



EL MÉTODO DE INTERCAMBIO ALÉLICO COMO HERRAMIENTA PARA LA MODIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE APLICACIÓN EN ALIMENTOS.

Carlos Eduardo Serrano-Maldonado y Maricarmen Quirasco. Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química. Depto. Alimentos y Biotecnología, Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México.

quirabma@unam.mx, Tel. (55) 5622-5305.

Palabras clave: Enterococcus faecalis, bacteriocinas, intercambio alélico sin marcadores.

Introducción. *Enterococcus faecalis* es una bacteria ácido láctica, puede crecer en altas concentraciones de NaCl, amplios rangos de pH y temperatura, por lo que se encuentra en muchos ambientes, incluidos los alimentos. En el grupo de trabajo se aisló una cepa de *E. faecalis* de queso Cotija artesanal, con actividad antibacteriana en contra de algunos microorganismos patógenos, la cual está dada parcialmente por peptidoglucano hidrolasas (1). Por otra parte, dicha cepa no produce enterocinas (2).

El objetivo de este trabajo fue clonar y expresar la Enterocina A en la cepa de *E. faecalis* aislada de queso Cotija a través de la integración del gen correspondiente al cromosoma, mediante la técnica de intercambio alélico sin marcadores de resistencia a antibióticos, con el fin de aplicar a la cepa recombinante como cultivo protector en alimentos.

Metodología. Para incrementar la actividad antibacteriana de la cepa de *E. faecalis*, se clonó la enterocina A mediante su integración al cromosoma, empleando la técnica de intercambio alélico sin marcadores (3) en un sitio que no altera la expresión de los demás genes (4) (Figura 1).

La integración del gen al cromosoma se detectó por PCR, con cebadores específicos, y la expresión mediante SDS-PAGE Tris-Tricina y zimogramas con *Listeria innocua* como indicador.

aislada de queso Cotija y se le fusionó el péptido señal de la Enterocina P para que pudiera ser secretado por la vía dependiente de Sec. La quimera fue subclonada en el vector pSD15, el cual contiene las secuencias necesarias para la recombinación en la cepa receptora. A partir de esta construcción, se digirió un fragmento de 720 pb, que coincide con el peso esperado (Figura 2).

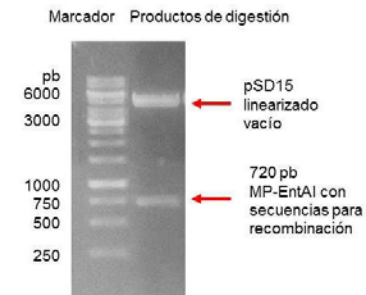


Fig. 2. Construcción del gen de la enterocina A con el péptido señal de la enterocina P y los sitios de recombinación digerida de pSD15 con la enzima SmaI. Gel de Agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

El fragmento fue insertado en el plásmido pRV1, previamente digerido con SmaI. Esta construcción se utilizó para transformar una cepa de *E. faecalis* (CK111), la que, mediante conjugación, transfirió el plásmido a la cepa receptora de *E. faecalis*. Posteriormente, mediante recombinación homóloga, el gen de la enterocina A fue integrado a su cromosoma, lo que se comprobó mediante PCR utilizando cebadores específicos para el gen *entA*. Esta técnica presenta la ventaja de que se elimina la necesidad de utilizar antibióticos como marcadores de selección, además de que no se pierde el gen insertado por pérdida del plásmido, ya que se integra a cromosoma.

Conclusiones. La técnica de intercambio alélico permitió integrar el gen de la enterocina A al cromosoma de una cepa de *E faecalis* aislada de queso Cotija sin dejar ningún marcador de resistencia a antibióticos, por lo que podría proponerse para su aplicación en un alimento.

Agradecimiento. PAPIIT IN222115, DGAPA-UNAM.

Bibliografía.

- García-Cano I, Serrano-Maldonado CE, Olvera-García M, Delgado-Arciniega E, Peña-Montes, Mendoza-Hernández G, Quirasco M. (2014). *LWT Food Sci Technol.* 59:26-34.
- Olvera-García ME. (2013). Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Kristich CJ, Chandler JR, Dunny GM. (2007). *Plasmid.* 57:131-144.
- DebRoy S, van der Hoeven R, Singh KV, Gao P, Harvey BR, Murray BE, Garsin DA. (2012). *J Microbiol Methods.* 90:1-8.

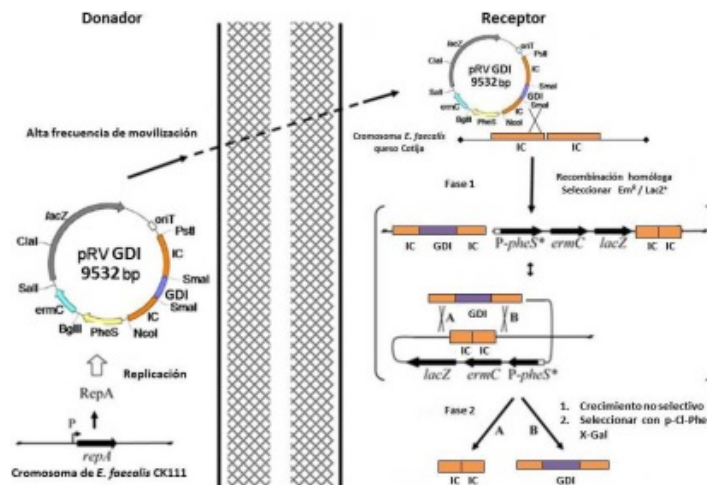


Fig. 1. Técnica de intercambio alélico sin marcadores

Resultados. El gen de la Enterocina A fue amplificado a partir del ADN cromosomal de una cepa de *E. faecium*