



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA PRODUCIDA POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE QUESO COTIJA ARTESANAL

Carlos Eduardo Serrano-Maldonado, Israel García-Cano, Maricarmen Quirasco Baruch.  
Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química. Depto. Alimentos y Biotecnología.  
Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México. [quirabma@unam.mx](mailto:quirabma@unam.mx), Tel. (55) 5622-5305.

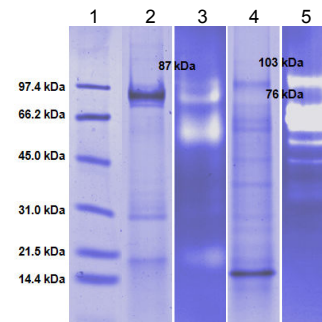
*Palabras clave:* Queso Cotija, *Enterococcus faecalis*, peptidoglucano hidrolasas.

**Introducción.** El queso Cotija es un alimento artesanal elaborado con leche bronca, sin la adición intencional de cultivos iniciadores. Después de tres meses de maduración su calidad microbiológica es aceptable y el número de coliformes totales disminuye drásticamente (1). Lo anterior se ve influenciado por el crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) durante la maduración, así como a los cambios de factores fisicoquímicos como el  $a_w$ , pH y acidez (1). Recientemente, se ha reportado que algunas cepas de BAL del género *Enterococcus* aisladas del queso Cotija, producen proteínas extracelulares que tienen un efecto antibacteriano (2). El objetivo de este trabajo fue la identificación y caracterización de proteínas con actividad antibacteriana a partir de dichos enterococos.

**Metodología.** Se estudiaron dos cepas de *Enterococcus faecalis* (G e I), las cuales fueron cultivadas en medio MRS. Las proteínas extracelulares fueron precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 40% (p/v) y dializadas con una membrana de 1 kDa de tamaño de corte. Posteriormente, la fracción proteínica fue precipitada con TCA al 10% (v/v). Por SDS-PAGE y zimogramas (3) se identificó el peso molecular y la actividad contra *S. aureus*, *E. coli* y *M. lysodeikticus*. Las fracciones precipitadas fueron tratadas con tripsina para comprobar su naturaleza y con distintos agentes reductores para determinar la presencia de puentes disulfuro; así mismo, se determinó la presencia de azúcares en la proteína. Algunas bandas que presentaron actividad lítica en zimograma se seleccionaron para ser secuenciadas parcialmente por medio de LC-MS/MS (IBT-UNAM). Los resultados fueron analizados mediante el algoritmo BLAST para determinar su identidad.

**Resultados.** En la Figura 1 se muestra el perfil electroforético y los zimogramas de las proteínas extracelulares, parcialmente puras, de las cepas en estudio. La banda de 87 kDa de la cepa G tuvo actividad lítica contra *M. lysodeikticus* y *S. aureus*. La cepa I presentó dos bandas de actividad lítica, de 76 y 103 kDa, ambas activas contra *M. lysodeikticus*, *S. aureus* y *E. coli*. El zimograma del extracto proteínico tratado con tripsina mostró la pérdida de la actividad lítica al 100%. El tratamiento con distintos agentes reductores no presentó efecto sobre la actividad antibacteriana, lo que indica la ausencia de puentes disulfuro en la estructura de las

proteínas involucradas. Se determinó la presencia de residuos de manosa en la proteína.



**Fig. 1.** SDS-PAGE 12%. 1, marcador de peso molecular bajo; 2 y 4, SDS-PAGE cepas G e I, respectivamente; 3 y 5, zimograma contra *M. lysodeikticus* cepas G e I respectivamente.

Los resultados de la secuenciación parcial de las tres proteínas se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Resultados de la secuenciación de bandas con actividad.

Cepa	Banda (kDa)	Región
G	87	NplcP60 (Endopeptidasa)
I	76	SCP (involucrada en degradación de pared celular)
	103	Dos proteínas con región N-acetilglucosaminidasa

La banda de la cepa I que se observó a 103 kDa está formada por dos proteínas de distintos pesos que migran juntas en la electroforesis. Ambas tienen una región de N-acetilglucosaminidasa. Todas las proteínas son putativas, a excepción de una de las glucosaminidasas que ya ha sido caracterizada (4).

**Conclusiones.** La actividad antibacteriana producida por las dos cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas del queso Cotija se debe a enzimas llamadas peptidoglucano hidrolasas; las cuales están glicosiladas con manosa, son sensibles a tripsina y cuya actividad no se ve afectada por agentes reductores.

**Agradecimiento.** PAPIIT IN213109. DGAPA-UNAM.

### Bibliografía.

- Bravo A. (2008). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Hernández A. (2010). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Leclerc D, Asselin A. (1989). *Can. J. Microbiol.* 35:749-753.
- Béliveau C, Potvin C, Trudel J, Asselin A, Bellemare G. (1991). *J. Bacteriol.* 173(18):5619-5623.