



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Clonación de los genes de la bacteriocina NC8
de *Lactobacillus plantarum* SP-50
en *Kluyveromyces lactis* GG799**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

L. Q. C. ARACELY GARCÍA BRAVO

ASESORES:

DRA. PATRICIA MENDOZA GARCÍA

DR. RODOLFO QUINTANA CASTRO

H. VERACRUZ VER.

MARZO, 2019

DEDICATORIA

A mi madre María del Sagrario.

Por ser mi pilar, no dejar que me rindiera nunca y enseñarme a salir de la zona de confort para disfrutar nuevos retos y crecer.

A mis amigos.

Gerson, Valentín, Jonás, Julio, Blanca, Óscar, Gera y Raúl, por ser mis hermanos de aventuras.



A Dexter .

Mi bebé por siempre y fiel compañero de desvelos.

RECONOCIMIENTOS

A la **Dra. Patricia Mendoza** por brindarme la bienvenida a la familia del Laboratorio de Microbiología y ser una increíble mentora y consejera.

Al **Dr. Rodolfo Quintana** por mostrarme el maravilloso mundo de la biología molecular. Gracias por la paciencia y nunca dejarme desistir.

Al **Dr. Mario Ramírez (†)** por los grandes consejos, los ánimos y las experiencias.

A mis revisoras, la **Dra. Carolina Peña**, la **Dra. Rosa María Oliart** y la **Dra. Abril Higuera** por brindarme iluminación y sabiduría en este proyecto.

A **Alexis y Caro**: Mis amigos incondicionales y guías espirituales de formación

A mis hermanas de generación: **Claudia, Elena, Fany, Laura, Vero, Lucy, Jaz, Yuli, Vivi, Monse, Alma y Reyna**. Por el apoyo dentro y fuera de la UNIDA, las risas y los conocimientos.

Al **Laboratorio 6 de la Universidad Veracruzana: Óscar, Blanca, Rommel, Deny, Vane y Rodri**. Con ustedes la ciencia jamás es aburrida.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por haberme otorgado el apoyo económico durante el programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

A la **Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz**, por facilitarme sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis.

A la **Universidad Veracruzana** por las facilidades otorgadas.

RESUMEN

García-Bravo, Aracely. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Agosto 2018. **Clonación de los genes de la bacteriocina PLNC8 de *Lactobacillus plantarum* SP-50 en *Kluyveromyces lactis* GG799.** Asesores: Mendoza-García Patricia Guillermina, Quintana-Castro Rodolfo.

Los sistemas de biopreservación en alimentos han incrementado el interés para la industria y los consumidores. La demanda de productos con menos aditivos químicos crea la necesidad de explorar nuevas alternativas. El empleo de productos biológicos como bacteriocinas para la inhibición de microorganismos patógenos es un método que tiene como finalidad la obtención de alimentos más seguros. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son consideradas como GRAS y por lo tanto ideales para su uso como bioconservadores en productos alimenticios y con potencial aplicación en la biomedicina. En estudios previos las BAL, *Lactobacillus plantarum* SP-50 fue aislada en quesos artesanales del estado de Veracruz y caracterizadas molecularmente, en ellas se identificaron los genes *plnE/F*, *plnJ/K* y *plnNC8* involucrados en la biosíntesis de bacteriocinas. Los estudios de producción de la bacteriocina NC8 (PLNC8) perteneciente a la clase IIb donde se presentan dos péptidos con actividad sinérgica, fue evaluada en *L. p* SP-50. El espectro de inhibición de las bacterias sensibles sólo fue observado contra la cepa *L. plantarum* BG101, sin embargo presentó una actividad inhibitoria baja la cual puede estar asociada a la producción de la bacteriocina de interés. La PLNC8, presente en *L. p*. SP-50 está codificada por dos péptidos ha sido aislada anteriormente en ensilado de hierba, y rara vez en lácteos.

Dado el potencial antibacteriano que presenta la PLNC8 resulta de interés el poder producir esta en cantidad suficiente de manera que nos permita evaluar y caracterizar esta bacteriocina. Por lo que el objetivo de este trabajo fue generar una bacteriocina recombinante expresada a través de *Kluyveromyces lactis* GG799 que permita la expresión de los genes *plnNC8A* y *plnNC8B* de *Lactobacillus plantarum* SP-50. *K. lactis* se ha utilizado como célula hospedera en la industria alimentaria por su capacidad para crecer a una densidad celular alta y secretar de manera eficiente proteínas heterólogas. Se utilizó un sistema de expresión a través de la ligación de los

genes *plnNC8A* y *plnNC8B* en el vector pKLAC2 el cual nos permitió insertar el cassette de expresión en células competentes de *Kluyveromyces lactis* GG799.

ABSTRACT

García-Bravo, Aracely. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Agosto 2018. **Cloning of PLNC8 bacteriocine genes from *Lactobacillus plantarum* SP-50 in *Kluyveromyces lactis* GG799.** Asesores: Mendoza-García Patricia Guillermina, Quintana-Castro Rodolfo, Ramírez-Lepe Mario.

The systems of biopreservation in foods have increased the interest for the industry and the consumers. The demand for products with fewer chemical additives creates the need to explore new alternatives. The use of biological products such as bacteriocins for the inhibition of pathogenic microorganisms is a method that aims to obtain safer food. Lactic acid bacteria (BAL) are considered as GRAS and therefore ideal for use as bioconservatives in food products and with potential application in biomedicine. In previous studies BAL, *Lactobacillus plantarum* SP-50 was isolated in artisanal cheeses from the state of Veracruz and characterized molecularly, in them the genes *plnE/F*, *plnJ/K* and *plnNC8* involved in the biosynthesis of bacteriocins were identified. The production studies of the bacteriocin NC8 (PLNC8) belonging to class IIb where two peptides with synergistic activity are presented, was evaluated in *L. p* SP-50. The spectrum of inhibition of sensitive bacteria was only observed against the strain *L. plantarum* BG101, however it had a low inhibitory activity which may be associated with the production of the bacteriocin of interest. The PLNC8, present in *L. p*. SP-50 is encoded by two peptides previously isolated in grass silage, and rarely in dairy.

Given the antibacterial potential of the PLNC8, it is of interest to be able to produce this in sufficient quantity in a way that allows us to evaluate and characterize this bacteriocin. So the objective of this work was to generate a recombinant bacteriocin expressed through *Kluyveromyces lactis* GG799 that allows the expression of the genes *plnNC8A* and *plnNC8B* of *Lactobacillus plantarum* SP-50. *K. lactis* has been used as a host cell in the food industry for its ability to grow at high cell density and efficiently secrete heterologous proteins. An expression system was used through the ligation of the *plnNC8A* and *plnNC8B* genes in the pKLAC2 vector, which allowed us to insert the expression cassette into competent cells of *Kluyveromyces lactis* GG799.

CONTENIDO

	PÁG.
INTRODUCCIÓN.....	1
1.-ANTECEDENTES.....	3
1.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)	3
1.2 Importancia de las bacterias ácido lácticas	4
1.3 Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL)	6
1.4 Clasificación de las bacteriocinas	8
1.4.1 Clase I	8
1.4.2 Clase II.....	9
1.4.3 Clase III	10
1.5 Espectro de acción antimicrobiana	11
1.6 Modo de acción de las bacteriocinas de la clase II	11
1.7 Genes implicados en la producción de bacteriocinas clase II	14
1.8 Género <i>Lactobacillus</i>	18
1.8.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	19
1.9 Bacteriocina NC8 de <i>L. plantarum</i>	20
1.10 <i>Kluyveromyces lactis</i>	21
1.10.1 <i>Kluyveromyces lactis</i> GG799 como sistema de expresión.....	23
1.11 Uso del vector pKLAC2 en bacteriocinas de clase II.....	26
2.- HIPÓTESIS	26
3.- JUSTIFICACIÓN	27
4.- OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo General.....	28
4.2 Objetivos Específicos.....	28

5.- MATERIAES Y MÉTODOS.....	29
5.1 Obtención del DNA plasmídico y cromosómico de <i>L. plantarum</i> SP-50...	29
5.1.1 Crecimiento y conservación.....	29
5.1.2 Extracción de DNA cromosómico.....	30
5.1.3 Extracción de DNA plasmídico.....	30
5.2 Diseño de oligonucleótidos.....	31
5.3 Reacción de la cadena de polimerasa (PCR).....	31
5.4 Análisis de los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa.	34
5.5 Purificación de los productos de PCR.....	34
5.6 Transformación de <i>E. coli</i> JM109 DE3 con el vector pKLAC2.....	35
5.6.1 Extracción y purificación del DNA plasmídico en <i>E. coli</i> JM109 DE3...	35
5.7 Clonación de los fragmentos obtenidos por PCR en en vector pKLAC2..	36
5.7.1 Digestión de los productos de PCR.....	36
5.7.2 Ligación de los productos digeridos con el vector pKLAC2.....	36
5.8 Transformación de <i>E. coli</i> BL21 con los genes <i>plnNC8A</i> y <i>plnNC8B</i> ligados al vector pKLAC2.....	38
5.9 Linealización del vector recombinante.....	38
5.10 Transformación de las células competentes de <i>K. lactis</i> GG799.....	38
5.10.1 Crecimiento de cepas recombinantes.	39
6.- RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
6.1 Obtención de paquetes celulares de <i>L. plantarum</i> SP-50.....	40
6.2 Diseño de oligonucleótidos.....	40
6.3 Extracción del DNA cromosómico y DNA plasmídico de <i>L. plantarum</i> SP-50.....	42
6.4 Recuperación de los genes <i>plnNC8A</i> y <i>plnNC8B</i>	43
6.5 Clonación de los genes <i>plnNC8A</i> y <i>plnNC8B</i> en el vector pKLAC2.....	45
6.5.1 Construcción de los vectores recombinantes pKLAC2- <i>plnNC8A</i> y pKLAC2- <i>plnNC8B</i>	45

6.6 Linealización de los vectores recombinantes para la transformación integradora de <i>K. lactis</i> GG799	47
6.6.1 Transformación de <i>E. coli</i> BL21.....	47
6.6.2 Linealización del cassette de expresión.....	47
6.7 Selección cepas de <i>K. lactis</i> GG799.	47
7.- CONCLUSIONES.....	52
8.RECOMENDACIONES.....	53
9.- REFERENCIAS.....	54
10.- ANEXOS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

μg/mL	Microgramos por mililitro
μL	Microlitro
aa	Aminoácidos
amdS	Acetamidasa
ATP	Adenosín trifosfato
BAL	Bacterias ácido lácticas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
kDa	Kilodalton
L	Litro
LB	Luria Bertani
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
NEB	New England Biolabs
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de base
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción de la cadena de polimerasa

RNA	Ácido ribonucleico
Tm	Melting temperatura
YPCB	Medio de base de carbón de levadura
YPGlu	Medio Levadura-Glucosa
YPGal	Medio Levadura-Galactosa

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una creciente demanda por parte de los consumidores por una dieta más equilibrada. Sin embargo, la tendencia es cada vez consumir productos más frescos y sanos, parecidos a su forma original, esto debido a la asociación del consumo de conservadores químicos con intoxicaciones, cáncer y otras enfermedades degenerativas. Esto genera la necesidad de buscar alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y compatibilidad con el alimento (Álvarez-Parrilla, 2006) o que sean mínimamente procesados y sin conservadores sintéticos. Los consumidores consideran que muchos alimentos procesados presentan una calidad nutricional pobre y que los aditivos sintéticos representan demasiados riesgos para la salud. Como resultado se ha generado un gran interés en desarrollar alimentos con agentes antimicrobianos naturales, con características inocuas que cumplan con los parámetros de calidad y seguridad y aunado a esto presenten alto espectro antimicrobiano. Es por esto que la industria alimentaria ha propuesto y desarrollado la aplicación de bacteriocinas, las cuales se consideran un producto del metabolismo secundario de algunas bacterias ácido lácticas (BAL) para la conservación de los alimentos. Las bacteriocinas se definen como péptidos de origen proteínico, que a bajas concentraciones presentan inhibición del crecimiento microbiano (Beshkova y Frengova, 2012).

Algunas BAL productoras de bacteriocinas han sido aisladas de alimentos como la carne y los productos lácteos, además pueden ser utilizadas como iniciadores en procesos de fermentación de otros alimentos. Las bacteriocinas pueden ser sintetizadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Jeevaratnam *et al.*, 2005); son consideradas seguras para su consumo (GRAS) además de no presentar toxicidad en las células eucariotas. Las bacteriocinas Gram-positivas presentan un espectro de inhibición más amplio en comparación con los espectros de las bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram-negativas (Nes *et al.*, 2007). Las bacteriocinas son metabolitos secundarios de las BAL, se definen como productos de la síntesis ribosómica, conformados por péptidos entre 20 y 60 aminoácidos (Chen y Hoover, 2003). Son secretados extracelularmente y presentan una alta actividad

bactericida o bacteriostática sobre cepas o especies relacionadas y sobre microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos (Cotter *et al.*, 2005).

El estudio de las BAL ha ido en aumento y se ha centrado en el aislamiento de BAL autóctonas a partir de ecosistemas complejos. En estudios previos las BAL, *Lactobacillus plantarum* SP-50 y SP-68 fueron aisladas en quesos artesanales del estado de Veracruz y caracterizadas molecularmente, en ellas se identificaron los genes *plnE/F*, *plnJ/K* y *plnNC8* involucrados en la biosíntesis de bacteriocinas (Portilla-Vázquez *et al.*, 2016), la inhibición se evaluó mediante la inducción de las bacteriocinas EF, JK y NC8. La producción de la bacteriocina NC8 (PLNC8) perteneciente a la clase IIb donde se presentan dos péptidos con actividad sinérgica, fue evaluada en *L. plantarum* SP-50 y *L. plantarum* SP-68, se realizaron cocultivos con *Lactobacillus sakei* NRRL-B1917 en donde la producción de las bacteriocinas aumentó en comparación a su producción en monocultivos. (Juarez-Anguiano, 2017).

Los sistemas de expresión han sido utilizados previamente en péptidos de clase II como la Enterocina A (EntA) y la Sakacina (SakA) con la finalidad de obtener una expresión óptima de las fracciones que lo componen (Jiménez *et al.*, 2013). *Kluyveromyces lactis* GG799 se ha utilizado como célula hospedera en la industria alimentaria por su capacidad para crecer a una densidad celular alta y secretar de manera eficiente proteínas heterólogas, sin embargo, no se ha evaluado la expresión de la bacteriocina producida por *L. plantarum* (Jiménez *et al.*, 2013).

El objetivo de este trabajo fue el recuperar y clonar dos genes de *Lactobacillus plantarum* para generar una bacteriocina empleando un sistema de expresión a través de la ligación de los genes *plnNC8A* y *plnNC8B* en el vector pKLAC2 cual nos permitirá insertar el cassette de expresión en células competentes a través de *Kluyveromyces lactis* GG799.

1- ANTECEDENTES

1.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias de ácido láctico (LAB) son un grupo de bacterias Gram positivas filogenéticamente diversas, caracterizadas por algunos rasgos morfológicos, metabólicos y fisiológicos comunes. Las BAL son generalmente reconocidas como bacterias seguras (GRAS), las cuales desempeñan un papel importante en la fermentación, conservación de alimentos y piensos, ya sea como parte de la microflora natural o como cultivos iniciadores añadidos bajo condiciones controladas, siendo *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium* los géneros más utilizados como cultivos iniciadores en procesos de fermentación de la leche, carne y productos vegetales (Cintas *et al.*, 2001).

Las bacterias lácticas se localizan frecuentemente en hábitats caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles, ricos en nutrientes, proteínas, péptidos y en condiciones limitantes en la concentración de oxígeno como por ejemplo, la leche, productos lácteos, productos cárnicos, vegetales fermentados, frutas, hortalizas frescas y pescado, algunas bacterias lácticas son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre y animales, estiércol y aguas residuales urbanas e industriales (Carr *et al.*, 2002; Murua *et al.*, 2013).

Las BAL poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos patógenos y/o potencialmente alterantes presentes en alimentos, ya que producen de forma natural diversas sustancias con propiedades antimicrobiana. El efecto antimicrobiano primario de las BAL es debido a la competencia intra e interespecífica por los nutrientes del sustrato y a la formación de ácidos orgánicos tales como: el ácido láctico y ácido acético, ácido fórmico, ácido fenil-láctico y ácido caproico, con el consiguiente descenso de pH (Dodd *et al.*, 1996; Jack *et al.*, 1995; Cleveland *et al.*, 2001). No obstante, las BAL también producen otras sustancias con

efectos antimicrobianos como: etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, isómeros D de los aminoácidos, reuterina, compuestos no proteicos de bajo peso molecular, y, por último, sustancias proteicas de síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas (Deegan *et al.*, 2006).

Las bacteriocinas son pequeños péptidos antimicrobianos producidos por numerosas bacterias. A menudo actúan sobre microorganismos con actividades metabólicas similares, los mecanismos comunes de inhibición por bacteriocinas son: la destrucción de células diana por la formación de poros y la inhibición de la síntesis de la pared celular. Diversos estudios han revelado que las bacteriocinas presentan un gran potencial en el sector clínico y médico como probióticos bacteriocinógenos o agentes terapéuticos (Hassan *et al.*, 2012). Las bacteriocinas se han posicionado como las sustancias producidas por las BAL de mayor interés para la bio-conservación de alimentos, ya que por su naturaleza proteica pueden ser degradadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal mientras permanecen activas en el sustrato (Cotter *et al.*, 2005).

1.2 Importancia de las bacterias ácido lácticas

Hoy en día, las bacterias ácido lácticas son empleadas ampliamente en la industria alimentaria a través de la adición de éstas como cultivos iniciadores, lo que resulta en un alto grado de control sobre el procesamiento de alimentos fermentados (Alfano *et al.*, 2015). Así mismo, debido a las actividades metabólicas de las bacterias ácido lácticas, la fermentación del ácido láctico es uno de los procesos de mayor interés tanto para la industria alimenticia como farmacéutica. (Alfano *et al.*, 2017; Rzepkowska *et al.*, 2017). Las aplicaciones a nivel industrial de las BAL también están enfocados al mejoramiento de la calidad de alimentos fermentados y no fermentados (vegetales, cárnicos, productos de panadería, bebidas alcohólicas, ensilados entre otros) mediante el enriquecimiento de cultivos de este tipo de bacterias, ya que estas

Antecedentes

juegan un papel importante en la preservación de los valores nutrimentales e inocuidad de la materia prima y su transformación (Yang *et al.*, 2012).

Dentro de las aplicaciones de las bacterias ácido lácticas se encuentra su potencial como inhibidoras de microorganismos patógenos, en este sentido, cuando son ingeridas en concentraciones adecuadas, ejercen un beneficio para la salud del huésped, siendo denominadas como probióticas (Quigley, 2010), tales como las bifidobacterias y levaduras no patogénicas. El uso como probiótico de ciertos géneros provoca un efecto benéfico en las poblaciones bacterianas a nivel tracto digestivo previniendo enfermedades, dando lugar a su uso como una alternativa a la adición de antibióticos en la alimentación (Mathiasen *et al.*, 2004).

Adicionalmente, las bacterias ácido lácticas son productoras bacteriocinas, péptidos pequeños, producto del metabolismo secundario de las mismas, los cuales poseen propiedades bactericidas. Esta actividad antimicrobiana se produce durante la fase logarítmica tardía y en el inicio de la fase estacionaria (Yang *et al.*, 2012; Juárez-Angiano, 2017). Su empleo a nivel industrial resulta atractivo debido a que las bacterias ácido lácticas ofrecen la posibilidad de producir bacteriocinas *in situ*, durante el procesamiento, evitando la adición directa de una preparación pura de la bacteriocina, reduciendo así los costos, y con un espectro de acción que incluye potenciales patógenos y alterantes asociados a los alimentos (*B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Clostridium*, entre otros) (Díez Aldama L., 2011) Desde un punto de vista aplicado, las bacteriocinas pueden ser usadas como ingredientes bioactivos en alimentos, como péptidos purificados, semipurificados o a través de cultivos lácticos productores de bacteriocinas. El uso de las bacteriocinas como una barrera eficaz, requiere de diferentes factores antimicrobianos tradicionales (pasteurización, pH, preservantes), aunados a nuevas tecnologías (atmósfera modificada, envasado, altas presiones), cuyos sistemas en conjunto inducirían una acción letal aún más eficiente (Katusic, 2002).

Sin embargo, a pesar de que su purificación es relativamente fácil y asequible, existen diversas limitantes en el uso de las BAL y la obtención de bacteriocinas para la preservación de alimentos, siendo el principal la selección de cepas resistentes (Riley, 2000), lo cual representa una limitante en el desarrollo de sistemas para la obtención de una alta densidad celular, aunado a sus bajos rendimientos de producción, se requieren de largos tiempos debido a la baja cantidad producida por el microorganismo (Camargo, Gómez, & Salazar, 2009) provocando generalmente un lote no rentable (Yun *et al.*, 2010; Alfano *et al.*, 2015). Diversos autores han propuesto diversas alternativas para este problema, las cuales incluyen el uso de biorreactores, sistemas de microfiltración o ultrafiltración (Sirisansaneeyaku *et al.*, 2007), aunque en los últimos años gracias al avance en las técnicas moleculares, también se han propuesto el uso de vectores de expresión.

1.3 Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos heterogéneos, que presentan diversos niveles y espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas (Stoyanova *et al.*, 2012). Éstas pueden ser producidas tanto por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Jeevaratnam *et al.*, 2005); sin embargo, las obtenidas a partir de BAL han sido de gran interés para su uso por industria alimentaria debido a la cantidad de BAL asequibles de manera comercial (*Lactococos*, *Lactobacilos* y *Pediococos* entre otros), son consideradas GRAS, no presentan toxicidad para células eucariotas y poseen un espectro de inhibición más amplio en comparación con las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas (Nes *et al.*, 2007).

Las bacteriocinas son metabolitos secundarios definidos como productos de la síntesis ribosómica, conformados por péptidos de entre 20 y 60 aminoácidos, son secretados extracelularmente y presentan una alta actividad bactericida o

Antecedentes

bacteriostática sobre microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos. La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica de su desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando una relación directa con la biomasa producida. Entre sus características principales destacan el ser termoestables y capaces de crecer a pHs considerados ácidos, propiedades estrechamente relacionadas, debido a que un incremento de pH reduce la estabilidad de estas al calor (Chen y Hoover, 2003; Cotter *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque las bacteriocinas son estables a pHs ácidos o neutros, son fácilmente inhibidas a pH por encima de 10 (Jack *et al.*, 1995). Las bacteriocinas con peso molecular menor a 5 kDa presentan una alta termoestabilidad, que les permite mantener su actividad después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche, la cual se ve afectada durante procesos con temperaturas por encima de los 100°C. Dicha estabilidad puede deberse a la formación de estructuras globulares pequeñas y a la presencia de regiones hidrofóbicas, así como a la formación de enlaces cruzados estables (Alquicira, 2006). Debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas son inactivadas por proteasas, incluyendo las de origen pancreático y gástrico, debido a ello durante su paso por el tracto gastrointestinal son inactivadas, sin ser absorbidas como compuestos activos (Quintero, 2006), resultando así inocuas para el consumidor.

Las bacteriocinas presentan un amplio espectro antimicrobiano, siendo activas a bajas concentraciones (menores a 10 ppm). Se ha demostrado que dicha actividad también se extiende a bacterias Gram-negativas previamente dañadas por tratamientos térmicos o la presencia de agentes quelantes. Estudios comparativos demuestran que presentan una mayor inhibición de bacterias Gram-positivas. Las bacteriocinas presentan inhibición potencial contra patógenos como *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y algunas especies de *Bacillus* (Wu *et al.*, 2004; Jeevaratnam *et al.*, 2005).

1.4 Clasificación de las bacteriocinas

A pesar de la heterogeneidad de su peso molecular, propiedades bioquímicas, espectro de acción y organización genética, las bacteriocinas de las bacterias lácticas poseen características comunes que permiten agruparlas en cuatro clases, diversos autores han propuesto clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas. La clasificación de las bacteriocinas se divide en tres clases principales: I) Lantibióticos, II) No lantibióticos, III) Bacteriolisinas (Cotter *et al.*, 2005; Todorov, 2009) las cuales son descritas a continuación:

1.4.1 Clase I

Lantibióticos (péptidos antibióticos que contienen lantionina) con un tamaño menor a los 5 KDa y de 19 a 38 aminoácidos, son consideradas pequeñas, presentan poca estabilidad al calor y se modifican postraduccionalmente, son los únicos que se producen en el ribosoma como un prepeptido y experimentan una modificación postraduccional extensa para formar un péptido activo. Todos los lantibióticos actualmente reportados son producidos por bacterias Gram-positivas (McAuliffe *et al.*, 2001; Todorov, 2009;) se dividen en lantibióticos del tipo Ia y antibióticos del tipo Ib.

Clase Ia: Son péptidos alargados, catiónicos, con un peso molecular menor a 4kDa, cuya actividad antimicrobiana se debe a la inhibición de la síntesis del peptidoglicano y la formación de poros en la membrana citoplasmática (Cotter *et al.*, 2005). La bacteriocina más representativa de este grupo es la nisina A, Z y U (Nes *et al.*, 2007).

Clase Ib: Los antibióticos de tipo Ib son compactos, con estructuras globulares, son inhibidores enzimáticos y son inmunológicamente activos Su actividad antimicrobiana está relacionada principalmente con la inhibición de enzimas.

Bacteriocinas como la duramina A, B, C y cinamisina son representativas de este grupo (Cotter *et al.*, 2005; Todorov, 2009).

1.4.2 Clase II

Estas bacteriocinas con un tamaño menor a los 10 kDa, no contienen ningún aminoácido inusual, son resistentes al calor llegando a sobrevivir en temperaturas de 100°C- 120°C. La mayoría de estas bacteriocinas se caracterizan por poseer un sitio de procesamiento de doble glicina (Gly-Gly) en el precursor de bacteriocina. Las bacteriocinas de la clase II poseen un alto contenido de aminoácidos pequeños como la glicina, siendo fuertemente catiónico y la presencia de dominios hidrófobos y anfifílicos (Todorov, 2009). Este grupo presenta la mayor cantidad de bacteriocinas reportadas, debido al gran número de péptidos provenientes de la BAL, su actividad antimicrobiana y sus aplicaciones potenciales (Gautam y Sharma, 2009). La clase II a su vez se subdivide en los siguientes grupos.

Clase IIa: También denominados bacteriocinas tipo pediocina, son producidas por una amplia variedad de bacterias ácido lácticas. Aunque el espectro antimicrobiano de estas bacteriocinas difiere de otros, todas han demostrado ser activas contra *Listeria spp.* Una de las características representativas de estas es que comparten en su estructura una secuencia conservada de aminoácidos, YGNGV. A este grupo pertenece la pediocina PA-1 siendo la más estudiada dentro de este grupo, así como sakacina A y enterocina A (Cotter *et al.*, 2005; Todorov, 2009).

Clase IIb: La actividad de este tipo de bacteriocinas depende de la acción complementaria de dos péptidos en una relación molar estequiométrica 1:1. El efecto combinado de ambos péptidos de este tipo de bacteriocinas es mayor que la actividad a partir del efecto individual de éstos (Maldonado *et al* 2003; Todorov, 2009), su mecanismo de acción se basa en la permeabilización de la membrana citoplasmática

(Nes y Holo, 2000). Algunas de estas bacteriocinas de dos péptidos necesitan que ambos sean activos para ejercer su actividad antimicrobiana, mientras que, por ejemplo, en el caso de plantaricina S, solo uno o ambos péptidos puede estar activos. Algunos ejemplos de plantaricinas con este tipo de actividad incluyen plantaricina S a y b, plantaricina J/K, plantaricina E/F y plantaricina NC8

Clase IIc: No poseen un péptido líder de doble glicina, pero se sintetizan con una secuencia líder N-terminal de tipo sec, que conduce a la secreción y procesamiento a través de la vía sec (Todorov, 2009). Poseen una estructura cíclica como resultado de la unión covalente de sus extremos carboxilo y amino terminal, son termoestables y no se modifican después de la traducción (Šušková *et al.*, 2010). La enterocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis* es la bacteriocina más representativa de este grupo (Dimov *et al.*, 2005).

Clase II d: Las bacteriocinas “mono-peptídicas lineales no pediocinas” son generalmente incluidas en el grupo. Algunos ejemplos son aureocina A70 y lactacina Q (Nes *et al.*, 2007)

1.4.3 Clase III

Comprende proteínas líticas (bacteriolisinas) de elevado peso molecular >30 kDa y lábiles al calor. Su mecanismo de acción se realiza a través de la catálisis e hidrólisis de la pared celular de las células sensibles; su mecanismo de acción es distinto al de las clases I y II, ya que estas lisan las células denominadas sensibles al catalizar la hidrólisis de la pared celular. (Cotter *et al.*, 2005; Abriouel *et al.*, 2011; Beshkova y Frengova, 2012). las bacteriolisinas más representativas son la helveticina J producida por *Lactobacillus helveticus* y la enterocina producida por *Enterococcus faecium*.

1.5 Espectro de acción antimicrobiana

Se ha determinado que las bacteriocinas demuestran diferentes modos de acción por lo que se han establecido tres categorías: i) Bacteriocinas con espectro inhibitorio estrecho, cuyos productos inhiben microorganismos de la misma especie, ii) Bacteriocinas con espectro inhibitorio intermedio, cuyos productos inhiben otros géneros de BAL, bacterias Gram-positivas y patógenos presentes en alimentos y iii) Bacteriocinas con amplio espectro de inhibición que actúan contra un gran número de bacterias Gram-positivas (Cintas *et al.*, 2001).

El efecto bactericida o bacteriostático de las bacteriocinas producidas por BAL depende de diversos factores, como: la dosis y grado de purificación de la bacteriocina, el estado fisiológico de las células sensibles a estas y las condiciones experimentales del ensayo, entre las que destacan la temperatura, el pH y la presencia de diversos agentes o compuestos antimicrobianos que desestabilicen la pared o membrana celular de las células (Moll *et al.*, 1999). Sin embargo, existen numerosas bacteriocinas que presentan inhibición de diversas especies de bacterias Gram-negativas, hongos patógenos y virus (Jenssen *et al.*, 2006).

1.6 Modo de acción de las bacteriocinas de la clase II

Como se mencionó anteriormente, la clase II está constituida por bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos (Nissen-Meyer *et al.*, 1992), siendo necesaria la presencia de ambos para que la bacteriocina presente actividad (Eijsink *et al.*, 2002). Algunas de las bacteriocinas de dos péptidos cuyo modo de acción se ha sido estudiado incluyen: lactococcina G, plantaricinas NC8, E/F J/K (Clase IIb), lactacina F, termofilina 13 y lactocina 705 (Maldonado *et al.*, 2002; Oppergård *et al.* 2007 Nissen-Meyer *et al.*, 2010).

Debido a la naturaleza catiónica e hidrofóbica de las bacteriocinas, estas

Antecedentes

permeabilizan la membrana citoplasmática de la célula mediante la formación de poros al unirse a los receptores de la superficie celular (Jenssen *et al.*, 2006). Los estudios sugieren que este tipo de bacteriocinas muestran cierta especificidad con respecto a las moléculas pequeñas que se conducen a través de las membranas, y que la especificidad de estas es variable (Figura 1) (Oppergård *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 20010).

El requisito de que ambos péptidos sean complementarios para un eficaz efecto antimicrobiano indica claramente que los dos péptidos de la clase IIb funcionan juntos como una sola entidad antimicrobiana. Además, estudios estructurales de las bacteriocinas lactococcin G y plantaricinas E/F y J/K revelaron una interacción física directa entre los péptidos complementarios cuando ejercen su efecto bactericida. (Cotter *et al.*, 2005; Maldonado, 2003).

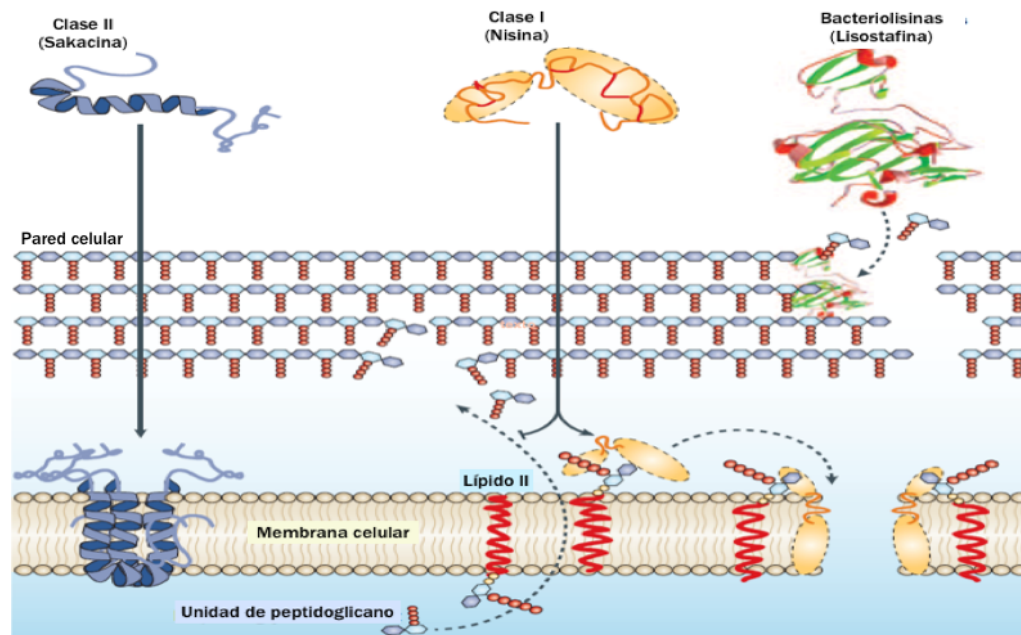


Figura 1: Modo de acción de las bacteriocinas clase II, I y bacteriolisinas (clase III). (Cotter *et al.*, 2005).

La acción inhibitoria de las bacteriocinas de la subclase IIb no pueden ser considerada como un efecto sinérgico de dos bacteriocinas, sino como el efecto de

Antecedentes

dos péptidos en el mismo operón que codifican sinérgicamente (en relación estequiométrica 1:16) para la acción bactericida o bacteriostática de esta (Garneau *et al.*, 2002; Oppergård *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2010).

La unión de las bacteriocinas a la membrana se establece a través de interacciones electrostáticas entre los residuos de la bacteriocina cargados positivamente y los grupos negativos de los fosfolípidos de la membrana, mientras que la formación de los poros se debe a la naturaleza hidrófoba-hidrófila de las bacteriocinas, lo que facilita su distribución a lo largo de la membrana. La formación de poros origina un flujo pasivo de pequeñas moléculas (iones, aminoácidos, ATP), lo que origina la disipación de la fuerza protón motriz (FPM) o de algunos de sus componentes (potencial de membrana y gradiente de pH). La alteración en la FPM, genera el gradiente electroquímico necesario para el desarrollo de procesos metabólicos dependientes de energía, reduce el transporte de nutrientes y la síntesis de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, originando la consiguiente muerte celular (Cintas *et al.*, 2001; Hassan *et al.*, 2012).

La inserción de las bacteriocinas en la membrana plasmática se debe a su capacidad de adoptar conformaciones anfipáticas en hélice α o en lámina β y puede entenderse según los dos modelos descritos por Moll *et al.*, (1999): (i) el modelo “cuña”, aplicable a la nisina y otros lantibióticos; (ii) y el modelo “duela de barril”, aplicable a bacteriocinas de la clase II. En el modelo “duela de barril” la naturaleza anfifílica de los péptidos es una característica clave debido a que se agregan estableciendo estructuras con forma de barril, en las que las regiones hidrofóbicas interactúan directamente con los componentes lipídicos de la membrana, mientras que las regiones hidrofílicas se dirigen hacia el lumen del poro recién formado (Cotter *et al.*, 2005).

1.7 Genes implicados en la producción de bacteriocinas

Clase II

La información genética necesaria para la síntesis de bacteriocinas se localiza tanto en el cromosoma bacteriano y en elementos móviles como plásmidos o transposones (Ennahar *et al.*, 2000; Cotter *et al.*, 2005). La biosíntesis de las bacteriocinas y su organización genética se encuentra relativamente conservada; usualmente se requieren de cuatro a cinco genes (dependiendo si es una bacteriocina de uno o dos péptidos) para codificar las proteínas de las bacteriocinas y estos se encuentran organizados en uno o dos operones, codificando así la síntesis de bacteriocinas.

Se han identificado hasta ahora cuatro cepas de *L. plantarum*, WCFS1, NC8, J51 y J23 que han mostrado albergar diferentes locus de plantaricinas (*pln*) en sus genomas (Figura 2). Juntos estos cinco locus *pln* codifican cuatro bacteriocinas pertenecientes a la clase IIb, un transportador ABC, un péptido inductor, y dos diferentes sistemas de regulación (Diep *et al.*, 2009; Sáenz *et al.*, 2009).

Estos genes se dividen a manera general en : i) dos genes estructurales para las bacteriocinas de dos péptidos, los cuales codifican las preformas de la bacteriocina (prebacteriocina), ii) un gen denominado de inmunidad, el cual codifica la proteína que se encarga de proteger al microorganismo productor de bacteriocina, usualmente situado junto al gen de bacteriocina en la misma unidad de transcripción, iii) un gen que codifica el transportador ABC (*ATP Binding Cassette*), el cual se encarga de transferir la bacteriocina a través de la membrana, mediante el reconocimiento de la secuencia líder y iv) un gen que codifica una proteína accesoria cuyo papel específico no ha sido dilucidado, pero que parece estar relacionado con la secreción de la bacteriocina (Eijsink *et al.*, 2002; Nissen-Meyer *et al.*, 2010).

Es importante considerar que los genes que codifican a ambos péptidos en las bacteriocinas de clase II se encuentran uno junto al otro en el mismo operón y que solo

un gen provee de inmunidad para cada bacteriocina de dos péptidos.

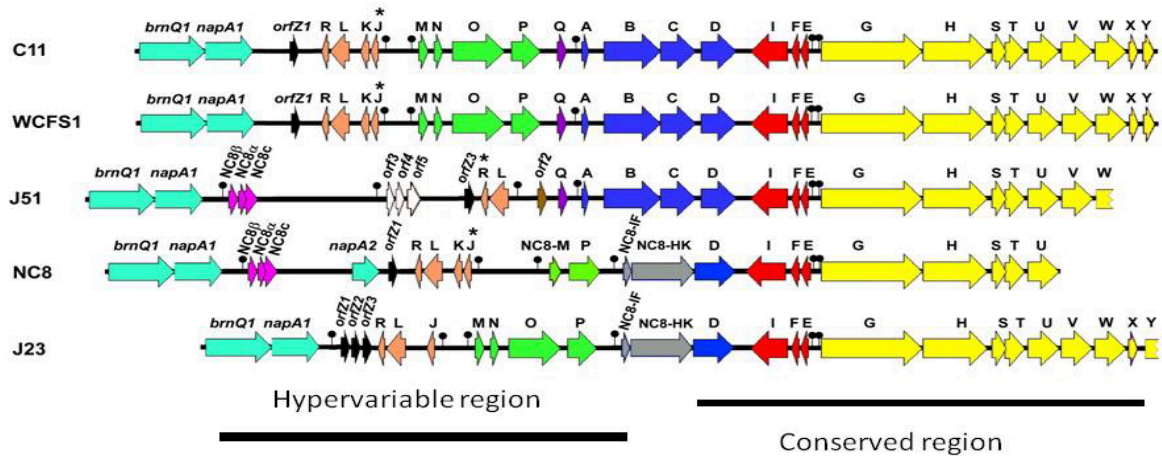


Figura 2. Mapa genético de loci *pln* de las cepas C11, WCFS1, J51, NC8 y J23. Los genes *pln* son representados por flechas con diferentes colores correspondientes a cada operón. Las flechas incompletas indican que los genes son secuencias parciales. Las secuencias promotoras se indican mediante pequeñas flechas negras. Código de color para operones *pln*: verde / rojo para los genes del operón regulador; naranja para el operón *plnEFI*; amarillo para el operón *plnMNOP*; color azul para el operón *plnJKLR*; negro para el operón *pINC8βac* y morado para los genes del sistema transportador ABC. Los genes específicos de la cepa se denominan como *orf* y de color diferente (cafe, rosa y gris); (Sáenz *et al.*, 2009).

El gen estructural de una bacteria ácido láctica codifica una prebacteriocina la cual es denominada precursor o prepéptido inactivo, el cual contiene un dominio C-terminal y una secuencia líder N-terminal, ese tipo de secuencias pueden ser del tipo péptido doble glicina o bien del tipo péptido señal sec. La función de la secuencia líder parece ser la inactivación de la actividad biológica de la bacteriocina previo a su exportación, facilitando su interacción con el sistema de transporte (Savadogo *et al.*, 2006; Todorov, 2009). La modificación postraduccional de estas prebacteriocinas, como el establecimiento de anillos tipo éster en las bacteriocinas clase I (Lantibioicos), o de puentes disulfuro en las de clase II (como las pediocinas) dan lugar a un péptido

Antecedentes

maduro, se ha sugerido que esta modificación postraduccional se lleva a cabo en el exterior de la célula, debido a que la presencia de este tipo de estructuras cíclicas podrían dificultar su exportación de la célula (Cotter *et al.*, 2005)

El gen de inmunidad codifica una proteína que, como su nombre lo indica, protege al microorganismo productor del efecto de su propia bacteriocina madura. Este gen se sitúa generalmente en el mismo operón que el gen estructural, la variabilidad en la presencia y expresión de este tipo de genes pueden explicar la variabilidad en la sensibilidad mostrada por diferentes bacterias ácido lácticas hacia las bacteriocinas. Esta proteína se expresa en conjunto con la bacteriocina, pero a diferencia de esta no requiere de un sistema de procesamiento o transporte. El tamaño de este tipo de proteína varía de los 51-254 aminoácidos, poseen un elevado punto isoeléctrico (7-10) y presentan segmentos transmembranales, lo que sugiere que podrían estar integrados en la membrana celular. Han sido propuestos diversos mecanismos de acción para tratar de dilucidar la acción de esta inmunidad conferida, sin embargo, no se conoce con precisión, dichos mecanismos de inmunidad no proporcionan protección contra la actividad de otras bacteriocinas, aunque se han reportado excepciones (Cotter *et al.*, 2005; Diep *et al.*, 2009; Nissen-Meyer *et al.*, 2010)

Debido a que las bacteriocinas son sintetizadas en el citoplasma y necesitan ser secretadas posteriormente a través de la membrana, su transporte y procesamiento, depende de la expresión de dos genes, los cuales codifican un transportador del tipo ABC y su proteína accesoria, que a su vez se encuentran estrechamente relacionados con el gen estructural y el de inmunidad en el caso de las bacteriocinas con región N-terminal del tipo doble glicina, o bien se encuentran codificadas dentro de un solo operón constituido por el gen estructural y de inmunidad, como es el caso de las BAL sintetizadas como prepeptido. (Cotter *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 2007)

Existen diversos reportes de genes provenientes de bacteriocinas clase II

Antecedentes

(poseen dos péptidos) tales como: Pediocinas PA-1, Pediocina JD, Sakacina A y P, Curvacina A, Mesentericina Y105, Plantaricina E/F, Lactococcina A y B Lactacina F Divergicina (Gonzalez-Martínez, 2003; Maldonado y Llanas, 2007; Diep *et al.* 2009; Díez Aldama L., 2011)

La pediocina PA-1 cuya estructura terciaria ya ha sido determinada, es sintetizada como un pre-péptido de 62 aminoácidos que da lugar a un péptido maduro de 44 residuos, anfifílico, con carga positiva y regiones altamente hidrofóbicas y con 2 enlaces disulfuro (Cleveland *et al.*, 200; Díez Aldama L., 2011). , en el extremo N-terminal contiene 3 láminas β que originan una conformación de horquilla, en cambio en el extremo C terminal presenta un alto grado de libertad conformacional, con excepción de un enlace disulfuro entre los aminoácidos 24 y 44, que es esencial para su actividad. Los genes implicados en la síntesis de la pediocina son: i). el gen estructural pedA, ii) el gen pedB para la inmunidad y iii) los genes pedC y pedD que participan en la secreción del péptido maduro.

La síntesis de plantaricinas (E/F y J/K) es sumamente compleja, está regulada por la acción de 5 operones con 21 genes diferentes. Los péptidos activos para la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células blanco son PlnE y PlnF que conforman la plantaricina E/F y los péptidos PlnJ y PlnK constituyen la plantaricina J/K. Se ha encontrado que esos 4 péptidos catiónicos poseen de 25 a 34 aminoácidos y tienen actividad bactericida de manera independiente, la cual se potencia cuando se interactúan en pares formando los complejos de poración E/F y J/K. (Maurad, 2007; Diep *et al.*, 2009)

Lactobacillus plantarum C11 fue uno de los primeros productores de bacteriocina de dos péptidos en ser secuenciado, determinando así los factores implicados en la biosíntesis y regulación de los genes. El locus *pln* de *L. plantarum* C11 incluye cinco genes: i y ii) *plnEFI* y *plnJKLR* que dan origen a las bacteriocinas EF y JK , iii) *plnGHSTUVW* que codifica para el sistema de transporte ABC , iv)

plnABCD el cual se encarga de la regulación y codifica para el péptido inductor (A) perteneciente al sistema Quorum sensing y finalmente v) el gen *plnMNOP* , el cual codifica cuatro proteínas putativas. (Diep *et al.*, 2009).

1.8 Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* comprende alrededor de 80 especies, siendo *Bacilli* el más extenso. Las especies de *Lactobacillus* son generalmente facultativas, generando ácido láctico como principal o único producto de la fermentación, y que poseen requisitos alimenticios complejos. Este género incluye microorganismos con morfología de varilla, capaces de metabolizar diferentes carbohidratos y crecer temperaturas de 45 °C, el género es dividido en 3 sub-géneros: *Streptobacterium*, *Betabacterium* y *Thermobacterium*. Kandler y Weiss (1986) propusieron la clasificación del género *Lactobacillus* en tres grupos:

- Grupo A: Sólo especies homofermentativas estrictas. Este grupo incluye 15 especies. Ejemplos de este grupo son *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus acidophilus*.
- Grupo B: incluye especies heterofermentativas facultativas productoras de ácido láctico producto de la fermentación de la glucosa a través de la vía metabólica EMP. Aunado a la producción ácido láctico, los miembros de este grupo producen ácido acético, etanol y ácido fórmico, siendo *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus sakei* los ejemplos más notables.
- Grupo C: Incluye solo especies heterofermentativas estrictas, productoras de ácido láctico y ácido acético como metabolitos finales. Este grupo incluye *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus Fermentum*, y *Lactobacillus reuteri*.

Los lactobacilos realizan una fermentación homoláctica utilizando la vía de Embden-Meyerhof o una fermentación heteroláctica con la vía de fosfato de pentosa.

Crece óptimamente en condiciones ligeramente ácidas (pH 4.5 - 6.4) y con una temperatura entre los 25-40 °C (mésófilos). El género se encuentra ampliamente reportado y ha sido aislado de superficies de plantas, productos lácteos, carne, agua, aguas residuales, cerveza, frutas entre otros. Estas bacterias también forman parte de la flora normal del cuerpo humano en la boca, el tracto intestinal y la vagina. Por lo general, no son patógenas (Prescott *et al.*, 2002). Las bacterias del género *Lactobacillus* son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores para la producción de productos fermentados y debido a su capacidad antimicrobiana por la producción de bacteriocinas. Esta característica se ha vuelto atractiva, abriendo la oportunidad a diversos estudios para la búsqueda y aplicación de nuevas cepas con potencial bacteriocinogénico (Perín *et al.*, 2012). Se ha determinado que las bacteriocinas provenientes del género *Lactobacillus* forman parte del microbiota autóctona en quesos artesanales elaborados a partir de leche cruda debido a su capacidad de crecer a un pH bajo, contribuyendo en su sabor y textura, siendo las bacterias heterofermentativas *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* las especies dominantes (Caro *et al.*, 2013).

1.8.1 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum es una bacteria formadora de esporas y catalasa negativa, aerobia tolerante y anaeróbica facultativa, la cual posee un bajo contenido de G-C, capaz de crecer a temperaturas de entre 15 - 45 °C. y de pH entre 4- 9 con un tamaño aproximado de 0.9–1.2 × 1.0–8.0 µm. Ha sido clasificado en el Grupo B, descrito anteriormente y es una de las especies de BAL más estudiadas, ha sido reportada en diferentes ambientes (carnes, heces, saliva, alimentos fermentados, tracto vaginal), este comportamiento flexible y adaptativo es debido a su amplio espectro de funciones de regulación y transporte (Portilla-Vazquez *et al.*, 2016). Se ha reportado como una BAL capaz de crecer empleando vegetales como sustratos), sin embargo, ha sido ampliamente reportada como una especie dominante en procesos fermentativos (producción de quesos: feta, mozzarella y vinos entre otros). Varias

cepas de *L. plantarum* son genéticamente accesibles y se han desarrollado herramientas genéticas para esta especie, incluyendo sistemas de expresión génica (controlados) y vectores que pueden usarse para la construcción de variantes de alteración o delección de genes (Kleerebezem *et al.*, 2002; Todorov y Franco, 2010).

Comparada con otras BAL, es quizá una de las más tolerantes a bajos pH, motivo por el cual se muestra presente al final de las fermentaciones. Esta característica y otras como la producción de péptidos antimicrobianos han logrado que sea una opción para emplearla como cultivo iniciador de muchos productos fermentados comerciales (Murua *et al.*, 2013).

Se han aislado diversas cepas de *L. plantarum* provenientes de quesos artesanales en el estado de Veracruz, Méx., dentro las cuales destacaron la *L. plantarum* SP-50 y SP-68, debido a su capacidad de producir tres bacteriocinas diferentes, a partir de los genes, *plnE/F*, *plnJ/K* y *plnNC8* que codifican para las plantaricinas (bacteriocinas) E/F, J/K y NC8 (Portilla-Vázquez *et al.*, 2016).

1.9 Bacteriocina PLNC8 de *L. plantarum*

La plantaricina NC8 (PLNC8), producida por *Lactobacillus plantarum* es una bacteriocina de naturaleza proteica perteneciente a la clase IIb, inducible a partir de co-cultivos con otras bacterias Gram-positivas, recientemente purificada y caracterizada filogenéticamente, resistente al calor, con características GRAS, aislada de quesos artesanales provenientes del estado de Veracruz.

Originalmente se pensaba que la PLNC8 se encontraba únicamente en sustratos vegetales, actualmente se sabe que la bacteriocina PLNC8 puede ser obtenida mediante la utilización de co-cultivos de *L. plantarum* SP-68 y SP-50 (inductoras). Se ha reportado que el inductor y los fenotipos sensibles pudieran no estar vinculados, sin embargo, PLNC8 tiene la capacidad de ser auto-inducible

(Maldonado *et al.*, 2003). La PLNC8 al pertenecer a la clase IIb de bacteriocinas, cuenta con dos fracciones que actúan de manera complementaria produciendo un efecto inhibitorio, dichas fracciones se denominan PLNC8 α y PLNC8 β , en donde la máxima actividad inhibitoria se presenta en una relación molar 1:16. Los genes correspondientes para dichas fracciones, denominados *pINC8A* y *pINC8B* ya han sido secuenciados, revelando que ambos péptidos son precursores de bacteriocina formados por 47 y 55 aminoácidos tomando en cuenta sus fracciones estructural y madura respectivamente, incluyendo secuencias líderes N-terminal del tipo de doble glicina (Gly-Gly). Los péptidos α y β maduros contienen 29 y 34 aminoácidos, respectivamente (Maldonado *et al.*, 2003, 2004).

Juárez-Anguiano, 2017 mediante TR-qPCR evaluó los niveles de expresión de los genes *plnE/F*, *plnJ/K* y *pINC8* de *L. plantarum* SP-50 y SP-68 en cocultivo con *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917, empleando un total de catorce cepas diferentes de BAL para evaluar la actividad inhibitoria de estas plantarinas, observando una diferencia significativa en los niveles de expresión de los genes *plE/F* y *pINC8* de *L. plantarum* SP-50 en cocultivo con *L. sakei* NRRL B-1917, concluyendo que sólo mediante el cocultivo de *L. plantarum* SP-50 con *L. sakei* NRRL B-1917 es posible obtener una producción estable de actividad inhibitoria sobre la cepa sensible *L. plantarum* BG10, sin embargo las bacteriocinas fueron obtenidas mediante inducción por la presencia de células competitivas en el medio de crecimiento a partir de cultivos puros previamente aislados por Portilla-Vázquez *et al.*, 2016.

1.10 *Kluyveromyces lactis*

Kluyveromyces lactis es una de las levaduras no-*Saccharomyces* más importantes y estudiadas debido a sus aplicaciones biotecnológicas. Su importancia radica en su historia de uso seguro dentro de industria alimentaria y su conocida capacidad de producir enzimas como la lactosa y la quimosina bovina a nivel industrial. *K. lactis* ha sido estudiada durante décadas, estableciendo ampliamente uso de

Antecedentes

manera segura en diversas aplicaciones dentro de la industria alimentaria. Durante Das y Hollenberg en 1982 estudiaron a *K. lactis* y establecieron un sistema de transformación, lo que condujo posteriormente a su desarrollo como un hospedero eficiente para la expresión de proteínas heterólogas (van Ooyen *et al.*, 2006).

K. lactis puede crecer en condiciones estándar con medio a base de levadura, para su cultivo a gran escala no se requieren equipos de fermentación. Aunado a esto las enzimas de *K. lactis* cuentan con la categoría de GRAS, ante la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América) permitiendo su uso en diversas aplicaciones en la elaboración y conservación de alimentos y fármacos. La expresión de una proteína implica típicamente el ensamblaje de un vector de expresión y el gen heterólogo deseado amplificado “downstream” (después del extremo 3' del gen) de un promotor fuerte y la posterior inserción de dicho vector en una cepa huésped; la integración de un vector de expresión linealizado en el genoma de *K. lactis* se emplea para aumentar la estabilidad genética de cepas productoras de enzimas o metabolitos secundarios de interés que requieran de períodos de crecimiento largos dentro de biorreactores (Van Ooyen *et al.*, 2006; Read *et al.*, 2007).

Con la aparición de la resistencia bacteriana y patógenos bacterianos emergentes, las bacteriocinas producidas por BAL pueden encontrar su uso como péptidos antimicrobianos naturales en aplicaciones alimentarias y médicas. Sin embargo, el alto costo de la producción sintética de bacteriocinas, sus bajos rendimientos y el riesgo de la intervención de factores de virulencia potenciales de muchos productos naturales impulsan la exploración de sistemas microbianos para la producción biotecnológica de bacteriocinas por LAB. Se han utilizado varias plataformas de levaduras para la producción heteróloga de péptidos y proteínas, incluyendo bacteriocinas (Borrero *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2015).

1.10.1 *Kluyveromyces lactis* GG799 como sistema de expresión.

La cepa GG799 de *K. lactis* (New England Labs) es un aislado industrial haploide (α) de tipo silvestre que no tiene marcadores genéticos (Figura 3). Fue elegido originalmente como una cepa huésped en la industria alimentaria debido a su capacidad para crecer a una densidad celular muy alta y para secretar de manera eficiente proteínas heterólogas. Como huésped para la producción heteróloga de proteínas, *K. lactis* GG799 tiene una serie de ventajas sobre otros sistemas de expresión de levadura (Van Ooyen *et al.*, 2006; Read *et al.*, 2007).

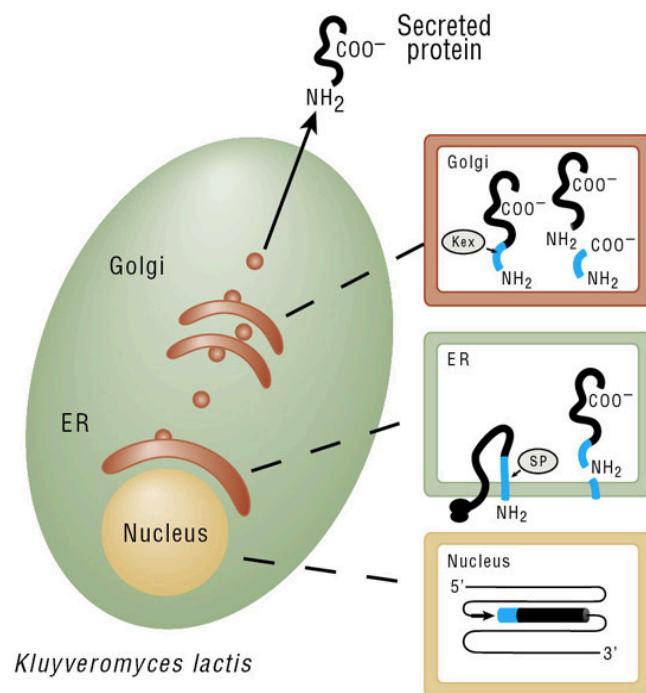


Figura 3. Proceso de secreción de las proteínas de interés en *K. lactis* GG799 (New England Biolabs ®, 2007)

El sistema de expresión de *K. lactis* GG799 ofrece varias ventajas sobre otros sistemas de expresión de proteínas de levadura y bacterias. En primer lugar, *K. lactis* se ha utilizado para producir proteínas a escala industrial en la industria alimentaria

Antecedentes

durante más de una década debido a su capacidad para alcanzar rápidamente altas densidades de cultivo y producir abundantemente proteínas recombinantes. En segundo lugar, la expresión de levadura es impulsada por una variante del promotor LAC4 fuerte que se ha modificado para carecer de expresión de fondo en *E. coli* (Colussi *et al.*, 2005). Por lo tanto, los genes tóxicos para *E. coli* pueden clonarse en pKLAC2 en bacterias antes de su expresión en levadura. En tercer lugar, el uso de células de *K. lactis* altamente competentes hacen que la tecnología sea de uso práctico de usar para aquellos que no están acostumbrados a trabajar con levaduras.

Su alta eficiencia de transformación hace que el sistema sea adecuado para métodos que requieren un gran número de transformantes. La selección de transformantes de levadura usa un método único sin antibiótico en el que la acetamidasa (*amdS*) expresada a partir de pKLAC2 permite que las células transformadas utilicen acetamida como única fuente de nitrógeno en un medio definido. La selección de acetamida promueve la formación de células que contienen múltiples integraciones de pKLAC2 lo que da como resultado mayores rendimientos de proteína. Por último, las proteínas expresadas en *K. lactis* tienen acceso a la dotación de proteínas eucarióticas y la maquinaria de glicosilación que las células de *E. coli* no poseen, por lo que es una alternativa importante a los sistemas de expresión bacteriana (Read *et al.*, 2007).

Muchos tipos de proteínas pueden ser secretadas por las células de levadura, como regla general, aquellos que tienden a secretarlas mejor son proteínas que también son secretadas por su huésped nativo. Sin embargo, existen proteínas normalmente no segregadas por esa vía que lo han hecho exitosamente a partir de varias levaduras. (Dujon, 2004; Van Ooyen *et al.*, 2006).

El vector de expresión integrador del sistema de expresión de proteínas de *K. lactis* pKLAC2 (Figura 4), contiene una variante del promotor de LAC4 de *K. lactis* fuerte (PLAC4-PBI) para la expresión de un gen deseado en *K. lactis*. La principal

Antecedentes

ventaja del promotor PLAC4-PBI es que es transcripcionalmente silencioso y de alto rendimiento. El vector pKLAC2 se inserta en la región promotora del locus LAC4 del genoma de *K. lactis* tras su introducción en células de *K. lactis*. Los vectores de expresión integradores son atractivos para la industria pues se insertan en el genoma, convirtiéndose así en parte del cromosoma del huésped, y por lo tanto son bastante estables (Colussi *et al.*, 2005; Van Ooyen *et al.*, 2006; Read *et al.*, 2007).

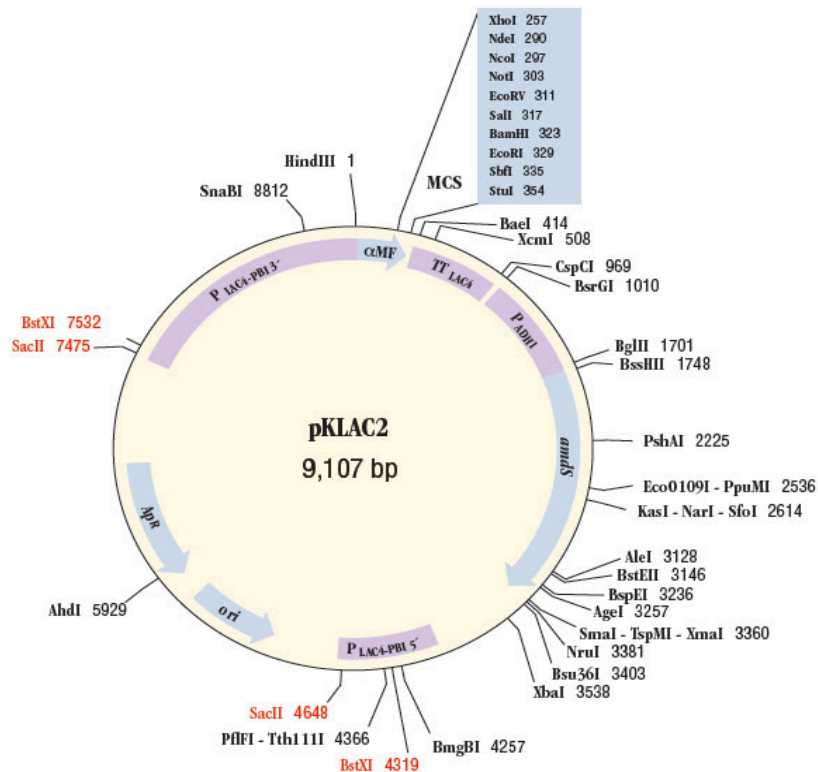


Figura 4: Vector de expresión pKLAC2 (New England Biolabs ®, 2007)

La expresión múltiple de proteínas es esencial para la expresión de las bacteriocinas de clase IIb al ser conformadas por dos péptidos, en el caso de la PLNC8: los genes *plnNC8A* y *plnNC8B* codifican para las fracciones PLNC8 α y PLNC8 β que actúan de forma sinérgica para el efecto inhibitorio de la bacteriocina PLNC8 de la clase IIb (Maldonado *et al.*, 2004)

Para la co-expresión de múltiples proteínas se ha descrito un método para la construcción de cepas de *K. lactis* que coexpresan múltiples proteínas. Este método que explota la tendencia de los vectores de la serie pKLAC a insertarse de forma tándem en el locus del promotor LAC4 a una frecuencia excepcionalmente alta. Este fenómeno permite que vectores separados de la serie pKLAC, cada uno de los cuales contenga un gen heterólogo diferente, se co-integren en las células generadoras de locus LAC4 que coexpresan cada gen. Este método se ha utilizado para crear cepas de *K. lactis* que producen hasta cuatro proteínas heterólogas diferentes después de sólo una reacción de transformación celular (Read *et al.*, 2007).

1.11 Uso del vector pKLAC2 en bacteriocinas de clase II

Se han reportado el uso de sistemas de expresión en bacteriocinas de clase IIa, como es el caso de la enterocina A (EntA) producida *Enterococcus faecium* clonada exitosamente y expresada en diversas levaduras como *Pichia pastoris* X-33EA, *Kluyveromyces lactis* GG799EA en donde se obtuvo una mayor actividad antimicrobiana en comparación al uso de la bacteriocina en condiciones nativas, así como su expresión en otras levaduras recombinantes (Borrero *et al.*, 2012).

La expresión heteróloga de los genes de bacteriocina en levaduras es uno de los enfoques que pueden emplearse para mejorar la producción de bacteriocina. Esto ha resultado exitoso para pediocina PA-1, bactofencina A y enterocina del grupo IIa. Las bacteriocinas de LAB son altamente potentes, de acción rápida, poseen nuevos modos de acción y son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) que facilitan las aplicaciones de alimentos tanto in situ como ex situ (Baranzan, 2018). Este trabajo buscó el uso de sistemas de expresión probados por primera vez en la bacteriocina NC8 que pertenece al grupo IIb para obtener una cepa recombinante de *Kluyveromyces lactis* GG799 que exprese los genes *plnNC8A* y *plnNC8B* de *L. plantarum* SP-50.

2.- HIPOTESIS

- A partir de cepas de *K. lactis* GG799 transformadas con el vector pKLAC2-*pINC8* es posible expresar la plantaricina recombinante funcional de *L. plantarum* SP-50.

3.- JUSTIFICACIÓN

- La función de las bacteriocinas es proporcionar a las cepas productoras la capacidad de inhibir a sus competidores.
- *L. plantarum* SP-50 en condiciones nativas y en cocultivo produce bajas concentraciones de bacteriocina NC8.
- *K. lactis* se ha utilizado como célula hospedera en la industria alimentaria por su capacidad para crecer a una densidad celular alta y secretar de manera eficiente proteínas heterólogas, sin embargo no se ha evaluado la expresión de la bacteriocina producida por *L. plantarum* SP-50.

4.- OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Obtener una cepa recombinante de *Kluyveromyces lactis* GG799 que exprese los genes *plnNC8A* y *plnC8B* de *L. plantarum* SP-50.

4.2 Objetivos específicos

1. Aislar los genes *plnNC8A* y *plnNC8B* de *L. plantarum* SP-50 que codifican para la bacteriocina NC8.
2. Obtener cepas recombinantes de *K. lactis* que expresen los genes pKLAC2-*plnNC8A* y pKLAC2-*plnNC8B*.
3. Evaluar la actividad de los péptidos recombinantes de *K. Lactis* GG799.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención del DNA plasmídico y cromosómico de *Lactobacillus plantarum* SP-50.

5.1.1 Crecimiento y conservación

En este trabajo se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* SP-50 aislada en el 2015 por Portilla-Vázquez en el Instituto Tecnológico de Veracruz, la cual fue obtenida a partir de muestras de queso fresco provenientes del estado de Veracruz. El medio empleado para la conservación y crecimiento de *Lactobacillus plantarum* SP-50, fue el medio Rogosa Sharpe (MRS) (Portilla-Vázquez *et al.*, 2016) cuya composición se muestra en el Apéndice A. Las cepas fueron conservadas en glicerol al 40% (v/v) a partir de cultivos de 8 h (150 rpm, 35°C). Las cepas se etiquetaron y sellaron con parafilm y se preservaron a -60°C.

Para la preparación del cultivo iniciador se utilizaron tubos de ensayo con 10 mL de medio MRS. A cada tubo se le adicionaron 300 µL de la cepa *Lactobacillus plantarum* SP-50 (conservada en glicerol), y se cultivaron durante 8 h en agitación orbital con agua a 150 rpm, a 35 °C. Transcurrido este tiempo se recuperó el paquete celular por centrifugación a 13,000 x *g* a 4°C durante 5 min en una centrífuga ThermoFisher Scientific. Las células fueron mantenidas en hielo hasta la extracción de DNA correspondiente para evitar la degradación.

5.1.2 Extracción de DNA cromosómico

La extracción del DNA cromosómico se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Falmm *et al.* (1984) y modificado por Quintana-Castro en el 2015. El paquete celular fue resuspendido en un amortiguador compuesto por Tris (50mM) y

EDTA (50mM, pH 8.0), las células se mantuvieron a -20°C durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se agregó un segundo buffer de Tris (50mM) y lisozima (10 mg/mL) en suspensión fría. La muestra se incubó en hielo durante 45 min. Posteriormente se adicionó un buffer que contenía SDS (0.5%), EDTA (0.4M) y proteinasa K (1mg/mL), provocando una lisis celular. Se utilizaron soluciones de Tris equilibrado con fenol y acetato de sodio (3M) para la recuperación el paquete celular, que finalmente fue lavado con etanol al 96% y secado a temperatura ambiente. Se corroboró la presencia de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa 1X, empleando como referencia un marcador de empleando como referencia carril con 3 μ L de un marcador de peso molecular de 1kb (Promega).

5.1.3 Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción del DNA plasmídico se utilizó la técnica propuesta por O'Sullivan-Klaenhammer (1993). El paquete celular fue resuspendido en una solución compuesta de sacarosa al 25% y lisozima (30 mg/mL), las células fueron incubadas durante 15 min a 37 °C, posteriormente se realizó una lisis alcalina con SDS al 20% y NaOH 0.2N, la mezcla fue incubada durante 7 min a temperatura ambiente, se añadió una solución en frío de acetato de sodio (3M, pH 4.8), se mezcló y se centrifugó durante 15 min a 13 x g a (4°C). El sobrenadante fue lavado con isopropanol para después centrifugarse a 13 x g durante 15 min (4°C). El paquete celular fue resuspendido en agua destilada estéril. Se añadió una solución de acetato de amonio (7.5M) que contenía 0.5 mg/mL de bromuro de etidio, a la mezcla se le agregó una dilución de fenol-cloroformo (1:1), la mezcla fue centrifugada a 13 x g durante 5 minutos. Finalmente los lavados del paquete celular se realizaron con etanol absoluto (-20°) y etanol al 70%. Una vez evaporado el etanol, el paquete celular fue resuspendido en agua miliQ. Se corroboró la presencia de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa 1X, empleando como referencia carril con 3 μ L de un marcador de peso molecular de 1kb (Promega).

5.2 Diseño de oligonucleótidos

Para la recuperación de los dos genes de *Lactobacillus plantarum* SP-50 se diseñaron oligonucleótidos específicos. Para la amplificación de las fracciones: pre péptidos A y B (péptidos estructurales), los péptidos maduros A y B, así como un marco abierto de lectura (*orfC*). Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia reportada por Maldonado *et al.*, (2003) y evaluada su especificidad mediante el programa SerialCloner® versión 2.6.0. A los oligonucleótidos se les añadieron sitios de restricción respectivos para las enzimas XhoI y BamHI basados en el vector pKLAC2 que permitieran la integración del cassette en *K. lactis*.

Los sitios de corte de las enzimas fueron previamente evaluados mediante el programa NEBcutter V2.0 (New England BioLabs) para descartar la presencia de estos en los genes respectivos. Se diseñó un total de diez oligonucleótidos para la amplificación de diferentes fracciones provenientes de la bacteriocina NC8 de *Lactobacillus plantarum* SP-50.

5.3 Reacción de la cadena de polimerasa (PCR).

Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron en un termociclador Gene Cycler (Bio-Rad®). Las mezclas de reacción para la PCR se realizaron utilizando el reactivo Mastermix® de Promega® de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Para la amplificación de los genes *plnNC8A* y *plnNC8B*, se utilizaron los oligonucleótidos de la TABLA 1.

Para el cálculo de la temperatura de fusión (T_m) se utilizó la regla de Wallace (1986).

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 4 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})$$

El valor de T_m para la reacción fue de 60°C tomando en cuenta el promedio de la T_m los cinco pares de oligonucleótidos; los tiempos, temperaturas de desnaturalización y polimerización para las reacciones de PCR se muestra en la Figura 5. Los ciclos de la PCR fueron los siguientes:

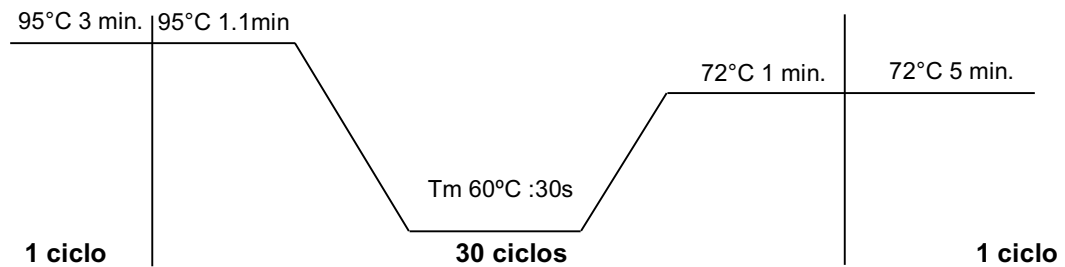


FIGURA 5. Ciclos de temperaturas y tiempos para la PCR

TABLA 1. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas en este trabajo

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Annealing °C
<i>pInNC8</i>	FC8BPrMXh	CCGCTCGAGATGAATAACTTGAATAAA TTTTCTA	58
	RC8BendBh	CGGGATCCATGATAAAAAGCCTTTATTA AAACT	58
Péptido maduro B	FC8BPMXh	CCGCTCGAGATCAGTCCCAACTTCAGT AT	56
	RC8BendBh	CGGGATCCATGATAAAAAGCCTTTATTA AAACT	58
<i>pINC8A</i>	FC8APrXh	CCGCTCGAGCCGCTCGAGATGGATAA ATTTGAA	92
	RC8AendBh	CGGGATCCAAAATTGAACATATGGGTG CTT	58
Péptido maduro A	FC8APXh	CCGCTCGAGTGATTTAACAACCAAGTT ATTGG	60
	RC8AendBh	CGGGATCCAAAATTGAACATATGGGTG CTT	58
(Marco abierto de lectura)	FC8MCXh	CCGCTCGAGATGGAGCTCTTGGGGAT A	54
	RC8MCBh	CGGGATCCCTTGAAAACCTTTTCTTATG AAACA	60

5.4 Análisis de los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa.

Para el análisis del DNA cromosómico, plasmídico y los productos de PCR se utilizó electroforesis horizontal en geles de agarosa con una celda de electroforesis mini subcell (BioRad). Los geles fueron preparados utilizando el amortiguador TAE 1X (ver apéndice A) y 1% de agarosa grado electroforesis. La agarosa fue fundida en horno de microondas durante 60 seg, una vez atemperado (aproximadamente a 60 °C) se agregó bromuro de etidio con una concentración de 0.5 µg /mL.

Para la carga de las muestras se utilizó una mezcla con 5µL de DNA y 2 µL de amortiguador carga 6X. Los geles se corrieron a 90V durante 40 min. Se utilizó el marcador molecular de 1kb. Los geles fueron visualizados y fotografiados en un transiluminador Gel Doc™ XR+ Imagin Systemn (Bio- Rad®).

5.5 Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega ®), los cuales utilizan una membrana de sílica para unir el DNA, que posteriormente es liberado por un cambio en la polaridad de la membrana por el paso de agua miliQ® y están diseñados para fragmentos de DNA de un tamaño aproximado de 100pb a 10kb. Una vez purificados los productos de PCR, se determinó la concentración en un Spectrofotometro NANODROP™ 2000.

Las fracciones aisladas y amplificadas fueron comparadas con las reportadas por Maldondo *et al.* (2003). Las muestras fueron conservadas a una temperatura de 4 °C hasta su posterior uso en la ligación de los productos digeridos resultantes de la transformación de una cepa *E. coli* JM109 DE3 con el vector pKLAC2.

5.6 Transformación de *E. coli* JM109 DE3 con el Vector pKLAC2

La transformación de las células de *E. coli* JM109 DE3 se llevó a cabo mediante células químico-competentes utilizando de cloruro de calcio e incubación en frío a 4 °C. Las células transformadas fueron seleccionadas a través del marcador de resistencia a la ampicilina del vector pKLAC2.

Para la transformación se utilizaron 100 µL de células *E. coli* JM109 DE3 competentes a las cuales se les adicionó 1 µL del vector pKLAC2, se mezclaron suavemente y se almacenaron en hielo durante 30 minutos. El microtubo con las células y el vector adicionado se calentó a 42°C durante 1 minuto, posteriormente se llevaron nuevamente al hielo durante 30 minutos.

Las células fueron transferidas a un tubo que contenía 1 mL de medio LB (Apéndice A), se incubaron durante 45 minutos a 37°C a 150 rpm en agitación orbital. Las células suspendidas en 1 mL de LB fueron transferidas a un microtubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 5 000 rpm durante 30 segundos a una temperatura de 4°C, una vez eliminado la mayoría del sobrenadante por decantación, el resto fue utilizado para resuspender las células y sembrarlas en placas de agar LB sólido con ampicilina 100 µg/mL. El sembrado se llevó a cabo con una varilla de vidrio estéril utilizando sólo 100 µL del total de las células resuspendidas. Las placas se incubaron por 12 horas a de 37°C. El proceso se llevó simultáneamente en otro ensayo utilizando un control del vector pKLAC2.

5.6.1 Extracción y Purificación del DNA plasmídico en *E. coli* JM109 DE3

La extracción del DNA plasmídico de *E. coli* JM109 DE3 transformada con el vector pKLAC2 resistentes a ampicilina se llevó a cabo con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante

utilizando una membrana de sílica para obtener una elución en 100 μ L de agua. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega)

5.8 Clonación de los fragmentos obtenidos por PCR en el vector pKLAC2.

5.8.1 Digestión de los productos de PCR.

Los genes *plnNC8A* y *plnNC8B*, fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y BamHI. Las condiciones de digestión se realizaron utilizando 4 μ g de producto de PCR purificado, 5 μ L de 1X NEBuffer 3, 18.6 μ L de agua libre de nucleasas, 4 μ L de la enzima de restricción XhoI y 4 μ L de la enzima de restricción BamHI, en un volúmen total de 50 μ L. Ambas reacciones se incubaron a 37°C durante 4 horas, posteriormente se purificaron y se cuantificaron para obtener un producto suficiente para una reacción de ligación con el vector pKLAC2 siguiendo el protocolo del proveedor.

5.8.2 Ligación de los productos digeridos con el vector pKLAC2.

La ligación requirió 40 ng del vector pKLAC2 digerido, con una concentración de 200 ng concentrados en 10 μ L de los genes *plnNC8A* y *plnNC8B* digeridos, 2 μ L del tampón de ligación de concentración 10X (New England Biolabs), 14 μ L de agua libre de nucleasas y finalmente 1 μ L (~400 unidades) de la ligasa T4 DNA (New England Biolabs). Ambas reacciones fueron incubadas a 16°C durante 2 horas. Los productos fueron purificados utilizando el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega), dando como resultado los vectores pKLAC2-*plnNC8A* y pKLAC2-*plnNC8B*

5.9 Transformación de *E. coli* BL21 con los vectores pKLAC2-*pInNC8A* y pKLAC2-*pInNC8B*

Para la transformación se utilizaron 100 μ L de células *E. coli* BL21 competentes a las cuales se les adicionó 1 μ L de cada una de las mezclas de ligación. Las células transformadas fueron inoculadas en placas que contenían medio LB-Ampicilina durante, después fueron incubadas 12 hrs a 37°C. Se seleccionaron colonias resistentes, para ser inoculadas en 5 mL de caldo LB-ampicilina e incubadas

La extracción del DNA plasmídico de *E. coli* BL21 transformada con pKLAC2-*pInNC8A* y pKLAC2-*pInNC8B* se llevó a cabo con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega™) siguiendo el protocolo del fabricante utilizando una membrana de sílica que se une al DNA y que posteriormente es eluído con un volumen de 100 μ L de agua libre de nucleasas.

5.10 Linealización del vector recombinante

El vector pKLAC2 dirige la expresión de una proteína recombinante de la levadura *Kluyveromyces lactis*, el cual es compatible con el kit de expresión de proteínas *K. lactis* y que se emplea para la expresión de proteínas intracelulares o secretadas. Los vectores pKLAC2-*pInNC8A* y pKLAC2-*pInNC8B* fueron linealizados empleando la enzima de restricción SacII para permitir la inserción en el genoma de *K. lactis*, para la posterior integración en el locus LAC4 durante transformación de células competentes.

Los genes de expresión lineal pKLAC2-*pInNC8A* y pKLAC2-*pInNC8B*, fueron sometidos a una digestión con SacII. El cassette de expresión se propuso como lo describe la figura 6: conteniendo >6.2 kb de DNA de cada gen de interés (A y B) con P_{LAC4-PB}, el vector recombinante y el cassette de selección *amdS*

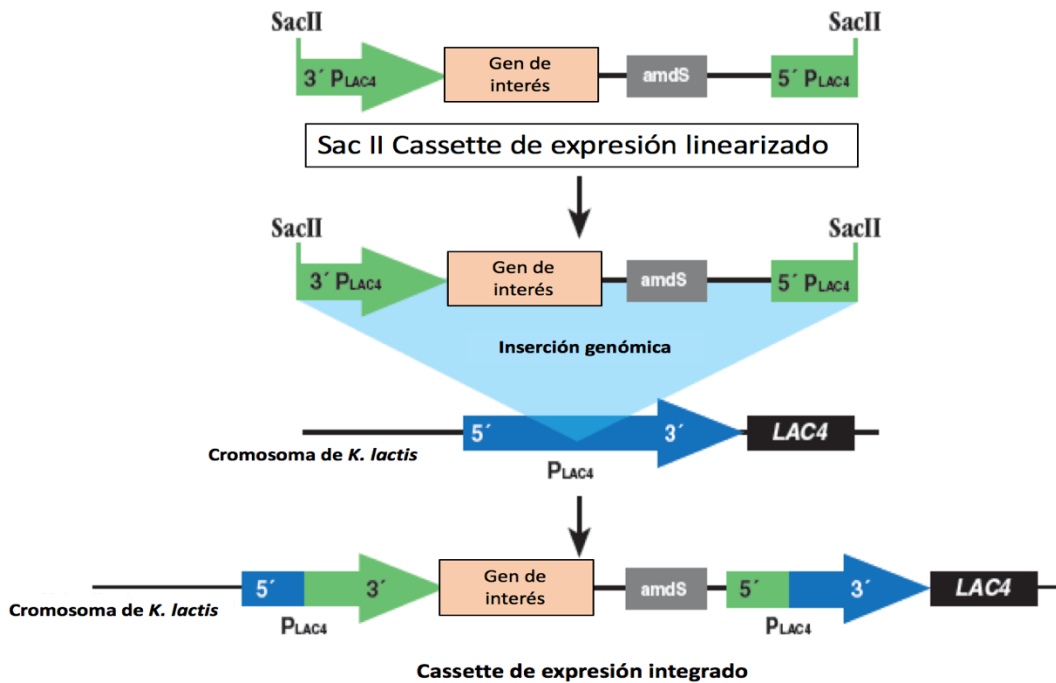


FIGURA 6. Integración genómica del cassette de expresión linealizado.

La reacción de linealización se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del proveedor, utilizando 4 µg de cada uno de los vectores que contenía el gen de interés (pKLAC2-*pInNC8A* y pKLAC2-*pInNC8B*), 20 unidades de la enzima SacII en 50 µL del amortiguador NEBuffer 4 1X, la incubación se realizó a una temperatura de 37°C durante 2 horas. Se necesitó un total de 1 µg de DNA linealizado en un volumen inferior a 15 µl para transformar las células de *K. lactis*.

5.11 Transformación de las células competentes de *K. lactis* GG799

La introducción de un cassette de expresión linealizada se logró por la transformación integrativa utilizando las células competentes *K. lactis* GG799 y añadiendo el reactivo de transformación de levaduras (New England Labs). El crecimiento de cepas recombinantes en agar de levadura a base de carbono (YEB) que contiene 5mM de acetamida.

5.11.1 Crecimiento de cepas recombinantes

El crecimiento de las células transformadas se llevó a cabo en cajas Petri con medio (YEB) incubadas a 37 °C, hasta la formación de colonias. Las colonias aisladas obtenidas fueron sometidas a una resuspensión en 2mL de YPGal y se centrifugaron a 250 rpm en agitación a 30 °C. El crecimiento depende de la proteína secretada (aproximadamente, 2 días a 30°C hasta la observación del crecimiento de las células).

6.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Obtención de paquetes celulares de *L. plantarum* SP-50

Se realizó la reactivación de la cepa de *L. plantarum* SP-50, perteneciente al cepario de bacterias acidolácticas del laboratorio de Microbiología de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos, en medio de cultivo MRS. Para la obtención de los paquetes celulares se realizaron dos generaciones de biomasa con cultivos de 10 mL para realizar una extracción de DNA cromosómico y otra de DNA plasmídico.

Los paquetes celulares se recuperaron por centrifugación a 13, 000 x g a durante 15 min a 4 °C en microtubos de 1.5 mL. Se obtuvieron aproximadamente 0.5 g de biomasa coincidiendo con los tiempos de crecimiento reportados por Juárez Anguiano (2017), (Apéndice C), esta fase de crecimiento corresponde a la la fase logarítmica tardía y en el inicio de la fase estacionaria, con una concentración celular aproximada de 1×10^8 UFC/mL de acuerdo a lo reportado previamente por Yang *et al.*, (2012). Una vez obtenidos los paquetes celulares, se procedió a realizar la extracción de DNA cromosómico y DNA plasmídico con la finalidad de obtener los genes *plnNC8A* y *plnNC8B* que codifican para la bacteriocina NC8 en *L. plantarum* SP-50.

6.2 Diseño de oligonucleótidos.

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia de la bacteriocina NC8 reportada previamente por Maldonado *et al.*, en 2003. Los oligonucleótidos diseñados ya contienen el sitio de corte de las enzimas de restricción para llevar a cabo la clonación en el vector pKLAC2. En la TABLA 2 se muestran los cinco pares de oligonucleótidos utilizados para cada gen.

TABLA 2. Oligos diseñados para amplificar las diferentes fracciones de pINC8, en rojo y subrayado los los sitios de restricción de las enzimas XhoI y BamHI.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio de restricción
<i>pInNC8B</i>	FC8BPrMXh	CCG <u>CTCGAG</u> ATGAATAACTTG	XhoI
		AATAAATTTTCTA	
	RC8BendBh	CG <u>GGATCC</u> ATGATAAAAAGCCT	BamHI
		TTATTA AAACT	
Péptido maduro B	FC8BPMXh	CCG <u>CTCGAG</u> ATCAGTCCCAA	XhoI
		CTTCAGTAT	
	RC8BendBh	CG <u>GGATCC</u> ATGATAAAAAGCCT	BamHI
		TTATTA AAACT	
<i>pINC8A</i>	FC8APrXh	CCG <u>CTCGAG</u> CCGCTCGAGAT	XhoI
		GGATAAATTTGAA	
	RC8AendBh	CG <u>GGATCC</u> AAAATTGAACATA	BamHI
		TGGGTGCTT	
Péptido maduro A	FC8APXh	CCG <u>CTCGAG</u> TGATTTAACAAC	XhoI
		CAAGTTATTGG	
	RC8AendBh	CG <u>GGATCC</u> AAAATTGAACATA	BamHI
		TGGGTGCTT	
orfC (Marco abierto de lectura)	FC8MCXh	CCG <u>CTCGAG</u> ATGGAGCTCTT	XhoI
		GGGGATA	
	RC8MCBh	CGG <u>GATCC</u> CTTGAAA ACTTTT	BamHI
		CTTATGAAACA	

6.3 Extracción del DNA cromosómico y plasmídico de *L. plantarum* SP-50

El DNA de *L. plantarum* SP-50 se extrajo de cultivos de 8 horas en medio MRS. El DNA fue cuantificado y utilizado para realizar la reacción en cadena de la polimerasa. La Figura 8 muestra el patron electroforético del DNA cromosómico y plasmídico de *L. plantarum* SP-50 con la integridad suficiente para ser utilizado en las reacciones de PCR.

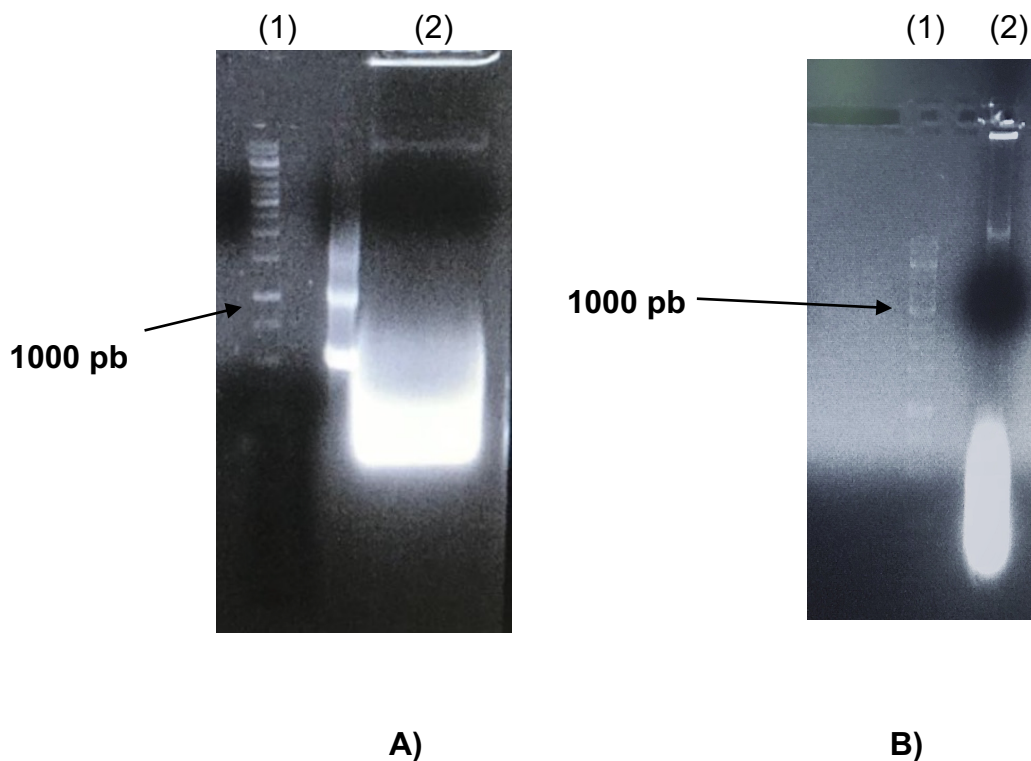


Figura 8. A) Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmídico de *L. plantarum* SP-50. (1) Marcador 1kb, (2). **B)** Electroforesis en gel de agarosa del DNA cromosómico de *L. plantarum* SP-50. (1) Marcador 1kb, (3) DNA cromosómico.

Los resultados comprueban que los genes que codifican la producción de las bacteriocinas puede situarse en el cromosoma o en plásmidos e incluso en algunos

casos, como *L. plantarum*, puede estar repartidos en ambos elementos génicos coincidiendo con lo reportado con Ennar (2000).

6.4 Recuperación de los genes *plnNC8A* y *plnNC8B*

Para la recuperación y clonación de los genes *plnNC8A* y *plnNC8B* se implementaron los oligonucleótidos descritos anteriormente en la TABLA2. Con estos oligonucleótidos fue posible amplificar los genes que codifican para las fracciones estructurales de la bacteriocina NC8, conocidas como Pre péptido B, Péptido Maduro B y el Péptido Maduro A.

Las bandas obtenidas se muestran en la figura 9. El tamaño obtenido de los genes que codifican para la fracciones estructurales de la bacteriocina NC8 revelaron un peso menor a 200 pb tomando como referencia de peso un carril con un marcador de peso molecular de 100 pb. Lo cuál era esperado por el peso teórico reportado por Maldonado (2003), para las fracciones: Pre péptido B de 87 pb, Péptido Maduro B de 102 pb, Péptido Maduro A de 87pb.

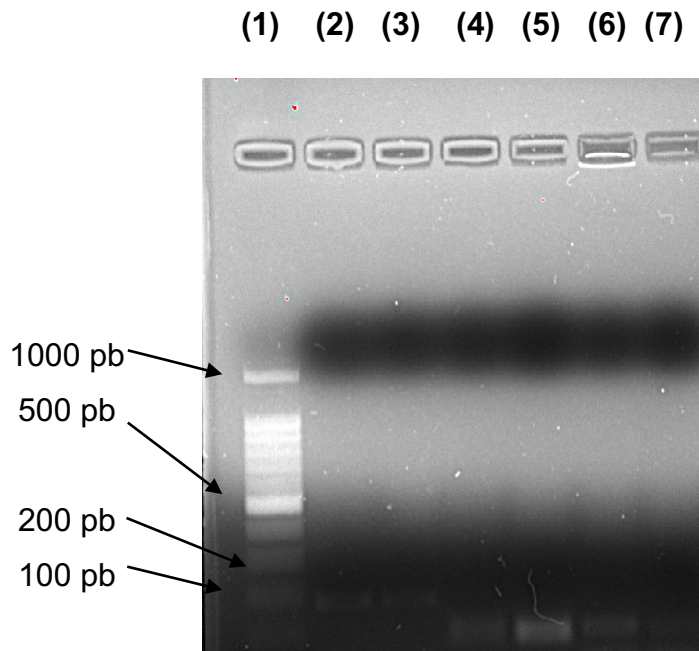


Figura 9. Producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos.(1) Marcador de 100 pb, (2) Amplicón de la fracción estructural del gen B en DNA cromosómico, (3) Amplicón de la fracción estructural del gen B en DNA plasmídico, (4) Amplicón del gen B en DNA cromosómico, (5) Amplicón de la fracción B del gen B en DNA plasmídico, (6) Amplicón de la del gen A en DNA cromosómico, (7) Amplicón de la del gen A en DNA plasmídico.

Se obtuvieron un total de 3 amplicones dos de los cuales correspondieron a la fracción estructural y madura de *pInNC8B* y uno a la fracción madura de *pInNC8A* a partir del DNA cromosómico. La misma distribución de amplicones fue observada a partir del DNA plasmídico. Corroborando que las fracciones se encuentran tanto en el DNA cromosómico como en DNA plasmídico de *L. plantarum* SP-50 y coincidiendo con Maldonado (2003). Se determinó la concentración y la pureza por medio de la relación Abs_{260}/Abs_{280} que tomando en cuenta que valores de 1.8 a 2.0 corresponden a preparaciones de alta pureza, las muestras obtenidas presentaban un nivel de pureza alto (Tabla 3).

TABLA 3. Concentración y pureza de los amplicones

Péptido	Concentración (ng/ μ L)	Pureza (260/280)
Prepéptido B	154	1.85
Péptido Maduro B	94.06	1.76
Péptido Maduro A	88.2	1.78

Las amplificaciones se realizaron hasta obtener una concentración total de 4 mg de cada una de las fracciones de la PLNC8: *pInNC8A*, *pInNC8B*, y la fracción estructural de *pInNC8B* (Prepéptido B), para llevar a cabo la reacción de ligación en el vector pKLAC2.

En el caso del marco abierto de lectura (*orf*) y la fracción estructural de *pInNC8A* no fue posible lograr una amplificación óptima. Esto pudo deberse a que las altas TM requeridas debido a los sitios de restricción utilizados, impidieron que se llevara a cabo el proceso de amplificación de manera correcta. A su vez, debido a las modificaciones postraduccionales de los péptidos estructurales, se decidió utilizar únicamente los genes que codifican para las fracciones maduras de *pInNC8B* y *pInNC8A*.

6.5 Clonación de los genes *pInNC8B* y *pInNC8A* en el vector pKLAC2

6.5.1 Construcción de los vectores recombinantes pKLAC2-*pInNC8A* y pKLAC2-*pInNC8B*

Los vectores digeridos (Figura 10), fueron ligados por medio de la enzima T4 DNA ligasa (NEB) a los genes de interés *pInNC8A* y *pInNC8B*. La ligación se efectuó hasta obtener un producto amplificado y purificado para realizar la transformación de las células de *E. coli* BL21. El vector pKLAC2 permite la ligación y crecimiento posterior en cualquier cepa de *E. coli*, sin embargo la detección de las ligaciones exitosas por el método “White-blue screening” en presencia de X-gal no es posible al utilizar el vector pKLAC2 (van Ooyen *et al.*, 2006).

Para comprobar la presencia de los genes insertados en el vector se realizó una PCR y mediante la observación de un gel de agarosa se determinó que ambos genes se insertaron de manera exitosa en el vector pKLAC2. En la figura 11 se muestran los carriles que contienen el gen extraído por medio de PCR, empleando los oligonucleótidos específicos FC8APXh y RC8AendBh para *pInNC8A* y los oligonucleótidos específicos FC8BPrMXh y RC8BendBh para *pInNC8B*, dando como resultado a las fracciones pKLAC2-*pInNC8A* y pKLAC2-*pInNC8B*, demostrando que se encuentran dentro de los pesos reportados por Maldonado (2003) para cada uno: 87 pb (*pInNC8A*) y 102 pb (*pInNC8B*).

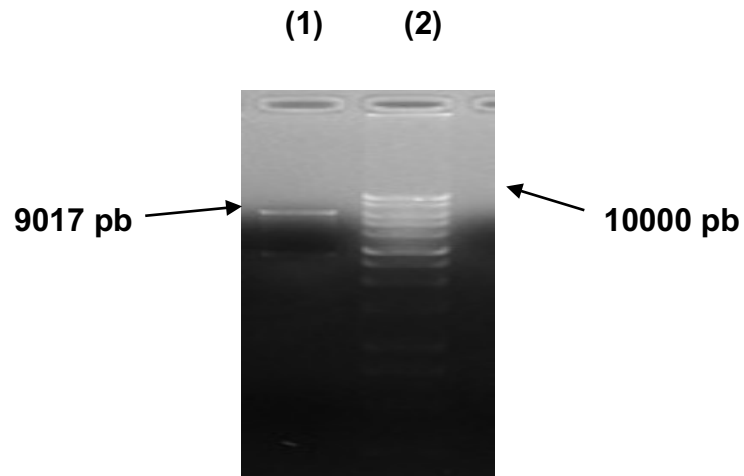


Figura 10. Vector pKLAC2 digerido. (1) Vector pKLAC2 (9017 pb), (2) Marcador de peso molecular de 10000pb.

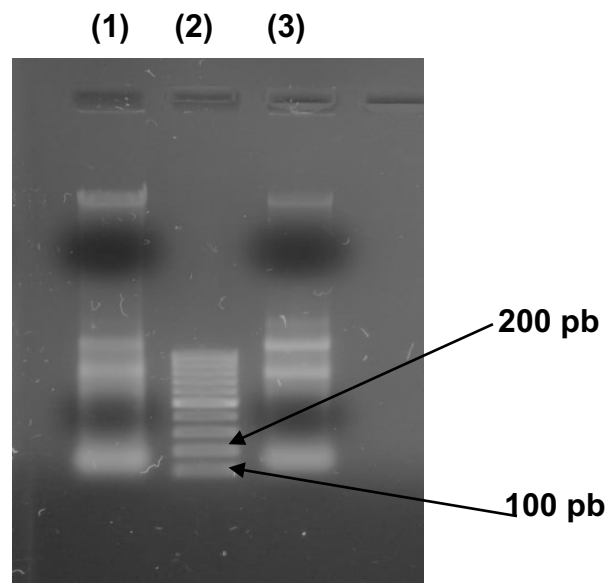


Figura 11. Extracción de DNA de las fracciones pKLAC2-*pInNC8A* y pKLAC2-*pInB*. (1) Fracción Madura A (*pInNC8A*), (2) Marcador de peso molecular de 1000 pb, (3) Fracción Madura B (*pInNC8B*).

6.6 Linealización de los vectores recombinantes para la transformación integradora de *K. lactis* GG799.

6.6.1 Transformación de *E. coli* BL21

Los vectores recombinantes fueron insertados en la cepa *E. coli* BL21 mediante la transformación con los vectores pKLAC2-pInNC8A y pKLAC2-pInNC8B. La cepa *E. coli* BL21 es ideal para la expresión de los vectores LAC siendo de uso regular unido a su capacidad de expresar elevados niveles de proteínas heterólogas (Jia *et al.*, 2016) Las células que contenían el vector con cada uno de los genes de interés fueron seleccionadas por su crecimiento en el medio LB-ampicilina.

En la figura 12 se muestran las cajas con crecimiento en medio LB-Ampicilina, así como el censo de las células de *E. coli* BL21 que contienen el vector recombinante.

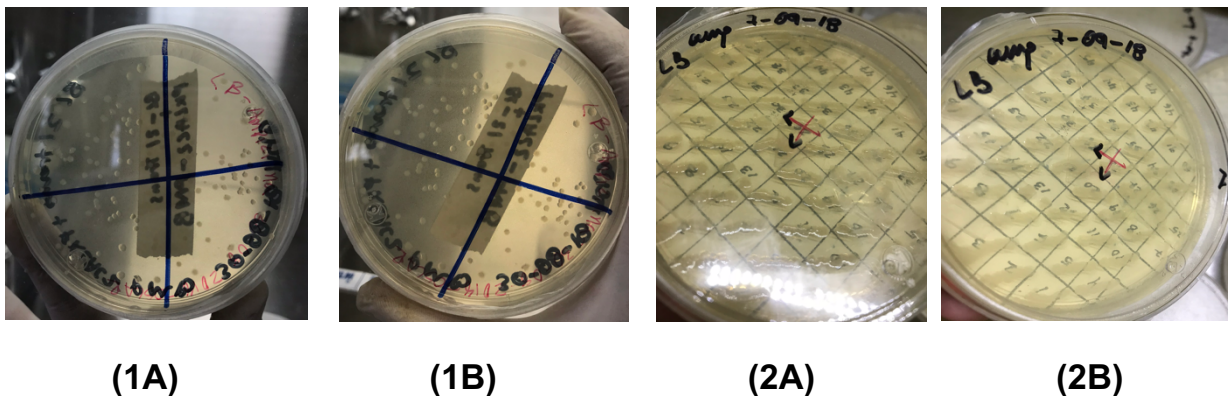


Figura 12. Placas de agar LB-Ampicilina en donde se muestra el crecimiento de las células transformadas resistentes a ampicilina con el vector recombinante pKLAC2pInNC8A (1A) y pKLAC2pInNC8B (1B), así como el censo en placas de agar LB-Ampicilina (2A y 2B).

6.6.2 Linealización del cassette de expresión

A partir de las cepas *E. coli* BL21 seleccionadas, se realizó una digestión con la enzima SacII para lograr el denominado cassette de expresión lineal que contiene: el

gen de interés (*plnNC8* o *plnNC8B*), el gen de selección *amdS*, así como un promotor de la secuencia LAC4 el cual dirige la expresión de proteínas heterólogas dentro del genoma de la levadura *K. Lactis* GG799.

La figura 13 muestra los productos amplificados y purificados de la PCR realizada con los oligonucleótidos específicos para los genes *plnNC8 A* y *plnNC8B* demostrando que se encuentran dentro de los pesos reportados por Maldonado (2003) para cada uno: 87 pb (Fracción A) y 102 pb (Fracción B).

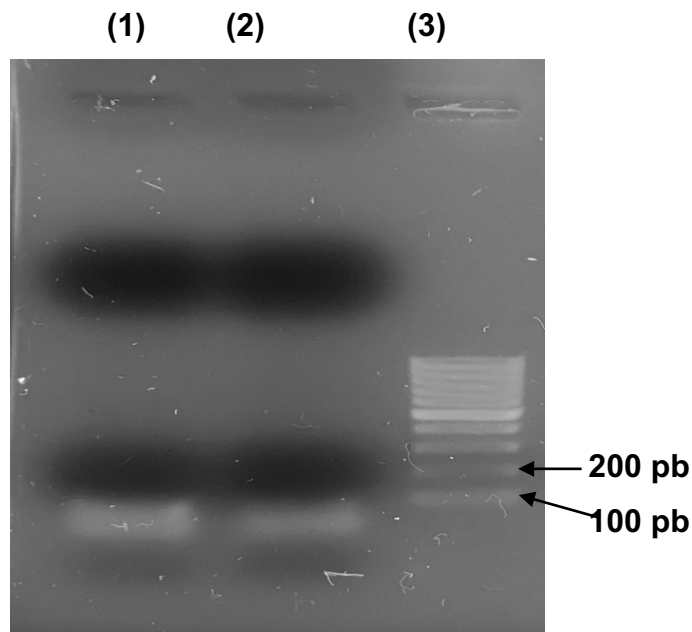


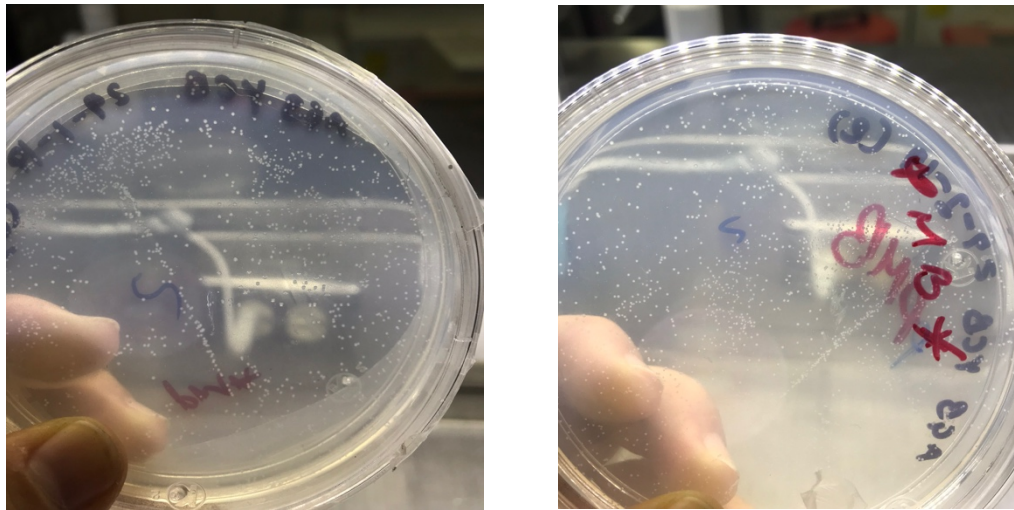
Figura 13. Amplificación obtenida a partir de los cassettes de expresión linealizados. De izquierda a derecha se observa: **(1)** el gen *plnNCB* (102 pb), **(2)** el gen *plnNC8A* (87) y **(3)** Marcador de peso molecular de 1000 pb.

6.7 Selección cepas de *K. lactis* GG799.

Una vez obtenido el cassette se llevó a cabo la transformación de la cepa *K. Lactis* GG799. Sólo las células que expresan *amdS* pueden descomponer la acetamida en amoníaco para utilizarla como fuente de nitrógeno. Contando con esta

característica conferida por el gen *amdS* se realizó una prueba negativa de crecimiento, donde se empleó la cepa *K. lactis* GG799 en medio líquido YCB-acetamida a 5mM sin la transformación con el vector pKLAC2. Se tomó como control negativo a la inserción del cassette de expresión la ausencia de crecimiento de la cepa *K. lactis* GG799 en dicho medio. Las clonas transformadas de *K. lactis* GG799 que presentaron crecimiento fueron seleccionadas y se muestran en la figura 14.

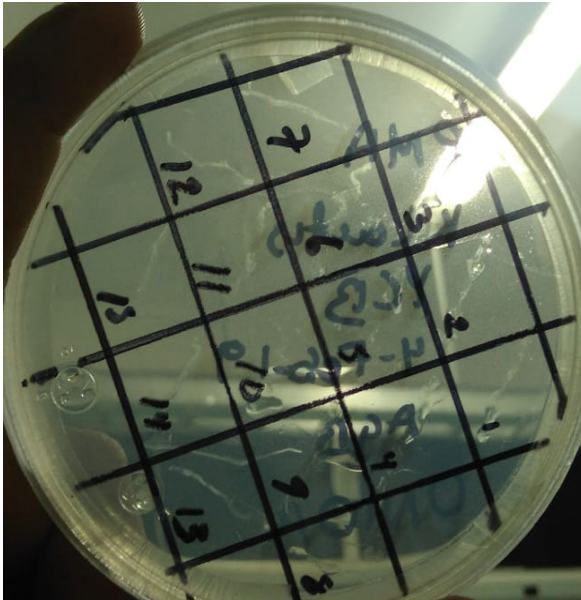
Se llevó a cabo un censo de proximadamente 20 colonias por caja en medio YCB-Acetamida 5mM (Figura 15) el crecimiento celular demuestra que es posible la inserción de un cassette de expresión integrado al DNA genómico de *K. lactis* GG799 al mostrar un crecimiento cuantificable en un medio selectivo.



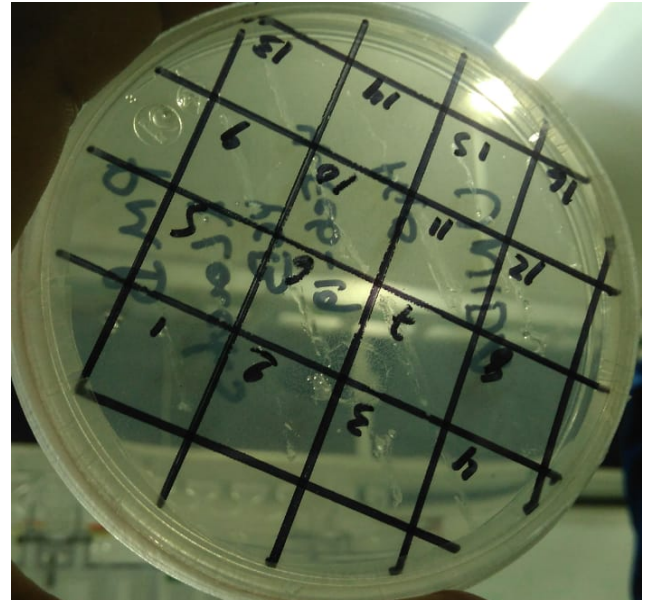
(1)

(2)

Figura 14. Clonas transformadas de *K. lactis* GG799 por medio de la inserción del cassette de expresión linealizado que contiene los vectores recombinantes pKLAC2pInNC8A (1) y pKLAC2pInNC8 B (2)



(1)



(2)

Figura 15. Censo de las clonas transformadas de *K. lactis* GG799, pKLAC2-*plnNC8A* (1) y pKLAC2-*plnNC8 B* (2).

La inserción de los vectores recombinantes fue positiva, por lo tanto los vectores recombinantes pKLAC2-*plnNC8A* y pKLAC2-*plnNC8B* fueron integrados al DNA cromosómico de la levadura *K. lactis* GG79

7.- CONCLUSIONES

A partir del DNA cromosómico de *Lactobacillus plantarum* SP-50 se pudieron recuperar los genes que codifican para los péptidos a y b mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Se realizaron las construcciones correspondientes a los péptidos a y b en el vector pKLAC2 para generar los vectores pKLAC2-*pInNC8A* y pKLAC2-*pInNC8B*.

A partir de los vectores pKLAC2-*pInNC8A* y pKLAC2-*pInNC8B* fue posible transformar la cepa *K. lactis* GG799 y corroborar por PCR y por crecimiento en medio con acetamida la inserción del cassette de transformación en el DNA cromosómico de la cepa.

8.- RECOMENDACIONES

Evaluar el uso de vectores recombinantes en bacteriocinas de clase I (a, b y c), así como en bacteriocinas de clase IIa secuenciadas (Sakacina, Pediocina y Enterocina), las cuales no necesitan un efecto sinérgico entre dos péptidos para la producción del efecto bactericida.

Evaluar el espectro antimicrobiano ante la cepa sensible *L. p.* BG101, de las cepas recombinantes en sinergia.

Ligar los genes recombinantes plnNC8A y plnNC8B en una proporción 1:16 respectivamente, para la evaluación de la inhibición de la cepa testigo *L. plantarum* BG101.

9- REFERENCIAS

Álvarez-Parrilla, 2006. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas. Disponible en: http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf, [Consulta 09/ Nov. /2007]

Abriouel *et al.*, 2011

Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N.B. y Gálvez, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiology Reviews. 2011;35(1):201-232.

Alquicira *et al.*, 2006

Alquicira, L. 2006. Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana. México.100 p.

Bernbom *et al.*, 2009

Bernbom N., Jelle B., Brogren C-H., Vogensen F.K., Nørrung B., Licht T.R. Pediocin PA-1 and a pediocin producing *Lactobacillus plantarum* strain do not change the HMA rat microbiota. Int J Food Microbiol. 2009; 130(3):251–257

Beshkova y Frengova, 2012

Beshkova, D., Frengova, G. Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. Engineering in Life Sciences. 2012; 12(4):1-14.

Borrero *et at.*, 2012

Borrero J., Kunze G., Jiménez J. J., Böer E., Gútiez L., Herranz C., Cintas L.M., Hernández P.E. Cloning, production and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*,

Kluyveromyces lactis, *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans*. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(59): 56–61

Caro *et al.*, 2013

Caro I., Mateo J., Sandoval M.H., Soto S., García-Armesto M.R., Castro J.M. Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains. *J. Dairy Sci.* 2013; 96: 3461–3470.

Carr *et al.*, 2002

Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002; 28: 281–370.

Cintas *et al.*, 2001

Cintas L.M., Casaus M.P., Herranz C., Nes I.F., Hernández P.E. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science Technology International.* 2001; 7(4):281- 305.

Chen y Hoover, 2003

Chen, H. y Hoover D.G. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2003; 2:82-100.

Cleveland *et al.*, 2001

Cleveland, J., Monteville, T.J., Nes, I.F. y Chikindas, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology.* 2001; 71(1):1-20.

Colussi *et al.*, 2005

Colussi, P.A. Characterization of a nucleus-encoded chitinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Appl Environ. Microbiol.* 2005; 71: 2862–2869

Cotter *et al.*, 2005

Referencias

Cotter, P.D., Hill, C. y Roos, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*.2005;3(10):777- 788

Das y Hollenberg, 1982

Das S. y Hollenberg C.P. A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet*. 1982; 6:123–128.

Deegan *et al.*, 2006

Deegan, L. H.; Cotter, P. D.; Hill, C. and Ross, P. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*. 2006; 61: 1058-1071.

Dimov *et al.*,2005

Dimov, S.G., Ivanova, P.M., Harizanova, N.T. y Ivanova, I.V. Bioactive peptides used by bacteria in the concurrence for the ecological niche: general classification and mode of action (overview). *Biotechnology and Biotechnological Equipement*. 2005; 2:3-22.

Dobson *et al.*, 2012

Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol*. 2012; 78:1–6.

Dodd *et al.*, 1996

Dodd, H. M., N. Horn, W. C. Chan, C. J. Giffard, B. W. Bycroft, G. C. K. Roberts, and M. J. Gasson. Molecular analysis of the regulation of nisin immunity. *Microbiology*. 1996; 142: 2385–2392.

Dujon, 2004

Dujon B., Sherman D., Fisher G. Genome evolution in yeasts. *Nature*. 2004; 430: 35-44.

Eijsink et al., 2002

Eijsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Ha°varstein, H. Holo, and I. F. Nes. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Leeuwenhoek*. 2004; 81: 639–654.

Ennahar *et al.*, 2000

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. & Ishizaki, A. Class Ila bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev*. 2000; 24: 85–106

Garneau et al., 2002

Garneau, S., Martin, N.I., Vedras, J.C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. 2002; 84: 577–592.

Gautam y Sharma, 2009

Gautam, N. y Sharma, N. Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian Journal Microbiology*. 2009; 49(3): 204-211.

Hassan *et al.*, 2012

Hassan, M., Kjos, M., Diep, D.B. y Lotfipour, F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 2012; (1):1-14.

Hurtado *et al.*, 2011

Hurtado A., Ben O. N., Chammem N., Hamdi M., Ferrer S., Reguant C., Bordons A., Rozès N. Characterization of *Lactobacillus* isolates from fermented olives and their bacteriocin gene profiles. *Food Microbiol*. 2011; 28: 1514-1518

Jack *et al.*, 1995

Referencias

Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 1995; 59(2): 171-200.

Jeevaratnam *et al.*, 2005

Jeevaratnam K., Jamuna M. y Bawa A.S. Biological preservation of foods-bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*. 2005; 4: 446-454.

Jenssen *et al.*, 2006

Jenssen, H., Hamill, P. y Hancock, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 19(3): 491-511.

Jiménez *et al.*, 2013

Jiménez J.J., Borrero J., Diep D.B., Gútiez L., Nes I.F., Herranz C., Cintas L.M., Hernández P.E. Cloning, production and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 40: 977–93.

Jiménez *et al.*, 2015

J.J. Jiménez, D.B. Diep, J. Borrero, L. Gútiez, S. Arbulu, I.F. Nes, C. Herranz, L.M. Cintas, P.E. Hernández. Cloning strategies for heterologous expression of the bacteriocin enterocin A by *Lactobacillus sakei* Lb790, *Lb. plantarum* NC8 and *Lb. casei* CECT475. *Microb. Cell Fact.* 2015; 14 (1)

Juarez-Anguiano, 2017

Kleerebezem *et al.*, 2002

Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O. P., Leer R., *et al.* Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002; 100: 1990-1995.

Kumar y Srivastava, 2008

Kumar S. y Srivastava S. Statistical Optimization of Culture Components for Enhanced Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* LR/14. Food Biotechnology. 2008; (22): 64-77

Leroy y DeVuyst, 2010

Leroy .F y de Vuyst L. Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products. Aust J Dairy Tech. 2010; 65(3):143–149

Maldonado *et al.*, 2002

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R., Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8. a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. Applied and Environmental Microbiology. 2002; 69(1): 383–389

Maldonado *et al* 2003

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel co-culture inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. Applied and Environmental Microbiology. 2003; 69: 383–389.

Maldonado *et al.*, 2004

Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J.L.. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific Gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. Journal of Bacteriology. 2004; 186: 1556–1564.

Mataragas *et al.*, 2004

Mataragas M., Drosinos E.H., Tsakalidou E., Metaxopoulos J. Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol.* 2004; 85(3): 191–198

McAuliffe *et al.*, 2001

McAuliffe, O., Ross, R.P. y Hill, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews.* 2001: 25(3): 285-308.

Moll *et al.*, 1999

Moll, G.N., Van Den Akker, E., Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. Complementary and overlapping selectivity of the two peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 4848–4852.

Murua *et al.*, 2013

Murua, A., Todorov, S. D., Vieira, A. D. S., Martinez, R. C. R., Cencic, A. and Franco, B. D. Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of *Lactobacillus plantarum* with potential beneficial properties from donkey milk. *J Appl Microbiol.* 2013; 114: 1793–1809.

Nes y Holo, 2000

Nes I.F. y Holo H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers.* 2000; 55(1): 50-61.

Nes *et al.*, 1996

Nes, I. F., Diep, L. S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek.* 1996; 70:

113–128.

Nes *et al.*, 2007

Nes I.F.1, Diep D.B., Holo H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol.* 2007-Feb; 189 (4):1189-98

Nissen-Meyer *et al.*, 2010

Nissen-Meyer J., Oppegård C., Rogne P., Haugen H. S., Kristiansen P. E. Structure and Mode of Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2010-Mar; 2(1): 52–60

Nissen-Meyer *et al.*, 1992

Nissen-Meyer J., Holo H., Havarstein L. S., Sletten K. y Nes I. F. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol.* 1992; 174: 5686–5692

Oppergård *et al.*, 2007

Oppergård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G. y Nissen-Meyer, J. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 2007; 13(4):210-219.

Perín *et al.*, 2012

Perin L. M., & Mendonça-Moraes P., Silva Jr. A., Nero L. A. Lantibiotics biosynthesis genes and bacteriocinogenic activity of *Lactobacillus spp.* isolated from raw milk and cheese. *Folia Microbiol.* 2012; 57: 183–190

Portilla-Vázquez *et al.*, 2016

Portilla-Vázquez S., Rodríguez A., Ramírez-Lepe M., Mendoza-García P. G. y Martínez B. Biodiversity of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Mexican Regional Cheeses and their Contribution to Milk Fermentation, *Food Biotechnology.* 2016; 30(3): 155-172

Prescott *et al.*, 2002

Prescott, L. M., Harley, J. P., y Klein, D. A. Microbiología. 5ª edición. McGraw-Hill Interamericana, 2002. Cap. 23.

Quintero, 2006

Quintero B.S. Incorporación de la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 en películas y recubrimientos comestibles. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana. México. 2006; 111 p.

Read *et al.*, 2007

Read, J.D. Acetamide selection of *Kluyveromyces lactis* cells transformed with an integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73: 5088-5096.

Stoyanova *et al.*, 2012

Stoyanova L.G., Ustyugova E.A. y Netrusov A.I. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2012; 48(3): 229-243.

Šušković *et al.*, 2010

Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš A., Habjanič K. y Matošić S. Antimicrobial activity - the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology.* 2010; 48(3): 296-307.

Todorov, 2009

Todorov S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action. *Braz J Microbiol.* 2009 Apr-Jun; 40(2): 209–221.

Referencias

Todorov y Franco, 2010

Todorov S. D. y Franco B.D. *Lactobacillus plantarum*: characterization of the species and application in food production. *Food Rec Int.* 2010; 26: 205-229

Van Ooyen *et al.*, 2006

Van Ooyen, A.J. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6: 381–92.

Wu *et al.*, 2004

Wu C.W., Yin L.J. y Jiang S.T. Purification and characterization of bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2004; 52: 1146-1151.

11.- APÉNDICES

Apéndice A:

Se muestra la composición por litro de los medios empleados en el crecimiento. Antes de su uso, los medios se esterilizaron en autoclave (121°C, 15 lb) durante 15 minutos.

Medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe (MRS), (1L).

Componente	g/L ó mL/L	Unidad
D-GLucosa	20	g
Peptona de caseína	10	g
Extracto de carne	8	g
Extracto de levadura	4	g
Fosfato dipotásico	2	g
Acetato de sodio	5	g
Citrato de amonio	2	g
Sulfato de magnesio	0.2	g
Sulfato de manganeso	0.4	g
Tween 80	1	mL

pH final: 6.8.

Medio de Cultivo Luria Bertani (LB), (1L).

Componente	g/L
Extracto de levadura	5
Cloruro de Sodio	5
Bactotripton	10
*Agar	15

Medio de Cultivo YCB (1L).

Componente	g/L ó mL/L	Unidad
Tris-HCl (1M)	15	mL
Medio base de levadura YCB	5.85	g
Agar	10	g
Agua desionizada	495	mL
Acetamida (100X)	5	mL

La mezcla se llevó a cabo en un contenedor autoclavable el Tris-HCl, el medio base de levadura (New England Biolabs™), y el agar se aforaron con 495 mL de agua desionizada. Se esterilizó durante 20 min a 121°C.

La mezcla fue enfriada a temperatura ambiente hasta llegar a 60°C aproximadamente, finalmente se agregó la acetamida en condiciones de esterilidad.

Medio de cultivo Levadura-Glucosa (Y-Glu), (1L).

Componente	g/L ó mL/L	Unidad
Extracto de levadura	10	g
Bactopeptona	20	g
Solución de glucosa (40%)	50	mL
Agua desionizada	950	mL
Agar*	20	g

Se disolvieron el extracto de levadura, la bactotriptona en 950 mL de agua desionizada. La mezcla se esterilizó durante 20 min a 121°C, fue enfriada a temperatura ambiente y en condiciones estériles se agregó una solución de glucosa 40% previamente esterilizada.

Medio de cultivo Levadura-Galactosa (Y-Gal), (1L).

Componente	g/L ó mL/L	Unidad
Extracto de levadura	10	g
Bactopeptona	20	g
Solución de galactosa (40%)	50	mL
Agua desionizada	950	mL
Agar*	20	g

Se disolvieron el extracto de levadura, la bacto triptona en 950 mL de agua desionizada. La mezcla se esterilizó durante 20 min a 121°C, fue enfriada a temperatura ambiente y en condiciones estériles se agregó una solución de galactosa 40% previamente esterilizada.

Apéndice B:**Gel de agarosa 1% (30mL)**

Componente	g/L ó mL/L	Unidad
Agarosa grado electroforético	0.3	g
TAE 50X	600	μL

*Aforar a 30mL de agua destilada

Amortiguador Tris-Acetato-EDTA (TAE). Solución de stock 50X, (1L).

Componente	g/L ó mL/L	Unidad
Tris Base	242	g
Ácido acético glacial	57.1	mL
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2	g

*Aforar a un litro de Agua destilada

Apéndice C:

Figura 11.1 Cinética de crecimiento de *L. plantarum* SP-50 y SP-68 en caldo MRS (Juarez-Anguiano, 2017).

