

Artículo original

Caracterización parcial de enterocinas producidas por una cepa de *Enterococcus faecium* aislada de leche ovina

Marisol Vallejo^{a,*}, Pablo Ledesma^b, Emilio Rogelio Marguet^a

^aCátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), Patagonia, Argentina. ^bCátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew, UNPSJB, Argentina.

Recibido 20 de abril de 2012; aceptado 6 de septiembre de 2012

Resumen: Los enterococos son constituyentes de la microflora de quesos artesanales y contribuyen a sus características organolépticas. También producen enterocinas que pueden prevenir el crecimiento de patógenos alimentarios. En este estudio se aislaron 27 cepas de enterococos a partir de leche y queso ovinos provenientes de la Patagonia (Argentina) y se investigó la producción de bacteriocinas. De las 27 cepas aisladas, 22 cepas de *Enterococcus faecium* y 1 cepa de *E. faecalis* inhibieron el crecimiento de *Listeria innocua* ATCC 33090. *E. faecium* Tw6 mostró la mayor actividad antimicrobiana entre las cepas estudiadas y se seleccionó con el propósito de caracterizar el principio activo y su espectro de inhibición. La tripsina abolió la actividad antilisteria, lo que sugiere que el compuesto activo es de naturaleza proteica; resultó ser estable al calor, resistente al pH y permaneció estable durante más de 12 meses. La masa molecular determinada mediante electroforesis fue aproximadamente de 5,6 KDa. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mostró la presencia de múltiples secuencias de enterocinas (entA, entB, entP y entL50A/B). Las características físico-químicas y bioquímicas de las enterocinas producidas por *E. faecium* Tw6 las convierten en potenciales candidatas para ser utilizadas en la conservación de alimentos.

Palabras clave: enterocinas, actividad antilisteria, leche ovina, queso ovino.

Partial characterization of enterocins produced by an *Enterococcus faecium* strain isolated from ovine milk

Abstract: Enterococci are part of the microflora of artisan type cheese and contribute to their organoleptic characteristics. They also produce enterocins which can prevent the growth of food pathogens. In this study 27 enterococci strains were isolated from ovine milk and cheese produced at the Argentine Patagonia and they were investigated regarding their bacteriocin production. Of the 27 strains isolated, 22 *Enterococcus faecium* and one *E. faecalis* inhibited the growth of *Listeria innocua* ATCC 33090; *E. faecium* Tw6 showed the highest antimicrobial activity among the strains studied and it was selected with the purpose of characterizing the active principle and its inhibition spectrum. Trypsin abolished antilisteria activity, which suggests that the active component has a protein nature; it was heat stable, pH resistant, and it remained stable during more than 12 months. The molecular mass determined by electrophoresis was approximately 5.6 KDa. The polymerase chain reaction (PCR) showed the presence of multiple enterocin sequences (entA, entP, and ent50A/B). The physicochemical and biochemical characteristics of the enterocins produced by *E. faecium* Tw6 identify them as a potential candidates for use in food preservation.

Keywords: enterocins, antilisteria activity, ovine milk, ovine cheese.

* Correspondencia:
E-mail: soltrelew@yahoo.com.ar

Introducción

En forma fortuita o intencional, las bacterias ácido lácticas (BAL) han estado presentes en la alimentación humana desde hace siglos. El hombre ha aprendido diferentes formas de utilizarlas en la elaboración de productos fermentados

(carne, vegetales, frutas, bebidas y derivados lácteos), heredando por generaciones las técnicas aplicadas.

El efecto conservador de las BAL durante la fabricación y el almacenamiento de los alimentos fermentados se debe a la producción de diversos metabolitos con actividad antimicrobiana que se han utilizado con éxito en la conservación

de los alimentos, destacándose dentro de este grupo, las bacteriocinas, péptidos con actividad específica [1,2]. Un gran número de bacteriocinas provenientes de diversos géneros de BAL han sido estudiadas por su capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos contaminantes de alimentos, en particular *Listeria monocytogenes* [3-9].

En los últimos años, ha cobrado relevancia dentro de las BAL el género *Enterococcus*, porque se caracteriza por la alta producción de bacteriocinas, conocidas en forma general como enterocinas. Estos péptidos exhiben actividad antimicrobiana frente a especies de bacterias grampositivas relacionadas, tanto de patógenas como de contaminantes de alimentos [5-7].

En la actualidad, la clasificación más aceptada es la publicada por Franz *et al* [10], donde las enterocinas se agrupan en 4 clases principales. Las enterocinas de clase II son las más frecuentemente halladas en cepas de enterococos y se dividen en 2 subclases: las enterocinas relacionadas con la pediocina y las que se sintetizan sin péptido líder.

Otros rasgos característicos del género y que son de importancia industrial son la resistencia que exhiben a las temperaturas de pasteurización, así como su adaptabilidad a diversos sustratos y factores que condicionan el crecimiento (pH extremo y salinidad). En consecuencia, estos microorganismos pueden encontrarse en alimentos elaborados con materia prima cruda (leche o carne) y en los productos tratados por el calor, constituyéndose en una parte importante de la microbiota de alimentos fermentados, sobre todo en quesos y carnes [11-14].

En años recientes, los informes sobre el uso de los enterococos como cultivos iniciadores o como cultivos adjuntos han aumentado considerablemente [1,2,12]. Su presente uso en la elaboración de alimentos es fuertemente debatido desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. Algunas especies, particularmente *E. faecium* y *E. faecalis* han sido asociadas e identificadas como agentes etiológicos de enfermedades humanas y animales [15-17]. Sin embargo, su utilización en la industria alimentaria no constituye un riesgo particular para la salud, ya que de hecho no existen registros de infecciones que estén relacionadas con este origen [2,18].

Debido a las características geográficas y climáticas, el ganado ovino constituye la especie más explotada en la Patagonia Argentina. En los últimos años, la elaboración de quesos de leche ovina ha significado una nueva alternativa económica en esta región. Se ha determinado en distintos estudios y en diferentes regiones del mundo, que la presencia de cepas del género *Enterococcus* es habitual en este tipo de producto, aún en aquellos que son procesados bajo estrictas normas de elaboración [11,12,19,20].

En el presente trabajo se aislaron cepas del género *Enterococcus* de leche y quesos ovinos de la región patagónica y posteriormente se seleccionaron aquellas que presentaron actividad antagonista frente a *Listeria innocua* ATCC 33090. Dentro de este grupo se seleccionó, por presentar la más alta actividad, la cepa de *E. faecium* Tw6 para realizar estudios posteriores. El objetivo del trabajo fue

estudiar las características físicas, químicas y biológicas del principio activo de la cepa de *E. faecium* Tw6, determinar la capacidad antagonista frente a distintos patógenos habitualmente hallados en alimentos y determinar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la presencia de genes estructurales de enterocinas.

Materiales y métodos

Toma de muestras y aislamiento: Las muestras de leche ovina se obtuvieron mediante ordeño mecánico de animales pertenecientes a tambos ubicados en el valle inferior del río Chubut (Patagonia, Argentina). Se trasladaron a 4 °C y se conservaron a -30 °C hasta el momento de su procesamiento. Las muestras de quesos se extrajeron con sacabocados estériles y se procesaron dentro de las 4 h de obtenidas.

Las muestras de leche se sembraron en caldo púrpura de bromocresol-azida (Merck, Argentina) con una concentración de NaCl (6,5%) (Anedra, Argentina). Las muestras de queso se procesaron de igual manera, previa homogenización de 1 g de material en 10 mL de agua destilada estéril. Luego de 48 h de incubación a 35 °C los cultivos se sembraron en agar Man Rogosa Sharp (MRS) (Biokar, Francia), suplementado con NaCl (6,5%), 40 µg/mL de ácido nalidixico (Sigma, EE.UU.) y 10 µg/mL de cicloheximida (Sigma, EE.UU.).

Las colonias se estudiaron mediante la coloración de Gram, prueba de la catalasa, prueba de la oxidasa, crecimiento a 45 °C, hidrólisis de la esculina y crecimiento en bilis al 40% [21]. Además, se estudió la actividad de pirrolidonil aminopeptidasa mediante un kit comercial (pyrrolidonyl peptidase strips; BioChemika, Sigma, EE.UU.).

Identificación fenotípica: Las colonias aisladas se identificaron a nivel de género y especie según las recomendaciones de Manero *et al* [22]. Las cepas se conservaron en una suspensión de leche descremada al 10% suplementada con glicerol al 10% a -30 °C y se ingresaron al cepario perteneciente a la Cátedra de Biología Celular y Molecular (Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia) de acuerdo con los códigos establecidos por el laboratorio.

Identificación genotípica: Luego de una incubación a 35 °C durante 12 h en caldo MRS, las cepas de enterococos se centrifugaron a 12.000 g a 4 °C durante 5 min y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Mediante la reacción de PCR se amplificó el gen que codifica el ARNr 16S, con un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ, EE.UU.), usando los cebadores universales para procariontes 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3', según lo descrito por DeLong [23]. Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc.

(Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [24].

Actividad antagónica de las cepas aisladas. Ensayos antimicrobianos de los sobrenadantes: Las cepas de enterococos se cultivaron en caldo MRS a 35 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (12-16 h). Luego del período de incubación, los cultivos se centrifugaron a 8.000 g a 4° C durante 10 min, los sobrenadantes libres de células (SLC) se ajustaron a pH 7,0 con NaOH 0,5 M (Anedra, Argentina) y se sometieron a un calentamiento de 100 °C durante 5 min. Posteriormente, los SLC se filtraron utilizando membranas Sartorius de 0,22 µm de diámetro de poro (Sartorius, Alemania) y se almacenaron a -30 °C hasta su uso.

Los SLC tratados de las 27 cepas estudiadas se emplearon en el ensayo antimicrobiano que se realizó por el método de difusión en placa [8]. Se colocaron 50 µL de SLC en pocillos (6 mm de diámetro) practicados en placas de agar tripticasa soja (Britania, Argentina), sembrados previamente con 50 µL de un cultivo de una noche (0,5 de la escala Mc Farland) de *Listeria innocua* ATCC 33090. Las placas se mantuvieron a 4-8 °C durante 2 h y luego se incubaron a 30 °C durante 24 h. El efecto antimicrobiano se expresó en mm, midiendo el halo de inhibición de crecimiento con un micrómetro (Starrett, USA).

Con el propósito de evaluar el espectro de inhibición de la cepa *E. faecium* Tw6, seleccionada sobre la base de su actividad frente a *Listeria innocua* ATCC 33090, se utilizaron los microorganismos indicadores en las condiciones de crecimiento mencionadas en la tabla 1.

Caracterización físico-química del principio activo:

Estabilidad térmica: El SLC neutralizado se sometió a temperaturas de 100 y 121 °C durante 5, 15 y 30 min. Además, se ensayó la estabilidad del sobrenadante a la congelación-descongelación, conservándolo a -30 °C. Periódicamente se descongeló y se ensayó la actividad residual. De igual forma se probó la estabilidad a temperatura de refrigeración (4 °C). En todos los casos la actividad residual se determinó

mediante el método de difusión en placa, utilizando a *L. innocua* ATCC 33090 como cepa indicadora.

Sensibilidad a enzimas: La sensibilidad a enzimas proteolíticas se llevó a cabo determinando la actividad residual según la técnica antes mencionada, luego de tratar el SLC con pepsina (Sigma, EE.UU.), tripsina (Sigma, EE.UU.) y bromelina (Sigma, EE.UU.) a una concentración de 1 mg/mL. Los sobrenadantes utilizados para tripsina se llevaron a pH 7,0 con NaOH 0,5 M, mientras que las restantes enzimas proteolíticas se ensayaron con los sobrenadantes a pH 4,5. Las muestras se incubaron durante 1 h a la temperatura óptima de cada enzima (25 °C: tripsina y bromelina; 37 °C: pepsina).

La sensibilidad a la lisozima (Sigma, EE.UU.), catalasa (Sigma, EE.UU.) y lipasa (Sigma, EE.UU.) se llevó a cabo tratando el sobrenadante con NaOH 0,5 M hasta lograr un pH de 7,2 y se incubaron durante una hora a 25 °C para lisozima y 37 °C para catalasa y lipasa. La actividad antimicrobiana residual se determinó de la misma forma que en los casos anteriores. Se utilizaron testigos o controles que correspondieron a las soluciones de cada enzima.

Influencia del pH: Se determinó la estabilidad del SLC de la cepa seleccionada desde un pH de 3 hasta un pH de 12, mediante la adición de soluciones tamponadas esterilizadas y preparadas a una concentración 0,2 M. Las muestras se incubaron durante 4 h a 30 °C y la actividad residual se determinó por el procedimiento previamente descrito.

Precipitación y cromatografía de intercambio iónico: La bacteriocina se purificó a partir de 500 mL de un cultivo de la cepa *E. faecium* Tw6 incubada en caldo MRS a 35 °C hasta alcanzar la fase estacionaria. Se empleó el SLC luego de una centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 4 °C, sometiéndolo a precipitación diferencial con alcohol absoluto (Anedra, Argentina) en dos etapas. Durante la primera etapa se adicionó alcohol absoluto hasta alcanzar el 20% de saturación, manteniéndose durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10.000 g durante 15 min y al nuevo sobrenadante se le adicionó alcohol absoluto hasta completar el 80% de saturación y se lo mantuvo a 4 °C durante 30 min. La muestra se centrifugó nuevamente y el precipitado se conservó a 4 °C hasta su utilización.

Luego de la precipitación se llevó a cabo una cromatografía de intercambio aniónico en QAE-Celulosa en una columna de 30 mL y con una velocidad de flujo de 3 mL/min, según el esquema propuesto por NG-Kwai-Hang y Pélissier [25]. La muestra fue diluida con 30 mL de buffer Imidazol 0,02 M, pH 8 y la elución se realizó en un rango de 0 a 0,3 M de NaCl.

Las lecturas de absorbancia de las fracciones se determinaron a 280 nm mediante un espectrofotómetro modelo Jenway 6405 (Bibby Sterling Ltd, London) y su actividad se determinó mediante el método de difusión en placa antes mencionado.

Determinación del peso molecular de la bacteriocina: El

Tabla 1. Cebadores específicos para la detección de los genes estructurales de enterocinas mediante PCR.

Enterocinas	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)
A	F: GGT ACC ACT CAT AGT GGA AA R: CCC TGG AAITGC TCC ACC TAA	138
B	F: CAAAAT GTAAAA GAA TTA AGT ACG R: AGA- GTA TAC ATT TGC TAA CCC	201
P	F: GCT ACG CGT TCA TAT GGT AAT R: TCC TGC AAT ATT CTC TTT AGC	87
LB50A	F: ATG GGA GCA ATC GCA AAA TTA R: TTT GTT AAT TGC CCA TCC TTC	274
LB50B	F: ATG GGA GCA ATC GCA AAA TTA R: CCT ACT CCT AAG CCT ATG GTA	274

peso molecular de la fracción activa se determinó mediante una electroforesis desnaturante (Tricina SDS-PAGE) descrita por Pardo y Natalucci [26] y el zimograma o “revelado biológico” de acuerdo a la técnica sugerida por Foulquié Moreno *et al.* [5].

Detección de genes estructurales de enterocinas: Los cebadores y protocolos utilizados en la reacción de PCR para la amplificación de los genes estructurales de las enterocinas A, B, P, LB50A y LB50B se mencionan en la tabla 1, según lo descrito por De Vuyst *et al.* [27].

Resultados

En total, se aislaron 27 cepas pertenecientes al género *Enterococcus* (18 de leche y 9 de queso), las cuales presentaron los rasgos fenotípicos que son utilizados para distinguir dicho género de otros cocos grampositivos, catalasa negativos y anaerobios facultativos. Las pruebas diferenciales realizadas fueron: capacidad de crecer en presencia de 6,5% de NaCl, a pH 9,6, a 45 °C, capacidad de hidrolizar la esculina en presencia de sales biliares al 40% y presentar actividad pirrolidonil aminopeptidasa. La identificación a nivel de especie se realizó por medio de los patrones de fermentación de azúcares, por los cuales 22 cepas se clasificaron como *E. faecium* y 5 como *E. faecalis* (resultados no mostrados). Estos resultados se corroboraron mediante la identificación genotípica del gen ARNr 16S.

Todas las cepas de *E. faecium* y una cepa de *E. faecalis* presentaron actividad frente a *L. innocua* ATCC 33090 (datos no mostrados). La cepa de *E. faecium* Tw6, aislada de leche ovina, exhibió la mayor actividad antilisteria y fue seleccionada con el propósito de continuar los estudios de caracterización del principio activo y espectro de inhibición.

Como se muestra en la tabla 2, el SLC de la cepa seleccionada presentó actividad inhibitoria contra todas las cepas de listeria ensayadas, mientras que no mostró inhibición contra otros microorganismos gram-positivos y gramnegativos utilizados.

En la tabla 3 se puede observar el efecto producido por las distintas enzimas hidrolíticas luego de someter al SLC a incubación en las condiciones descritas. La catalasa, la lisozima y la lipasa no produjeron efecto alguno sobre la actividad inhibitoria del SLC de *E. faecium* Tw6. Dentro del grupo de enzimas proteolíticas, la bromelina y la pepsina disminuyeron el efecto antagónico, mientras que el tratamiento con tripsina neutralizó por completo la actividad antilisteria.

Los tratamientos térmicos a 100 °C durante 5 y 15 min no afectaron la actividad del SLC, en cambio se observó una disminución cuando el tiempo se extendió a 30 min. El tratamiento a 121 °C durante 5 min produjo una disminución de la actividad antagónica, mientras que cuando el tratamiento térmico se extendió a 15 min el efecto inhibitorio se perdió por completo (Tabla 3).

La actividad inhibitoria del SLC resultó estable en un

Tabla 2. Condiciones de cultivo y actividad antimicrobiana del cultivo libre de células de *E. faecium* Tw6.

Cepas indicadoras	Medio de cultivo y temperatura (°C)	Actividad inhibitoria
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	TSA, 30	++
<i>L. innocua</i> Tw 1	TSA, 30	++
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	TSA, 35	+
<i>L. monocytogenes</i> Tw 5	TSA, 35	++
<i>L. monocytogenes</i> Tw 11	TSA, 35	++
<i>L. monocytogenes</i> Tw 35	TSA, 35	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	BHI, 35	-
<i>S. aureus</i> Tw 1	BHI, 35	-
<i>Bacillus cereus</i> DBFIQ Bc	AS, 35	-
<i>B. megaterium</i> DBFIQ Bm	AS, 35	-
<i>B. subtilis</i> DBFIQ Bs	AS, 35	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	BHI, 37	-
<i>E. coli</i> Tw 1	BHI, 37	-
<i>Shigella flexneri</i> Tw 19	BHI, 37	-
<i>Salmonella</i> sp. Tw 18	BHI, 37	-

Halo de inhibición: +, ≥ 10 mm; ++ ≥ 15 mm; -, sin inhibición.

TSA: tripticasa soja agar, BHI: caldo cerebro-corazón, AS: agar sangre.

Tw: Cepario de la Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales – Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (Sede Trelew, Chubut-Argentina). DBFIQ: Departamento de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe-Argentina).

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células de la cepa *E. faecium* Tw6.

Tratamientos	Actividad inhibitoria contra <i>L. innocua</i> ATCC 33090
Control	++
Catalasa	++
Lisozima	++
Lipasa	++
Tripsina	-
Bromelina	+
Pepsina	+
100 °C, 5 min	++
100 °C, 15 min	++
100 °C, 30 min	+
121 °C, 5 min	+
121 °C, 15 min	-

Halo de inhibición: +, ≥ 10 mm; ++ ≥ 15 mm; -, sin inhibición.

rango de pH de 3 hasta 11, mientras que no se detectaron halos de inhibición en la prueba de difusión en placa cuando el sobrenadante se trató a pH 12. La actividad antimicrobiana resultó estable después de 12 meses a 4 °C y 28 meses a -30 °C (datos no mostrados).

Luego de la precipitación diferencial del sobrenadante, se ensayó la actividad inhibitoria de las diferentes fracciones recogidas en la cromatografía de intercambio iónico mediante la técnica de difusión en placa, detectándose actividad en una sola fracción durante la elusión a 0,1 M de NaCl. En las condiciones de la cromatografía (pH 8), la fracción activa exhibe carga positiva y en consecuencia no interactúa con la matriz de QAE-Celulosa utilizada. La fracción activa presentó una sola banda de aproximadamente 5,6 KDa cuando la misma fue sometida a electroforesis en poliacrilamida y posteriormente realizado el revelado biológico (Figuras 1 y 2).

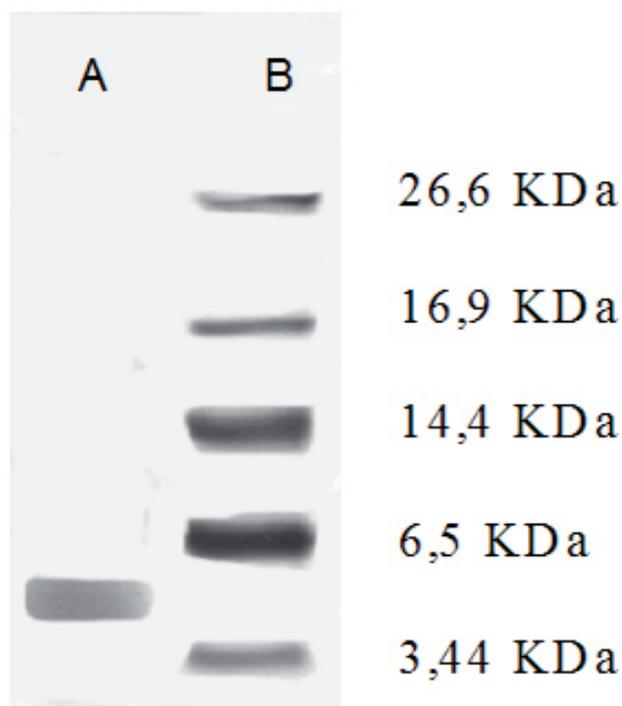


Figura 1. Gel de tricina-SDS-PAGE de la fracción purificada en la cromatografía de intercambio iónico. Carril A: fracción activa de la cepa *E. faecium* Tw6; carril B: marcadores de pesos moleculares

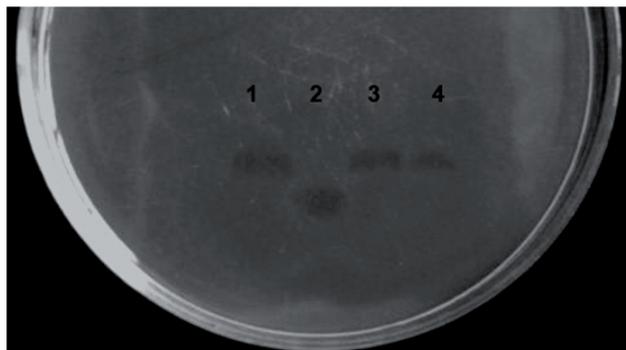


Figura 2: Revelado biológico del gel de tricina-SDS-PAGE utilizando como cepa indicadora a *L. innocua* ATCC 33090. 1,3,4: fracción activa de la cepa *E. faecium* Tw6; 2: bacitracina (marcador molecular).

Los resultados de PCR revelaron la presencia de todos los genes estructurales de enterocinas ensayados en este estudio (A, B, P, LB50A y LB50B). En todos los casos se obtuvieron los tamaños de los amplicones esperados según las condiciones y cebadores utilizados [27].

Discusión

Los resultados obtenidos muestran una alta prevalencia de cepas del género *Enterococcus* aisladas de leche y quesos ovinos de la Patagonia Argentina, aún en aquellos casos donde los mismos se elaboraron con materia prima pasteurizada, indicando que este género presenta resistencia a los tratamientos térmicos empleados. Estos resultados son coincidentes con algunos trabajos previos donde se destaca la alta incidencia de estos microorganismos en subproductos lácteos y su comportamiento frente a la pasteurización [11-13]. Tradicionalmente, la prevalencia de este género en leche y otros alimentos era considerada como un resultado de contaminación fecal; sin embargo, su presencia no siempre está directamente relacionada con una mala higiene [28]. Además, en los últimos años se ha demostrado que los enterococos tienen poco valor como indicadores de higiene en el procesamiento industrial de alimentos [29].

En consecuencia, en la actualidad se acepta que los enterococos se encuentran naturalmente en la leche cruda y puedan actuar como un cultivo iniciador adjunto durante la fabricación de una variedad de productos lácteos fermentados, especialmente quesos duros en los que se ha demostrado su influencia en el desarrollo de sabores y aromas particulares. [2,12,13].

La elevada frecuencia de cepas de enterococos con actividad antagonica frente al género *Listeria* está de acuerdo con los datos disponibles de varios autores [2,30], diversos trabajos indican que la producción de metabolitos con capacidad antimicrobiana constituye un rasgo metabólico distintivo del género [9,12,14].

Los enterococos producen bacteriocinas de conocida efectividad contra patógenos de origen alimentario pero de un espectro restringido a microorganismos grampositivos relacionados desde el punto de vista filogenético: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes* [10,31]. Basados en el análisis de las secuencias del gen ARNr 16S y el contenido de guanina-citosina del ADN, el género *Enterococcus* y las citadas especies están agrupados dentro de la rama *Clostridium* de bacterias grampositivas [32].

Con el propósito de continuar la caracterización del principio activo, se seleccionó la cepa de *E. faecium* Tw6 sobre la base de su alta actividad antagonica y además porque en trabajos previos se demostró, mediante técnicas de amplificación genética por PCR, la ausencia de factores de virulencia y en consecuencia su inocuidad para ser incluido en la conservación de alimentos [19,20].

La actividad antagonica contra *L. innocua* ATCC 33090 no sufrió alteración cuando se neutralizó con NaOH, fenómeno que demuestra que la inhibición del crecimiento no era

producida por efecto de los ácidos orgánicos generados por el metabolismo de las BAL. El efecto antimicrobiano tampoco se vio afectado cuando los SLC neutralizados se sometieron a temperaturas de 100 °C ó 121 °C durante 30 y 5 minutos, respectivamente; demostrándose la estabilidad del principio activo en las condiciones impuestas. Cabe destacar también la alta estabilidad del principio activo durante su conservación (4 y -30 °C). La actividad enzimática de lipasa y lisozima no alteró la actividad antilisteria, lo que permite descartar la existencia de lípidos o azúcares involucrados con la actividad del principio activo.

Algunas cepas de BAL tienen la capacidad de producir peróxido de hidrógeno, molécula con gran capacidad antagonista que puede ejercer su acción sobre una gran variedad de microorganismos. Sin embargo, la capacidad inhibitoria del sobrenadante ensayado no se vio afectada luego del tratamiento enzimático con catalasa y, en consecuencia, es posible afirmar que no existe una relación entre la inhibición y la presencia del metabolito.

Luego de 1 hora de incubación, la actividad proteolítica de la tripsina inactivó por completo la capacidad inhibitoria del sobrenadante, demostrándose de esta manera que el principio activo es de naturaleza proteica. Es interesante destacar que la enzima más activa sobre las sustancias tipo bacteriocinas de la cepa seleccionada fue la tripsina, que tiene particular afinidad por los enlaces que contienen aminoácidos con carga positiva (arginina y lisina), presentes en este tipo de molécula [10,33].

Las características determinadas en las pruebas descritas permiten afirmar que la cepa de *E. faecium* Tw6 ejerce su actividad antagónica gracias a la síntesis de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas, específicamente denominadas enterocinas.

Según los resultados obtenidos por PCR se detectó la presencia de los genes que codifican las enterocinas A, B, P y L50A y L50B en la cepa de *E. faecium* Tw6 evaluada. Este resultado es coincidente con trabajos previos [10,27,34], en los cuales se demuestra que la presencia de más de un gen codificante de enterocinas, es un rasgo predominante en esta especie. Sin embargo sólo en un número reducido de casos se puede detectar por técnicas de amplificación genética la presencia de 5 genes estructurales, como en el caso de la cepa de *E. faecium* Tw6 [10,27].

La detección de los genes no implica necesariamente la producción de estos péptidos, su expresión depende de condiciones ambientales (pH, temperatura, composición del medio de cultivo, etc) o de mecanismos genéticos tales como la inducción o el control transcripcional.

La mayoría de las enterocinas que se han caracterizado hasta la fecha pertenecen a la clase I (péptidos lantibióticos), clase II y sus divisiones (péptidos no modificados, 4-6 KDa) y clase III (péptidos cíclicos), según el esquema propuesto por Franz *et al* [10]. El revelado biológico y la corrida electroforética en SDS-PAGE permite observar una banda de aproximadamente 5,6 KDa compatible con el peso molecular de las enterocinas L50 A/B y B (5, 1 y 5,4 KDa). La sensibilidad de la técnica empleada no permite resolver

la presencia de bandas con pesos moleculares similares y en consecuencia afirmar si la banda obtenida es debido a la actividad de una o ambas enterocinas. Como se describió anteriormente, la amplificación genética reveló la presencia de los genes estructurales implicados en la codificación de las enterocinas citadas. La expresión conjunta de genes de enterocinas es en la actualidad un tema de estudio en desarrollo y hasta el momento controvertido.

Conclusiones

En la actualidad es de interés el uso de enterococos en la industria alimenticia, dado que las bacteriocinas producidas por este grupo bacteriano son moléculas estables, inocuas y con actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos y/o contaminantes de alimentos. En el caso particular de este estudio se seleccionó la cepa de *E. faecium* Tw6 debido a que exhibió la más alta actividad antilisteria de las 27 cepas estudiadas.

La resistencia a altas temperaturas, la estabilidad en un amplio rango de pH y la prolongada persistencia de la actividad a bajas temperaturas, convierten al principio activo sintetizado por la cepa de *E. faecium* Tw6, en un aditivo posible de ser utilizado como biopreservante de alimentos, aún en aquellos que deban ser sometidos a tratamientos térmicos o exhiban pH extremos.

La inclusión de la cepa como fermento adjunto en la elaboración de productos lácteos o para la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos o contaminantes de alimentos es un tema controvertido. La ausencia de factores de virulencia aumenta su seguridad alimentaria pero no garantiza su estabilidad en el tiempo, siendo necesario realizar controles periódicos debido a la tendencia del género a la transmisión horizontal de elementos genéticos compatibles con factores de patogenicidad.

La detección por medio de la técnica de PCR de todos los genes estructurales ensayados, permite especular que se pueda aumentar la capacidad inhibitoria de la cepa estudiada mediante la síntesis de enterocinas en respuesta a la variación de distintas condiciones físicas o químicas. Sin embargo, la expresión genética de los genes vinculados con bacteriocinas constituye un complejo mecanismo de regulación donde debemos considerar no sólo la síntesis, sino también la maduración de los prepéptidos, el transporte y el desarrollo de sistemas de inmunidad.

Referencias

1. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol.* 2006; 106:1-24.
2. Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88:215-22.
3. Campos CA, Rodríguez O, Calo-Mata P, Prado M, Barros-Velázquez J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res Int.* 2006; 39:356-64.
4. Todorov SD, Ho P, Vaz-Velho M, Dicks LMT. Characterization

- of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Sci.* 2010; 84:334-43.
5. Foulquié Moreno MR, Callewaert R, Devreese B, Van Beeumen J, De Vuyst L. Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. *J Appl Microbiol.* 2003; 94:214-29.
 6. Cocolin L, Foschino R, Comi G, Fortina MG. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiol.* 2007; 24:752-8.
 7. Ghrairi T, Frere J, Berjaud JM, Manai M. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control* 2008; 19:162-9.
 8. Floriano B, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R. Purification and genetic characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:4883-90.
 9. Sparo MD, Castro MS, Andino PJ, Lavigne MV, Ceriani C, Gutiérrez GL, et al. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Appl Microbiol.* 2006; 100:123-34.
 10. Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev.* 2007; 31:293-310.
 11. Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kersters K, et al. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J Dairy Res.* 2001; 68:303-16.
 12. Sarantinopoulos P, Leroy F, Leontopoulou E, Georgalaki MD, Kalantzopoulous G, Tsakalidou E, de Vuyst L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *Int J Food Microbiol.* 2002; 72: 125-36.
 13. Coppola R, Succi M, Sorrentino E, Iorizzo M, Grazia L. Survey of lactic acid bacteria during the ripening of Caciocavallo cheese produced in Molise. *Le Lait.* 2003; 83:211-22.
 14. Hugas M, Carriga M, Aymerich MT. Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88:223-33.
 15. Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol.* 1994; 176:7335-44.
 16. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of evolution. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2220-8.
 17. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13:1-11.
 18. Ogier JC, Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol.* 2008; 126:291-301.
 19. Vallejo M. Tesis doctoral. Potencial biotecnológico, aspectos higiénicos y seguridad de *Enterococcus* aislados de leche y quesos ovinos. 2008. Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.
 20. Marguet ER, Vallejo M, Olivera NL. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2009; 42:543-8.
 21. [21] Schleifer K, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1984; 34:31-4.
 22. Manero A, Blanch, AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:4425-30.
 23. DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89:5685-9.
 24. Altschul SF, Gish W, Miller M, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215:403-10.
 25. NG-Kwai-Hang KF, Pélissier JP. Rapid Separation of bovine caseins by mass ion exchange chromatography. *J Dairy Res.* 1989; 56:391-7.
 26. Pardo MF, Natalucci CL. Electrophoretic analysis (Tricine SDS-PAGE) of bovine caseins. *Acta Farm Bonaerense* 2002; 21:57-60.
 27. De Vuyst L, Foulquié Moreno MR, Revets H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol.* 2003; 84:299-318.
 28. Mundt OJ. Enterococci. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1986. p. 1063-5.
 29. Birollo GA, Reinheimer JA, Vinderola CG. Enterococci vs. nonlactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. *Food Microbiol.* 2001; 18:597-604.
 30. Franz CMAP, Muscholl-Silverhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:4385-9.
 31. Aymerich T, Holo H, Havarstein LS, Hugas M, Carriga M, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62:1676-82.
 32. Schleifer KH, Ludwig W. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: Wood BJB, Holzapfel WH, editors. *The lactic acid bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Glasgow: Blackie Academic and Professional; 1995. p. 7-18.
 33. Ennahar S, Asou Y, Zendo T, Sonomoto K, Ishizaki A. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int J Food Microbiol.* 2001; 70:291-301.
 34. Rivas FP, Castro MP, Vallejo M, Marguet ER, Campos CA. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. *LWT - Food Sci Tech.* 2012; 46:428-36.