de otras barreras tales como los tratamientos a altas temperaturas o la conservación en frío. Es de destacar que precisamente ésta es la tendencia imperante en la actualidad en lo que respecta al uso de bacteriocinas en tecnologías alimentarias. Dado que las mismas no pueden garantizar por sí solas la inocuidad de los alimentos, su aplicación se debe integrar como una barrera más en un sistema que sí lo haga. Esta estrategia es de sumo interés, dado que posibilita disminuir la intensidad de otros tratamientos que alteran las propiedades nutricionales o los caracteres sensoriales de los alimentos preservados.

- La comprobación de que el SLC es activo en un amplio rango de pH también es importante desde el punto de vista tecnológico, ya que garantiza la potencial aplicación del mismo en la conservación de una variada gama de alimentos. Este aspecto merece una reflexión idéntica a la realizada en el ítem anterior con respecto a la integración a sistemas de barreras de aseguramiento de la calidad e inocuidad alimentarias, dado que la manipulación del pH es otra de las barreras muy frecuentemente usadas en esos sistemas. El hecho de que exista un rango de pH de máxima actividad para el SLC en estudio, comprendido entre los valores 6.0 y 7.0, es común para la mayoría de las bacteriocinas conocidas, mientras que no lo es tanto el

que la actividad se mantenga, aunque ligeramente disminuida, fuera de ese segmento de valores óptimos de pH.

- El hecho de haber comprobado que, en general, el agregado de surfactantes favorece el aumento de la actividad antimicrobiana del SLC investigado, como consecuencia de la desagregación de los complejos de bacteriocina, es importante a fin de determinar las mejores condiciones para su obtención y posterior aplicación. El comportamiento de cada bacteriocina frente a los detergentes es único y depende de las cepas utilizadas en el ensayo, lo que explica la gran disparidad de resultados observada en la bibliografía.
- El marcado efecto bactericida y bacteriolítico comprobado para el SLC E24, tanto frente a bacterias Gram (+) como Gram (-), lo torna especialmente eficaz para el control efectivo de la presencia de estos microorganismos en distintos tipos de alimentos. A diferencia de otras bacteriocinas conocidas, cuyo efecto es sólo bacteriostático y por lo tanto muy limitado, el empleo como agente antibacteriano del SLC en estudio aseguraría el control efectivo de la población bacteriana contaminante.

- En lo que respecta a la cepa bacteriocinogénica en sí misma, se pudo establecer que *E. faecalis* DBFIQ E24 no presentó actividad hemolítica y que resultó sensible al antibiótico vancomicina. Estos aspectos son importantes para poder aplicar la cepa en estudio en la industria alimentaria o en la elaboración de productos veterinarios, dado que se trata de un microorganismo seguro para ser aprovechado por su actividad productora de agentes antimicrobianos, sin correr el riesgo de potenciales efectos adversos sobre la salud humana o animal.

- En lo que se refiere a los ensayos de purificación efectuados, y en referencia específica al primer protocolo de purificación parcial del SLC, los resultados obtenidos permiten destacar los siguientes aspectos:

- De la cromatografía de intercambio catiónico se obtuvieron dos fracciones activas, que fueron las correspondientes al lavado y a la fracción A. La fracción lavado posee actividad debido posiblemente a la formación de agregados peptídicos, los cuales no son retenidos por la columna de intercambio catiónico y son eluidos con la solución de lavado. La obtención de la fracción A al efectuar la elución con 0.1M de AcNH_4 , permite concluir que la sustancia antimicrobiana es de carácter catiónico.
- La fracción A, resultante de la elución con 0.1M de AcNH_4 , y cuya actividad expresada en Unidades Arbitrarias fue de 266 AU/mL, resultó ser más activa que la de lavado, dado que esta última presentó halos inhibitorios menores frente a las cepas indicadoras. Esto indica que, para continuar avanzando eficazmente con el proceso de purificación, conviene centrar la atención y seguir trabajando sobre la mencionada fracción.
- De la cromatografía en fase reversa C_{18} se obtuvieron dos fracciones activas, la de lavado y la eluida con el 20% de ACN. Esto permite concluir que, o bien se está en presencia de dos compuestos antimicrobianos diferentes, o se produce agregación de las moléculas de sustancia antimicrobiana entre sí mismas o con moléculas de otros péptidos del medio.
- De la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) se obtuvieron cuatro fracciones, siendo la I y la IV las activas frente a las cepas indicadoras. De este modo se pudo avanzar sensiblemente en el proceso de purificación de la sustancia activa, dado que se obtuvieron fracciones cada

vez más puras, desagregadas y con menor grado de contaminación con sustancias interferentes que no aportan nada al proceso de inhibición frente a las cepas sensibles.

- En referencia específica al segundo protocolo de purificación parcial del SLC, de acuerdo con los resultados logrados es importante destacar los siguientes aspectos:

- La precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación produjo un recupero del 32% de la actividad antimicrobiana total, respecto del sobrenadante sin concentrar. De esta manera, la actividad inhibitoria específica de la sustancia antimicrobiana se incrementó 3.3 veces en relación a la del SLC. En conclusión, esta metodología resulta útil para concentrar la sustancia activa y así facilitar las etapas siguientes del proceso de purificación.
- La cromatografía de filtración por geles resultó útil para eliminar las sales remanentes y aquellas partículas de tamaño molecular menor a 700 Da.
- Al aplicar cromatografía de intercambio catiónico, sólo la fracción A (0.05 M de AcNH₄) proveniente del lavado de la columna, resultó ser activa, con un título de 133 AU/mL. Esto demuestra que el empleo de esta técnica con SP-Sepharosa es útil para avanzar en la purificación del precipitado obtenido a partir del SLC tratado con sulfato de amonio al 80% de saturación.
- En la cromatografía en fase reversa C₁₈ sólo la fracción de lavado presentó actividad antimicrobiana, con un título de 133 AU/mL. Si bien no hubo retención de la sustancia antimicrobiana, esta técnica permitió realizar un clean-up de la muestra, de modo que se logró eliminar los pigmentos

coloreados relativamente hidrofóbicos presentes, los cuales interfieren con los métodos de determinación de proteínas, ya sean directos o colorimétricos.

- La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) de la fracción activa de lavado proveniente de la cromatografía en fase reversa C₁₈, mostró un perfil cromatográfico semejante al del primer protocolo de purificación. En conclusión, a pesar de las diferencias metodológicas existentes entre ambos protocolos ensayados, el resultado final, analizado mediante los perfiles cromatográficos de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), lleva a considerar que en términos de pureza no hubo diferencias. Por lo tanto, es posible utilizar cualquiera de las dos metodologías para alcanzar niveles de purificación prácticamente comparables.
- Para evitar la pérdida de sustancia activa y al mismo tiempo disminuir los costos, siempre es conveniente utilizar el protocolo de purificación que posea menor número de etapas. Esta aseveración también se fundamenta en la muy escasa concentración en que estos compuestos se encuentran en los SLC, comprendida generalmente entre 0.75 y 16 mg/L.

- Con respecto a la electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando Tricina- SDS-PAGE, se pudo constatar que:

- El PM de la banda activa se encontraba entre los valores de PM de los patrones correspondientes a 3.5 y 1.06 kDa, lo que coincide con la determinación realizada a través de membranas dialíticas con límites de exclusión de 1000 y 2000 Da. Esto permite confirmar lo previamente observado por otros autores en lo relativo a que este sistema electroforético es muy útil, siendo el generalmente

preferido para la resolución de péptidos y proteínas de bajo peso molecular. Además, se puede agregar que la tinción con Coomassie Brilliant blue R es más aconsejable que la realizada con plata, dado que el colorante tiñe menos por ser menos sensible que la plata, permitiendo así el logro de una imagen más nítida y con mejor resolución de las bandas.

A fin de tratar de expresar una conclusión final que deje claramente establecida la importancia del tema desarrollado y de los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede argumentar que, en la última década, el estudio del aspecto tecnológico relacionado con la bacteriocinogénesis de las bacterias del ácido láctico se ha visto fuertemente incrementado. Este interés creciente surge a modo de respuesta a la tendencia del mercado consumidor, que ha demostrado una muy marcada preferencia por los alimentos denominados “naturales”, es decir “libres de aditivos químicos”, y por lo tanto libres de los compuestos químicos tradicionalmente utilizados como preservadores en la industria alimentaria.

La utilización de starters de bacterias lácticas para la producción “in situ” de sustancias antimicrobianas en diferentes matrices alimentarias, o el empleo de esos compuestos total o parcialmente purificados como biopreservadores alimentarios, se traduce en un incremento del “shelf-life” y de la seguridad de los alimentos en los que están involucrados. Por lo tanto, su estudio y desarrollo ocupa y ocupará en el futuro inmediato un espacio económico relevante, teniendo en consideración los daños causados en las industrias de alimentos por defectos microbiológicos de variada naturaleza.

En lo que respecta al aspecto social, como ya se ha dicho anteriormente, en la última década las exigencias del público consumidor se han volcado hacia los aditivos alimentarios naturales, relacionando estas sustancias con alimentos cuyo consumo les brinda mayor seguridad. Además, el uso de bacterias del ácido láctico, y en particular de extractos libres de células obtenidos de su propagación en medios adecuados, resultaría totalmente seguro para los consumidores y minimizaría los posibles cambios en la textura y el flavor de los alimentos, especialmente de aquellos no fermentados.

En lo que hace al aspecto científico, si bien el tema ha recibido destacada atención en los últimos años, quedan aún cuestiones por aclarar en función de la notable complejidad del sistema antagónico generado por las bacterias ácido lácticas que, además, es variable de cepa a cepa.

Considerando a cada alimento como un verdadero y particular ecosistema donde la vida de las poblaciones microbianas está regida por una gran complejidad de fenómenos, la cepa de *E. faecalis* DBFIQ E24 resultaría muy adecuada para integrar starters que desempeñen más adecuadamente su papel tecnológico en la maduración de ciertos alimentos fermentados. De esta manera, su uso como biopreservador alimentario “natural” muestra un futuro promisorio.

De este modo se considera haber efectuado una considerable contribución al desarrollo de una temática de gran interés tecnológico, teniendo en cuenta la tendencia actualmente imperante en la industria alimentaria mundial, relativa a la obtención de productos libres de aditivos químicos y, en consecuencia, al uso de preservadores obtenidos por procesos biotecnológicos.

Tratando de reunir los conceptos anteriormente expuestos en un párrafo que los contenga y resuma, se puede afirmar que la sostenida investigación de este

aspecto de las bacterias del ácido láctico formará la base de futuras estrategias para desarrollar alimentos más estables y seguros, más acorde con las exigencias sociales del mercado, y que incluso podrían llegar a desempeñar un interesante papel en la profilaxis intestinal.

ANEXO

Todos los ensayos descritos en la Sección “Materiales y Métodos” que se detallan a continuación fueron realizados por triplicado, siendo los resultados expuestos en la Sección “Resultados y Discusión” un promedio de los resultados individuales obtenidos en cada determinación:

- 4.- Determinación de la actividad inhibitoria por el método de difusión en agar.**
- 5. Espectro antimicrobiano de la sustancia inhibitoria producida por la cepa de *E. faecalis* DBFIQ E24.**
- 6. Ensayos de inhibición cruzada entre *E. faecalis* DBFIQ E24 y distintas cepas de bacterias ácido lácticas.**
- 7. Caracterización primaria del sobrenadante libre de células de *E. faecalis* DBFIQ E24.**
- 8. Protocolos de purificación de la sustancia antimicrobiana presente en el sobrenadante libre de células.**
- 10. Electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando tricina y dodecil sulfato sódico.**

Buffers y soluciones empleadas en la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico, según Schägger y Von Jagow (1987) (Tricina-SDS-PAGE)

Soluciones y buffers necesarios para el armado del gel

Solución madre de acrilamida bis-acrilamida (30% T, 3% C)

Composición en g:

Acrilamida (30% T, Bio-Rad)	29.1
N,N'-metilen-bis-acrilamida (3% C, Bio-Rad)	0.9

Preparación:

Pesar y disolver los componentes tomando los recaudos necesarios, en concordancia con la toxicidad de estas sustancias. Enrasar a 100 mL con agua destilada, en un matraz aforado. Filtrar por papel Whatman N° 1 y colocar la solución en frasco de color caramelo o cubierto con papel de aluminio. Conservar en la heladera.

Datos:

% T: $[(g \text{ acrilamida} + g \text{ de bis-acrilamida}) / (\text{volumen total (mL)})] * 100$; (% p/v)

% C: $[(g \text{ de bis-acrilamida}) / (g \text{ acrilamida} + g \text{ de bis-acrilamida})] * 100$; (% p/p)

Buffer del gel 3X

Composición en g:

TRIS (TRIS 3 M, Bio-Rad)	36.34
SDS (SDS 0.3% p/v, Bio-Rad)	0.30

Preparación:

Disolver el TRIS-BASE con agitador y calor. Ajustar el pH=8.45 con HCl concentrado (aproximadamente 15 mL), y luego agregar lentamente el SDS hasta su completa disolución. Enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar en heladera.

Dato: Peso molecular del TRIS = 121.14 g/mol

Solución madre de persulfato de amonio (10% p/v)*Composición en g:*

Persulfato de amonio (APS, Bio-Rad)	1.0
-------------------------------------	-----

Preparación:

Disolver la sustancia en el menor volumen de agua posible. Enrasar a 10 mL en matraz aforado. Distribuir en alícuotas en tubos Eppendorf. Conservar a -20 °C.

Solución de N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED)

Es una solución comercial suministrada por Bio-Rad. Tanto el APS como el TEMED constituyen los agentes catalizadores de la reacción de polimerización de la acrilamida.

Buffers de corridaBuffer de cátodo*Composición en g:*

TRIS (TRIS 0.1 M)	12.11
Tricina (Tricina 0.1 M) (Bio-Rad)	17.92
SDS (SDS 0.1% p/v)	1.00

Preparación:

Disolver el TRIS-BASE (pH ajustado a 8.25) y luego agregar tricina (N-[Tris (hidroximetil) metil] glicina); finalmente agregar el SDS. No es necesario ajustar nuevamente el pH. Enrasar a 1000 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar en la heladera.

Dato: Peso molecular de la Tricina = 179.17 g/mol

Buffer de ánodo*Composición en g:*

TRIS (TRIS 0.2 M)	24.23
-------------------	-------

Preparación:

Disolver el TRIS-BASE y ajustar el pH a un valor de 8.90 con HCl concentrado (aproximadamente 4.0 mL). Enrasar a 1000 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar en heladera.

Solución de Tris-HCl, pH=6.80*Composición:*

TRIS (hidroximetil aminometano)	6.0 g
---------------------------------	-------

Preparación:

Ajustar el pH a un valor de 6.80 con HCl 1 N (aproximadamente 48 mL). Enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar en heladera.

Buffer de Muestra*Composición:*

TRIS-HCl 0,5 M, pH=6.80 (TRIS-HCl 100 mM)	2.0 mL
SDS (SDS 1% p/v)	0.10 g
Glicerol (24% v/v) (Merck)	2.4 mL
β-mercaptoetanol (4% v/v) (Bio-Rad)	0.4 mL
Coomassie Blue G-250 (0.02% p/v) (Bio-Rad)	0.002 g

Preparación:

Mezclar todos los componentes y enrasar a 10 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar en heladera.

Solución fijadora empleada en el método de detección directa de la actividad antimicrobiana (Bhunja y Johnson, 1992)

Composición en mL:

Isopropanol (20% v/v)	20
Ácido acético glacial (10% v/v)	10

Preparación:

Mezclar ambas cantidades de solventes y enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Preparar en el momento de usar.

Soluciones empleadas en la técnica de tinción argéntica según Blum et al., 1987

Solución fijadora fuerte

Composición en mL:

Glutaraldehído al 25% (Merck)	20
-------------------------------	----

Preparación:

Efectuar la dilución del reactivo puro con agua destilada, en matraz aforado de 100 mL. Tomar las precauciones necesarias. Preparar en el momento.

Solución fijadora débil

Composición en mL:

Metanol (Cicarelli)	50
Ácido acético glacial (Cicarelli)	12
Formaldehído al 37% (Anedra)	0.05

Preparación:

Mezclar todos los componentes y enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar a temperatura ambiente.

Solución de lavado I

Composición en mL:

Etanol (Cicarelli)	50
--------------------	----

Preparación:

Enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar a temperatura ambiente.

Solución de pretratamiento

Composición en g:

Tiosulfato de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Cicarelli)	0.03
--	------

Preparación:

Disolver el reactivo sólido en 150 mL de agua destilada. Preparar en el momento.

Solución de plata*Composición:*

Nitrato de plata (AgNO ₃) (Cicarelli)	0.2 g
Formaldehído al 37%	0.075 mL

Preparación:

Disolver la sustancia sólida en el menor volumen posible de agua destilada. Luego agregar el formaldehído. Por último, enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar a temperatura ambiente.

Solución desarrolladora*Composición:*

Carbonato de sodio anhidro (Carlo Erba)	6 g
Solución de pretratamiento	1 mL
Formaldehído	0.05 mL

Preparación:

Mezclar y disolver los componentes. Enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Preparar en el momento.

Solución de stopping*Composición en mL:*

Metanol	10
Ácido acético glacial	12

Preparación:

Mezclar los componentes. Enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar a temperatura ambiente.

Solución de lavado II*Composición en mL:*

Metanol	30
---------	----

Preparación:

Enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar a temperatura ambiente.

Soluciones empleadas en la técnica de tinción con Coomasie Brilliant Blue RSolución fijadora fuerte*Composición en mL:*

Glutaraldehído al 25% (Merck)	20
-------------------------------	----

Preparación:

Efectuar la dilución en matraz aforado de 100 mL, con agua destilada. Tomar las precauciones necesarias. Preparar en el momento.

Solución fijadora débil*Composición en mL:*

Metanol (Merck)	40
Ácido acético (Merck)	10

Preparación:

Mezclar los componentes. Enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar a temperatura ambiente.

Solución Colorante: Coomasie Brilliant Blue R*Composición:*

Coomasie Brilliant Blue R (Sigma)	0.025 g
Ácido acético	10 mL

Preparación:

Disolver la sustancia sólida en el menor volumen posible de agua destilada. Luego, agregar el ácido acético. Por último, enrasar a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado. Conservar a temperatura ambiente.

Solución Decolorante*Composición:*

Ácido acético (Merck)	10 mL
-----------------------	-------

Preparación:

Efectuar la dilución en matraz aforado de 100 mL con agua destilada.

Reactivos utilizados en el método de cuantificación de proteínas por el ácido bicinconínico (Walker, 2002)

Reactivo A*Composición en g:*

Bicinconinato disódico (BCA, Sigma)	0.10
Carbonato de sodio monohidrato ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck)	2.00
Tartrato de sodio dihidratado ($\text{NaOOC}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Cicarelli)	0.16
Hidróxido de sodio (NaOH) (Merck)	0.40
Carbonato ácido de sodio anhidro (NaHCO_3) (Merck)	0.95

Preparación:

Pesar y disolver todos los componentes en agua Milli-Q. Ajustar, si es necesario, el pH a un valor de 11.25 con NaOH o NaHCO_3 . Enrasar a 100 mL con agua Milli-Q, en matraz aforado.

Reactivo B*Composición en g:*

Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Cicarelli)	0.4
---	-----

Preparación:

Disolver el componente con agua Milli-Q y enrasar a 10 mL en matraz aforado.
Los reactivos A y B son estables indefinidamente a temperatura ambiente.

Reactivo de trabajo standard (SWR)

Preparación:

Mezclar 100 volúmenes del reactivo A con 2 volúmenes del reactivo B. La solución es de color verde manzana y resulta estable, a temperatura ambiente, durante 1 semana.

Buffers utilizados en el ensayo enzimáticoBuffer de fosfato de potasio 0.2 M:

- a) **A:** 0.2 M de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4); PM = 136.09 g/mol. Para 100 mL de solución se pesan 2.7218 g y se enrasa a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado.
- b) **B:** 0.2 M de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4); PM = 174.18 g/mol. Para 100 mL de solución se pesan 3.4836 g y se enrasa a 100 mL con agua destilada, en matraz aforado.

Según el valor de pH que se pretenda lograr, mezclar un cierto volumen de A con otro de B y enrasar a 200 mL con agua destilada, en matraz aforado.

- Para obtener un buffer de pH=7.50: mezclar 16 mL de A y 84 mL de B. Controlar el valor del pH antes de enrasar. Si no es el adecuado, agregar pequeñas cantidades conocidas de la sal necesaria de modo de disminuir o aumentar el pH. Luego, controlar nuevamente el valor del pH. Enrasar a 200 mL con agua destilada, en matraz aforado.
- Para obtener un buffer de pH=7.40: mezclar 19 mL de A y 81 mL de B. Efectuar los mismos controles de pH que para el buffer de pH=7.50. Enrasar a 200 mL con agua destilada, en matraz aforado.

Buffer de fosfato de potasio 0,01 M, pH=7.50

Realizar una dilución 1/20 del buffer fosfato de potasio 0.2 M, pH=7.50, previamente preparado. Controlar el valor del pH antes de enrasar

Buffer de fosfato de potasio 0.066 M, pH=6.24

- Para 0.2 M y pH=6.24: mezclar 79.9 mL de A y 20.1 mL de B. Controlar el valor del pH antes de enrasar. Enrasar a 200 mL con agua destilada, en matraz aforado.

A continuación realizar una dilución al tercio de una alícuota del buffer de fosfato 0.2 M, pH=6.24, previamente preparado. Controlar el valor del pH antes de enrasar.

Buffer de fosfato de potasio 0.01 M, pH=6.20

- Para 0.2 M y pH=6.20: mezclar 81.5 mL de A y 18.5 mL de B. Controlar el valor del pH antes de enrasar. Enrasar a 200 mL con agua destilada, en matraz aforado. Luego efectuar una dilución 1/20 de una alícuota del buffer de fosfato 0.2 M, pH=6.20, previamente preparado. Controlar el valor del pH antes de enrasar.

Soluciones y buffers empleados en los ensayos de purificación efectuados sobre los sobrenadantes libres de células de la bacteria bacteriocinogénica

Buffer empleado en la precipitación salina con sulfato de amonio

Buffer de fosfato de sodio 0.04 M, pH=7.0*Contiene:*

Fosfato dibásico de sodio (Cicarelli)	1.065 g
Fosfato monobásico de sodio monohidratado (Merck)	1.656 g

Preparación:

Disolver ambas sales en agua Milli-Q, trasvasarlas a un matraz aforado de 500 mL y enrasar.

Soluciones y buffers utilizados en la cromatografía de intercambio catiónico

Solución madre de acetato de amonio 0,8 M, pH=4.50

Contiene:

Acetato de amonio (Cicarelli) 61.66 g

Preparación:

Disolver la sal con 700 mL de agua Milli-Q en un vaso de precipitado y ajustar el valor del pH a 4.50, utilizando ácido acético glacial. A continuación trasvasar a un matraz aforado de 1000 mL y enrasar con agua destilada.

Los buffers de acetato de amonio de menor concentración molar se obtienen por dilución de la solución madre. A continuación se muestra la Tabla 1, que detalla el volumen de solución madre necesaria para lograr 500 mL de la solución de acetato de amonio de la molaridad deseada y con un valor de pH de 4.50.

Molaridad (M)	Volumen de solución madre necesario (mL)
0.05	31.25
0.1	62.5
0.2	125
0.3	187.5
0.4	250

Tabla 1: Volumen de solución madre necesario para lograr 500 mL de la solución de acetato de amonio de la molaridad deseada y con pH=4.50.

Soluciones utilizadas en la cromatografía en fase reversa C₁₈

Se utilizaron mezclas acetonitrilo-agua. En la Tabla 2, se detallan tanto el porcentaje de acetonitrilo deseado como el volumen de acetonitrilo necesario para preparar un volumen final de 200 mL de cada mezcla.

% (v/v) de acetonitrilo deseado	Volumen necesario de acetonitrilo puro (mL)
20	40
30	60
50	100
80	160

Tabla 2: Volumen de acetonitrilo puro necesario para preparar 200 mL de mezcla acetonitrilo-agua del porcentaje deseado.

Soluciones y buffers utilizados en la cromatografía de filtración por geles

Solución de acetato de amonio 0.05 M, pH=7.0

Contiene:

Acetato de amonio 3.854 g

Preparación:

Disolver la sal en el menor volumen posible de agua Milli-Q, trasvasar a un matraz de 1000 mL y enrasar. La solución tiene un valor de pH de 7.0.

Soluciones empleadas en la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Solución A

Contiene:

Agua Milli-Q 1000 mL
 Ácido trifluoroacético (TFA, J. T. Baker) 1 mL

Preparación:

Filtrar el agua Milli-Q utilizando un equipo de filtración "Millipore", con una membrana de diámetro de poro de 0.22 μm . A continuación agregar el TFA con pipeta de vidrio bajo campana de extracción.

Solución B

Contiene:

Acetonitrilo (ACN, J.T. Baker)	1000 mL
Ácido trifluoroacético	0.8 mL

Preparación:

Filtrar el acetonitrilo utilizando un equipo de filtración "Millipore", con una membrana de diámetro de poro de 0.22 μm . A continuación agregar el TFA con pipeta de vidrio bajo campana de extracción.

Curva de calibrado para la determinación de proteínas mediante el método del ácido bicinónico utilizando Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma, A-4503)

Los valores de absorbancia a $\lambda=562$ nm de las soluciones del patrón en concentraciones crecientes se muestran en la *Tabla A*. Los ensayos se efectuaron por triplicado, se promediaron los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración del estándar y se graficó la curva correspondiente. Luego se efectuó una regresión de los datos, aplicando el modelo lineal $Y = A + B \cdot X$, utilizando el software "Origin 5.0". La gráfica y su regresión se aprecian en la Figura A.

Concentraciones del testigo ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancias del Primer Ensayo	Absorbancias del Segundo Ensayo	Absorbancias del Tercer Ensayo	Promedio de absorbancias
0	0.000	0.000	0.000	0.000
25	0.010	0.011	0.010	0.010
125	0.144	0.145	0.157	0.149
250	0.289	0.303	0.270	0.287
500	0.580	0.580	0.497	0.552
750	0.778	0.828	0.813	0.806
1000	1.032	1.077	0.984	1.031
1500	1.518	1.540	1.582	1.547
2000	1.888	2.058	2.174	2.040

Tabla A. Valores de absorbancia a $\lambda=562$ nm, obtenidos por triplicado, de las diferentes concentraciones del patrón. En "negrita" se resaltan los valores con que fueron construidas las curvas. Como blanco de reactivo se utilizó SWR incubada en las mismas condiciones que los patrones, sin el agregado de muestra.

Empleando la curva de calibrado obtenida con BSA, la concentración de proteína se calculó con la siguiente fórmula:

$$C_{\text{proteína}} (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Absorbancia de muestra incógnita} - 0.02}{0.00102}$$

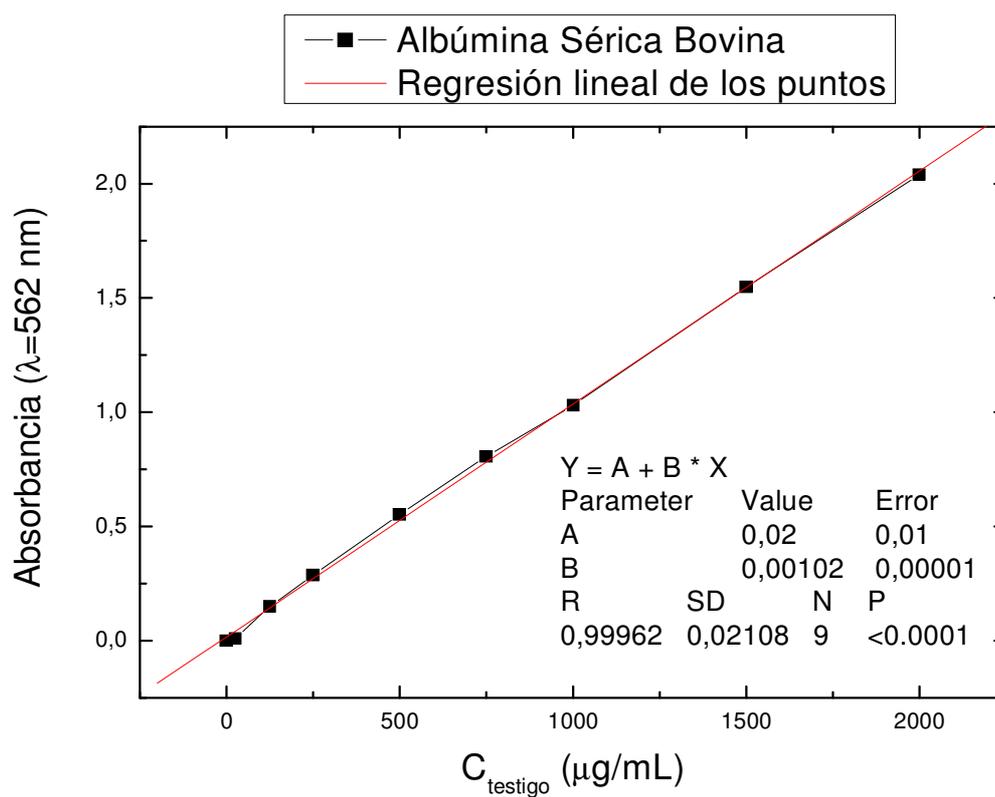


Figura A. Curva de calibrado y valores de los parámetros de la regresión lineal obtenidos con BSA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Bar**, N.; Harris, N. D. and Rill, R. L. "Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*". 1987. *J. Food Sci.*, 52 (2): 411-415.
- Abee**, T. "Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanism of producer organism". 1995. *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**: 1-10.
- Aktypis**, A.; Kalantzopoulos, G.; Huis in't Veld, J. H. J.; Ten Brink, B. "Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040". 1998. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 568-576.
- Allison**, G. E. and Klaenhammer, T. R. "Functional analysis of the gene encoding to lactacin F, *lafI*, and its use as *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker". 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4450-4460.
- Ammor**, S.; Tauveron, G.; Dufour, E.; Chevallier, I. "Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds". 2006. *Food Control*, 17: 454-461.
- Anastasiadou**, S.; Papagianni, M.; Filiouis, G.; Ambrosiadis, I.; Koidis, P. "Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization". 2008. *Bioresource Technol.*, **99**: 5384-5390.
- Axelsson**, L.T.; Chung, T. C; Dobrogosz, W. J. and Lindgren, S. E. "Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*". 1989. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **2**: 131-136.

- Axelsson**, L. T. "Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology". pp. 1-64. En: Salminen, S.; von Wright, A. (Eds.) "Lactic Acid Bacteria". 1993. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Aymerich**, T.; Holo, H.; Håvarstein, L. S.; Hugas, M.; Garriga, M. and Nes, I. F. "Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins". 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1676–1682.
- Aymerich**, M. T. and Hugas, M. "Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos". 1998. *Eurocarne*, **72**: 39-49.
- Aymerich**, T.; Martín, B., Garriga, M.; Vidal-Carou, M.C.; Bover-Cid, S. and Hugas, M. "Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. 2006. *J. Appl. Microbiol.*, **100**: 40-49.
- Bacus**, J.N. and Brown, W.L. "Use of microbiolculture: Meat products". 1981. *Food Technol.*, **35**: 74-78.
- Baird-Parker**, A. C. "Organic Acids". pp. 126-135. En: Silliker, J. H. (Ed.) "Microbial Ecology of Foods". 1980. Academic Press, New York.
- Balla**, E.; Dicks, L. M. T.; du Toit, M.; van der Merwe, M. J. and Holzapfel, W. H. "Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE1071". 2000. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 1298– 1304.
- Barefoot**, S. F. and Klaenhammer, T. R. "Detection and Activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*". 1983. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 1808-1815.

- Barefoot**, S. F. and Klaenhammer, T. R. "Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B". 1984. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**: 328-334.
- Barrow**, G. I. "The nature of inhibitory activity by *Staphylococcus aureus* type 71". 1963. *J. Gen. Microbiol.*, **32**: 255-261.
- Basanta**, A.; Sánchez, J.; Gómez-Sala, B.; Herranz, C.; Hernández, P. E.; Cintas, L. M. "Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers". 2008. *Int. J. Food Microbiol.*, **125(3)**: 293-307.
- Benkerroum**, N.; Ghouati, Y.; Sandine, W. E. and Tantaoui-Elaraki, A. "Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins". 1993. *Lett. Appl. Microbiol.*, **17**: 78-81.
- Bennik**, M. H. J.; Verheul, A.; Abee, T.; Naaktgeboren-Stoffels, G.; Gorris, L. G. M. and Smid, E. J. "Interactions of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity". 1997. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 3628-3636.
- Bernardeau**, M. ; Vernoux, J. P. ; Henri-Dubernet S.; Guéguen M. "The *Lactobacillus* genus". 2008. *Int. J. Food Microbiol.*, **126(3)**: 278-285.
- Bhugaloo-Vial**, P.; Dousset, X.; Metivier, A.; Sorokine, O.; Anglade, P.; Boyaval, P. and Marison, D. "Purification and amino acid sequences of piscicocins VIa y VIb, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* VI that display significantly different levels of specific inhibitory activity". 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4410-4416.

- Bhunia**, A. K.; Johnson, M. C. and Ray, B. "Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis". 1987. *J. Ind. Microbiol.*, 2: 319-322.
- Bhunia**, A. K.; Johnson, M. C. and Ray, B. "Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*". 1988. *J. Appl. Bacteriol.*, 65: 261-268.
- Bhunia**, A. K.; Johnson, M. C.; Ray, B. and Belden, E. L. "Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H". 1990. *J. Appl. Bacteriol.*, 69 (2): 211-215.
- Bhunia**, A. K.; Johnson, M. C.; Ray, B. and Kalchayanand, N. "Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains". 1991. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 25-33.
- Bhunia**, A. K. and Johnson, M. G. "A modified method to directly detect in SDS-PAGE the bacteriocin of *Pediococcus acidilactici*". 1992. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15: 5-7.
- Bhunia**, A. K. "Monoclonal Antibody-Based Enzyme Immunoassay for Pediocins of *Pediococcus acidilactici*. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(8): 2692-2696.
- Bierbaum**, G. and Sahl, H.G. "Influence of cationic peptides on the activity of the autolyt endo- β -N-acetylglucosamidase of *Staphylococcus simulans* 22". 1988. *FEMS Microbiol. Lett.*, 58: 223-228.
- Blom**, H.; Katla, T.; Hagen, B. F. and Axelsson, L. "A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins". 1997. *Int. J. Food Microbiol.*, 38: 103-109.
- Blum**, H.; Beier, H. and Gross, H. J. "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels". 1987. *Electrophoresis*, 8: 93-99.

- Bonadè**, A.; Murelli, F.; Vescovo, M.; Scolari, G. "Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*". 2001. *Lett. Appl. Microbiol.*, **33**: 153-158.
- Bourdreaux**, D. P. and Matrozza, M. A. "Method and composition for extending the shelf life of processed meats". 1992. Patente 5.137.319. EE.UU.
- Bouksaim**, M; Fliss, I.; Meghrou, J.; Simard, R. and Lacroix, C. "Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence. 1998. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 176-184.
- Bouksaim**, M.; Lacroix, C.; Bazin, R. and Simard, R. "Production and utilization of polyclonal antibodies against nisin in an ELISA and for immunolocation of nisin in producing and sensitive bacterial strains". 1999. *J. Appl. Microbiol.*, **87**: 500-510.
- Broadbent**, J. R.; Chou, Y. C.; Gillies, K. and Kondo, J. K. "Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens". 1989. *J. Dairy Sci.*, **72**: 3342-3345.
- Brötz**, H.; Josten, M.; Wiedemann, I.; Schneider, U.; Götz, F.; Bierbaum, G. and Sahl, H. G. "Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics". 1998. *Mol. Microbiol.*, **30**: 317-327.
- Bruno**, M. E. C.; Kaiser, A. and Montville, T. J. "Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells". 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2255-2259.
- Bruno**, M. E. C. and Montville, T. J. "Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria". 1993. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3003-3010.

- Burianek**, L. L. and Yousef, A. E. "Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures". 2000. *Lett. Appl. Microbiol.*, **31**: 193-197.
- Buyong**, N.; Kok, J. and Luchansky, J. B. "Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese". 1998. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 4842-4845.
- Caldwell**, S. L.; McMahon, D. J.; Oberg, C. J. and Broadbent, J. R. "Development and characterization of lactose-positive *Pediococcus* species for milk fermentation". 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 936-941.
- Carminati**, D.; Giraffa, G. and Bossi, M. "Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*". 1989. *J. Food Prot.*, **52**: 614-617.
- Carolissen-Mackay**, V.; Arendse, G. and Hastings, J. W. "Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers". 1997. *Int. J. Food Microbiol.*, **34**: 1-16.
- Casaus**, P.; Nielsen, T.; Cintas, L. M.; Nes, I. F.; Hernández, P. E. and Holo, H. "Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A". 1997. *Microbiology*, **143**: 2287-2294.
- Chen**, Y.; Shapira, R.; Eisenstein, M. and Montville, T. J. "Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure". 1997a. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 524-531.
- Chen**, Y.; Ludescher, R. D. and Montville, T. J. "Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipids vesicles". 1997b. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4770-4777.

- Chen, Y.;** Ludescher, R. D. and Montville, T. J. "Influence of lipid composition of pediocin PA-1 binding to phospholipid vesicles". 1998. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3530-3532.
- Chen, H.** and Hoover, D. G. "Bacteriocins and their Food Applications". 2003. *Compr. Rev. Food Sci. Food F.*, **2 (3)**: 82–100.
- Chikidans, M. L.;** García-Garcerá, M. J.; Driessen, A. J. M.; Ledebøer, A. M.; Nissen-Meyer, J.; Nes, I. F.; Abee, T.; Konings, W. N. and Venema, G. "Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells". 1993. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3577-3584.
- Chikidans, M. L.;** Venema, K.; Ledebøer, A. M.; Venema, G. and Kok, J. "Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts". 1995. *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**: 183-189.
- Christensen, D. P.** and Hutkins, R. B. "Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*". 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3312-3315.
- Chung, T. C.;** Axelsson, L.; Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. "In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*". 1989. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **2 (2)**: 137-144.
- Chumchalová, J.;** Stiles, J.; Josephsen, J.; Plocková, M. "Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* CH5". 2004. *J. Appl. Microbiol.*, **96**: 1082-1089.
- Cintas, L. M.** "Caracterización bioquímica y genética parcial de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de

- embutidos crudos curados". 1995. *Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid*.
- Cintas**, L. M.; Rodríguez, J. M.; Fernández, M. F.; Stetten, K.; Nes, I. F.; Hernández, P. E. and Holo, H. " Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum". 1995. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2643-2648.
- Cintas**, L. M.; Casaus, P.; Havarstein, L. S.; Hernández, P. E. and Nes, I. F. "Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum". 1997. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4321-4330.
- Cintas**, L. M.; Casaus, P.; Fernández, M. F. and Hernández, P. E. "Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria". 1998a. *Food Microbiol.*, **15 (3)**: 289-298.
- Cintas**, L. M.; Casaus, P.; Holo, H.; Hernández, P. E.; Nes, I. F.; Havarstein, L. S. "Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins". 1998b. *J. Bacteriol.*, **180**: 1988-1994.
- Clarke**, D. J.; Robson, R. M. and Morris, J. G. "Purification of two *Clostridium* bacteriocins by procedures appropriate to hydrophobic proteins". 1975. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7**: 256-264.
- Coallier-Ascah**, J. and Idziak, E. S. "Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxin". 1985. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 163-167.

- Condon**, S. "Responses of lactic acid bacteria to oxygen". 1987. *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**: 269-280.
- Contreras**, B. G. L.; De Vuyst, L.; Devreese, B; Busanyova, K.; Raymaeckers, J.; Bosman, F.; Sablon, E. and Vandamme, E. J. "Isolation, purification and characterization of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139". 1997. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 13-20.
- Corsetti**, A.; Settanni, L. "Lactobacilli in sourdough fermentation". A Review. 2007. *Food Res. Int.*, **40**: 539-558.
- Cutler**, P. (ed.). *Methods in molecular biology*: "Protein purification protocols". Second Edition. 2004. Humana Press, Inc. Totowa, New Jersey.
- Daba**, H.; Pandian, S.; Gosselin, J. F.; Simard, R. E.; Huang, J. and Lacroix, C. "Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*". 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 3450-3455.
- Daba**, H.; Lacroix, C.; Huang, J. and Simard, R. E. "Influence of growth conditions on production and activity of mesenteriocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*". 1993. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 166-173.
- Daba**, H.; Lacroix, C.; Huang, J.; Simard, R. E. and Lemiex, L. "Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5". 1994. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**: 682-688.
- Daeschel**, M. A. "Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as preservatives". 1989. *Food Technol.*, **43**: 164-167.
- Dahl**, T. A.; Midden, W. R. and Hartman, P. E. "Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen". 1989. *J. Bacteriol.*, **171**: 2188-2194.

- Dajani**, A. S. and Taube, Z. "Plasmid mediated production of staphylococcin in bacteriophage type 71 *Staphylococcus aureus*". 1974. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **5 (6)**: 594-598.
- Dajani**, A. S. and Wannamaker, W. "Demonstration of a bactericidal substance against β -hemolytic streptococci in supernatant fluids of staphylococcal cultures". 1969. *J. Bacteriol.*, **97 (3)**: 985-91.
- de Vos** W. M.; Kuipers, O. P.; Van Der Meer, J. R. and Siezen, R. J. "Maturation pathway of nisin and other lantibiotic: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria". 1995. *Mol. Microbiol.*, **17**: 427-437.
- De Vuyst**, L. and Vandamme, E. J. (eds.) "Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, genetics and applications". 1994. *Blackie Academic & Professional, London*.
- De Vuyst**, L.; Foulquié Moreno, M. R. and Revets, H. "Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins". 2003. *Int. J. Food Microbiol.*, **84**: 299-318.
- Demel**, R. A.; Peelen, T.; Siezen, R. J.; de Kruijff, B. and Kuipers, O. P. "Nisin Z, mutant nisin Z and lactacin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity, a monolayer study". 1996. *Eur. J. Biochem.*, **235**: 267-274.
- Devereux**, J. P.; Haeberli, P. and Smithies, O. "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX". 1984. *Nucleic Acids Res.*, **12**: 387-395.
- Diep**, D. B.; Håvarstein, L. S. and Nes, I. F. "A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin síntesis in *Lactobacillus plantarum* C11". 1995. *Mol. Microbiol.*, **18**: 631-639.

- Diop**, M.B.; Dubois-Dauphin, R.; Tine, E.; Ngon, A.; Destain, J. and Thonard, P. "Bacteriocin producers from traditional food products". 2007. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **11 (4)**: 275-281.
- Dodd**, H. M.; Horn, N.; Zhang, H. and Gasson, M. J. "A lactococcal expresion system for engineered nisins". 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3683-3693.
- Dodd**, H. M.; Horn, N. and Gasson, M. J. "A cassette vector for protein engineering the lantibiotic nisin". 1995. *Gene.*, **162**: 163-164.
- Dodd**, H. M.; Horn, N.; Giffard, C. J. and Gasson, M. J. "A gene replacement strategy for engineering nisin". 1996. *Microbiology*, **142**: 47-55.
- Drider**, D.; Fimland, G.; Héchard, Y.; McMullen, L. M. and Prévost, H. "The Continuing Story of Class II_a Bacteriocins". 2006. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70 (2)**: 564-582.
- Driessen**, A. J. M.; van den Hooven, H. W.; Kuiper, W.; van den Kamp, M.; Sahl, H. G.; Konings, R. N. H. and Konings, W. N. "Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipids vesicles". 1995. *Biochemistry*, **34**: 1606-1614.
- Eguchi**, T.; Kaminaka, K.; Shima, J.; Kawamoto, S.; Mori, K.; Choi, S.; Doi, K.; Ohmomo, S. and Ogata, S. "Isolation and Characterization of Enterocin SE-K4 Produced by Thermophilic Enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4". 2001. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65 (2)**: 247-253.
- Eijsink**, V. G. H.; Skeie, M.; Middelhoven, P. H.; Brurberg, M. B. and Nes, I. F. "Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria". 1998. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3275-3281.

- El-Jastimi**, R. and Lafleur, M. "Structural characterization of free and membrane-bound nisin by infrared spectroscopy". 1997. *Biochem. Biophys. Acta*, **1324**: 151-158.
- Elliker**, P.R.; Sandine, W.E.; Hauser, B.A.; Moseley, W.K. "Influence of culturing cottage cheese dressing with different organisms on flavour and keeping quality". 1964. *J. Dairy Sci.*, **47**: 680.
- Ellison**, J. S. and Kauter, J. A. "Purification and some properties of two botocins". 1970. *J. Bacteriol.*, **104**: 19-26.
- Ennahar**, S.; Aoude-Werner, D.; Sorokine, O.; van Dorsslaer, A.; Bringel, F.; Hubert, J. C. and Hasselmann, C. "Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese". 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4381-4387.
- Ennahar**, S.; Sashihara, T.; Sonomoto, K. and Ishizaki, A. "Class II_a bacteriocins: biosynthesis, structure and activity". 2000a. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**: 85-106.
- Ennahar**, S.; Deschamps, N. and Richard, J. "Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class II_a bacteriocins". 2000b. *Curr. Microbiol.*, **41**: 1-4.
- Fimland**, G.; Blingsmo, O. R.; Sletten, K.; Jung, G.; Nes, I. F. and Nissen-Meyer, J. "New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity". 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 3313-3318.
- Fimland**, G.; Jack, R.; Jung, G.; Nes, I. F. and Nissen-Meyer, J. "The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center towards the C terminus". 1998. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 5057-5060.

- Foulquié Moreno**, M. R.; Callewaert, R.; Devreese, B.; Van Beeumen, J. and De Vuyst, L. "Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources". 2003. *J. Appl. Microbiol.*, **94**: 214-229.
- Foulquié Moreno**, M. R.; Sarantinopoulos, P.; Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. "The role and application of enterococci in food and health". 2006. *Int. J. Food Microbiol.*, **106**: 1-24.
- Franke**, C. M. "Topology of a type I secretion system for bacteriocins of *Lactococcus lactis*". 1998. *Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Holanda*.
- Franz**, C. M. A. P.; Stiles, M. E.; Schleifer, K. H. and Holzapfel, W. H. "Enterococci in foods-a conundrum for food safety". 2003. *Int. J. Food Microbiol.*, **88**: 105-122.
- Franz**, C. M. A. P.; van Belkum, M. J.; Holzapfel, W. H.; Abriouel, H. and Gálvez, A. "Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme". 2007. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**: 293-310.
- Gagliano**, V.J. and Hinsdill, R.D. "Characterization of a *Staphylococcus aureus* Bacteriocin". 1970. *J. Bacteriol.*, **104(1)**: 117-125.
- Gallagher**, N. L.; Sailer, M.; Niemczura, W. P.; Nakashima, T. T.; Stiles, M. E. and Vederas, J. C. "Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecyl-phosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type II_a bacteriocins from lactic acid bacteria". 1997. *Biochemistry*, **36**: 15062-15072.
- Gálvez**, A.; Giménez-Gallego, G.; Maqueda, M. and Valdivia, E. "Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48". 1989. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**: 437-441.

- Gálvez**, A.; Valdivia, E.; Abriouel, H.; Camafeita, E.; Méndez, E.; Martínez-Bueno, M. and Maqueda, M. "Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97". 1998. *Arch. Microbiol.*, **171**: 59– 65.
- Gänzle**, M. G.; Hölzel, A.; Walter, J.; Jung, G.; Hammes, W. P. "Characterization of Reutericyclin Produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584". 2000. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 4325-4333..
- Gao**, F. H.; Abee, T. and Konings, W. N. "Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome C oxidase-containing proteoliposomes". 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2164-2170.
- Garver**, K. I. and Muriana, P. M. "Purification and partial amino acid sequence of uvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47". 1994. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2191-2195.
- Geis**, A.; Singh, J. and Teuber, M. "Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin". 1983. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 205-211.
- Gerez**, C. L.; Torino, M. I.; Rollán, G.; Font de Valdez, G. "Prevention of bread mould spoilage by using lactic bacteria with antifungal properties". 2009. *Food Control*, **20**: 144-148.
- Gibbs**, P. A. "Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation". 1987. *J. Appl. Bacteriol.*, **63**: 51_s -58_s (Symposium supplement).
- Gilmore**, M. S.; Segarra, R. A.; Booth, M. C.; Bogie, C. P.; Hall, L. R. and Clewell, D. B. "Genetic structure of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1- encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants". 1994. *J. Bacteriol.*, **176**: 7335– 7344.

- Gilliland**, S. E. and Speck, M.L. "Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in non-fermented refrigerated foods". 1975. *J. Food Sci.*, **40**: 446-450.
- Gilliland**, S. E. "Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria". 1990. *FEMS Microbiol. Rev.*, **7(1-2)**: 175-188.
- Gomes**, B. C.; Esteves, C. T.; Palazzo, I.; Darini, A. L. C.; Felis, G. E.; Sechi, L. A.; Franco, B. D. G. M.; De Martinis, E. C. P. "Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods". 2008. *Food Microbiol.*, **25**: 668-675.
- González**, C. F. "Method for inhibiting bacterial spoilage". 1989. Patente 4.883.673. EE.UU.
- González**, C. F. and Kunka, B. S. "Plasmid-Associated Bacteriocin Production and Sucrose Fermentation in *Pediococcus acidilactici*". 1987. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53 (10)**: 2534-2538
- Guder**, A.; Wiedemann, I. and Sahl, H. G. "Post-translationally modified bacteriocins-the lantibiotics". 2000. *Biopolymers*, **55**: 62-73.
- Guyonnet**, D.; Fremaux, C.; Cenatiempo, Y.; Berjeaud, J. M. "Method for rapid purification of Class IIa bacteriocins and comparison of their activities". 2000. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66 (4)**: 1744-1748.
- Hale**, E. M. and Hinsdill, R. D. "Characterization of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* strain 462". 1973. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **4**: 634-640.
- Hanlin**, M. B.; Kalchayanand, N.; Ray, P. and Ray, B. "Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity". 1993. *J. Food Prot.*, **56**: 252-255.

- Hänninen**, M.; Oivanen, P.; Hirvelä-Koski, V. "Aeromonas species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater". 1997. *Int. J. Food Microbiol.*, **34**: 17-26.
- Harris**, L. J.; Fleming, H. P. and Klaenhammer, T. R. "Developments in nisin research". 1992. *Food Res. Int.*, **25**: 57-66.
- Harris** E. L. V. and Angal S. (eds.) "Protein Purification Methods: A Practical Approach (Practical Approach Series)". 1989. IRL Press. Oxford University Press. England.
- Hastings**, J. W.; Sailer, M.; Jonson, K.; Roy, K. L.; Vederas, J. C. and Stiles, M. E. "Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*". 1991. *J. Bacteriol.*, **173**: 7491-7500.
- Haugaard**, N. "Cellular mechanisms of oxygen toxicity". 1968. *Physiol. Rev.*, **48 (11)**: 311-373.
- Håvarstein**, L. S.; Holo, H. and Nes, I. F. "The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with the leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria". 1994. *Microbiology*, **140**: 2383-2389.
- Håvarstein**, L. S.; Diep, D. B. and Nes, I. F. "A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export". 1995. *Mol. Microbiol.*, **16**: 229-240.
- Héchar**, Y.; Dérijard, B.; Letellier, F. and Cenatiempo, Y. "Characterization and purification of mesentericin Y 105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*". 1992. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 2725-2731.
- Heckly**, R. J. "Preservation of microorganisms". 1978. *Adv. Appl. Microbiol.*, **24**: 1-53.
- Heinemann**, B. and Williams, R. "Inactivation of nisin by pancreatin". 1966. *J. Dairy Sci.*, **49**: 312-314.

- Helander**, I. M.; von Wright, A. and Mattila-Sandholm, T. M. "Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria". 1997. *Trends Food Sci. Technol.*, **8 (5)**:146-150.
- Henderson**, J. T.; Chopko, A. L. and van Wassenaar, P. D. "Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0". 1992. *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**: 5-12.
- Herranz**, C.; Mukhopadhyay, S.; Casaus, P.; Martínez, J. M.; Rodríguez, J. M.; Nes, I. F.; Cintas, L. M.; Hernández, P. E. "Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-Like strains from fermented sausages". 1999. *Curr. Microbiol.*, **39**: 282-290.
- Herraiz** T.; Casal V. "Evaluation of solid-phase extraction procedures in peptide analysis". 1995. *J. Chromatogr. A*, **708**: 209-221.
- Hildeng-Hauge**, H.; Mantzilas, D.; Moll, G. N.; Konings, W. N.; Driessen, A. J. M.; Eijsink, V. C. H. and Nissen-Meyer, J. "Plantaricin A is an amphiphilic α -helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial activities through different mechanisms". 1998. *Biochemistry*, **37**: 16026-16032.
- Holo**, H.; Nissen, O. and Nes, I. F. "Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene". 1991. *J. Bacteriol.*, **173**: 3879-3887.
- Holzappel**, W. H.; Geisen, R. and Schillinger, U. "Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes". 1995. *Int. J. Food Microbiol.*, **24**: 343-362.
- Hoover**, D. G. and Steenson, L. R. (eds.). "Bacteriocins of lactic acid bacteria". 1993. Academic Press, Inc. New York.

- Horn, N.;** Martínez, M.I.; Martínez, J.M.; Hernández, P.E.; Gasson, M.J.; Rodríguez, J.M. and Dodd, H.M. "Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus". 1998. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 818-823.
- Horn, N.;** Martínez, M. I.; Martínez, J. M.; Hernández, P. E.; Gasson, M. J.; Rodríguez, J. M. and Dodd, H. M. "Enhanced production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin and pediocin PA-1, by *Lactococcus lactis*". 1999. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 4443-4450.
- Hughenoltz, J.** "Citrate metabolism in lactic acid bacteria". 1993. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12 (1-3)**: 165-178.
- Hun-Joo L.;** Yun-Jung J.; Chan-Sun P.; Seung-Ho K.; In-Kyeong H. ; Jong-Seog A. and Tae-Ick M. "Purification and characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 Isolated from Kimchi". 1999. *J. Biosci. Bioeng.*, **88(2)**: 153-159.
- Hurst, A.** "Nisin". pp. 85-123. En: "Advances in Applied Microbiology". Perlman, D. and Laskin, A. I. (eds.). 1981. Academic Press, Inc. New York.
- Hurst, A.** "Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria". pp. 327-351. En: "Antimicrobials in Foods". Braun, A. L. and Davidson, P. M. (eds.). 1983. Marcel Dekker, New York.
- Jack, R. W.;** Tagg, J. R. and Ray, B. "Bacteriocins of gram-positive bacteria". 1995. *Microbiol. Rev.*, **59**: 171-200.
- Jamuna, M.;** Jeevaratnam, K. "Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species". 2004. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**: 433-439.

- Jarvis**, B. and Farr, J. "Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*". 1971. *Biochem. Biophys. Acta*, **227**: 232-240.
- Jarvis**, B. and Mahoney, R. R. "Inactivation of nisin by alpha-chymotripsin". 1969. *J. Dairy Sci.*, **52**: 1448-1449.
- Jay**, J. M. "Effect of diacetyl on foodborne microorganisms". 1982a. *J. Food Sci.*, **47**: 1831-1836.
- Jay**, J. M. "Antimicrobial properties of diacetyl". 1982b. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 525-531.
- Jetten**, A. M. and Vogels, G. D. "Characterization and extrachromosomal control of bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*". 1973. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **4**: 49-57.
- Jiménez-Díaz**, R.; Ríos-Sánchez, R. M.; Desmazeaud, M.; Ruiz-Barba, J. L. and Piard, J. C. "Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation". 1993. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1416-1424.
- Jiménez-Díaz**, R.; Ruiz-Barba, J. L.; Catheart, D. P.; Holo, H.; Nes, I. F.; Sletten, K. H. and Warner, P. J. "Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides". 1995. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 4459-4463.
- Joerger**, M. C. and Klaenhammer, T. R. "Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481". 1986. *J. Bacteriol.*, **167**: 439-446.

- Joosten**, H. M. L. J.; Núñez, M.; Devreese, B.; Van Beeumen, J. and Marugg, J. D. "Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4". 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4220– 4223.
- Kandler**, O. "Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria". 1983. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.*, **49 (3)**: 209-24.
- Kelly**, W. J.; Asmundson, R. V. and Huang, C. M. "Characterization of plantaricin Kw30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*". 1996. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**: 657-662.
- Klaenhammer**, T. R. "Bacteriocins of lactic acid bacteria". 1988. *Biochimie*, **70**: 337-349.
- Klaenhammer**, T. R. "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria". 1993. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**: 39-86.
- Kleerebezem**, M.; Quadri, L. E. N.; Kuipers, O. P. and de Vos, W. M. "Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria". 1997. *Mol. Microbiol.*, **24**: 895-904.
- Klein**, C. and Entian, K. D. "Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633". 1994. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2793-2801.
- Konings**, W. R. and Otto, R. "Energy transduction and solute transport in streptococci". 1983. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.*, **49 (3)**: 247-57.
- Kozak**, W.; Bardowski, J. and Dobrzanski, W. T. "Lactostrepcin-acid bacteriocins produced by lactic acid streptococci". 1978. *J. Dairy Res.*, **45**: 247-257.

- Kuipers**, O. P.; Rulema, H.S.; Yap, W.M.G.J.; Siezen, R.J. and De Vos, W.M. "Engineering dehydrated amino acid residues in the antimicrobial peptide nisin". 1992. *J. Biol. Chem.*, **267**: 2430-2434.
- Kuipers**, O. P.; Beerthuyzen, M. M.; de Ruyter, P. G. G. A.; Luesink, E. J. and de Vos, W. M. "Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction". 1995. *J. Biol. Chem.*, **270**: 27299-27304.
- Kuipers**, O. P.; de Ruyter, P. G. G. A.; Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. "Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria". 1998. *J. Biotechnol.*, **64**: 15-21.
- Laemmli**, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". 1970. *Nature*, **227 (5259)**: 680-685.
- Larsen**, A. G.; Vogensen, F. K. and Josephsen, J. "Antimicrobial Activity of a Lactic Acid Bacteria isolated from Sourdoughs: Purification and Characterization of Bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401". 1993. *J. Appl. Bacteriol.*, **75 (2)**: 113-122.
- Lauková**, A.; Mareková, M. and Javorsky, P. "Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231". 1993. *Lett. Appl. Microbiol.*, **16**: 257-260.
- Leer**, R. J.; van der Vossen, J. M. B. M.; van Giezen, M.; van Noort, J. M. and Pouwels, P. H. "Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*". 1995. *Microbiology*, **141**: 1629-1635.
- Leistner**, L. "Food preservation by combined methods". 1992. *Food Res. Int.*, **25**: 151-158.
- Lemos Miguel**, M.A.; Días de Castro, A.C.; Ferreira Gómez Leite, S. "Inhibition of Vancomycin and High-Level Aminoglycoside-Resistant Enterococci Strains

- and *Listeria monocytogenes* by Bacteriocin-Like Substance Produced by *Enterococcus faecium* E86". 2008. *Curr. Microbiol.*, **57**: 429-436.
- Lewus**, C. B.; Sun, S. and Montville, T. J. "Production on an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain". 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 143-149.
- Lindgren**, S.E. and Dobrogosz, W. J. "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations". 1990. *FEMS Microbiol. Rev.*, **7 (1-2)**: 149-63.
- Lloyd**, A. G. and Drake, J. J. "Problems posed by essential food preservatives". 1975. *Br. Med. Bull.*, **31 (3)**: 214-219.
- Magnusson**, J. and Schnürer, J. "*Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound". 2001. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67 (1)**: 1-5.
- Magnusson**, J.; Ström, K.; Roos, S.; Sjögren, J. and Schnürer, J. "Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria". 2003. *FEMS Microbiol. Lett.*, **219 (1)**: 129-135.
- Mahony**, D. E. "Bacteriocin susceptibility of *Clostridium perfringens*: a provisional typing shema". 1974. *Appl. Microbiol.*, **28**: 172-176.
- Malik**, R. K.; Kumar, N.; Nageswara Rao, K. and Mathur, D. K. "Bacteriocins-Antibacterial Proteins of Lactic Acid Bacteria: a Review". 1994. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **12 (2)**: 117-132.
- Manca de Nadra**, M. C.; Sandino de Lamelas, D. and Strasser de Saad, A. M. "Pediocin n5p from *Pediococcus pentosaceus*: adsorption on bacterial strains". 1998. *Int. J. Food Microbiol.*, **39**: 79-85.

- Marciset**, O.; Jeronimus-Stratingh, M. C.; Mollet, B. and Poolman, B. "Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin that functions without a receptor". 1997. *J. Biol. Chem.*, **272**: 14277-14284.
- Martínez**, B.; Suárez, J. E., and Rodríguez, E. "Antagonistic activities of wild lactococcal strains isolated from homemade cheeses". 1995. *J. Food Prot.*, **58**: 1118-1123.
- Martínez**, M. I.; Rodríguez, J. M.; Suárez, A. M.; Martínez, J. M.; Azcona, J. I. and Hernández, P. E. "Generation of polyclonal antibodies against a chemically synthesized N-terminal fragment of the bacteriocin pediocin PA-1". 1997. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**: 488-492.
- Martínez**, M. I.; Rodríguez, E.; Medina, M.; Hernández, P. E. and Rodríguez, J. M. "Detection of specific bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization". 1998. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 1099-1103.
- Martínez**, J. M.; Martínez, M. I.; Herranz, C.; Suárez, A. M.; Fernández, M. F.; Cintas, M. L.; Rodríguez, J. M. and Hernández, P. E. "Antibodies to a synthetic 1-9-N-terminal amino acid fragmento f pediocin PA-1 and cross-reactivity against Class IIa bacteriocins". 1999. *Microbiology*, **145**: 2777-2787.
- Martínez-Bueno**, M.; Maqueda, M.; Gálvez, A.; Samyn, B.; van Beeumen, J.; Coyette, J. and Valdivia, E. "Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48". 1994. *J. Bacteriol.*, **176**: 6334-6339.
- Martínez Magro**, M. I.; Martínez Corbacho, J. M.; Herranz Sorribes, C.; Suárez Gea, A. M. y Rodríguez Gómez, J. M. "Las Bacteriocinas de las Bacterias Lácticas. 1 – Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección". 2000. *Alimentaria*, **Nº 314**: 59-66.

- Martín-Platero**, A. M.; Valdivia, E.; Ruiz-Rodríguez, M.; Soler, J. J.; Martín-Vivaldi, M.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M. "Characterization of Antimicrobial Substances Produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, Isolated from the Uropygial Gland of the Hoopoe (*Upupa epops*)". 2006. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 4245-4249.
- McAuliffe**, O.; Ross, R. P. and Hill, C. "Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action". 2001. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**: 285-308.
- Messens**, W.; De Vuyst, L. "Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review". 2002. *Int. J. Food Microbiol.*, **72**: 31-43.
- Michels**, P. A. M.; Michels, J. P. J.; Boonstra, J. and Konings, W. N. "Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products". 1979. *FEMS Microbiol. Lett.*, **5 (5)**: 357-364.
- Millette**, M.; Dupont, C.; Archambault, D.; Lacroix, M. "Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates". 2007. *J. Appl. Microbiol.*, **102**: 274-282.
- Moll**, G. N.; Ubbink-Kok, T.; Hildeng-Hauge, H.; Nissen-Meyer, J.; Nes, I. F.; Konings, W. N. and Driessen, A. J. M. "Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two component bacteriocin". 1996. *J. Bacteriol.*, **178**: 600-605.
- Moll**, G. N.; Konings, W. N. and Driessen, A. J. M. "Bacteriocins: mechanisms of membrane insertion and pore formation". 1999. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.*, **76**: 185-198.
- Montville**, T. J. and Bruno, M. E. C. "Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins". 1994. *Int. J. Food Microbiol.*, **24**: 53-74.

- Moreira, W. L.** “Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico”. 1993. *Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.*
- Motta, A. S.; Cannavan, F. S.; Mui Tsai, S.; Brandelli, A.** “Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin”. 2007. *Arch. Microbiol.*, **188**: 367-375.
- MØrtvedt, C. I. and Nes, I. F.** “Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain”. 1990. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 1601-1607.
- MØrtvedt, C. I.; Nissen-Meyer, J.; Sletten, K. and Nes, I. F.** “Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45”. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 1829-1834.
- Motlagh, A.; Johnson, M. C. and Ray, B.** “Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites”. 1991. *J. Food Prot.*, **54**: 873–878.
- Müller, D.** “Péptidos bioactivos producidos por bacterias lácticas con actividad inhibitoria del desarrollo de microorganismos” 2007. *Tesis Doctoral. Fac. Bioqca. y Cs. Biológicas. Univ. Nac. del Litoral.*
- Müller, D.; Carrasco, M.; Tonarelli, G.; Simonetta, A.** “Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* LP 31 strain isolated from dry-fermented sausage”. 2009. *J. Appl. Microbiol.*, **106**: 2031-2040.
- Mulet-Powell, N.; Lacoste-Armynot, A. M.; Vinas, M. and Simeon De Buochberg, M.** “Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria”. 1998. *J. Food Prot.*, **61**: 1210-1212.
- Muriana, P. M.** “Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food”. 1996. *J. Food Prot.*, suppl. 1996. 54-63.

- Muriana**, P. M. and Klaenhammer, T. R. "Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88". 1987. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 553-560.
- Muriana**, P. M. and Klaenhammer, T. R. "Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088". 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 114-121.
- Nes**, I. F.; Diep, D. B.; Havarstein, L. S.; Brurberg, M. B.; Eijsink, V. and Holo, H. "Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria". 1996. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.*, **70**: 113-28.
- Nes**, I. F. and Holo, H. "Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria". 2000. *Biopolymers*, **55**: 50-61.
- Nieto-Lozano**, J. C.; Nissen-Meyer, J.; Sletten, K.; Peláez, C. and Nes, I. F. "Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*". 1992. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 1-6.
- Niku-Paavola**, M.L.; Laitila, A.; Mattila-Sandholm, T. and Haikara, A. "New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*". 1999. *J. Appl. Microbiol.*, **86** (1): 29-35.
- Nilsen**, T.; Nes, I. and Holo, H. "Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333". 2003. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(5): 2975-2984.
- Nissen-Meyer**, J. and Nes, I. F. "Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action". 1997. *Arch. Microbiol.*, **167**: 67-77.

- Nissen-Meyer**, J.; Holo, H.; Havarstein, L. S.; Sletten, K. and Nes, I. F. "A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides". 1992. *J. Bacteriol.*, **174**: 5686-5692.
- Ohmomo**, S.; Murata, S.; Katayama, N.; Nitisinprasart, S.; Kobayashi, M.; Nakajima, T.; Yajima, M. and Nakanishi, K. "Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157". 2000. *J. Appl. Microbiol.*, **88**: 81– 89.
- Okereke**, A.; Montville, T. J. "Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria". 1991. *J. Food Prot.*, **55**: 349-353.
- Okereke**, A. and Montville, T. J. "Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA3679". 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2463-2467.
- Pangallo**, D.; Drahovská, H.; Harichová, J.; Karellová, E.; Chovanová, K.; Feriane, P.; Turňa, J.; Timko, J. "Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance. 2008. *Antonie van Leeuwenhoek Int.J.*, **94**: 555-562.
- Parente**, E. and Hill, C. "A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria". 1992. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**: 290-298.
- Parente**, E. and Ricciardi, A. "Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria". 1999. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**: 628-638.
- Park**, S. H.; Itoh, K. and Fujisawa, T. "Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804^T". 2003. *J. Appl. Microbiol.*, **95**: 294-300.

- Pascual**, L. M.; Daniele, M. B.; Giordano, W.; Pájaro, M. C.; Barberis, I. L. "Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23". 2008. *Curr. Microbiol.*, **56**: 397-402.
- Piard**, J. C.; Delorme, F.; Girafa, G.; Commissaire, J. and Desmazeaud, M. "Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ481". 1990. *Neth. Milk Dairy J.*, **44**: 143-158.
- Piard**, J. C. and Desmazeaud, M. "Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1-Oxygen metabolites and end products from catabolism". 1991. *Lait*, **71**: 525-541.
- Piard**, J. C. and Desmazeaud, M. "Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 2-Bacteriocins and other antibacterial substance". 1992. *Lait*, **72**: 113-142.
- Piva**, A. and Headon, D. R. "Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61". 1994. *Microbiology*, **140**: 697-702.
- Pruitt**, K. M.; Tenovuo, J.; Andrews, R. W. and McKane, T. "Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate: polarographic study of the oxidation products". 1982. *Biochemistry*, **21** (3): 562-567.
- Pucci**, M. J.; Vedamuthu, R. E. R.; Kunka, B. S. and Vandenberg, P. A. "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0". 1988. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 2349-2353.
- Pulusani**, S. R.; Rao, D. R. and Sunki, G. R. "Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by *Streptococcus thermophilus*". 1979. *J. Food Sci.*, **44**: 575-578.

- Quadri**, L. E. N.; Sailer, M.; Roy, K. L.; Vederas, J. C. and Stiles, M. E. "Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV 17B". 1994. *J. Biol. Chem.*, **269 (16)**: 12204-12211.
- Quadri**, L. E. N.; Sailer, M.; Terebiznik, M. R.; Roy, K. L.; Vederas, J. C. and Stiles, M. E. "Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 y BM1". 1995. *J. Bacteriol.*, **177**: 1144-1151.
- Quadri**, L. E. N.; Yan, L. Z.; Stiles, M. E. and Vederas, J. C. "Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2: overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants and its precursor in *Escherichia coli*". 1997. *J. Biol. Chem.*, **272**: 3384-3368.
- Raccach**, M.; Baker, R. E.; Rengens Tein, J. M. and Mulnix, J. "Potential applications of microbiol antagonism to extended storage stability of a flesh type of food". 1979. *J. Food Sci.*, **44**: 43-46.
- Raccach**, M. and Geshell, D. J. "The inhibition of *Listeria monocytogenes* in milk by dehydrated pediococcal spent medium". 1995. *Food Microbiol.*, **12**: 229-235.
- Rammelsberg**, M.; Muller, E. and Radler, F. "Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*". 1990. *Arch. Microbiol.*, **154**: 249-252.
- Ray**, B. and Daeschel, M. (eds.) "Food biopreservatives of microbial origin". 1992. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
- Reddy**, S. G.; Harrickson, R. L. and Olson, H. "The influence of lactic culture on ground beef quality". 1970. *J. Food Sci.*, **35**: 789-791.

- Reddy**, S. G.; Chen, M. L. and Patel, P. J. "Influence of lactic cultures on the biochemical bacterial and organoleptic changes in beef". 1975. *J. Food Sci.*, **40**: 314-318.
- Rekhif**, N.; Atrih, A. and Lefebvre, G. "Selection of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains". 1994. *Curr. Microbiol.*, **28**: 237-241.
- Revol-Junelles**, A. M.; Mathis, R.; Krier, F.; Fleury, Y.; Delfour, A. and Lefebvre, G. "*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins". 1996. *Lett. Appl. Microbiol.*, **23 (2)**: 120-124.
- Riazi**, S.; Wirawan, R. E.; Badmaev, V.; Chikindas, M. L. "Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050". 2009. *J. Appl. Microbiol.*, **106(4)**: 1370-1377.
- Rodríguez**, J. M.; Cintas, L. M.; Casaus, P.; Suárez, A. M. and Hernández, P. E. "PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin-producing lactobacilli from meat". 1995. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2802-2805.
- Rodríguez**, J. M. and Dodd, H. M. "Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*". 1996. *Microbiologia*, **12**: 61-74.
- Rodríguez**, J. M.; Cintas, L. M.; Casaus, P.; Suárez, A. M. and Hernández, P. E. "Detection of pediocin PA-1 producing pediococci by rapid molecular biology techniques". 1997a. *Food Microbiol.*, **14**: 363-367.
- Rodríguez**, J. M.; Martínez, M. I.; Suárez, A. M.; Martínez, J. M. and Hernández, P. E. "Unsuitability of MRS medium to detect hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria". 1997b. *Lett. Appl. Microbiol.*, **25**: 73-74.

- Rodríguez, E.;** Martínez, M. I.; Medina, M.; Hernández, P. E. and Rodríguez, J. M. "Detection of enterocin AS-48 producing dairy enterococci by dot-blot and colony hybridization". 1998. *J. Dairy Res.*, **65**: 143-148.
- Rogers, A. H.** "Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*". 1972. *Appl. Microbiol.*, **24**: 294-295.
- Roller, S.** "The biotechnological development of new food preservatives". 1991. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **9**: 183-206.
- Rose, N.L.;** Sporns, P. and Mc Mullen, L.M. "Detection of bacteriocins by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry". 1999. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 2238-2242.
- Roth, L.A.** and Clark, D.S. "Effect of lactobacilli and carbon dioxide on the growth of *Microbacterium thermosphactum* on fresh beef". 1975. *Can. J. Microbiol.*, **21**: 629-632.
- Ruhr, E.** and Sahl, H. G. "Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence of the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles". 1985. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**: 841-845.
- Russell-White, K.** "Interacciones entre bacterias del ácido láctico y hongos toxicogénicos contaminantes de alimentos y sus metabolitos secundarios tóxicos". 2005. *Tesis de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral.
- Ryan, L. A. M.;** Dal Bello, F.; Arendt, E. K. "The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread". 2008. *Int. J. Food Microbiol.*, **125**: 274-278.
- Sabia, C.;** Manicardi, G.; Messi, P.; de Niederhäusern, S.; Bondi, M. "Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM

- 416K1 isolated from Italian sausages". 2002. *Int. J. Food Microbiol.*, **75**: 163-170.
- Sabia**, C.; Messi, P.; de Niederhäusern, S.; Manicardi, G. and Bondi, M. "Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Ent. faecalis*". 2004. *Lett. Appl. Microbiol.*, **38**: 99-105.
- Sabia**, C.; de Niederhäusern, S.; Guerrieri, E.; Messi, P.; Anacarso, I.; Manicardi, G.; Bondi, M. "Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources". 2008. *J. Appl. Microbiol.*, **104**: 970-979.
- Sablon**, E.; Contreras, B. and Vandamme, E. "Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis". 2000. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, **68**: 21-60.
- Savado**, A.; Ouattara, C. A. T.; Bassole, I. H.N. and Traore, S. A. "Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview". 2006. *Afr. J. Biotechnol.*, **5 (9)**: 678-683.
- Scanell**, A. G. M.; Hill, C.; Buckley, D. J. and Arendt, E. K. "Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork". 1997. *J. Appl. Microbiol.*, **83**: 407-412.
- Schägger**, H. and von Jagow, G. "Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa". 1987. *Analyt. Biochem.*, **166**: 368-379.
- Schägger**, H. "Tricine-SDS-PAGE". 2006. *Nat. Protoc.*, Vol. 1 **Nº 1**: 16-22.
- Schillinger**, U. and Lücke, F. K. "Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat". 1989. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 1901-1906.

- Schillinger**, U. "Bacteriocins of lactic acid bacteria". pp. 55-74. En: Bills, D. D. and Kung, S. (eds.) "*Biotechnology and Food Safety*". 1990. Butterworth-Heinemann, Boston.
- Schillinger**, U.; Geisen, R. and Holzapfel, W. H. "Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods". 1996. *Trends Food Sci. Technol.*, **7**: 158-164.
- Schlegel**, R. and Slade, H. D. "Properties of a *Streptococcus sanguis* (group H) bacteriocin and its separation of the competence factor of transformation". 1973. *J. Bacteriol.*, **11**: 655-661.
- Schoeman**, H.; Vivier, M. A.; Du Toit, M.; Dicks, L. M. T. and Pretorius, I. S. "The development of bactericidal yeast Straits by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*". 1999. *Yeast*, **15**: 647-656.
- Shin**, M. S.; Han, S. K.; Ryu, J. S.; Kim, K. S.; Lee, W. K."Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi". 2008. *J. Appl. Microbiol.*, **105(2)**: 331-339.
- Simonetta**, A. C.; Moragues de Velasco, L. G. and Frisón, L. N. "Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*". 1997. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**: 139– 143.
- Simonová**, M.; Lauková, A. "Bacteriocin Activity of Enterococci from Rabbits". 2007. *Vet. Res. Commun.*, **31**: 143-152.
- Smith**, P.K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson B. J. and Klenk, D. C. "Measurement of protein using bicinchoninic acid". 1985. *Anal. Biochem.*, **150**: 76-85.

- Smith**, G. C.; Hall, I. C. and Vanderzant, L. "Inoculation of beef steak with *Lactobacillus* species. II. Effect on meat quality characteristics. 1980. *J. Food Prot.*, **43**: 842-849.
- Smulders**, F. J. M.; Barendsen, P; van Logtestijn, J. G.; Mossel, D. A. A.; van der Marel, G. M. "Review: Lactic Acid: Considerations in Favour of its Acceptance as a Meat Decontaminant". 1986. *J. Food Technol.*, **21 (4)**: 419-436.
- Sobrinho**, O. J.; Rodríguez, J. M.; Moreira, W. L.; Fernández, M. F.; Sanz, B. and Hernández, P. E. "Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages". 1991. *Int. J. Food Microbiol.*, **13**: 1-10.
- Sobrinho**, O. J.; Rodríguez, J. M.; Moreira, W. L.; Cintas, L. M.; Fernández, M. F. Sanz, B. and Hernández, P. E. " Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148". 1992. *Int. J. Food Microbiol.*, **16**: 215-225.
- Sparo**, M. D.; Castro, M. S.; Andino, P. J.; Lavigne, M. V.; Ceriani, C.; Gutiérrez, G. L.; Fernández M. M.; De Marzi, M. C.; Malchiodi, E. L.; Manghi, M. A. "Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*". 2006. *J. Appl. Microbiol.*, **100**: 123-134.
- Spelhaug**, S. R. and Harlander, S. K. "Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus*". 1989. *J. Food Prot.*, **52**: 856-862.
- Stackebrandt**, E. and Teuber, M. "Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria". 1988. *Biochimie*, **70**: 317– 324.
- Stevens**, K. A.; Sheldon, B. W.; Klapes, N. A. and Klaenhammer, T. R. "Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria". 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 3612-3615.

- Stiles**, M. E. "Biopreservation by lactic acid bacteria". 1996. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.*, **70**: 331-345.
- Stoffels**, G.; Nes, I. F. and Guthmundsdóttir, A. "Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish". 1992. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**: 309-316.
- Strasser de Saad**, A. M.; Pasteris, S. E. and Manca de Nadra, M. C. "Stability of pediocin N5p". 1993. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **11**: 371-375.
- Stringer**, S. C.; Dodd, C. E. R.; Morgan, M. R. A. and Waites, W. M. "Locating nisin-producing *Lactococcus lactis* in a fermented meat system". 1995. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**: 341-348.
- Strompfová**, V.; Marciňaková, M.; Simonová, M.; Gancarciková, S.; Jonecová, Z.; Sciranková, L.; Koscová, J.; Buleca, V.; Cobanová, K.; Lauková, A. "Enterococcus faecium EK13-an enterocin A-producing strain with probiotic character and its effect in piglets". 2006. *Anaerobe*, **12**: 242-248.
- Strompfová**, V.; Lauková, A. "In vitro study on bacteriocin production of Enterococci associated with chickens". 2007. *Anaerobe*, **13**: 228-237.
- Suárez**, A. M.; Rodríguez, J. M.; Hernández, P. E. and Azcona-Olivera, J. I. "Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassays development". 1996a. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2117-2121.
- Suárez**, A. M.; Rodríguez, J. M.; Morales, P.; Hernández, P. E. and Azcona-Olivera, J. I. "Development of monoclonal antibodies to the lantibiotic nisin A". 1996b. *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 2936-2940.

- Suárez**, A. M.; Azcona, J. I.; Rodríguez, J. M.; Sanz, B. and Hernández, P. E. "One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography". 1997. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4990-4992.
- Suma**, K.; Misra, M. C.; Varadaraj, M. C. "Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium". 1998. *Int. J. Food Microbiol.*, **40**: 17-25.
- Susani**, T.; Neviani, E.; Carminati, D. and Giraffa, G. "Inibizione in latte di *Clostridium tyrobutiricum* e *Propionibacterium* spp. da batteriocine prodotte da enterococchi". 1995. *Industria Latte*, **31**: 3-15.
- Tagg**, J. R.; Mc Given, A. R. "Assay systems for bacteriocins". 1971. *Appl. Environ. Microbiol.*, **21**: 943-947.
- Tagg**, J. R.; Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. "Bacteriocin of a group B *Streptococcus*: partial purification and characterization". 1975. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7**: 764-772.
- Tagg**, J. R.; Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. "Bacteriocins of Gram-positive bacteria". 1976. *Bacteriol. Rev.*, **40**: 722-756.
- Tahara**, T. and Kanatani, K. "Isolation, Partial Characterization and Mode of acidocin j1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JMC 1229". 1996a. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**: 669-677.
- Tahara**, T.; Oshimura, M.; Umezawa, C.; Kanatani, K. "Isolation, Partial Characterization and Mode of acidocin j1132, a Two-Component Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* JMC 1132". 1996b. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 892-897.

- Talarico**, T. L.; Casas, I. A.; Chung, T. C. and Dobrogosz, W. J. "Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produce by *Lactobacillus reuteri*". 1988. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**: 1854-1858.
- Talarico**, T. L. and Dobrogosz, W. J. "Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*". 1989. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**: 674-679.
- Ten Brink**, B.; Minekus, M.; van der Vossen, J. M. B. M.; Leery, R. J. and Huis in't Veld, J. H. J. "Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46". 1994. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**:140-148.
- Thomas**, E. L. and Aune, T. M. "Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action". 1978. *Infect. Immun.*, **20 (2)**: 456-463.
- Tichaczek**, P. S.; Nissen-Meyer, J.; Nes, I. F.; Vogel, R. F. and Hammes, W. P. "Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673". 1992. *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**: 460-468.
- Tiwari**, S. K.; Srivastava, S. "Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14". 2008. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**: 759-767.
- Toba**, T.; Yoshioka, E. and Itoh, T. "Lacticin, a bacteriocin produce by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*". 1991. *Lett. Appl. Microbiol.*, **12**: 43-45.
- Todorov**, S. D.; Vaz-velho, M.; Gibbs, P. "Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31". 2004. *Braz. J. Microbiol.*, **35**: 157-160.

- Tomita**, H.; Fujimoto, S.; Tanimoto, K. and Ike, Y. "Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative element pYI17". 1996. *J. Bacteriol.*, **178**: 3583– 3593.
- Tseng**, C. P. and Montville, T. J. "Metabolic Regulation of End Product Distribution in Lactobacilli: Causes and Consequences". 1993. *Biotechnol. Prog.*, **9**: 113-121.
- Tzannetis**, S.E.; Papavassiliou, J. and Papanayiotou, P. "Naturally occurring antibodies against colicines in human sera". 1972. *J. Med. Microbiol.*, **5**: 275-281.
- Tubylewicz**, H. "Antigenic properties of the bacteriocin preparations obtained from type A *Cl. perfringens* strains". 1970. *Bull. Acad. Pol. Sci. Biol.*, **18**: 253-256.
- Valerio**, F.; Favilla, M.; De Bellis, P.; Sisto, A.; de Candia, S.; Lavermicocca, P. "Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products". 2009. *Syst. Appl. Microbiol.*, **32**: 438-448.
- van Belkum**, M. J.; Kok, J; Venema, G; Holo, H.; Nes, I.F.; Koning, W.N. "The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner". 1991. *J. Bacteriol.*, **173**: 7934-7941.
- van der Vossen**, J. M. B. M.; van Herwinjnen, M. H. M.; Leer, R. J.; ten Brink, B.; Pouwels, P. H. and Huis in't Veld, J. H. J. "Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid-encoded trait: Plasmid curing, genetic marking by in vivo plasmid integration, and gene transfer. 1994. *FEMS Microbiol. Lett.*, **116**: 333-340.

- van Laack**, R. L. J. M.; Schillinger, U. and Holzapfel, W. H. "Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA44A". 1992. *Int. J. Food Microbiol.*, **16**: 183-195.
- Vandenbergh**, P. A.; Pucci, M. J.; Kunka, B. S. and Vedamuthu, E. R. "Method for inhibiting *Listeria monocytogenes* using a bacteriocin". 1989. *European Patent Application* 89101125.6.
- Vandenbergh**, P. A. "Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with metabolic growth". 1993. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**: 221-238.
- Vaughan**, F. E.; Caplice, E.; Looney, R.; O'Rourke, N.; Coveney, H.; Daily, C. and Fitzgerald, G. F. "Isolation from food sources of lactic acid bacteria that produced antimicrobials". 1994. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**: 118-123.
- Venema**, K.; Abee, T.; Haandrikman, A. J.; Leenhouts, K. J.; Konings, W. N. and Venema, G. "Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*". 1993. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1041-1048.
- Venema**, K.; Haverkort, R. E.; Abee, T.; Haandrikman, A. J.; Leenhouts, K. J.; de Leij, L.; Venema, G. and Kok, J. "Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein". 1994. *Mol. Microbiol.*, **14**: 521-532.
- Venema**, K.; Venema, G. and Kok, J. "Lactococcins: mode of action, immunity and secretion". 1995a. *Int. Dairy J.*, **5**: 815-32.
- Venema**, K.; Venema, G. and Kok, J. "Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity". 1995b. *Trends Microbiol.*, **3**: 299-304
- Venema**, K.; Dost, M. H.; Venema, G. and Kok, J. "Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*". 1996. *Microbiology*, **142 (10)**: 2825-2830.

- Venema, K.;** Chikindas, M. L.; Seegers, J. F. M. L.; Haandrikman, A. J.; Leenhouts, K. J.; Venema, G. and Kok, J. "Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1": 1997. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 305-309.
- Vignolo, G. M.;** Suriani, F.; Ruiz Holgado, A. A. P. y Oliver, G. "Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages". 1993. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**: 334-349.
- Wachsman, M. B.;** Farías, M. E.; Takeda, E.; Sesma, F.; de Ruiz Holgado, A. P.; de Torres, R. A. and Coto, C. E. "Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses". 1999. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **12 (4)**: 293-299.
- Wachsman, M. B.;** Castilla, V.; de Ruiz Holgado, A. P.; de Torres, R. A.; Sesma, F. and Coto, C. E. "Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro". 2003. *Antiviral Res.*, **58 (1)**: 17-24.
- Wahlstrom, G. and Saris, P.E.J.** "A nisin bioassay based on bioluminescence". 1999. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3742-3745.
- Walker, J. M.** "The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation". Pp. 11-14. En: Walker, J. M. (ed.) "*The Protein Protocols Handbook*", Second edition. 2002. Humana Press, Inc., Totowa, New Jersey.
- West, C. A. and Warner, P. J.** "Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193". 1988. *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**: 163-165.
- Wiechelman, K.;** Braun, R. and Fitzpatrick, J. "Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of groups responsible for color formation". 1988. *Anal. Biochem.*, **175**: 231-237.

- Wiseman**, D. W. and Marth, E. H. "Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*". 1981. *Mycopathologia*, **73**: 49-56.
- Worobo**, R. W.; VanBelkum, M. J.; Sailer, M.; Roy, K. L.; Vederas, J. C. and Stiles, M. E. "A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*". 1995. *J. Bacteriol.*, **177**: 3143-3149.
- Yamamoto**, Y.; Togawa, Y.; Shimosaka, M. and Okazaki, M. "Purification and Characterization of a Novel Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* Strain RJ-11. 2003. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69(10)**: 5746-5753.
- Yanagida**, F.; Chen, Y.; Onda, T. and Shinohara, T. "Duracin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil". 2005. *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**: 430-435.
- Yang**, R.; Johnson, M. C. and Ray, B. "Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria". 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58 (10)**: 3355-3359.
- Yang**, R. and Ray, B. "Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria". 1994. *Food Microbiol.*, **140**: 281-291.
- Zamfir**, M.; Callewaert, R.; Cornea, P. C.; Savu, L.; Vatafu, I.; De Vuyst, L. "Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801". 1999. *J. Appl. Microbiol.*, **87**: 923-931.