

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Enterococcus* CON POTENCIALIDAD ANTIMICROBIANA AISLADAS DE QUESOS DE ELABORACIÓN ARTESANAL

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF NATIVE *Enterococcus* STRAINS WITH ANTIMICROBIAL POTENTIAL ISOLATED FROM ARTISANAL MANUFACTURED CHEESES

Elena Quillama Polo^{1,2}, Liz Cruz Pio² y Ginger Gandolfo Navarro²

Resumen

Los *Enterococcus* constituyen parte de la microbiota autóctona de quesos artesanales y contribuyen con el desarrollo del aroma y maduración de los quesos. Algunas cepas, sintetizan péptidos antimicrobianos denominados enterocinas y pueden suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos contaminantes de alimentos. El objetivo, fue seleccionar y caracterizar cepas nativas de *Enterococcus* con actividad antimicrobiana de quesos artesanales. Para su aislamiento, las muestras fueron sembradas en agar bilis esculina y agar MRS. La caracterización fenotípica así como la detección de sustancias antimicrobianas, fueron realizadas por métodos bioquímicos, bicapa y difusión en agar respectivamente. De 68 cepas aisladas, *Enterococcus faecium* fue la especie predominante, seguida de *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecalis*. Asimismo, nueve cepas mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias taxonómicamente afines y patógenas contaminantes de alimentos. Las cepas *Enterococcus faecium* QPa.1 y QPa.2 ejercieron un efecto antagonista muy efectivo frente a *Listeria monocytogenes*. La sustancia antimicrobiana producida por *E. faecium* QPa.1 fue inactivada por tripsina y α -quimotripsina, pero no por catalasa. Además, dicha actividad fue estable a pH 3 y 9, a 100 °C por 20 min y a 4 y -20 °C durante 180 días. En conclusión, *Enterococcus faecium* QPa.1 produjo una bacteriocina activa y específica contra *Listeria monocytogenes*, con posibilidad de ser utilizada como un cultivo bioprotector para la preservación de quesos.

Palabras clave: bacterias lácticas, actividad antimicrobiana, bacteriocinas, quesos.

Abstract

Enterococcus are part of indigenous microbiota of artisanal cheeses and contribute to the development of the aroma and ripeness of cheeses. Some strains synthesize antimicrobial peptides called enterocins that can suppress the growth of foodborne pathogenic microorganisms. The aim of this research was to select and characterize native strains of *Enterococcus* with antimicrobial activity isolated from artisanal cheeses. For their isolation, the samples were seeded in bile esculin agar and MRS agar. Phenotypic characterization as well as the detection of antimicrobial substances were carried out by biochemical, bilayer and diffusion on agar methods, respectively. Of 68 strains isolated, *Enterococcus faecium* was the predominant species, followed by *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecalis*. Nine strains also showed antimicrobial activity against taxonomically related bacteria and food-borne pathogens. *Enterococcus faecium* Qpa.1 and Qpa.2 strains exerted a very effective antagonistic effect against *Listeria monocytogenes*. The antimicrobial substance produced by *E. faecium* QPa.1 was inactivated by trypsin and α -chymotrypsin, but not by catalase. In addition, this activity was stable at pH 3 and 9, at 100 °C for 20 min and at 4 and -20 °C for 180 days. In conclusion, *Enterococcus faecium* QPa.1 produced an active and specific bacteriocin against *Listeria monocytogenes*, which could be used as a bioprotective culture for the preservation of cheeses.

Key words: acid lactic bacteria, antimicrobial activity, bacteriocin, cheeses.

Introducción

La elaboración de quesos se remonta a la época del antiguo Egipto aproximadamente 3007-2975 a. C., alcanzando su popularidad en Grecia y Roma. En 1552,

según López de Gomara, fueron los españoles los primeros en introducir el queso al Perú. A partir de esta fecha, su producción se extendió especialmente al sur del país donde adquirió la denominación de JAPCHA o

KAWCHU, que significa morder jebe o caucho (Velasco del Real, 1892). El queso andino en particular, es un producto tradicional elaborado artesanalmente por los pobladores de la sierra central y sur del Perú. Los quesos son producidos con leche cruda de vaca y/o cabra, sin añadir cultivos iniciadores y son apreciados por sus singulares características sensoriales. En general, los quesos artesanales son obtenidos por coagulación de la leche, separación del suero, salado, moldeado, prensado y en algunos casos pasa por un proceso de maduración, donde ocurren una serie de cambios secuenciales causados por las enzimas coagulantes y fermentos naturales (Sánchez-Ponte, 2003). Estos productos son ricos en proteínas de alta calidad, alto porcentaje de grasa y excelente fuente de calcio, fósforo, hierro y vitaminas. Asimismo, tienen una gran diversidad de sabores, texturas y formas, debido a la variabilidad de leches, las condiciones geográficas, climáticas y técnicas de procesamiento de cada localidad (Beresford *et al.*, 2001).

Los quesos tradicionales, presentan una población microbiana típica y diferente y están conformadas principalmente por bacterias lácticas (BAL) de los géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*. Algunas cepas, pueden contribuir al desarrollo del aroma y maduración de los quesos, debido a sus actividades proteolítica, lipolítica y capacidad de sintetizar sustancias aromáticas. Además, muchos de sus productos metabólicos como los ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterina y bacteriocinas, mejoran la calidad y contribuyen a la bioconservación de estos alimentos (Banwo *et al.*, 2013; Medeiros *et al.*, 2016).

Las bacterias lácticas con propiedades probióticas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y, recientemente, las del género *Enterococcus* asociadas a productos lácteos, son utilizadas en alimentos funcionales. El género *Enterococcus* está conformado por más de 26 especies, se caracterizan por ser ubicuas, habitan los suelos, los alimentos, el agua y el tracto gastrointestinal del hombre y los animales. Algunas cepas benéficas de *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* y *E. durans* predominan en productos lácteos (Banwo *et al.*, 2013).

Tradicionalmente, el queso artesanal se produce a partir de leche sin pasteurizar por fermentación espontánea, donde intervienen bacterias lácticas autóctonas. La actividad de las bacterias presentes naturalmente en la leche no es controlada, pudiendo resultar en algunos casos, un producto con características sensoriales menos uniformes (Leroy & De Vuyst, 2004; Topisirovic *et al.*, 2006; Suskovic *et al.*, 2010). Por lo tanto, la selección de cepas autóctonas de bacterias lácticas con propiedades biotecnológicas es muy importante, para producir quesos con características organolépticas similares al producto artesanal y seguros desde un punto de vista sanitario (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2016). De esta manera,

se puede mejorar y optimizar el control de los procesos de fermentación y obtener productos con propiedades definidas y constantes (Speranza *et al.*, 2015).

Asimismo, para garantizar la seguridad de los quesos elaborados con leche cruda, se pueden utilizar cepas autóctonas de *Enterococcus faecium* productoras de bacteriocinas o sus metabolitos, para eliminar el crecimiento de bacterias Gram positivas patógenas contaminantes de alimentos, particularmente *Listeria monocytogenes* especie muy frecuente en quesos. (Ennahar & Deschamps, 2000; Tulini *et al.*, 2011; Aspri *et al.*, 2017).

Actualmente, las bacteriocinas producidas por algunas cepas de *Enterococcus* son usadas en la conservación de un amplio rango de productos alimenticios y son consideradas como una alternativa prometedora para combatir la resistencia antimicrobiana emergente (Hanchi *et al.*, 2018).

El objetivo de este estudio fue seleccionar y caracterizar cepas autóctonas de *Enterococcus* con actividad antimicrobiana aisladas de quesos regionales de Perú.

Materiales y métodos

Aislamiento de cepas de *Enterococcus*

Un total de 14 muestras de quesos artesanales, procedentes de las localidades de Coracora (Ayacucho), Juliaca y Puno (Puno), Chalhuanca y Soraya (Apuurímac), Huancayo, Huánuco, Huancavelica, Cajamarca, Arequipa y Huarochirí (Lima), fueron recolectadas en recipientes estériles y transportadas en condiciones asépticas para su procesamiento inmediato. Para el aislamiento, se tomaron 10 g de queso y se homogenizaron en 90 ml de solución salina peptonada. Del homogenizado resultante se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina al 0.85%. Luego fueron sembradas por el método de diseminación en agar Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Germany) conteniendo cicloheximida al 0.05% y agar bilis esculina pH 6.5. Las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia a 30 °C por 48-72 h. La identificación presuntiva se realizó en base a la caracterización morfológica, comportamiento en medios líquidos y prueba de la catalasa. Los cultivos puros se conservaron a 4 °C en caldo MRS.

Caracterización fenotípica de cepas de *Enterococcus*

La identificación bioquímica se realizó según De Vos *et al.* (2009), utilizando el medio base MRS suplementado con púrpura de bromocresol pH 6.5 conteniendo diversos carbohidratos: arabinosa, glucosa, lactosa, galactosa, maltosa, manitol, sacarosa, ribosa, rafinosa, xilosa y melibiosa al 1%, incluyendo las pruebas de gluconato de potasio, Voges Proskauer, crecimiento en medios líquidos a diferentes temperaturas (37, 45 y 60 °C) durante 15 y 30 min, crecimiento en presencia de 6.5% NaCl, pH 9.6, 40% de sales biliares e hidrólisis de esculina.

Búsqueda de cepas productoras de sustancias antagonistas

La exploración de cepas de *Enterococcus* productoras de sustancias antimicrobianas y cepas sensibles o indicadoras a los compuestos en mención, se realizó mediante la técnica de la bicapa (Barefoot & Klaenhammer, 1983), enfrentándolas unas contra otras en grupos de 12. Las posibles cepas productoras fueron sembradas por moteado en la superficie de Agar MRS pH 6.5 e incubadas a 30 °C en condiciones de microaerofilia durante 20 h hasta obtener un crecimiento visible. Luego, se aplicó una segunda capa de agar MRS semisólido a 50 °C previamente inoculado con 100 µl de un cultivo activo de la posible cepa sensible de 12 h de crecimiento. Una vez solidificada la bicapa se procedió a incubar a 30 °C por 18 h en condiciones de microaerofilia. En esta etapa, no fue excluido el posible efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos ni del peróxido de hidrógeno. Las cepas de *Enterococcus* que mostraron mayores tamaños de halos de inhibición y las cepas sensibles a los compuestos inhibitorios, fueron seleccionadas para la caracterización complementaria.

Caracterización de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas *Enterococcus faecium* QPa.1 y *Enterococcus faecium* QPa.2

La caracterización se realizó mediante el método de difusión en agar (Tag & McGiven, 1971) utilizando los sobrenadantes crudos libres de células (SLC) de cultivos activos de las cepas productoras en fase logarítmica tardía y cultivos puros de las cepas indicadoras en fase logarítmica temprana a una D.O 560nm = 0.2. Los SLC fueron filtrados en membrana Millex® GP de 0.22 µm (Merck, Darmstadt, Germany) y fraccionados de la siguiente manera: A) Sobrenadante crudo, sin ningún tratamiento (Control), B) Sobrenadante tratado con NaOH a pH 6.5 (sobrenadante neutralizado), para comprobar si el efecto inhibitorio es debido a la acción de ácidos orgánicos y C) Sobrenadante neutralizado + catalasa (1 mg/ml; Sigma Aldrich) para demostrar si el efecto inhibitorio del sobrenadante neutralizado es debido a la acción del peróxido de hidrógeno. Seguidamente, los sobrenadantes tratados con antelación, fueron adicionados a los respectivos orificios realizados en agar MRS semisólido conteniendo 100 µl de la cepa indicadora *Enterococcus faecium* QPa.1. Después de 18 h de incubación a 30 °C, se seleccionó la cepa que mostró mayor halo de inhibición frente a la cepa indicadora en mención.

Efecto de las enzimas, temperatura y pH sobre la sustancia antibacteriana producida por *Enterococcus faecium* QPa.1

Para comprobar la estabilidad de la sustancia antimicrobiana, el sobrenadante neutralizado libre de células (SNLC) de la cepa seleccionada, fue tratado con tripsina pH 6.9 (Sigma Aldrich) y α -quimotripsina pH 8 (Sigma Aldrich) a una concentración final de 1 mg/ml

e incubado a 30 °C por dos horas. El SNLC fue también calentado a 80 y 100 °C por 10 min, a 121 °C por 15 min y mantenido a 4 y -20 °C por 180 días. Asimismo, fue ajustado a pH 3 y 9. La estabilidad de la sustancia antimicrobiana, fue verificada utilizando el método de difusión en agar.

Determinación del espectro antimicrobiano

La determinación de la capacidad de antibiosis de las cepas *Enterococcus faecium* QPa.1 y *Enterococcus faecium* QPa.2 contra bacterias patógenas contaminantes de alimentos: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* obtenidas del banco de Cultivos Iniciadores y Probióticos Lácticos, Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos (CIPROLAC, FCB-UNMSM), se realizó por el método de difusión en agar, para lo cual, se prepararon 10 placas con Agar *Brain Heart Infusion* (BHI) semisólido conteniendo 100 µl de cultivos activos de cada una de las cepas patógenas de 12 horas de crecimiento (D.O = 0.2 a 560 nm), donde se hicieron los orificios respectivos y se agregaron 100 µl de los sobrenadantes libres de células A, B, C y sobrenadantes ajustados a pH 3, pH 8 y conservados a -20 °C por 180 días. Después de 24 h de incubación, se observaron zonas claras alrededor de los orificios. El caldo MRS sin microorganismo fue utilizado como control negativo.

Resultados y discusión

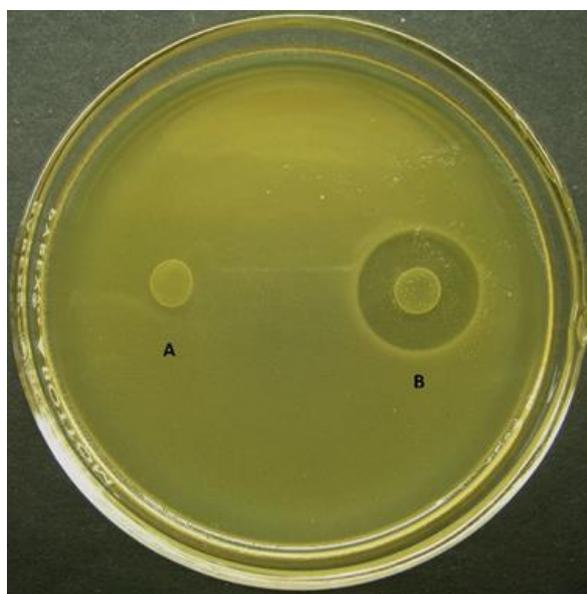
Aislamiento y caracterización fenotípica de cepas de *Enterococcus*

De un total de 14 muestras de quesos frescos y semimaduros de elaboración artesanal procedentes de diferentes zonas del centro y sur de Perú, se lograron aislar e identificar por métodos fenotípicos 68 cepas de *Enterococcus* (Tabla 1), correspondiendo el 56% a *Enterococcus faecium*, el 3% a *Enterococcus durans* y el 1% a *Enterococcus faecalis*. 27 cepas de *Enterococcus* no fueron identificadas porque mostraron un perfil bioquímico atípico (Tabla 2). Estas bacterias fueron caracterizadas como cocos Gram positivos, catalasa negativos, tolerantes a altas concentraciones de cloruro de sodio, de sales biliares y a pH 9.6. Además, mostraron resistencia a 60 °C por 30 min e hidrolizaron la esculina. Estos resultados revelaron que en la mayoría de los quesos evaluados de distinta procedencia, predominó *Enterococcus faecium*, lo que indica su activa participación en la fermentación de los quesos artesanales. Resultados similares reportaron Jurkovič *et al.* (2006) y Slyvka *et al.* (2018) quienes también identificaron las especies de *Enterococcus faecium*, *E. durans* y *E. faecalis*, en quesos bryndza y quesos Carpatianos tradicionales de Eslovaquia, mediante métodos fenotípicos y moleculares. Asimismo, en quesos de elaboración artesanal producidos en dos regiones de Brazil, Medeiros *et al.* (2016) y Luiz *et al.* (2016), revelaron la presencia de

una microbiota diversificada de bacterias lácticas, prevaleciendo las especies *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. italicus* y *E. durans*, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio a excepción de *Enterococcus italicus*.

Selección de cepas nativas de *Enterococcus* con actividad antimicrobiana

De 68 cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos, se seleccionaron nueve cepas con actividad antimicrobiana por el método de la bicapa (Barefoot & Klaenhammer, 1983), correspondiendo siete a *Enterococcus faecium*, una a *Enterococcus faecalis* y una a *Enterococcus durans*. Además, se registró un alto porcentaje de cepas sensibles taxonómicamente afines (Tabla 3). Las cepas que mostraron mayores tamaños de halos de inhibición (19 a 20 mm) frente a la cepa indicadora QPe.1 fueron *Enterococcus faecium* QPa.1 y *Enterococcus faecium* QPa.2 (Figura 1). Otros autores como Franz *et al.* (1996), emplearon también el método de la bicapa para explorar cepas de *Enterococcus* con actividad antagonista en productos vegetales fermentados como las aceitunas, utilizando como cepas indicadoras, las especies *Lactobacillus sakei* DSM 20017, *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20343, *Lb. plantarum* DSM 20174 y *Enterococcus faecalis* DSM 20380.



A: Halo de inhibición (negativo) de *Lactobacillus casei* y **B:** Halo de inhibición (positivo) de *Enterococcus faecium* QPa.1 frente a *Enterococcus faecium* QPe.1.

Figura 1. Actividad antimicrobiana de cepas de bacterias lácticas contra *Enterococcus faecium* QPe.1.

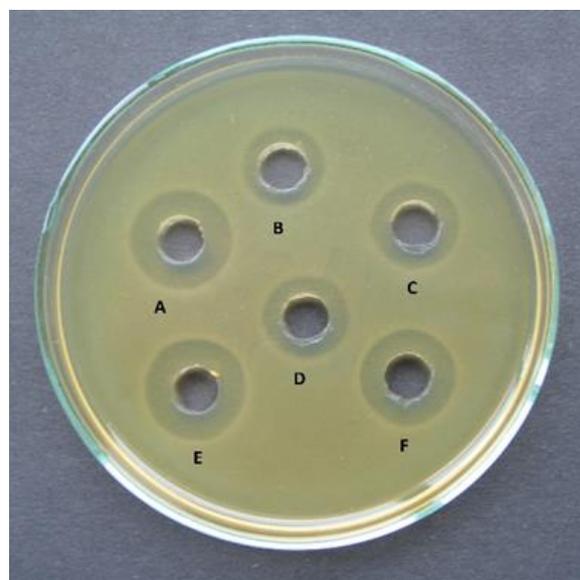
Caracterización del compuesto inhibitorio producido por las cepas *Enterococcus faecium* QPa.1 y *Enterococcus faecium* QPa.2

Para caracterizar las sustancias antimicrobianas contenidas en los SNLC de *Enterococcus faecium*

QPa.1 y *Enterococcus faecium* QPa.2 contra cepas taxonómicamente afines, se utilizó el método de difusión en agar. Los resultados obtenidos indicaron que el efecto de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas productoras, no fue debido a la presencia de ácidos orgánicos ni agua oxigenada (Tabla 4). Resultados coincidentes fueron obtenidos por Khay *et al.* (2011), quienes seleccionaron a partir de leche de camello en Marruecos, una cepa de *Enterococcus faecium* R111 y dos cepas de *Enterococcus durans* E204, y E214 con actividad antimicrobiana contra cepas taxonómicamente afines por el método de difusión en agar.

Determinación del espectro antimicrobiano

Las cepas *Enterococcus faecium* QPa.1 y *Enterococcus faecium* QPa.2, aisladas de quesos de elaboración artesanal de la región de Puno, mostraron una actividad inhibitoria efectiva contra *E. faecium* QPe.1 y *Listeria monocytogenes* (Tablas 4 y 6, Figura 2). Diversos autores también reportaron que ciertas cepas de *E. faecium* asociados a leche de vaca (Banwo *et al.*, 2013), quesos Koopeh de Iran (Hassanzadazar *et al.*, 2014), quesos Coalho de Brasil (Freitas *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2014) y quesos de cabra de Francia (Hammi *et al.*, 2018), produjeron un efecto inhibitorio contra *Listeria monocytogenes*, con probabilidades de ser utilizados como probióticos y/o cultivos iniciadores (Banwo *et al.*, 2013; Hassanzadazar *et al.*, 2014; Furlaneto-Maia *et al.*, 2017).



A: Sobrenadante crudo, **B:** Sobrenadante tratado a pH 3, **C:** Sobrenadante tratado a pH 8, **D:** Sobrenadante almacenado a -20°C por 180 días, **E:** Sobrenadante neutralizado y **F:** Sobrenadante neutralizado más catalasa.

Figura 2. Actividad inhibitoria de *Enterococcus faecium* QPa.1 frente a *Listeria monocytogenes*.

Efecto de las enzimas, temperatura y pH sobre la sustancia antibacteriana producida por *Enterococcus faecium* QPa.1

La actividad antimicrobiana del sobrenadante neutralizado libre de células de la cepa seleccionada *E. faecium* QPa.1 fue completamente inactivada después de ser tratada con las enzimas proteolíticas tripsina y α -quimotripsina, indicando que el compuesto inhibitorio es de naturaleza proteica (Tabla 5). Asimismo, cuando el sobrenadante neutralizado libre de células de *E. faecium* QPa.1 fue tratado a diferentes temperaturas, la actividad inhibitoria fue completamente estable a 80 y 100 °C durante 20 min. Por otro lado, se pudo observar que la actividad de la sustancia antagonista fue también estable a pH 3 y 9 después de 24 horas de incubación a 30 °C. Con respecto a la estabilidad de la sustancia antimicrobiana producida por *E. faecium* QPa.1 a diferentes temperaturas en función del tiempo, se comprobó que la actividad del SNLC de la cepa productora, fue completamente estable durante 180 días a 4 y -20 °C.

En base a estos resultados, se confirmó que la sustancia antimicrobiana producida por la cepa *Enterococcus faecium* QPa.1 es una posible bacteriocina, coincidiendo con los resultados obtenidos por Ennahar & Deschamps (2000) quienes seleccionaron a partir de queso, la cepa *E. faecium* EF01 de espectro reducido y alta especificidad contra cepas de *Listeria monocytogenes* y estable a pH 4 hasta 9. Por otro lado, Dos Santos *et al.* (2014) también demostraron que las sustancias antimicrobianas producidas por *E. faecium* EM485 y *E. faecium* EM925, aisladas de quesos de Brasil, fueron inactivadas por enzimas proteolíticas y se mantuvieron estables a pH 2 y 10, y a 100 °C por 20 min. También, Banwo *et al.* (2013) revelaron que las sustancias antagonistas producidas por *E. faecium* CM4 y *E. faecium* 2CM1 fueron inactivadas completamente por proteinasa K y pronasa E, y parcialmente por tripsina. Asimismo, fueron estables a pH 4 y 9, y mostraron una estabilidad relativa hasta 60 °C por 30 min y a 100 °C por 10 min. La estabilidad térmica es una propiedad común de las bacteriocinas producidas por *Enterococcus*, y es un rasgo muy importante para su uso como conservante alimentario, ya que muchos procedimientos de procesamiento de alimentos implican un tratamiento térmico (Lee *et al.*, 1999; Yildirim *et al.*, 2014). Franz *et al.* (1996), comprobaron también que la cepa *Enterococcus faecium* BFE 900 asociada a aceitunas negras, producía una bacteriocina denominada enterocina 900, estable a 121 °C por 15 min y a pH 2 a 10. A su vez, fue inactivada por pepsina, α -quimotripsina, proteinasa K y tripsina. De la misma manera, Yusuf & Hamind (2012) demostraron que la actividad de la bacteriocina BFE 900 producida por *E. faecium* B3L3 fue estable a 100 °C por 15 min, a 4 y -20 °C, a un pH 4 y 10, y fue completamente inactivada por la tripsina. Tulini *et al.* (2011) y Aspri *et al.* (2017)

también, han demostrado que las bacteriocinas producidas por las cepas de *Enterococcus faecium* fueron inactivadas por enzimas proteolíticas, y cuando fueron tratadas a diferentes rangos de pH 2 a 10 y a temperaturas de 121 °C por 15 min no perdieron su actividad antimicrobiana. Estos resultados fueron similares para la mayoría de las enterocinas producidas por diferentes cepas nativas de *Enterococcus* descritas por los autores antes mencionados, incluyendo *Enterococcus faecium* QPa.1.

La importancia de las bacteriocinas enterococales, radica en su actividad antilisterial. Numerosas cepas de *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* aisladas de productos lácteos y otras fuentes alimenticias, producen una variedad de sustancias antimicrobianas como las enterocinas con actividad antagonista específica contra *Listeria monocytogenes*, microorganismo patógeno contaminante de alimentos (Hanchi *et al.*, 2018).

Conclusión

Nuestro estudio confirmó la presencia de cepas de *Enterococcus*, como parte importante de la microbiota autóctona de los quesos tradicionales, siendo *Enterococcus faecium* la especie predominante.

Además, se comprobó que *Enterococcus faecium* QPa.1 produjo una sustancia antimicrobiana específica contra *Listeria monocytogenes*, patógeno frecuente en quesos. A su vez, la naturaleza de la sustancia antagonista producida por la cepa en mención no es ácido orgánico ni peróxido de hidrógeno sino una posible bacteriocina, con perspectivas de ser utilizada como biopreservante natural en la elaboración de quesos andinos y otros alimentos regionales.

Agradecimientos

Al Vicerrectorado de Investigación y al Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento.

Literatura citada

- Aspri M., O'Connor P.M., Field D., Cotter P.D., Ross P., Hill C. & Papademas P. 2017. Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*, 73: 1-9. DOI: 10.1016/j.idairyj.2017.04.008.
- Banwo K., Sanni A. & Tan H. 2013. Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *Journal of Applied Microbiology*, 14(1): 229-241. DOI: 10.1111/jam.12031.
- Barefoot S.F. & Klaenhammer T.R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6): 1808-1815. URI: <https://aem.asm.org/content/45/6/1808>; <https://aem.asm.org/content/aem/45/6/1808.full.pdf>.

- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L. & Cogan T.M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4-7): 259-274. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00056-5.
- De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. & Whitman W.B. (Eds). 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. 2nd ed. Springer (Dordrecht, Heidelberg, London and New York). DOI: 10.1007/b92997.
- Dos Santos K.M.O., Vieira A.D.S., Rocha C.R.C., do Nascimento J.C.F., de Souza Lopes A.C., Bruno L.M., Carvalho J.D.G., Gombossy de Melo Franco B.D. & Todorov S.D. 2014. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. *Annals of Microbiology*, 64(4): 1463-1471. DOI: 10.1007/s13213-013-0789-4.
- Ennahar S. & Deschamps N. 2000. Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 449-457. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00985.x.
- Franz C.M.A.P., Schillinger U. & Holzapfel W.H. 1996. Production and characterization of enterococin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE900 from black olives. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3): 255-270. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00036-4.
- Freitas W.C., Travassos A.E.R. & Maciel J.F. 2013. Characterization of lactic acid bacteria in coalho cheese and antagonism to some pathogenic food-related bacteria. *Revista del Instituto Adolfo Lutz*, 72(2): 131-137. URI: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial72_2_completa/arquivos-separados/1553.pdf.
- Furlaneto-Maia L.F., Giazzi A., Brandalize C., Katsuda M.S., Rocha K.R., Terra M.R. & Furlaneto M.C. 2017. Isolation and characterization of potential probiotic enterococci strains from soft cheese flora. *African Journal of Microbiology Research*, 11(12): 482-487. DOI: 10.5897/AJMR2017.8429.
- Hammi I., Mensag K., Ennahar S., Delalande F., Marchioni E., Cianferani S. & Belkhou R. 2018. Native production of pediocin PA-1 by *Enterococcus faecium* E16 isolated from goats' cheese. *Journal of Food and Nutrition Research* (ISSN 1336-8672), 1:1-8. National Agricultural and Food Centre, Slovakia. URI: <http://www.vup.sk/en/download.php?bulID=2005>.
- Hanchi H., Mottawea W., Sebei K. & Hammami R. 2018. The Genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in Microbiology*, 9: Article 1791. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01791.
- Hassanzadazar H., Ehsani A. & Mardani K. 2014. Antibacterial activity of *Enterococcus faecium* derived from Koopeh cheese against *Listeria monocytogenes* in probiotic ultra-filtrated cheese. *Veterinary Research Forum*, 5(3): 169-175. URI: http://vrf.iranjournals.ir/article_6620.html.
- Jurkovič D., Križková L., Dušinský R., Belicová A., Sojka M., Krajčovič J. & Ebringer L. 2006. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 42(6): 553-559. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01918.x.
- Khay E.O., Idaomar M., Pastrana Castro, L.M., Fajardo Bernárdez P., Senhaji N.S. & Abrini J. 2011. Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(51): 10447-10455. DOI: 10.5897/AJB11.1328.
- Lee H.-J., Joo Y.-J., Park C.-S., Kim S.-H., Hwang I.-K., Ahn J.-S. & Mheen T.-I. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from kimchi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2): 153-159. DOI: 10.1016/s1389-1723(99)80194-7.
- Leroy F. & De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.*, 15(2): 67-78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>.
- Luiz L.M.P., Castro R.D., Sandes S.H.C., Silva J.G., Oliveira L.G., Sales G.A., Nunes A.C. & Souza M.R. 2016. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. *CyTA-Journal of Food*, 15(1): 125-128. (vPress: 2017). DOI: 10.1080/19476337.2016.1219392.
- Medeiros R.S., Araújo L.M., Queiroga N.V., Andrade P.P., Melo M.A. & Gonçalves M.M.B.P. 2016. Identification of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coalho cheese produced in the Brazilian Northeast. *CyTA – Journal of Food*, 14 (4): 613-620. DOI: 10.1080/19476337.2016.1185468.
- Pavunc A.L., Beganovi J., Kos B., Uroic K., Blazic M. & Suskovic J. 2012. Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technology and Biotechnology*, 50 (2):141-151. URI: <http://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2012/April-June/141.pdf>.
- Ramírez-López C. & Vélez-Ruiz J.F. 2016. Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Información Tecnológica*, 27(6): 115-128. DOI: 10.4067/S0718-07642016000600012.
- Sánchez-Ponte M.D. 2003. Maduración acelerada de queso con bacterias lácticas atenuadas térmicamente. *Revista Científica FCV-LUZ*, 13(4): 299-306. URI: <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14991>.
- Slyvka I.M., Tsisaryk O.Y., Dronyk G.V. & Musiy L.Y. 2018. Strains of lactic acid bacteria isolated from traditional Carpathian cheeses. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(1): 62-68. DOI: <https://doi.org/10.15421/021808>.
- Speranza B., Bevilacqua A., Corbo M.R., Altieri C. & Sinigaglia M. 2015. Selection of autochthonous strains as promising starter cultures for Fior di Latte, a traditional cheese of southern Italy. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 95(1): 88-97. DOI: 10.1002/jsfa.6686.
- Suskovic J., Kos B., Beganovic J., Lebos Pavunc A., Habjanic K. & Matosic S. 2010. Antimicrobial activity – The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology Biotechnology*, 48(3): 296-307. URI: <https://hrcaj.srce.hr/57561>.

- Tagg J.R. & Mcgiven A.R. 1971. Assay System for Bacteriocins. Applied and Environmental Microbiology, 21(5): 943-947. URI: <https://aem.asm.org/content/aem/21/5/943.full.pdf>.
- Topisirovic Lj., Kojic M., Fira Dj., Golic N., Strahinic I. & Lozo J. 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, 112(3): 230-235. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.009.
- Tulini F.L., Gomes B.C. & De Martinis E.C.P. 2011. Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* 130 isolated from mozzarella cheese. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 31(1): 155-159. DOI: 10.1590/S0101-20612011000100022.
- Velasco del Real O. 1892. Viaje por la América del Sur: impresiones y recuerdos. 1^{ra} ed. California: R. Molinas.
- Yildirim Z., Bilgin H., Isleroglu H., Tokalti K., Sahingil D. & Yildirim M. 2014. Enterocin HZ produced by a wild *Enterococcus faecium* strain isolated from a traditional, starter-free pickled cheese. Journal of Dairy Research, 81(2): 164-172. DOI: 10.1017/S0022029914000016.
- Yusuf M.A. & Hamid T.A.T.A. 2012. Optimization of temperature and pH for the growth and bacteriocina production of *Enterococcus faecium*. B3L3. IOSR Journal of Pharmacy, 2(6(5)): 49-59. DOI: 10.9790/3013-26504959.

Tabla 1. Aislamiento de cepas de *Enterococcus* asociadas a quesos artesanales procedentes de diferentes departamentos del Perú.

Procedencia	Localidad	Tipo de muestra	Tiempo de maduración (días)	Especies	
Apurímac	Chalhuanca	fresco	7	<i>Enterococcus</i> sp. (8) <i>Enterococcus faecium</i> (5)	
	Soraya	maduro	30	<i>Enterococcus</i> sp. (1)	
	Cajamarca	Cajamarca	fresco	7	<i>Enterococcus</i> sp. (1) <i>Enterococcus faecium</i> (3)
		semimaduro	15-21	<i>Enterococcus faecium</i> (1)	
Lima	Huachichirí	fresco	7	<i>Enterococcus faecium</i> (4)	
Arequipa	Yuta	fresco	7	<i>Enterococcus faecium</i> (4) <i>Enterococcus faecalis</i> (1)	
	Pampa Colca	semimaduro	15-21	<i>Enterococcus</i> sp. (2)	
	Arequipa		semimaduro	15-21	<i>Enterococcus faecium</i> (3) <i>Enterococcus</i> sp. (3)
					<i>Enterococcus durans</i> (1)
Puno	Puno	semimaduro	15-21	<i>Enterococcus</i> sp. (1) <i>Enterococcus faecium</i> (13) <i>Enterococcus durans</i> (1)	
	Juliaca	semimaduro	15-21	<i>Enterococcus</i> sp. (2)	
	Huancayo	semimaduro	15-21	<i>Enterococcus faecium</i> (2)	
Huánuco	Huánuco	semimaduro	15-21	<i>Enterococcus</i> sp. (4)	
Ayacucho	Cora Cora	semimaduro	15-21	<i>Enterococcus</i> sp. (4) <i>Enterococcus faecium</i> (2)	
		semimaduro	30	<i>Enterococcus</i> sp. (1)	

Tabla 2. Caracterización morfológica, cultural, fisiológica y bioquímica de cepas nativas de *Enterococcus* aisladas de quesos regionales.

Características	<i>Enterococcus faecium</i> (38 cepas)	<i>Enterococcus durans</i> (2 cepas)	<i>Enterococcus faecalis</i> (1 cepa)	<i>Enterococcus</i> sp. (27 cepas)
Morfología de la colonia	Forma circular, borde entero, blanca, 1 mm de diámetro	Forma circular, borde entero, crema, 1 mm de diámetro	Forma circular, borde entero, crema, 1 mm de diámetro	Forma circular, borde entero amarillo claro < 1 mm de diámetro
Coloración Gram	Cocos Gram positivos en cadenas largas y cortas	Cocos Gram positivos en pares y cadenas cortas	Cocos Gram positivos en pares y cadenas cortas	Cocos Gram positivos en pares, cadenas cortas
Comportamiento en caldo MRS	Turbidez en 2 fases, sedimento blanquecino compacto	Turbidez homogénea, sedimento blanquecino no compacto	Turbidez en 2 fases, sedimento blanquecino no compacto	Turbidez en 2 fases, sedimento blanquecino compacto
Catalasa	-	-	-	-
Producción de acidez:				
Glucosa	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+
Sacarosa	v	-	+	+
Maltosa	+	+	+	+
Manitol	+	-	d	+
Melibiosa	v	-	-	+
Rafinosa	-	-	-	-
Ribosa				
Arabinosa	v	-	+	+
Xilosa	-	-	+	-
Crecimiento:				
45 °C	+	+	+	+
37 °C	+	+	+	+
pH 9.6	+	+	+	+
NaCl 6.5%	+	+	+	+
Sales biliares 40%	+	+	+	+
Sobrevivencia a 60 °C:				
15 minutos	+	+	+	+
30 minutos	+	+	+	+
Voges Proskauer	v	-	+	-
Gluconato de Potasio	v	+	+	+
Hidrólisis de Esculina	+	+	+	+

+: Reacción positiva; -: reacción negativa; v: reacción variable

Tabla 3. Inhibición de cepas taxonómicamente afines por sustancias antimicrobianas producidas por *Enterococcus* aisladas de quesos regionales.

Cepas productoras	Cepas indicadoras	Diámetro de inhibición (mm)
<i>Enterococcus faecium</i> QHch.3	<i>Lactococcus</i> sp. QCS.d	5.0
	<i>Lactococcus</i> sp. QCCF.c	2.0
<i>Enterococcus faecalis</i> QYA.b	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.a	15.0
	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.c	18.0
	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.e	18.0
	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.f	18.0
	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.g	18.0
	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.2	15.0
	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.3	14.0
	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.4	17.0
	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.5	18.0
	<i>Enterococcus durans</i> QPe	13.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPf.1	12.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QP5.1	18.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPe.1	15.0
<i>Enterococcus faecium</i> QPa.1	<i>Enterococcus faecium</i> QPb.1	18.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPf.1	13.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QP5.1	18.0
	<i>Lactobacillus</i> sp. QP5.2a	18.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPe.1	20.0
<i>Enterococcus faecium</i> QPa.2	<i>Enterococcus faecium</i> QP8	18.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPc.2	18.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPe.1	20.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPf.1	16.0
	<i>Enterococcus durans</i> QPe	15.0
	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.5	10.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QP5.1	18.0
<i>Enterococcus faecium</i> QP7	<i>Enterococcus durans</i> QPe	14.0
	<i>Enterococcus</i> sp. QC2	11.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPe.1	8.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPf.1	7.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QP5.1	8.0
<i>Enterococcus faecium</i> QPb.2	<i>Enterococcus faecium</i> QP8	16.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPc.2	9.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPe.1	10.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPf.1	7.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QP2.2	14.0
	<i>Enterococcus durans</i> QPe	6.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QP5.1	8.0
<i>Enterococcus faecium</i> QP5.2	<i>Enterococcus faecium</i> QP8	16.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPc.2	8.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPe.1	10.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QPf.1	9.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QP2.2	10.0
	<i>Enterococcus durans</i> QPe	6.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QP5.1	7.0
<i>Enterococcus faecium</i> QPA.I	<i>Lactococcus lactis</i> QPA.5	9.0
	<i>Lactococcus lactis</i> QPA.d	9.0
	<i>Enterococcus faecium</i> QP2.2	7.0
<i>Enterococcus durans</i> QPA.f	<i>Lactococcus</i> sp. QCCF.c	12.0

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de cepas de *Enterococcus faecium* contra bacterias estrechamente relacionadas.

Cepas productoras	Cepas indicadoras	Diámetro de Inhibición (mm)
<i>Enterococcus faecium</i> QPa.1	<i>Enterococcus faecium</i> QPe.1	20
	<i>Enterococcus faecium</i> QPb.1	18
	<i>Enterococcus faecium</i> QPf.1	13
	<i>Enterococcus faecium</i> QP5.1	18
<i>Enterococcus faecium</i> QPa.2	<i>Enterococcus faecium</i> QP8	18
	<i>Enterococcus faecium</i> QPc.2	18
	<i>Enterococcus faecium</i> QPe.1	19
	<i>Enterococcus faecium</i> QPf.1	16
	<i>Enterococcus durans</i> QPe	15
	<i>Lactococcus lactis</i> QYA.5	10
	<i>Enterococcus faecium</i> QP5.1	18

Tabla 5. Efecto de enzimas sobre el sobrenadante neutralizado de un cultivo de *Enterococcus faecium* QPa.1.

Tratamiento enzimático	Diámetro de actividad (mm)
Control	20.0
Tripsina	0.0
α -quimotripsina	0.0

Tabla 6. Efecto inhibitorio de cepas nativas de *Enterococcus faecium* contra bacterias patógenas contaminantes de alimentos.

Cepa	Diámetro de la zona de inhibición (mm) contra cepas sensibles					
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecium</i> QPe.1
<i>Enterococcus faecium</i> QPa.1	4	4	6	20	6	20
<i>Enterococcus faecium</i> QPa.2	4	4	4	17	4	19
Cepa indicadora: <i>E. faecium</i> QPe.1.						

¹ Autor de correspondencia: equillamap@unmsm.edu.pe.

² Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Av. Venezuela s/n, Lima 1, Perú.