



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA  
PRODUCIDA POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS  
DE UN ALIMENTO ARTESANAL MEXICANO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

CARLOS EDUARDO SERRANO MALDONADO



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Raúl Genaro Aguilar Caballero

**VOCAL:** Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres

**SECRETARIO:** Profesora: Maricarmen Quirasco Baruch

**1er. SUPLENTE:** Profesora: Martha Giles Gómez

**2° SUPLENTE:** Profesora: Laura Carmona Salazar

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 312. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Edificio "E". Facultad de Química. Circuito de la investigación Científica. Ciudad Universitaria.

Esta tesis fue financiada por el proyecto PAPIIT IN213109, "El Queso Cotija: una fuente de compuestos funcionales y de microorganismos importantes en la inocuidad de alimentos". El alumno agradece la beca recibida por este mismo proyecto.

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_  
Maricarmen Quirasco Baruch

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

\_\_\_\_\_  
Israel García Cano

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_  
Carlos Eduardo Serrano Maldonado

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a la UNAM por darme la mejor formación académica, deportiva, como una persona de bien y darme a los mejores amigos.

A la doctora Maricarmen Quirasco Baruch por darme la oportunidad de participar en este proyecto y de formar parte de este maravilloso grupo de trabajo.

A Israel García Cano, por toda su paciencia, su tiempo, por sus experimentos macabros, que fueron parte fundamental para la realización de este trabajo y, sobretodo, por su amistad.

Al grupo de trabajo del laboratorio 312: Myrna, Sergio, Blanca, Mirna, Pily, Caro, Dra. Amelia, don Rodri. Siempre he contado con su ayuda y consejos cuando lo necesito.

## **Dedicatorias**

Les dedico esta tesis a mis papás, que me han dado todo y siempre han querido lo mejor para mis hermanos y para mi, han formado a la familia más maravillosa. El esfuerzo que han hecho a lo largo de estos años está dando resultados y la culminación de mis estudios profesionales es sólo una forma de agradecerles y corresponder a ese esfuerzo. Gracias por estar siempre a mi lado.

A mi hermana Pepita, por todo tu cariño y la ayuda que siempre me has dado en la escuela. Fuiste importante en la elección de mi carrera y una inspiración para ser siempre el mejor en lo que hago.

A mi hermano Alex, por todos los buenos momentos que hemos pasado, porque siempre estás al pendiente y preocupado por lo que hago y por ser un hermano Puma.

A mi pequeña Myrna, por todo el amor que me has dado, todos esos grandes momentos que hemos vivido juntos, la ayuda que siempre me brindas y porque siempre quieres lo mejor para mi.

A mis tíos José y Chela, que aunque están lejos, siempre recibo cariño, palabras de apoyo, buenas vibras y se preocupan porque estemos bien.

A mi tío Paco, porque siempre estás al pendiente y se que disfrutas cuando mis hermanos y yo logramos algo importante. Agradezco todo tu cariño.

A mi tía Silvia, porque siempre estás con nosotros, ya sea en el futbol americano, en la escuela o sólo por el placer de estar juntos.

Y a mi tío Oscar, por toda la atención que nos prestaba, sus consejos, sus pláticas tan interesantes, porque siempre aprendía algo cuando estaba contigo.

# ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1. QUESO COTIJA .....	3
2.2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS .....	5
2.3. COMPUESTOS INHIBITORIOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS .....	6
2.3.1 <i>Ácidos orgánicos</i> .....	6
2.3.2 <i>Peróxido de hidrógeno</i> .....	7
2.3.3 <i>Dióxido de carbono</i> .....	8
2.3.4 <i>Diacetilo</i> .....	8
2.3.5 <i>Compuestos inhibitorios de bajo peso molecular</i> .....	9
2.3.5.1 <i>Reuterina</i> .....	9
2.3.5.2 <i>Reuteriicina</i> .....	10
2.3.5.3 <i>Ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico</i> .....	11
2.3.6 <i>Bacteriocinas</i> .....	11
2.3.7 <i>BLIS (Bacteriocin Like Inhibitor Substances)</i> .....	13
2.3.8 <i>Peptidoglucano hidrolasas (PGH)</i> .....	14
2.4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	15
2.4.1. <i>Zimogramas</i> .....	24
3. ANTECEDENTES.....	26
3.1. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EXTRACELULAR PRODUCIDA POR BAL AISLADAS DEL QUESO COTIJA .....	26
3.2. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CARÁCTER PROTEÍNICO PRODUCIDOS POR BAL .....	29
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS .....	31
5.1. GENERAL .....	31
5.2. PARTICULARES .....	31
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	32
6.1. DIAGRAMA GENERAL.....	32
6.2. CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS .....	33
6.3. CONDICIONES DE SEMIPURIFICACIÓN .....	34
6.3.1. <i>Extracto crudo</i> .....	34
6.3.2. <i>Liofilización del extracto crudo</i> .....	34
6.3.3. <i>Precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i> .....	35
6.3.4. <i>Liofilización de la fracción precipitada con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i> .....	35
6.3.5. <i>Ultrafiltración de la fracción precipitada con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i> .....	35
6.3.6. <i>Precipitación con TCA</i> .....	35
6.3.7. <i>Precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y TCA</i> .....	36

6.4.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (MÉTODO DE BRADFORD).....	36
6.5.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES (FENOL – SULFÚRICO) .....	37
6.6.	PRUEBAS DE DIFUSIÓN EN AGAR .....	38
6.7.	ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y ZIMOGRAMAS .....	39
6.7.1.	<i>Perfil electroforético</i> .....	39
6.7.2.	<i>Identificación de las bandas con actividad</i> .....	40
6.8.	SENSIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS PRODUCIDOS A ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.....	40
6.9.	SENSIBILIDAD A DIFERENTES AGENTES REDUCTORES.....	41
6.10.	SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA .....	42
6.11.	PRUEBA DE GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS .....	42
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
7.1.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.....	45
7.2.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES .....	46
7.3.	PRUEBAS DE DIFUSIÓN EN AGAR .....	47
7.4.	PERFIL ELECTROFORÉTICO E IDENTIFICACIÓN DE BANDAS CON ACTIVIDAD.....	50
7.4.1.	<i>Extracto crudo</i> .....	50
7.4.2.	<i>Extracto crudo liofilizado</i> .....	52
7.4.3.	<i>Precipitado con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i> .....	52
7.4.4.	<i>Liofilización y ultrafiltración del precipitado con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i> .....	55
7.4.5.	<i>Precipitado con TCA y precipitado con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y TCA</i> .....	56
7.5.	SENSIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS PRODUCIDOS A ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.....	59
7.6.	SENSIBILIDAD A DIFERENTES AGENTES REDUCTORES.....	64
7.7.	SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS .....	66
7.7.1.	<i>Lb. paracasei 1, banda de 18 kDa</i> .....	67
7.7.2.	<i>E. faecalis, banda de 87 kDa</i> .....	68
7.7.3.	<i>Lb. paracasei 2, banda de 103 kDa</i> .....	69
7.7.4.	<i>Lb. paracasei 2, banda de 76 kDa</i> .....	71
7.8.	PRUEBA DE GLICOSILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE INTERÉS .....	73
8.	CONCLUSIONES .....	76
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	77

## 1. Resumen

El queso Cotija es un alimento artesanal elaborado con leche bronca y sin la adición intencional de cultivos iniciadores, sin embargo después de tres meses de maduración, su calidad microbiológica es aceptable. Esto es debido en parte a que durante su maduración se ven modificados factores fisicoquímicos como la actividad acuosa (la cual disminuye por la pérdida de humedad), el pH y la acidez (influenciados por el crecimiento de bacterias ácido lácticas). Además, algunas cepas de bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* presentes en el producto son capaces de producir compuestos extracelulares de naturaleza proteínica que contribuyen al efecto antibacteriano.

El objetivo de este trabajo fue la identificación y caracterización de las proteínas con actividad antibacteriana. Estas proteínas fueron purificadas parcialmente precipitando con sulfato de amonio y ácido tricloroacético. Por migración electroforética y zimogramas se identificó su peso molecular aproximado y su actividad contra microorganismos indicadores como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Micrococcus lysodeikticus*. Además, para comprobar su naturaleza proteínica, fueron tratadas con enzimas proteolíticas que fueron capaces de degradarlas y de hacer que perdieran su actividad. También, fueron tratadas con distintos agentes reductores; sin embargo, no se observó efecto de la fuerza reductora sobre la actividad antibacteriana, que pudiera indicar la presencia de puentes disulfuro en su estructura de importancia en la capacidad catalítica.

Algunas bandas que presentaron actividad en el zimograma fueron seleccionadas para su secuenciación, con lo que se pudo determinar su identidad.

*Lactobacillus paracasei* 2 fue capaz de producir dos muramidasa de 103 kDa, que presuntamente se encuentran glicosiladas con cadenas de manosa y son activas contra los tres microorganismos indicadores. También, produjo una proteína de 76 kDa con una región muy conservada perteneciente a la superfamilia SCP; dicha familia presenta actividad inhibitoria mediante la degradación de la pared celular de bacterias e incluso de hongos.

De *Enterococcus faecalis* se identificó una proteína de 87 kDa con una región perteneciente a una familia de dominios muy conservada, denominada NplC/P60, que debe su actividad antibacteriana a su acción como peptidasa de pared celular. Esta proteína también se encuentra glicosilada con cadenas de manosa.

## **2. Introducción**

### **2.1. Queso Cotija**

El queso Cotija se elabora de manera artesanal desde hace más de 400 años. Es un queso de gran formato pues se produce en voluminosas piezas cilíndricas de 22 kg en promedio, de pasta firme, prensada y friable. Es nombrado así por la ciudad de Cotija de la Paz en el estado de Michoacán, donde se ha comercializado tradicionalmente. La zona de donde es originario está ubicada en la sierra Jalmich, entre los estados de Jalisco y de Michoacán.

Esta región se ha caracterizado fundamentalmente por su población escasa y dispersa en ranchos aislados, dedicados a la explotación ganadera con producción estacional de queso, asociada al cultivo itinerante de maíz de temporal.

El queso Cotija se produce a partir de leche entera y bronca que proviene de ganado cebú o criollo que se alimenta en pastoreo libre. Las vacas son ordeñadas para la producción de queso durante los meses de lluvia (julio a octubre). Cabe destacar que la zona donde se produce el queso artesanal es una región libre de brucelosis y tuberculosis.

De manera general, el proceso de elaboración del queso es el siguiente (Álvarez-Barajas *et al*, 2005):

La ordeña se lleva a cabo manualmente. La leche recién ordeñada del día se hace pasar por cedazos limpios para retener cualquier materia extraña, antes de su uso. La leche no sufre algún tratamiento térmico, como la pasteurización, que permita eliminar microorganismos patógenos o de descomposición.

La leche obtenida se deja reposar para que baje un poco la temperatura, de 37°C hasta 30 a 32°C. Una vez que la leche alcanza la temperatura óptima para ser cuajada, se le incorpora el cuajo mezclándolo rápidamente, pudiendo acompañarse de una parte de la sal total añadida, según la costumbre. Se utiliza

cuajo natural de rumiantes jóvenes, no microbiano. Se añaden 10 mL de cuajo por cada 100 L de leche. La sal debe ser de mar (de grano).

La consistencia de la cuajada se prueba cruzándola con cuchara y, una vez alcanzado el punto deseado, que debe ser firme a la vista y al tacto, se corta hasta obtener grumos equivalentes en tamaño a un grano de maíz.

Se deja reposar hasta que la cuajada cortada se asiente en el fondo del recipiente. Es posible ayudarle a bajar o “asentar” de manera manual o ejerciendo sobre ella presión descendente. Se desuera manualmente o por drenado y se deja escurrir en una artesa.

Posteriormente, se sala con sal de mar (generalmente proveniente del estado de Colima), se agrega entre un 4 y 6% de sal, sin embargo la dosificación no es exacta. Se amasa manualmente procurando que la distribución de sal sea pareja y se vacía dentro de un molde fajado y cubierto internamente con una manta de fibras de maguey o ixtle. La masa también se puede dejar reposar sobre la artesa para que al día siguiente se incorpore otra porción y así tener la cantidad adecuada para llenar el molde que le confiere la forma y volumen que darán lugar a las piezas de presentación tradicional cilíndrica de alrededor de 20 kg.

Al quedar perfectamente abrazada o fajada la cuajada, se procede a prensar por 18 a 24 h. La pasta ya prensada se mantiene fajada para que no pierda su forma, se voltea sobre su cara diariamente hasta que deja de escurrir suero (hasta que se “orea”), durante 15 días o hasta que adquiera la firmeza necesaria para que cada pieza pueda ser manipulada.

El queso se desfaja pero se continúa con la rutina de voltearlo periódicamente durante los primeros tres meses. Durante este periodo, el queso se limpia o “soba” con un trapo limpio, suave pero que no desprenda hilos o materia extraña.

El queso Cotija, cuando es el auténtico madurado, tiene un mínimo de tres meses de vida dentro del lugar que se produce antes de ser comercializado, considerando el inicio de su vida a partir del retiro de la prensa; por lo que

desarrolla aromas, olores y sabores característicos intensos (Álvarez-Barajas *et al*, 2005; Cervantes *et al*, 2008; Bravo, 2008). Estos sabores y olores característicos son debidos a la modificación de factores fisicoquímicos (como la actividad acuosa) y al crecimiento de bacterias ácido lácticas.

## **2.2. Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se definen como cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, anaerobios facultativos, que producen ácido láctico como producto final mayoritario por la fermentación de carbohidratos.

Los principales géneros que conforman al grupo de las BAL son: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Salminen *et al*, 2004).

Existen dos vías principales de fermentación de azúcares por las BAL. La glicólisis (vía Embden-Meyerhof-Parnas) genera exclusivamente ácido láctico como producto final; este tipo de metabolismo es conocido como fermentación homoláctica. La vía del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (o vía de las pentosas fosfato) genera otros productos finales en cantidades significativas como etanol, acetato y CO<sub>2</sub>, además del ácido láctico, este tipo de metabolismo es conocido como fermentación heterofermentativa (Salminen *et al*, 2004). Hay un grupo de BAL que son capaces de usar las dos vías, sin embargo, prefieren la vía homofermentativa en presencia de hexosas.

Las BAL tienen muchas aplicaciones en la producción de alimentos fermentados y bebidas, pero la más importante es su uso como cultivos iniciadores en la producción de varios alimentos lácteos fermentados (Savijoki *et al*, 2006). Las BAL son de gran importancia en la manufacturación, maduración y propiedades organolépticas de los quesos:

- La fermentación de los azúcares lleva a un descenso en el pH, importante en el fenómeno de la coagulación y en la reducción o prevención del crecimiento de microbiota acompañante.
- Participan en la hidrólisis de proteínas, contribuyendo a la textura y sabor final de diferentes productos fermentados.
- Sintetizan compuestos que dan sabor y aroma, como ácidos orgánicos, acetaldehído, diacetilo, acetoína, etc.
- Sintetizan agentes texturizantes, los cuales aportan consistencia al producto.
- Producen componentes inhibitorios de otros microorganismos (Salminen *et al*, 2004).

### **2.3. Compuestos inhibitorios producidos por bacterias ácido lácticas**

La capacidad que tienen las BAL para producir sustancias antibacterianas ha sido utilizada históricamente para la conservación de alimentos, incluso antes del conocimiento de su existencia. En una fermentación las BAL reducen la cantidad de carbohidratos disponibles y producen una variedad de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana (pueden inhibir bacterias, hongos y/o levaduras; Salminen *et al*, 2004). Producen ácido láctico y acético como productos finales de la fermentación, causando una reducción en el pH, pero también producen otras sustancias como peróxido de hidrógeno, ácido propiónico, diacetilo, etc. (Magnusson, 2003).

#### **2.3.1 Ácidos orgánicos**

El ácido láctico es el metabolito que producen en mayor cantidad las BAL. Se ha observado que los ácidos débiles tienen una mayor actividad antibacteriana a bajo

pH que a valores neutros. La forma no disociada es la forma tóxica de la molécula, ya que ésta difunde a través de la membrana celular por ser liposoluble y, una vez dentro, dependiendo del pH intracelular, puede disociarse en mayor o menor medida liberando iones  $H^+$  que acidifican el citoplasma. Además del efecto del pH, la forma no disociada de la molécula contribuye al efecto antibacteriano mediante el colapso del gradiente electroquímico de protones, causando bacteriostasis y la eventual muerte de la bacteria susceptible. El efecto es más pronunciado a valores de pH por debajo del  $pK_a$  del ácido, ya que una mayor proporción de éste está en su forma no disociada.

Las BAL heterofermentativas también producen ácido acético y propiónico. Estos ácidos tienen un efecto antibacteriano más fuerte, lo que puede explicarse en parte por su alto valor de  $pK_a$  comparado con el del ácido láctico. El ácido propiónico tiene un valor de  $pK_a$  de 4.87, el ácido acético de 4.75 y el ácido láctico presenta un valor de 3.08. Así, por ejemplo, a pH 4, el porcentaje que permanece en su forma no disociada de estos ácidos es: del ácido láctico, sólo el 11%; del ácido acético, 85% y del ácido propiónico, el 92%. Cuando están presentes en una mezcla, el ácido láctico contribuye mayormente a la reducción del pH, mientras que el propiónico y el acético, los cuales se encuentran en la forma no disociada, causan el efecto inhibitorio (Magnusson, 2003 y Salminen, 2004).

### **2.3.2 Peróxido de hidrógeno**

En presencia de oxígeno, la mayoría de las BAL son capaces de generar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), a través de la acción de las flavoprotein oxidasas, NADH oxidasas y superóxido dismutasas. El peróxido de hidrógeno se excreta y se acumula, ya que no producen catalasa, sin embargo, no se acumula en cantidades significativas, pues es descompuesto por la acción de peroxidasas, flavoproteínas y pseudocatalasas. El efecto antibacteriano del peróxido de hidrógeno se atribuye a su efecto fuertemente oxidante sobre la pared celular y la destrucción de estructuras moleculares de proteínas celulares. Su efecto puede incrementarse

por la presencia de lactoperoxidasa y tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ). La lactoperoxidasa cataliza la oxidación del tiocianato por el peróxido de hidrógeno, generando hipotiocianato ( $\text{OSCN}^-$ ), incluso  $\text{O}_2\text{SCN}^-$  y  $\text{O}_3\text{SCN}^-$ . Las membranas de las bacterias sufren daños estructurales al exponerse al  $\text{OSCN}^-$ ; sin embargo, el mayor efecto se da por el bloqueo de la glucólisis, ya que inhibe el transporte de glucosa, la actividad de la hexocinasa y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. La actividad contra bacterias Gram positivas es bacteriostática, mientras que a las Gram negativas las mata rápidamente (Magnusson, 2003 y Salminen, 2004).

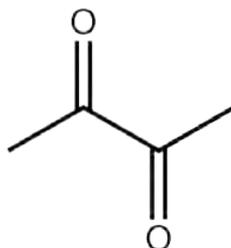
### **2.3.3 Dióxido de carbono**

El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) se forma durante la fermentación heteroláctica de las hexosas. El dióxido de carbono tiene un doble efecto antibacteriano. Su formación crea un ambiente anaeróbico y, además, como tal tiene actividad antibacteriana, ya que puede inhibir las descarboxilaciones enzimáticas y su acumulación en la bicapa lipídica causa una disfunción en la permeabilidad de la membrana (Salminen, 2004).

### **2.3.4 Diacetilo**

El citrato puede convertirse en diacetilo (2,3-butanodiona) (Figura 1) vía piruvato. El diacetilo es responsable del aroma característico asociado a la mantequilla. Su actividad antibacteriana es más efectiva a valores de pH menores a 7. Es más efectivo contra bacterias Gram negativas que contra las Gram positivas. El diacetilo reacciona con la proteína de unión a arginina que se acopla al transportador de tipo ABC, por lo que la célula no puede transportar arginina a su interior, interfiriendo con la utilización de este aminoácido. Sin embargo, las cantidades necesarias para que se presente la actividad antibacteriana son tan

altas que afectaría dramáticamente el sabor y aroma de los productos (Magnusson, 2003 y Salminen, 2004).



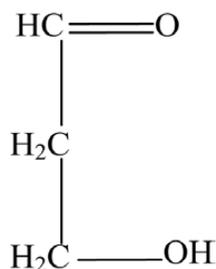
**Figura 1.** Estructura de 2,3-butanodiona o diacetilo

### 2.3.5 Compuestos inhibitorios de bajo peso molecular

Se han encontrado muchos compuestos de bajo peso molecular con actividad inhibitoria contra bacterias, hongos y levaduras producidos por BAL. Estos compuestos tienen propiedades importantes: a) son activos a bajos valores de pH, b) son termoestables y c) presentan un amplio espectro de actividad inhibitoria de microorganismos. Algunos de esos compuestos son:

#### 2.3.5.1 Reuterina

La reuterina o 3-hidroxiopropanal (Figura 2) es una sustancia con actividad antibacteriana de amplio espectro; se reportó por primera vez en *Lactobacillus reuteri*, dicho compuesto es producido por la célula cuando es crecida en una mezcla de glucosa y glicerol o gliceraldehído en condiciones anaerobias.



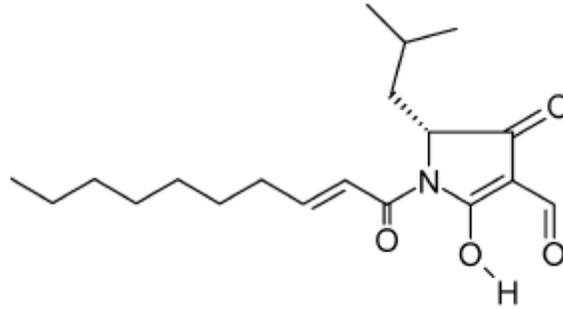
**Figura 2.** Estructura de la reuterina o 3-hidroxiopropanal

La reuterina tiene actividad antibacterial, antifúngica, antiprotozoaria y antiviral. No se ha reportado un posible efecto negativo contra humanos, aunque se ha observado que la reuterina es capaz de enlazar tejidos biológicos en una forma similar al glutaraldehído, debido a su capacidad de establecer puentes de entrecruzamiento con proteínas. En solución acuosa, la reuterina se puede encontrar en forma dimérica, dando lugar a un dialdehído, que puede enlazar a los grupos amino de las proteínas, específicamente los grupos aldehído reaccionan con el grupo amino de la lisina ubicada en proteínas adyacentes originando los puentes de entrecruzamiento. Las mismas BAL son sensibles a la reuterina, pero son más resistentes que los demás microorganismos.

Su amplio espectro puede explicarse por su mecanismo de acción. Actúa en contra de enzimas con grupos sulfidrilo y proteínas como la actina, que forma el citoesqueleto, la GSH-reductasa y las ATPasas transportadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática y el retículo endoplásmico. La inactivación de estas enzimas da lugar a un aumento mantenido de  $\text{Ca}^{2+}$  celular (al igual que el incremento de la permeabilidad de la membrana), lo que compromete la viabilidad celular. Es inhibidor de la subunidad de unión a sustrato de ribonucleótido reductasas, por lo que interviene en la síntesis de ADN (Urbina *et al*, 1997; Magnusson, 2003; Salminen, 2004; Rang *et al*, 2008).

### **2.3.5.2 Reuteriicina**

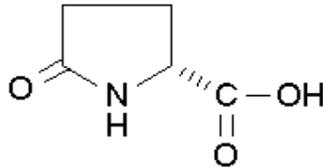
La reuteriicina (Figura 3) es un compuesto que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas. Tiene un peso molecular de 349 Da y es anfifílica, posee una región que está cargada negativamente y otra que es altamente hidrofóbica. Su actividad inhibitoria se incrementa dramáticamente a altas concentraciones de sal (2%) y pH bajo (4.5). La reuteriicina funciona como un ionóforo; se distribuye dentro de la membrana citoplasmática, debido a su parte hidrofóbica, y disipa selectivamente el gradiente de pH transmembranal (Gänzle, 2004; Salminen, 2004).



**Figura 3.** Estructura de la reutericyclina

### 2.3.5.3 Ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico

El ácido piroglutámico o PCA (Figura 4) es estable al calor (121°C, 20 min), pero pierde su actividad cuando el pH se incrementa por arriba de 2.5. Su mecanismo de acción antibacteriana es similar al de los ácidos orgánicos (Salminen, 2004).



**Figura 4.** Estructura del ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico (PCA)

### 2.3.6 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antibacterianos de bajo peso molecular, sintetizadas en los ribosomas, estables al calor, producidas por bacterias y que son activas contra otras bacterias, en ocasiones de la misma especie (espectro reducido), o de diferente género (de amplio espectro) (Cotter *et al*, 2005).

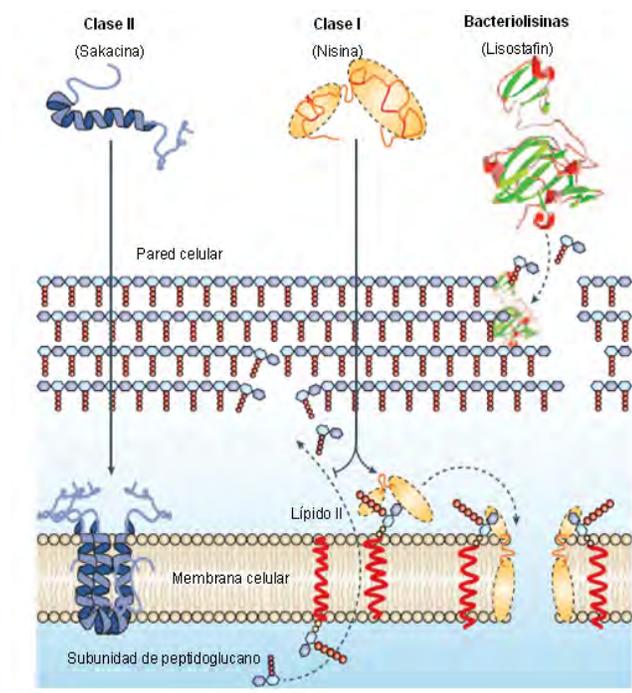
En general, las bacteriocinas producidas por las BAL son péptidos pequeños, catiónicos, con tendencia a adoptar estructuras helicoidales anfífilas (Nes *et al*, 1996).

Muchas de las bacteriocinas producidas por las BAL son activas sólo contra otras BAL, pero otras muestran una actividad contra muchas bacterias Gram positivas y, ocasionalmente, contra bacterias Gram negativas. La región C-terminal es determinante en la especificidad de las células blanco, ya que en esta región es donde principalmente se da la formación de puentes disulfuro, proporcionando la conformación final (Eijsink *et al*, 1998).

Klaenhammer, en 1993, clasificó las bacteriocinas de las BAL en cuatro grandes grupos. La clase I incluye los lantibióticos, los cuales son pequeños péptidos de <5 kDa que contienen los residuos inusuales lantionina y  $\beta$ -metil lantionina. La lantionina se forma cuando una serina deshidratada enzimáticamente, se condensa con el grupo sulfidrilo de una cisteína vecina. Cuando la unión se da entre treonina y cisteína, el residuo que se forma es la  $\beta$ -metil lantionina. Un ejemplo de la clase I es la nisina. Esta bacteriocina es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y tiene un peso molecular de 3.5 kDa, es considerada un aditivo tipo GRAS, por lo que está permitido su uso en alimentos como conservador en aproximadamente 50 países. La marca más usada es Nisaplin (Danisco); es una preparación que contiene 2.5% de nisina con NaCl (77.5%) y leche en polvo descremada (12% de proteína y 6% de carbohidratos) (Cotter *et al*, 2005; Barboza-Corona *et al*, 2007). La clase II incluye los péptidos pequeños que no contienen lantionina y es un grupo heterogéneo que incluye péptidos de <10 kDa. La clase III incluye proteínas grandes termolábiles de >30 kDa. La clase IV son proteínas complejas que contienen fracciones adicionales, como lípidos y carbohidratos.

Una clasificación más reciente fue hecha por Cotter y colaboradores en el 2005, esta clasificación comprende 3 clases (Figura 5). La clase I que incluye a los lantibióticos, que son pequeños péptidos de entre 19 y 38 aminoácidos de longitud, los cuales pueden actuar de dos formas: se pueden enlazar al lípido II, el mayor transportador de subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular, lo que evita la síntesis correcta de la pared, con la consecuente muerte

celular. Además, pueden usar al lípido II como molécula de acoplamiento para insertarse en la membrana e iniciar la formación de poros, lo que lleva a una rápida muerte. La clase II, o bacteriocinas que no contienen lantionina, son péptidos termoestables pequeños (menos de 10 kDa), inducen la permeabilización de la membrana y la salida de moléculas del interior de la bacteria. Y la clase III son bacteriolisinas o proteínas bacteriolíticas, son termolábiles y su modo de acción es mediante la lisis de la pared celular.



**Figura 5.** Modo de acción de las bacterias ácido lácticas (Adaptado de Cotter, 2005)

### 2.3.7 BLIS (Bacteriocin Like Inhibitor Substances)

Este término es aplicado a sustancias antimicrobianas de naturaleza proteínica, las cuales no están completamente definidas o cumplen con los criterios de la definición de bacteriocinas. Las BLIS por lo general tienen un espectro más amplio de actividad que las propias bacteriocinas, ya que son capaces de inhibir el

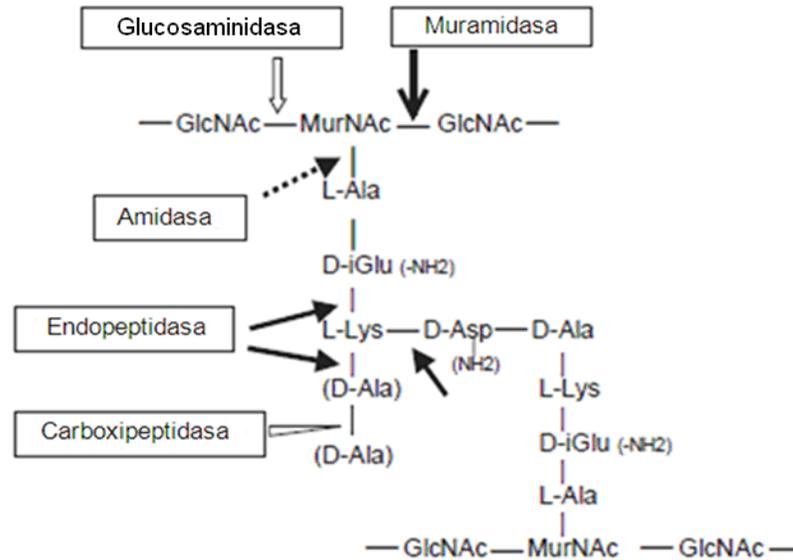
crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como hongos y levaduras (Atanassova *et al*, 2003).

### **2.3.8 Peptidoglucano hidrolasas (PGH)**

La autólisis de las bacterias es el resultado de la degradación enzimática del peptidoglucano de la pared celular por peptidoglucano hidrolasas (PGHs) endógenas, llamadas autolisinas. Las PGHs bacterianas participan además en un gran número de funciones celulares diferentes como son: la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de peptidoglucano durante el crecimiento y la separación de las células hijas durante la división celular. La autólisis de las BAL es de especial interés con respecto a su uso como cultivos iniciadores en productos lácteos fermentados. La lisis de las BAL es considerado un parámetro para controlar y acelerar la maduración de quesos, además, las BAL producen enzimas intracelulares (peptidasas, lipasas y enzimas del catabolismo de aminoácidos), las cuales juegan un papel importante en el desarrollo del sabor del queso durante su maduración (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Vollmer *et al*, 2008).

Las bacterias producen PGHs que son capaces de hidrolizar enlaces del peptidoglucano en su propia pared celular o de otras bacterias. En bacterias Gram positivas, el peptidoglucano constituye una fuerte red tridimensional que rodea a la célula. Es un polímero comprimido de cadenas de glicano (se alternan residuos de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina) enlazados por péptidos de cadena corta (Figura 6). Dependiendo del enlace que son capaces de hidrolizar, las PGHs tienen diferente especificidad y se clasifican en: glucosaminidasas, muramidásas, amidásas y endopeptidasas. Como las autolisinas son peligrosas para la integridad de la célula, su expresión o actividad debe estar bien regulada. Hay algunas especies de BAL llevan en su genoma uno o varios profagos en estado lisogénico que codifican endolisinas con actividad de PGH. La inducción del profago puede ser causada por un agente mutagénico o por estrés ambiental

(por ejemplo, choque térmico). Una vez producida la PGH, su regulación se lleva a cabo por algunas proteasas asociadas a la pared celular que disminuyen drásticamente su capacidad autolítica (Lortal y Chapot-Chartier, 2005).



**Figura 6.** Estructura del peptidoglucano y especificidad de hidrólisis de enlaces de las peptidoglucano hidrolasas (adaptado de Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

## 2.4. Purificación de proteínas

Cuando se desea investigar una nueva proteína o enzima, es necesario encontrar las condiciones óptimas de su producción. Para poder estudiarlas en detalle, es necesario tener una preparación pura de la proteína en cuestión, poder separarla de las miles de proteínas que puede contener una célula. Los métodos clásicos de separación de proteínas aprovechan las distintas propiedades de éstas, como son el tamaño, carga e interacciones.

La purificación de una proteína requiere de una estrategia inteligente en la selección y combinación de técnicas basadas en el conocimiento de la proteína de interés. No existe un esquema de purificación que permita purificar todo tipo de proteínas.

Los principales problemas encontrados durante la separación de proteínas son generalmente la desnaturalización, proteólisis y contaminación, de aquí la conveniencia de que al menos los primeros pasos de preparación sean realizados rápidamente y a la menor temperatura posible. Sin embargo, no siempre es posible mantener una temperatura suficientemente baja a lo largo de todo el proceso y en ocasiones puede ser no necesario o inconveniente. Por lo que la temperatura es un parámetro que debe ser optimizado.

La fuente de una proteína es generalmente tejido o células de microorganismos. El primer paso es saber si la proteína es extracelular o intracelular. Si se encuentra en el interior, se procede a romper las células y liberar las proteínas en una solución conocida como extracto crudo. Si es necesario, puede ser empleada una centrifugación diferencial para obtener fracciones de organelos específicos. Si es extracelular, se deben separar las células. La técnica más empleada es la centrifugación, aunque una filtración podría ser útil, sobre todo en técnicas a gran escala.

Una vez que se tiene listo el extracto, se somete a tratamientos que permitan separar proteínas en diferentes fracciones. En los primeros pasos de purificación puede utilizarse la precipitación; los métodos de precipitación de proteínas se basan en la disminución de la solubilidad, desnaturalización selectiva y precipitación por afinidad. De tal modo que la precipitación proteínica puede ser realizada por la adición de sales, solventes o polímeros orgánicos, por alteraciones de pH y temperatura o por la adición de ligandos.

La solubilidad de las proteínas se reduce generalmente a altas concentraciones de sal; cuando una sal es adicionada al sistema, el agua solvata los iones de sal y a medida que la concentración salina aumenta, el agua que rodea a la proteína es secuestrada, exponiendo eventualmente las porciones hidrofóbicas. Es entonces cuando los segmentos hidrofóbicos de una molécula proteica pueden interactuar con los de otra, resultando en la agregación de éstas. Por lo que las proteínas con largos segmentos hidrofóbicos tienden a agregarse y precipitar antes que aquellas

con pequeños o pocos segmentos hidrofóbicos. La precipitación ocurre por la neutralización de cargas de la superficie por la sal, por la reducción de la actividad química de la proteína y por la disminución efectiva de la concentración de agua, este efecto es conocido como “salting out”. La adición de ciertas sales en la cantidad correcta puede precipitar selectivamente algunas proteínas, mientras que otras permanecen en solución. El sulfato de amonio  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  es particularmente efectivo y es regularmente usado para precipitar proteínas. Las proteínas precipitadas pueden ser removidas de las que permanecen solubles mediante una centrifugación a baja velocidad. Las cantidades residuales de sulfato de amonio pueden interferir con otras mediciones y métodos de purificación y tiene que ser removido posteriormente (Prado-Barragán *et al*, 1999; Nelson y Cox, 2008).

También, es posible utilizar TCA (ácido tricloroacético) para la precipitación de proteínas. Es un método popular en la preparación de muestras para ensayos posteriores como electroforesis (se comentará más adelante) porque puede concentrar la muestra, es efectivo para remover sales, polisacáridos y muchos detergentes (como el SDS) de las proteínas (Matsudaira, 1993; Nandakumar *et al*, 2002). Los residuos de TCA deben ser removidos con lavados exhaustivos con acetona o etanol.

Las proteínas se pueden separar de moléculas pequeñas mediante la diálisis a través de una membrana semipermeable, como puede serlo una membrana porosa de celulosa. Las moléculas de dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro se retienen dentro de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas más pequeñas y los iones atraviesan los poros de esta membrana y pasan al dializado. Esta técnica es útil para retirar las sales u otras moléculas pequeñas como el sulfato de amonio después de una precipitación (Berg *et al*, 2008).

Otra técnica que emplea membranas de celulosa para llevar a cabo la separación selectiva de las moléculas de interés es la ultrafiltración. Esta técnica involucra la

separación de componentes de líquidos o gases aplicando una fuerza (presión) sobre el fluido a través de membranas semipermeables. Los componentes que son más pequeños que los poros de la membrana pasan a través de ella y los más grandes son retenidos. La ultrafiltración tiene un umbral de exclusión en el rango de 1 a 200 kDa y aproximadamente un tamaño de poro de 1 a 100 nm. Se lleva a cabo a presiones entre 1 y 3 kg/cm<sup>3</sup>. Permite el paso de sales y otros compuestos como los azúcares (Prado-Barragán *et al*, 1999).

Uno de los métodos de utilidad general para la separación de proteínas es la cromatografía, la cual aprovecha las diferencias en carga, tamaño, afinidad de enlaces y otras propiedades para separar pequeñas moléculas como azúcares y aminoácidos. Un material poroso sólido con propiedades químicas apropiadas (fase estacionaria) se sostiene en una columna, y una solución amortiguada (fase móvil) pasa a través de ésta. La solución que contiene las proteínas se vierte por la parte superior de la columna y pasa a través de la matriz sólida. Las proteínas migran más rápido o más lento a través de la columna dependiendo de su interacción con la fase estacionaria.

Hay diferentes tipos de matrices para cromatografía. Las de intercambio iónico están llenas de pequeñas esferas que contienen cargas positivas o negativas, de modo que las proteínas se separan en función de la disposición de cargas de la superficie. Las columnas hidrofóbicas están llenas de esferas con cadenas laterales hidrofóbicas que sobresalen de ellas, de modo que las proteínas que tengan regiones hidrofóbicas al descubierto quedan retardadas en su tránsito por la columna. Las columnas de filtración en gel, que separan proteínas en función de su tamaño, contienen diminutas esferas porosas: a medida que van descendiendo por la columna, las moléculas suficientemente pequeñas para penetrar en los poros pasan sucesivamente por el interior de estas esferas, mientras que las moléculas más grandes permanecen en la solución fluyendo entre las esferas, y por lo tanto eluyen más rápidamente a través de la columna y salen primero.

Un procedimiento más eficiente, conocido como cromatografía de afinidad, utiliza interacciones de enlace, importantes desde el punto de vista biológico, que se producen en la superficie de las proteínas. Por ejemplo, si un sustrato enzimático se acopla covalentemente a una matriz inerte, como pueden ser pequeñas esferas de un polisacárido, la enzima específica de este sustrato fijado a la columna será retenida en la matriz y podrá ser eluida en forma casi pura. También, se pueden acoplar anticuerpos específicos a una matriz para purificar moléculas proteicas reconocidas por los anticuerpos. Debido a la alta especificidad de estas columnas de afinidad, algunas veces se pueden conseguir, en un solo paso, purificaciones del orden de 1000 a 10000 veces.

La resolución de las columnas convencionales de cromatografía está limitada por la falta de homogeneidad de las matrices, la cual genera un flujo desigual de los disolventes a través de la columna. Se han desarrollado nuevas resinas cromatográficas en forma de diminutas esferas (de 3 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) que pueden ser empaquetadas mediante un aparato especial formando un lecho uniforme en la columna. Con estas columnas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, de High Performance Liquid Chromatography) se alcanza un alto grado de separación. Como las columnas de HPLC contienen partículas empaquetadas de forma muy compacta, la velocidad de flujo a través de ellas es prácticamente nula a menos que se apliquen altas presiones (Alberts *et al*, 2002).

Otra importante técnica para la separación de proteínas está basada en la migración de partículas cargadas en un campo eléctrico. Este proceso es llamado electroforesis. Este procedimiento no se usa generalmente para purificar grandes cantidades de proteínas, sin embargo es bastante útil para métodos analíticos. Una de sus ventajas es que permite visualizar las proteínas separadas y así estimar rápidamente el número de proteínas diferentes en una mezcla o el grado de pureza en una preparación. Además, permite determinar algunas propiedades importantes como su punto isoeléctrico y su peso molecular aproximado. La electroforesis de proteínas generalmente se lleva a cabo en geles hechos con

polímeros entrecruzados, que funcionan como un tamiz molecular, diferenciando la migración de las proteínas de acuerdo a su tamaño y forma (Nelson y Cox, 2008).

Existen varios soportes como el almidón, la poliacrilamida y el acetato de celulosa. Uno de los soportes más populares es la poliacrilamida. Este soporte se forma por la polimerización vinílica de monómeros de acrilamida y el entrecruzamiento de cadenas largas de poliacrilamida por el co-monómero N,N'-metilen-bisacrilamida en condiciones anaeróbicas con la presencia de catalizadores como persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina, o 3-dimetilaminopropionitrilo. Las principales ventajas de los geles de poliacrilamida son las siguientes:

1. La composición del gel puede ser modificada de una forma controlada para lograr una mejor separación de las isoenzimas optimizando el tamizado molecular.
2. La matriz del gel es altamente homogénea.
3. El gel es claro y puede ser utilizado directamente para la cuantificación de actividad enzimática de bandas por densitometría.
4. Los resultados obtenidos con los geles de poliacrilamida son altamente reproducibles.
5. El uso de este soporte permite la detección de enzimas después de la electroforesis de muestras muy diluidas.
6. El sistema de los geles desnaturizantes SDS-poliacrilamida es el único medio electroforético adecuado para el análisis de muchas enzimas insolubles en agua que pueden ser renaturalizadas después de tratamientos apropiados.
7. Con este soporte se pueden obtener las bandas de proteínas más nítidas.

8. Los geles de poliacrilamida son rígidos, lo que es conveniente para su manipulación.

Los geles de poliacrilamida son reconocidos como el mejor medio para la separación de proteínas. Sin embargo, esto no siempre es cierto en el caso de las enzimas, ya que presenta algunas desventajas.

La más crítica es la formación de isoenzimas secundarias no genéticas como resultado de la acción de persulfato residual que no reaccionó al polimerizar el gel. Es un agente oxidante, el cual puede causar modificaciones estructurales en las enzimas o la pérdida de su actividad catalítica.

Además, la acrilamida y la bisacrilamida son altamente tóxicas. Incluso soluciones muy diluidas de estos compuestos pueden causar irritación en la piel y disturbios en el sistema nervioso central. Sin embargo, el gel polimerizado es relativamente no tóxico y puede ser manipulado de manera segura (Manchenko, 1994).

Un método electroforético comúnmente usado en la determinación de la pureza y peso molecular hace uso del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS). Este método es llamado SDS-PAGE por sus siglas en inglés (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis o electroforesis en gel de poliacrilamida – SDS). El SDS se enlaza a la mayoría de las proteínas en cantidades proporcionales a sus pesos moleculares, aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos. La unión del SDS contribuye a proporcionar a la proteína una carga neta altamente negativa, confiriendo a cada proteína una relación carga-masa similar. Además, la unión del SDS desnaturaliza parcialmente a las proteínas, por lo que asumen una forma similar. La electroforesis en la presencia de SDS separa a las proteínas exclusivamente con base en su masa (peso molecular), donde los polipéptidos pequeños migran más rápidamente. Después de la electroforesis, las proteínas se pueden visualizar por la adición de un colorante, como puede ser el azul de Coomasie, el cual se une a las proteínas y no al gel (Nelson y Cox, 2008).

Sin embargo, los sistemas tradicionales SDS-PAGE tienen un poder de resolución muy pobre por debajo de los 10 kDa. Por ejemplo el límite de separación en el sistema tradicional de Laemmli (1970), es superior a los 20 kDa, por debajo de éstos las proteínas son separadas parcialmente o no se pueden separar.

En cambio, existe un método que da una resolución mayor, especialmente en el rango de 5 a 30 kDa, que está basado en la introducción de Tricina como ion acarreador.

La separación de proteínas pequeñas en presencia de SDS es difícil, porque los péptidos pequeños pueden formar complejos de proteína y detergente del mismo tamaño y carga.

La glicina ( $pK_a$  9.6) y la tricina ( $pK_a$  8.15) se comportan un poco diferente en la separación de proteínas. La glicina, que es empleada en el sistema de Laemmli, lleva a la separación de proteínas muy grandes porque migra muy lentamente en el gel concentrador que es ácido, pero las proteínas que están por debajo de los 20 kDa no se separan o lo hacen parcialmente. Para solucionar este problema, una posibilidad es cambiar el ion acarreador.

Con la tricina, la separación de proteínas puede llevarse a cabo en condiciones ideales. Por ejemplo, se usa el mismo pH en el gel concentrador y en el separador y se pueden usar concentraciones bajas de acrilamida. A los valores de pH usuales entre 6.8 y 8.8, la tricina migra mucho más rápido que la glicina en el gel, a pesar de su mayor peso molecular, porque una mayor proporción se encuentra en forma aniónica, que es la que migra. Como consecuencia, el límite de separación se cambia a pesos moleculares bajos.

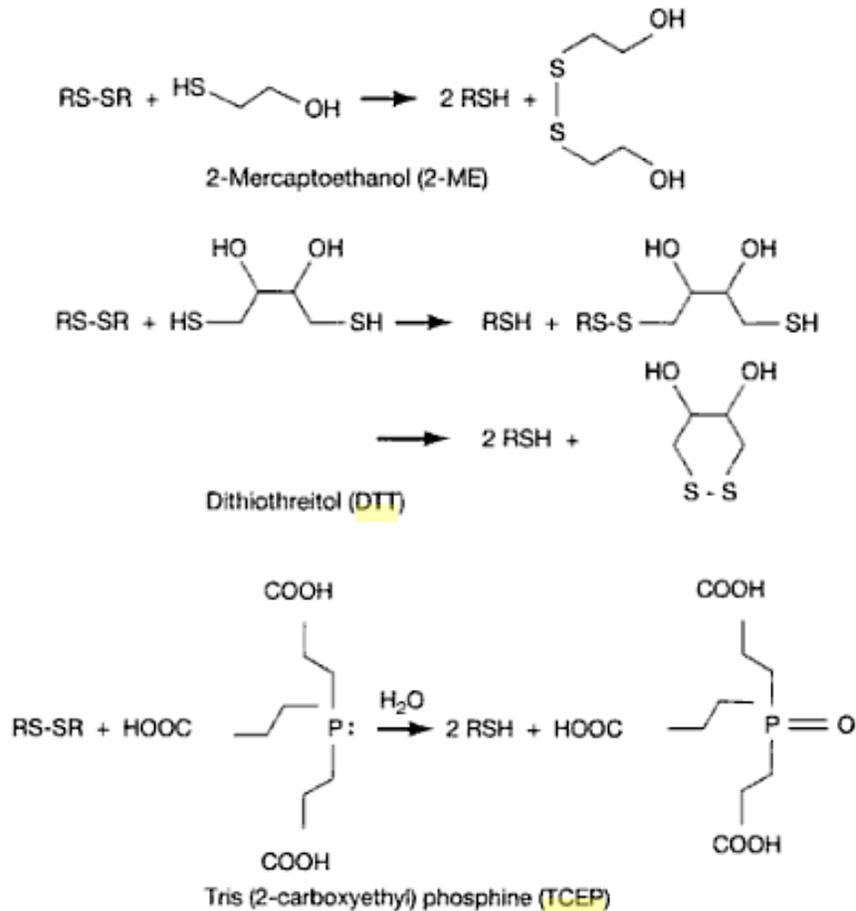
Resumiendo, el sistema de electroforesis con tricina ofrece las siguientes ventajas:

- 1) Se logra una separación de proteínas en el rango de 1 a 100 kDa con concentraciones de acrilamida por debajo del 10% de entrecruzamiento. Si se usa una concentración mayor, la resolución aumenta a un rango entre 5 y 20 kDa.

- 2) Los geles se pueden correr con o sin urea y no hay necesidad de crear gradientes en el gel.
- 3) Al utilizar bajas concentraciones de acrilamida es ideal para tareas preparativas. Al omitir la glicina y la urea, previene interferencias que pudieran ocurrir en una posterior secuenciación.
- 4) El sistema de electroforesis es reproducible a pesar de desviaciones en la fuerza iónica y el pH. Tolera la aplicación de elevadas cantidades de proteína sin efectos de sobrecarga y la aplicación de muestras en medios con elevada fuerza iónica (Schägger y von Jagow, 1987).

Muchas proteínas tienen uno o más puentes disulfuro. Para estudios funcionales y estructurales de las proteínas, en ocasiones es necesario romper estos puentes disulfuro, lo que se logra comúnmente reduciéndolos con mercaptanos, como son el ditioneitol (DTT), tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), 2-mercaptoetanol ( $\beta$ -mercapto), ácido tioglicólico, cisteína, etc. (Figura 7) (Hermanson, 2008).

El 2-mercaptoetanol es un agente reductor débil, soluble en agua y tiene un olor muy desagradable. El DTT es un agente reductor más fuerte que el 2-mercaptoetanol, también es soluble en agua y tiene un olor ligero. El TCEP es un agente reductor muy poderoso (incluso puede reducir al DTT oxidado), reduce los puentes disulfuro rápidamente, es altamente soluble en agua, no tiene olor, tiene una toxicidad muy baja y puede funcionar a valores de pH bajos (Simpson, 2003).



**Figura 7.** Agentes reductores comunes (Tomado de Simpson, 2003).

### 2.4.1. Zimogramas

En 1957, Hunter y Markert aplicaron por primera vez un procedimiento de tinción histoquímica a geles de almidón después de la electroforesis de extracto crudo de tejido para la visualización de áreas en el gel con actividad esterasa. Como resultado, la posición de la enzima quedó marcada por una banda (o zona) de tinción directamente en el gel. Esta visualización de enzimas sobre los geles electroforéticos se conoce como “zimogramas”.

Otro tipo de zimogramas se pueden obtener al renaturalizar un gel SDS-PAGE. Es una técnica eficiente para detectar actividad de enzimas como las peptidoglucano

hidrolasas. Se pueden incluir varios sustratos en el gel de poliacrilamida: células enteras, pared celular o peptidoglucano purificado de especies en estudio o de *Micrococcus lysodeikticus*, que es un sustrato clásico para este tipo de enzimas. La actividad se revela por la presencia de una banda translúcida sobre un fondo opaco después de una incubación. Además se puede estimar el peso molecular de la enzima (Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

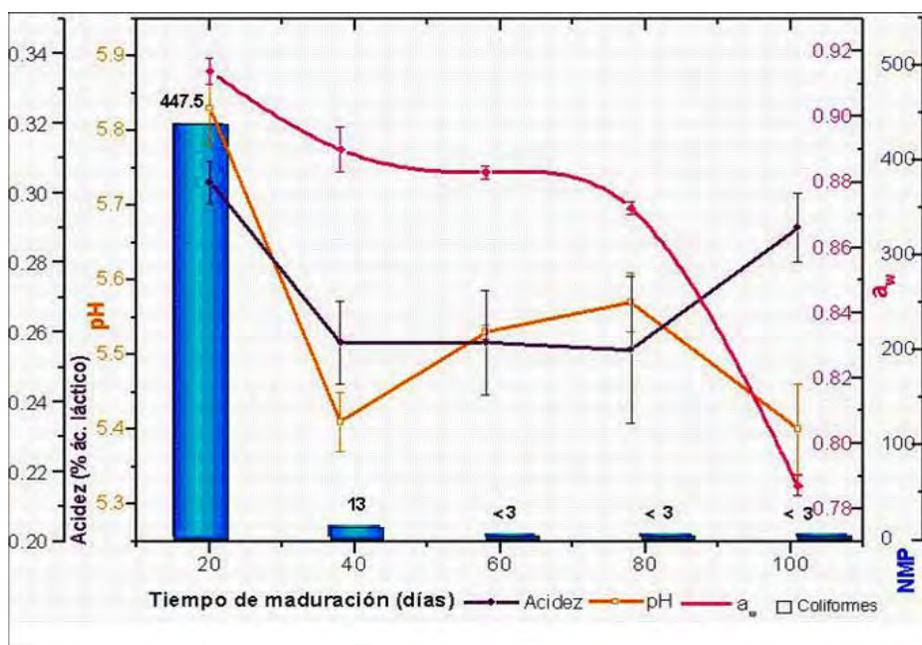
Los principios de detección de enzimas en geles electroforéticos no dependen del tipo del medio de soporte usado para la separación. Sin embargo, en la práctica, la elección adecuada del medio de soporte es de gran importancia. Esto se debe a que:

1. La calidad de los zimogramas obtenidos por los métodos de detección de enzimas dependen de las características que difieren significativamente entre cada medio de soporte.
2. Ciertos medios de soporte pueden ser preferibles cuando se usen algunas muestras biológicas como fuente de la enzima.
3. La elección de ciertos soportes puede depender de la pregunta que desee contestar y los recursos del investigador.
4. Algunos métodos zimográficos se adaptan mejor a ciertos soportes (Manchenko, 1994).

### 3. Antecedentes

#### 3.1. Actividad antibacteriana extracelular producida por BAL aisladas del queso Cotija

Bravo en el 2008 reportó una disminución de más del 95% de la población inicial de coliformes en muestras de queso Cotija después de 60 días de maduración (Figura 8). Esta disminución tan drástica puede deberse en parte, a factores fisicoquímicos que se ven modificados por el crecimiento de BAL en el queso, como lo son el pH, la acidez y la actividad acuosa ( $a_w$ ). Sin embargo, estos parámetros no explicarían por sí solos una disminución de coliformes tan drástica, por lo que este efecto puede deberse también a la producción de metabolitos inhibidores, como las bacteriocinas.

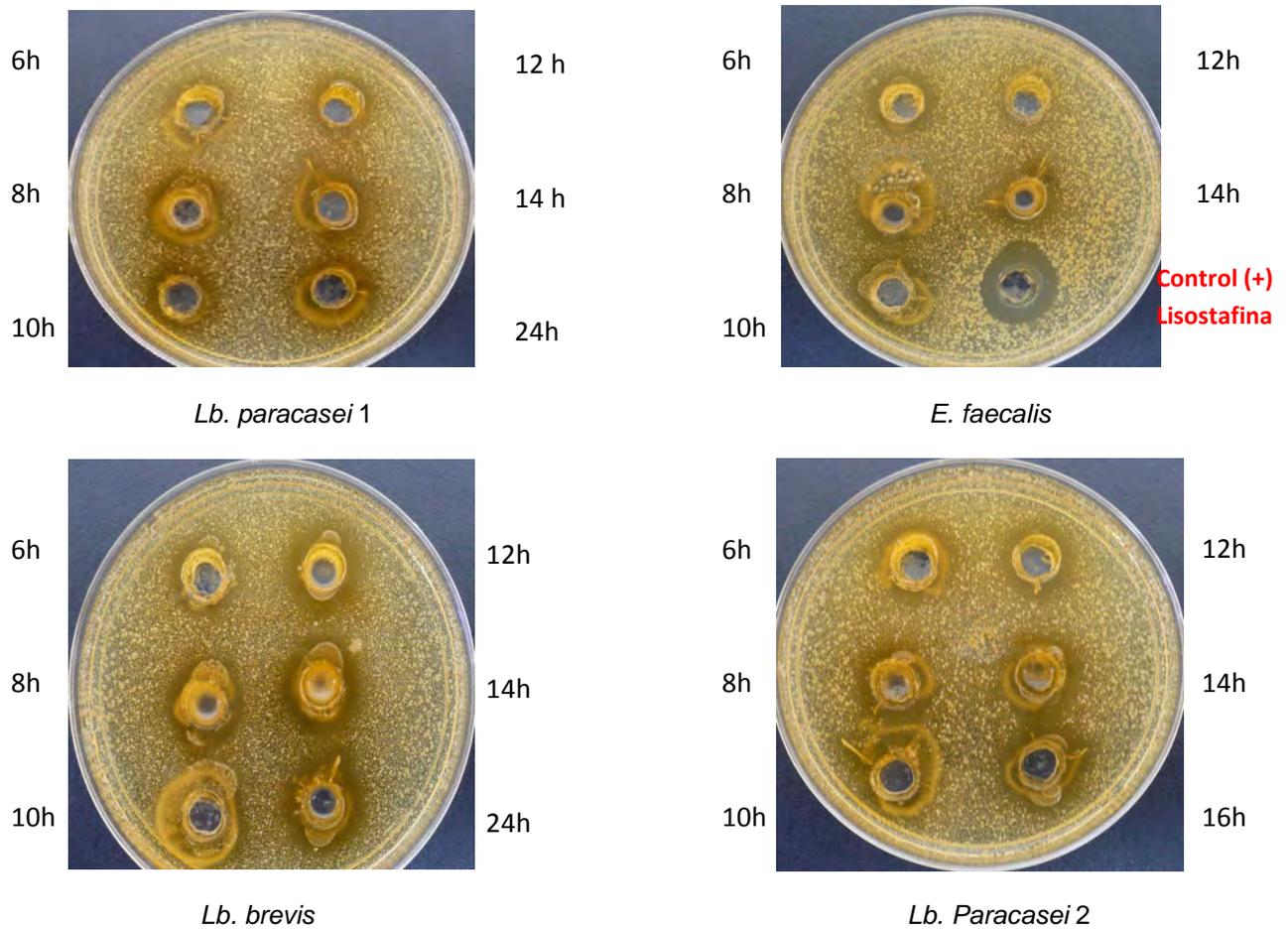


**Figura 8.** Resultados fisicoquímicos del queso Cotija, comparados con la cuenta de coliformes (Bravo, 2008).

En estudios posteriores realizados por Delgado-Arciniega, se encontró que algunas cepas de BAL aisladas del queso Cotija de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* presentaban actividad antibacteriana extracelular contra

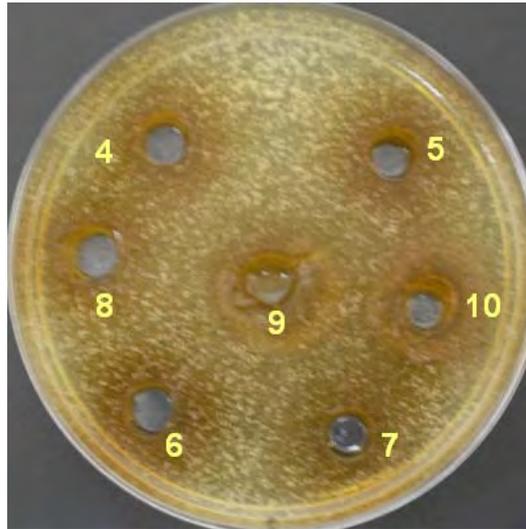
microorganismos indicadores como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Figura 9). Esta actividad extracelular se produjo en medio MRS. Los resultados fueron observados mediante una prueba de difusión en agar, en la que se aplicó el sobrenadante de la fermentación libre de células, neutralizado y concentrado por liofilización.

También, encontró que el tiempo al cual hubo una mayor inhibición de los microorganismos indicadores fue cuando las cepas en estudio se encontraban en la fase estacionaria temprana de crecimiento.

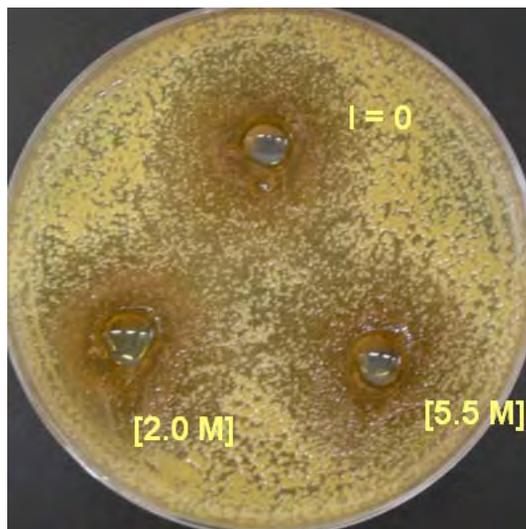


**Figura 9.** Prueba presuntiva por difusión en agar de las cepas en estudio usando como microorganismo indicador *S.aureus* (Delgado-Arciniega, 2010).

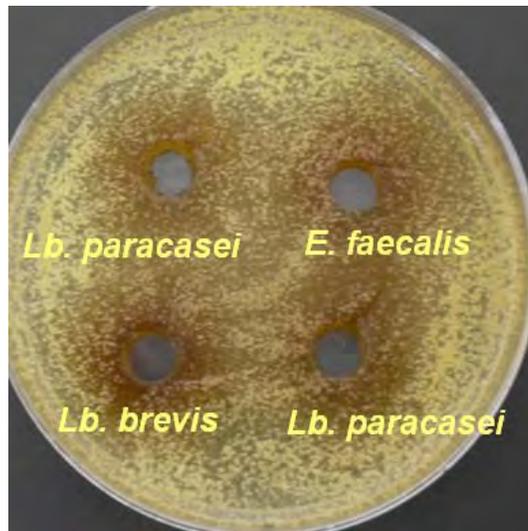
Además, Hernández-Alcántara en 2010 reportó que la actividad antibacteriana de los sobrenadantes se mantiene a diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10), fuerza iónica (0, 2 y 5.5 M de NaCl) y al ser sometidos a tratamientos con altas temperaturas (hasta 120°C por 20 minutos; Figuras 10, 11 y 12).



**Figura 10.** Efecto del pH en el sobrenadante de *Lb. paracasei* 2 frente a *S. aureus* (Hernández-Alcántara, 2010).



**Figura 11.** Efecto de la fuerza iónica en el sobrenadante de *Lb. paracasei* 1 frente a *S. aureus* (Hernández-Alcántara, 2010).



**Figura 12.** Efecto de la Temperatura (calentamiento 120°C / 20 min) frente a *S. aureus* (Hernández-Alcántara, 2010).

### **3.2. Identificación de compuestos con actividad antibacteriana de carácter proteínico producidos por BAL**

Existen numerosos reportes de BAL que producen compuestos con carácter proteínico y de la identificación y caracterización de los mismos.

En general, las bacteriocinas exhiben una actividad antagónica contra bacterias genéticamente relacionadas con las cepas productoras; sin embargo, hay algunas que presentan un amplio espectro de actividad. Por ejemplo, Line y colaboradores en 2008 describen una bacteriocina de 5.4 kDa producida por una cepa de *Enterococcus durans* aislada de pollos, con un amplio espectro de actividad, que incluye varias cepas de *Salmonella enterica* (serovariedades Enteritidis, Choleraesuis, Thyphimurium y Gallinarum), *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, y otras 20 especies de *Campylobacter*. Se han encontrado otras bacteriocinas con amplio espectro producidas por *Lactobacillus plantarum*,

*Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus mundtii*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus salivarius*, etc. (De Kwaadsteniet et al, 2005; Stern et al, 2006; Line et al, 2008; Shin et al, 2008).

Se han reportado varias BLIS producidas por BAL, principalmente del género *Lactobacillus*. En el 2001, Magnusson y Schnürer reportaron una sustancia inhibitoria producida por *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 con un peso molecular de 3 kDa. De igual forma, en el 2003, Atanassova y colaboradores caracterizaron un compuesto inhibitorio contra bacterias y levaduras con un amplio espectro, producido por una cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3 aislada de un queso amarillo de Bulgaria. Este compuesto tiene un peso molecular de 43 kDa y su actividad inhibitoria se extiende a bacterias como *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Helicobacter pylori*, además de varias levaduras como *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

También, se ha reportado actividad de peptidoglucano hidrolasa producida por BAL como *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, etc. con pesos moleculares entre los 18 y 55 kDa (Lortal y Chapot-Chartier, 2005). Para *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se ha reportado actividad lítica adherida a membrana a los 110 y 99 kDa, contra *Staphylococcus aureus* (García-Cano et al, 2009).

#### **4. Hipótesis**

La actividad antibacteriana que producen algunas BAL aisladas del queso Cotija es debida a compuestos extracelulares de carácter proteínico como peptidoglucano hidrolasas o bacteriocinas.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1. General**

Caracterización e identificación de la fracción proteínica extracelular con actividad antibacteriana producida por bacterias ácido lácticas aisladas de queso Cotija.

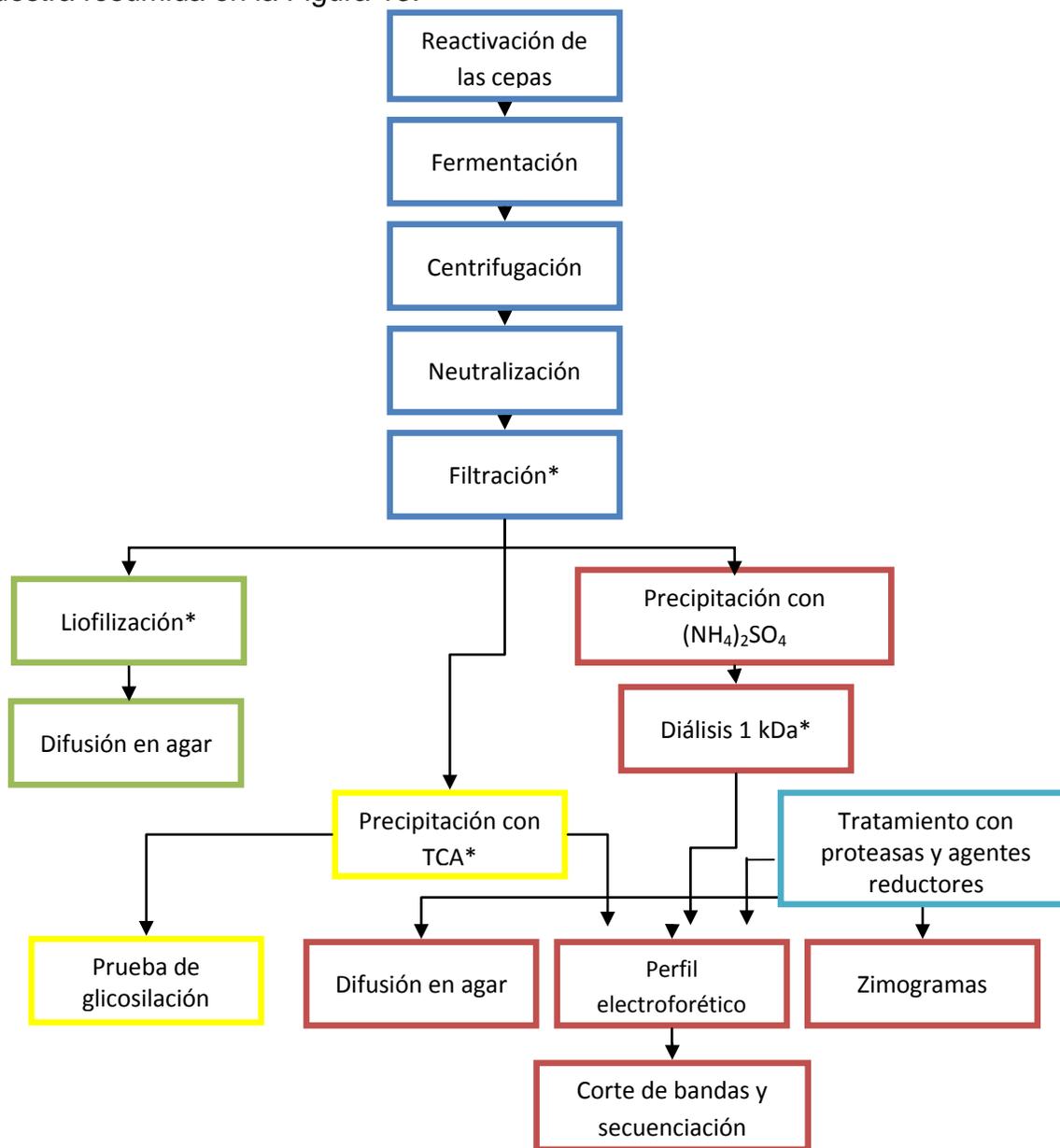
##### **5.2. Particulares**

- Encontrar las mejores condiciones para la purificación parcial y obtención de la mayor concentración de la fracción proteínica extracelular con actividad antibacteriana.
- Determinar el peso molecular de las proteínas antibacterianas producidas por las cepas de estudio.
- Identificación de las proteínas con actividad antibacteriana, utilizando la secuenciación de las bandas proteínicas separadas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

## 6. Metodología experimental

### 6.1. Diagrama general

La metodología experimental seguida durante el desarrollo de este trabajo se muestra resumida en la Figura 13.



**Figura 13.** Diagrama general de la metodología experimental. (\* Fracciones donde se determinó la concentración de proteína y de carbohidratos totales).

Las cepas previamente aisladas del queso Cotija que se emplearon en este estudio son:

- *Lactobacillus paracasei* 1
- *Enterococcus faecalis*
- *Lactobacillus brevis*
- *Lactobacillus paracasei* 2

Estas cepas fueron aisladas de quesos de la marca colectiva región de origen cuando estos llevaban entre 73 y 78 días de maduración. Se almacenaron en congelación a -20°C en caldo MRS (de man, Rogosa, Sharpe, marca Oxoid) con glicerol al 10% como crioprotector, en viales de plástico con tapa de rosca de 2 mL con esferas de vidrio perforadas.

## **6.2. Condiciones de producción de compuestos antibacterianos**

Para reactivar las cepas, se tomaron 3 esferas de vidrio perforadas y se inocularon en 20 mL de medio MRS en matraces Erlenmeyer de 50 mL. Se incubaron a 37°C durante 24 h a 250 rpm (Incubator Shaker, Innova 4000, New Brunswick Scientific). Posteriormente, se tomaron 2 mL y se inocularon en 100 mL de medio, en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Se incubaron a las mismas condiciones y los tiempos de fermentación fueron los reportados por Delgado-Arciniega, a los cuales se encontró la mayor actividad antibacteriana. Los tiempos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tiempos de fermentación

<b>Cepa</b>	<b>Tiempo (h)</b>
<i>Lactobacillus paracasei</i> 1	14
<i>Enterococcus faecalis</i>	12
<i>Lactobacillus brevis</i>	14
<i>Lactobacillus paracasei</i> 2	14

### **6.3. Condiciones de semipurificación**

#### **6.3.1. Extracto crudo**

Para separar las células del extracto extracelular, se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm (15,344 x g) durante 15 min a 4°C (Centrifuga Beckman J2-MC). Se desechó la pastilla y el sobrenadante se neutralizó con NaOH al 50% (p/v) para descartar que el efecto antibacteriano se deba a la producción de compuestos como el peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos o diacetilo, entre otros.

Posteriormente, se filtró la muestra con membranas con un tamaño de poro de 0.45 µm (Durapore Membrane Filters HVLP, Millipore) para eliminar las células remanentes o cualquier impureza y que las muestras quedaran estériles.

A partir de este punto, se probaron varios métodos para la purificación y concentración de los compuestos antibacterianos.

#### **6.3.2. Liofilización del extracto crudo**

Se liofilizaron (Freeze Dry System, Freezone 4.5, Labconco) directamente los 100 mL de las muestras y se resuspendieron en 2 mL de amortiguador de fosfatos (PBS) 100 mM a pH 7 para, posteriormente, poder utilizar a los concentrados en los ensayos.

Estos mismos tratamientos fueron realizados por Delgado-Arciniega y Hernández-Alcántara para sus determinaciones. Al neutralizar las muestras se descarta que la

actividad sea debida a la acción de ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuteriicina y ácido piroglutámico. Además, se determinó que su actividad se mantiene incluso a pH 10. Otros compuestos antibacterianos que pueden producir las BAL son de carácter proteínico, por lo que se decidió seguir una metodología de purificación de proteínas.

### **6.3.3. Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

Después de centrifugar, neutralizar y filtrar, las muestras se precipitaron con sulfato de amonio, probando dos condiciones: al 40% (p/v) y al 60% (p/v), con agitación, a 4°C durante 2 h. Como no precipitó mayor cantidad de proteína después de agregar el 40% (p/v) de sulfato de amonio, se decidió trabajar con esta concentración.

Después se centrifugaron a 17,000 rpm (39,191 x g) durante 30 minutos a 4°C (Beckman J2-MC). El precipitado se resuspendió en 1.5 mL de PBS y para eliminar el sulfato de amonio se llevó a cabo una diálisis con una membrana de tamaño de corte de 1 kDa contra agua durante 18 h a 4°C. También, se probó utilizando una membrana de tamaño de corte de 14 kDa, pero debido a que la pureza obtenida fue la misma, se decidió trabajar con la membrana de 1 kDa.

### **6.3.4. Liofilización de la fracción precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

Las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 40% (p/v) se liofilizaron y se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de PBS, para obtener un concentrado.

### **6.3.5. Ultrafiltración de la fracción precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

Las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 40% (p/v) se ultrafiltraron con una membrana de tamaño de poro de 10 kDa para concentrar 2 veces, obteniendo un volumen final de 1.5 mL.

### **6.3.6. Precipitación con TCA**

Los extractos crudos (7.2 mL) se precipitaron con TCA (ácido tricloroacético) a una concentración final del 10% (v/v). Se dejaron reposar a 4°C durante 1 h y se

centrifugaron a 14,000 rpm ( $19098 \times g$ ) durante 15 min (Biofuge Primo R, Haereus). Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con acetona al 90%. Posteriormente, se resuspendió en 200  $\mu$ L de PBS.

### **6.3.7. Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y TCA**

Las muestras que se precipitaron con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 40% (p/v) se precipitaron posteriormente con TCA siguiendo el mismo procedimiento que en el punto anterior. Todo el volumen que se obtuvo de las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  después de dializar (aproximadamente 3.5 mL) se precipitó con TCA a una concentración final del 10% (v/v) y se resuspendió en 600  $\mu$ L de PBS. Para facilitar la solubilización, se adicionaron 30  $\mu$ L de NaOH 0.1 N durante 2 a 3 minutos y después se adicionó el amortiguador de trabajo.

### **6.4. Determinación de la concentración de proteína (Método de Bradford)**

Fundamento de la técnica: Se emplea azul brillante de Coomasie G-250 como colorante. Al unirse a la proteína (principalmente a los aminoácidos básicos y aromáticos) hay un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm, pasando de un color rojo a azul, y es este aumento en la absorción a 595 nm el que se mide. Este ensayo es muy reproducible y rápido, ya que el proceso de unión del colorante se da en aproximadamente 2 minutos, y continúa estable durante 1 h aproximadamente (Bradford, 1976).

Ensayo: Se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor del reactivo de Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, No. de catálogo 500-0006, Bio-Rad Laboratories). En resumen:

Las muestras se diluyeron para que la cantidad de proteína estuviera dentro de la curva patrón elaborada con albúmina bovina sérica (de 0 a 10  $\mu$ g/mL). A 800  $\mu$ L

de muestra diluida ( $10^{-2}$  o  $10^{-3}$ ) se le añadieron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford, se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar por lo menos 5 minutos para que se estabilizara el color generado, del cual se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (Espectrofotómetro Biomate 3, Thermo Scientific).

Se determinó la concentración de proteína para las muestras de todos los tratamientos con el fin de conocer la purificación y concentración que se realizó en cada paso, así como la cantidad de proteína que se empleó en otras determinaciones.

### **6.5. Determinación de la concentración de carbohidratos totales (Fenol – sulfúrico)**

Fundamento de la técnica: Este método se basa en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones, una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple. Si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano (como el hidroximetilfurfural y el furfural) que condensan consigo mismos y otros subproductos para producir compuestos cafés y negros. También, pueden condensar con compuestos fenólicos como el fenol, resorcinol y  $\alpha$ -naftol para producir compuestos coloridos, los que son de utilidad para este análisis, y que se determinan a 490 nm. Es un método fácil, reproducible, eficaz y rápido.

Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser cuantificados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos.

La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo que se realiza una curva patrón (Dubois *et al*, 1956; Nielsen, 2003).

Ensayo: Se realizó una curva patrón con glucosa en un rango de 0 a 100 µg/mL. Se utilizó glucosa como referencia debido a que el medio MRS contiene principalmente este carbohidrato como fuente de carbono a una concentración de 20 g/L.

Las muestras se diluyeron para que entraran en el rango de la curva. Se tomaron 200 µL de muestra y se les adicionaron 120 µL de una solución de fenol al 5% (p/v) y 720 µL de ácido sulfúrico concentrado. Se agitó y dejó enfriar, aproximadamente durante 10 minutos. Posteriormente, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 480 nm contra un blanco de reactivos y agua en lugar de muestra (Espectrofotómetro Biomate 3, Thermo Scientific).

#### **6.6. Pruebas de difusión en agar**

La prueba de difusión en agar (Papagianni *et al*, 2006; Delgado-Arginiega, 2010) se realizó para comprobar la actividad antibacteriana de las muestras contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* DH5α. Estas cepas se tenían almacenadas en medio Infusión Cerebro Corazón o BHI (BD Bacto Brain Heart Infusion) con glicerol al 10% en viales con perlas de vidrio. Se inocularon 2 perlas de vidrio en 10 mL de caldo BHI en tubos de ensaye con tapón de rosca. Se incubaron a 37°C durante 24 h sin agitación (Gravity Convection Incubator) y concluido este tiempo se tomaron 200 µL y se inocularon en 10 mL de caldo BHI (inóculo al 2% (v/v)), incubando en las mismas condiciones durante 6 h (hasta alcanzar la fase logarítmica tardía de crecimiento).

Se prepararon cajas de Petri con una capa de 20 mL de medio BHI con agar al 1% (p/v) y se les colocó una sobrecapa de agar suave (0.8% (p/v)) de 10 mL al que se le agregaron 20 µL de una dilución  $10^{-2}$  de cultivo de las cepas previamente descrito (aproximadamente  $2 \times 10^5$  UFC). Se utilizaron estas condiciones y concentraciones porque se observó que se producía un césped bacteriano homogéneo idóneo para la detección de la actividad antibacteriana. Una vez

solidificado el agar, se hicieron pozos con el extremo superior de una punta para micropipeta P1000 estéril. El diámetro de los pozos resultantes fue de 9 mm. En estos pozos se cargaron 250  $\mu\text{L}$  de las muestras del extracto crudo liofilizado, el precipitado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y del precipitado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y TCA. Para poder probar estas últimas muestras, después de precipitar con TCA, al pellet se le agregaron 30  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.2 N durante 2 minutos y, posteriormente, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora (PBS), para facilitar su resuspensión (Nandakumar *et al*, 2002). Adicionalmente, se probó el caldo MRS sin inocular y sometido a los mismos tratamientos para descartar que la actividad inhibitoria se debiera al medio. También, se cargó un control positivo, que para el caso de *S. aureus* fue nisina (Nisaplin®) a una concentración de proteína activa de 0.25 mg/mL.

Se midieron los halos de inhibición producidos después de 24 h de incubación a 37°C.

## **6.7. Electroforesis SDS-PAGE y zimogramas**

### **6.7.1. Perfil electroforético**

Para identificar los compuestos de naturaleza proteínica y su peso molecular se llevó a cabo una electroforesis en geles de SDS-Tris-Tricina al 12% (p/v) siguiendo la metodología descrita por Bazán-Gómez en 2007 con el equipo Mini Protean 3 System, Electrophoresis Module de Bio-Rad Laboratories. Se utilizaron este tipo de geles para obtener una mejor resolución en la separación de las proteínas y posteriormente poder secuenciarlas. Se emplearon muestras de todos los tratamientos y se utilizaron marcadores de peso molecular bajo (SDS-PAGE Standards, low range. No. de catálogo 161-0304. Bio-Rad Laboratories) y de polipéptidos (Polypeptide SDS-PAGE Standards. No. De catálogo 161-0326. Bio-Rad Laboratories). Las muestras fueron tratadas antes de la electroforesis con un amortiguador de corrida, el cual contiene Tris-HCl 1 M pH 6.8, glicerol al 24% (v/v),

SDS al 8% (p/v), azul brillante de Coomasie al 0.02% (p/v) y 2-mercaptoetanol 0.2 M. Una vez agregado el amortiguador, las muestras se calentaron a ebullición durante 5 min. Las condiciones de la electroforesis fueron 80 V durante 4-5 h a temperatura de refrigeración (4°C). Las proteínas se tiñeron con una solución con azul brillante de Coomasie G-250 al 2.5% (p/v), metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v). Las imágenes se obtuvieron mediante el uso del densitómetro GS-700 (Bio-Rad) y se calcularon los pesos moleculares aproximados de las proteínas con el programa Quantity One® (Bio-Rad).

### **6.7.2. Identificación de las bandas con actividad**

Para identificar las bandas con actividad antibacteriana se utilizaron geles de SDS-Tris-Tricina al 12% (p/v) con células embebidas. Los microorganismos probados fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y *Micrococcus lysodeikticus*, con una concentración final en el gel del 0.2% (p/v).

Se corrieron los geles a las mismas condiciones que los anteriores y, posteriormente, se incubaron a 37°C y 50 rpm durante 18 h en una solución renaturalizante (Tris HCl 100 mM y Tritón 1% (v/v), pH 8) para que las proteínas recobraran su actividad.

La actividad se detectó por la presencia de una banda clara o translúcida sobre un fondo opaco. Para aumentar el contraste, el gel fue teñido con una solución de azul de metileno 0.1% (p/v) en KOH 0.01% (p/v) durante 20 minutos y posteriormente desteñido en agua hasta observar la aparición de las bandas (Leclerc y Asselin, 1989). Se utilizaron los mismos marcadores de peso molecular y además estos geles se compararon con su perfil electroforético.

### **6.8. Sensibilidad de los compuestos producidos a enzimas proteolíticas**

Se probó la sensibilidad de los concentrados obtenidos a enzimas proteolíticas. Las enzimas probadas fueron:

- Tripsina bovina (Research Organics), peso molecular 23.8 kDa, pH óptimo 7.6.
- Pronasa E (Sigma-Aldrich), peso molecular 20 kDa, pH óptimo 7.5.
- Proteinasa K (Roche), peso molecular 28.5 kDa, pH óptimo 7.5.

Las enzimas se utilizaron a una concentración final de 0.2 mg/mL. Las proteasas se probaron en las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y TCA, y se incubaron durante 1 h a 37°C, en un amortiguador de fosfatos 10 mM a pH 7.

Para determinar si las muestras mantuvieron su actividad, se realizó un zimograma y se analizó su perfil electroforético para determinar si las proteínas se habían degradado.

### **6.9. Sensibilidad a diferentes agentes reductores**

Las muestras precipitadas con TCA fueron tratadas con tres agentes reductores con distinto poder para comprar el perfil electroforético y su actividad que presentan en los zimogramas contra *M. lysodeikticus*. Esto para determinar si al romper los puentes disulfuro, los compuestos de carácter proteínico conservan su actividad.

Los agentes reductores empleados por orden de poder reductor de menor a mayor fueron:

- 2-Mercaptoetanol
- DTT (Ditiotreitol)
- TCEP (Tris (2-carboxietil) fosfina)

Los agentes reductores fueron agregados al amortiguador de corrida en una concentración de 0.2 M. El amortiguador de corrida se agregó a cada muestra y se calentaron en baño de agua a ebullición durante 5 minutos y después se cargaron

en geles SDS-Tris-Tricina al 10% (p/v) y en zimogramas con células de *M. lysodeikticus*.

#### **6.10. Secuenciación y análisis de la secuencia**

Se seleccionaron las bandas con mayor actividad antibacteriana, se cortaron y se mandaron a secuenciar a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

#### **6.11. Prueba de glicosilación de proteínas**

Se realizó una prueba para determinar si las proteínas de dos de las cepas de estudio (*Lb. paracasei* 2 y *E. faecalis*) se encontraban glicosiladas y que esto pudiera causar un incremento en su peso molecular.

Primeramente, se realizó una electroforesis en gel SDS-Tris-Tricina al 10% (p/v) de las muestras precipitadas con TCA. Posteriormente, se realizó una transferencia a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en inglés) PolyScreen® (Perkin-Elmer) a 15 V durante 1 h en un equipo Trans Blot® SD Semi-dry Transfer cell (Bio-Rad), con un amortiguador de transferencia de Tris 25 mM, Glicina 190 mM y metanol al 10% (v/v).

La membrana se utilizó para la detección y diferenciación de las glicosilaciones, empleando el kit DIG Glycan Differentiation de la marca Roche (No. de catálogo: 11 210 238 001). En el kit se usa a la fosfatasa alcalina para la visualización de bandas de proteína glicosilada.

La detección se logra mediante la unión de una lectina a la cadena de carbohidrato de la probable glicoproteína. La lectina está acoplada a digoxigenina, una molécula esteroidea que es reconocida a su vez por un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a la fosfatasa alcalina. Al incubar con el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP por sus siglas en inglés), que es sustrato de la fosfatasa

alcalina, se lleva a cabo su hidrólisis, lo que propicia la reducción del cloruro de 4-nitrotetrazolio (NBT por sus siglas en inglés), generando un compuesto colorido, permitiendo así la detección de glicoproteínas como bandas de color negro.

La diferenciación entre los tipos de glicosilaciones se hace probando la misma muestra con diferentes lectinas, cada una de las cuales tiene afinidad por un tipo específico de glicosilación. Las lectinas empleadas en esta prueba se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Lectinas empleadas y tipo de glicosilación que reconocen.

Lectinas	Azúcar que reconoce	Proteína control
Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Manosa (N-glicanos)	Carboxipeptidasa
Aglutinina de <i>Sambucus nigra</i> (SNA)	Ácido siálico (2-6) galactosa, ácido siálico (2-6) N-acetilgalactosamina, (N- y O-glicanos)	Transferrina
Aglutinina de <i>Maackia amurensis</i> (MAA)	Ácido siálico (2-3) / galactosa (N- y O-glicanos)	Fetuina
Aglutinina de cacahuate (PNA)	Galactosa $\beta$ (1-3) / N-acetilgalactosamina (O-glicanos)	Asialofetuina
Aglutinina de <i>Datura stramonium</i> (DSA)	Galactosa $\beta$ (1-4) N-acetilglucosamina (N- y O-glicanos)	Fetuina y asialofetuina

\*Nota: las proteínas control se cargaron en el gel para correr la electroforesis.

Después de la transferencia, la membrana se tiñó con solución de Ponceau S para la visualización de las proteínas y comprobar que se hubieran transferido. Posteriormente se destiñó con agua.

Una vez desteñida la membrana, se incubó a 4°C con agitación en una solución de bloqueo (que forma parte del kit) durante 1.5 h. Pasado este tiempo, se lavó dos veces con TBS (Tris buffered saline: 0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5) en

agitación a temperatura ambiente durante 10 min. Se hizo otro lavado con la solución amortiguadora 1 (TBS, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5) en agitación a temperatura ambiente durante 10 min.

Posteriormente, se incubó con la lectina correspondiente, en una dilución 1:10000 en solución amortiguadora 1 durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Después se lavó tres veces con TBS durante 10 min. Luego se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:10000 en TBS durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. La membrana se lavó nuevamente tres veces con TBS y se incubó con NBT / BCIP en una dilución 1:100 en la solución amortiguadora 2 (0.1 M Tris-HCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl, pH 9.5) hasta el desarrollo del color. Una vez finalizada la tinción se detuvo la reacción lavando con agua destilada en cantidad abundante (González-Martínez, 2010).

## 7. Resultados y discusión

Se midieron las concentraciones de proteína y carbohidratos de todos los tratamientos con el fin de determinar las mejores condiciones de purificación en las que la concentración de proteína sea la máxima posible y la de carbohidratos sea mínima.

Estas determinaciones fueron realizadas para: el sobrenadante de la fermentación libre de células (extracto crudo), este mismo sobrenadante concentrado por liofilización (extracto crudo liofilizado), las muestras obtenidas por la precipitación con sulfato de amonio del extracto crudo y estas mismas concentradas por liofilización y ultrafiltración, las muestras obtenidas por la precipitación con TCA del extracto crudo y las muestras obtenidas por precipitaciones sucesivas con sulfato de amonio y TCA del extracto crudo. Los tratamientos se describen en la sección de metodología experimental.

### 7.1. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína de cada paso de purificación de la misma, se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Concentración de proteína de las muestras de las cuatro cepas sometidas a los diferentes tratamientos (mg/mL).

<b>Tratamiento</b> <b>Cepa</b>	Extracto crudo	Extracto crudo liofilizado	Pp (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Pp y liofilizado	Pp y ultrafiltrado	Pp TCA	Pp (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y TCA
<i>Lactobacillus paracasei</i> 1	0.176	4.515	0.889	10.138	5.526	0.161	1.312
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.190	3.998	0.687	7.467	5.511	0.188	1.458
<i>Lactobacillus brevis</i>	0.162	5.137	0.152	8.072	4.456	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> 2	0.178	4.699	0.669	8.909	4.295	0.279	0.78
Medio MRS	0.157	5.063	0.103	-	-	-	-

## 7.2. Determinación de la concentración de carbohidratos totales

La concentración de carbohidratos totales en las muestras de cada paso de purificación se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Concentración de carbohidratos (mg / mL)

<b>Tratamiento</b> <b>Cepa</b>	Extracto crudo	Extracto crudo liofilizado	Pp (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Pp y liofilizado	Pp y ultrafiltrado	Pp TCA	Pp (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y TCA
<i>Lactobacillus paracasei</i> 1	1.487	147.7	0.381	0.564	-	0.034	0.020
<i>Enterococcus faecalis</i>	1.484	148.9	0.363	0.943	-	0.078	0.034
<i>Lactobacillus brevis</i>	1.470	148.5	0.401	0.928	-	0.072	0.025
<i>Lactobacillus paracasei</i> 2	1.412	144.2	0.458	0.775	-	0.058	0.022
Medio MRS	1.525	147.5	-	-	-	-	-

Primero se realizó la determinación de proteína en el extracto crudo extracelular, obteniéndose concentraciones entre 0.15 y 0.19 mg/mL. Luego, se intentó concentrar por liofilización, con lo cual se logró aumentar entre 20 y 30 veces la concentración de proteína, sin embargo, al ser sólo un método de concentración y no de purificación, también aumentó la concentración de otros compuestos, como los carbohidratos. Como se puede observar en la Tabla 4, la concentración de los carbohidratos aumentó alrededor de 100 veces con la liofilización.

Para concentrar únicamente las proteínas y no los carbohidratos, se decidió realizar una precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y con TCA del extracto crudo extracelular. Se observa un incremento significativo en la concentración de proteína y una disminución en la concentración de carbohidratos, que finalmente es lo que se buscaba, ya que los carbohidratos pueden interferir en otras determinaciones, como la visualización de bandas en el perfil electroforético, al generarse compuestos coloridos por reacciones de oscurecimiento no enzimático como la caramelización y las reacciones de Maillard.

Al tratar de concentrar mediante liofilización y ultrafiltración las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sucedió lo mismo que en el primer caso, ya que no sólo aumentó la concentración de proteína, sino que también lo hicieron los carbohidratos. Por el contrario, al precipitar con TCA se obtuvo la mejor purificación, ya que se tiene la proteína con una concentración muy baja de carbohidratos, logrando reducir también el color café del extracto. Esto fue importante, ya que ambos pueden interferir en análisis posteriores.

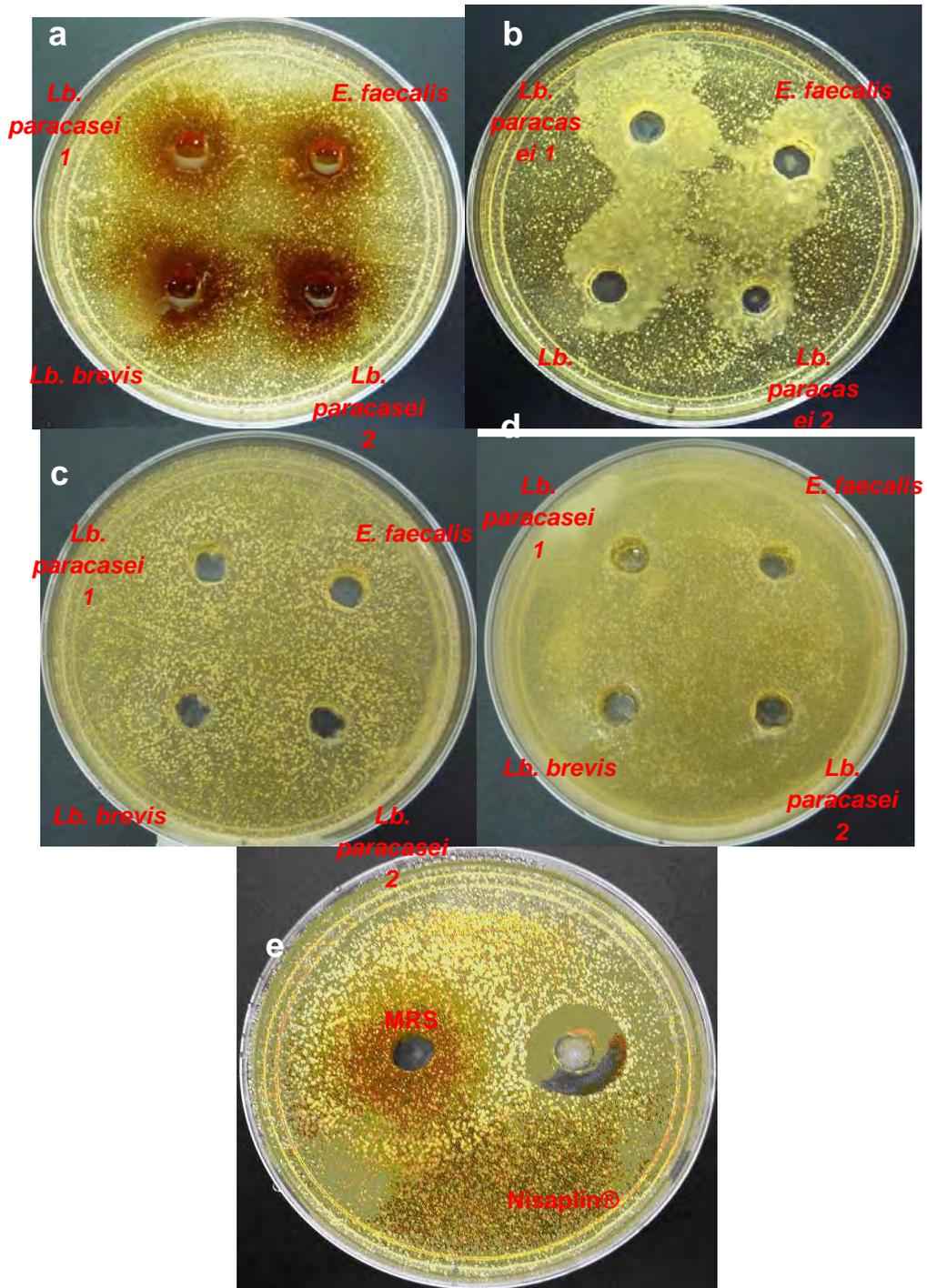
Es posible obtener muestras más puras y a mayor concentración, para lo cual, serían necesarios otros métodos de purificación, como pueden ser la cromatografía de intercambio iónico o de afinidad, ya que por estos métodos, las proteínas pueden unirse más específicamente al soporte que se use, eliminando una mayor cantidad de impurezas.

### **7.3. Pruebas de difusión en agar**

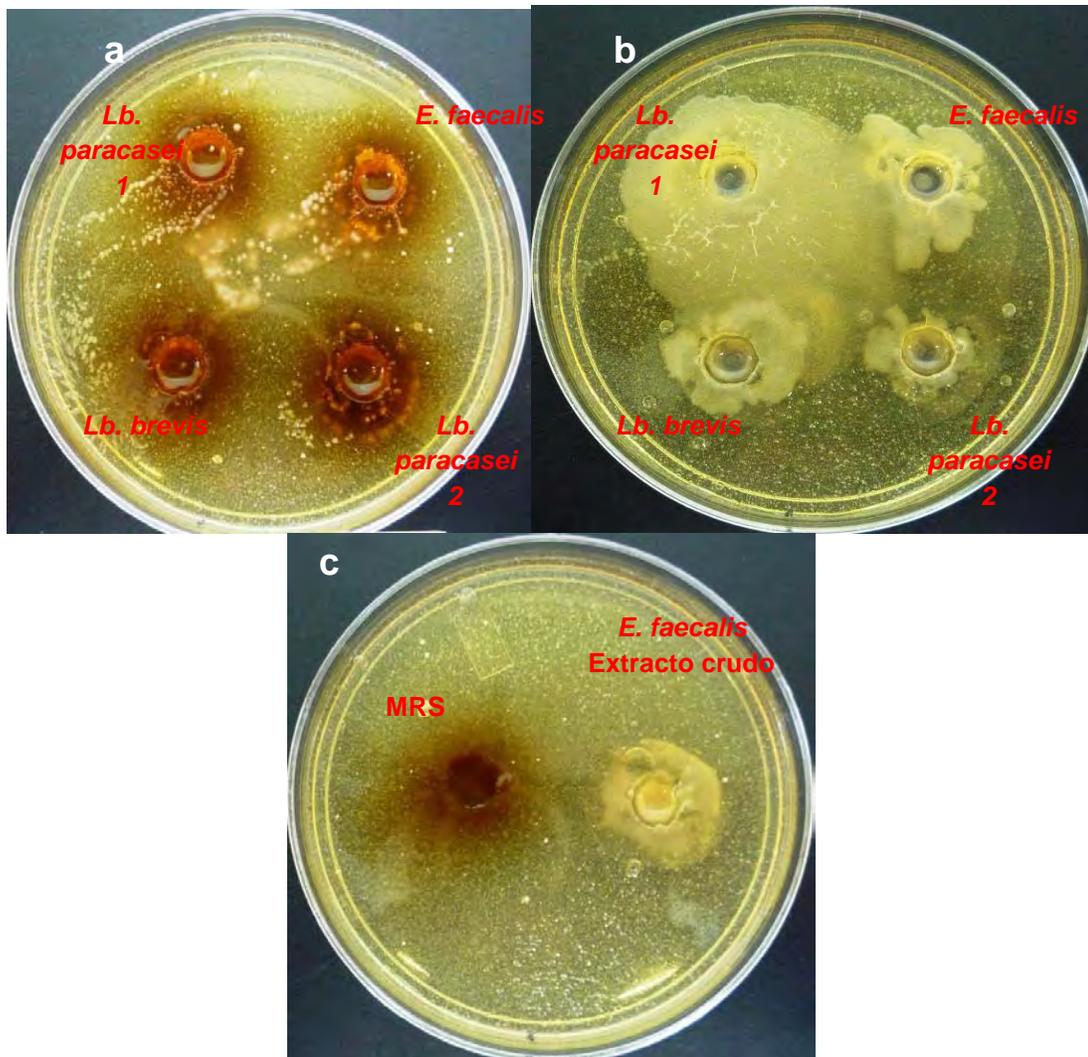
Para determinar si las muestras de cada paso de purificación presentaban actividad inhibitoria en contra de microorganismos indicadores, como *S. aureus* y *E. coli*, se realizó una prueba presuntiva de difusión en agar. Para esta prueba, se cargaron las muestras de los diferentes tratamientos en pozos hechos en agar inoculado con los microorganismos indicadores. Si se observa un halo de inhibición del microorganismo indicador alrededor del pozo, la prueba se considera positiva y quiere decir que la muestra presenta actividad antibacteriana.

Los resultados de las pruebas de difusión en agar contra *S. aureus* y *E. coli* se muestran en las Figuras 14 y 15 respectivamente.

Las únicas muestras que presentaron actividad antibacteriana contra los microorganismos indicadores fueron las del extracto crudo liofilizado. Las cuatro cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus* y de *E. coli*.



**Figura 14.** Pruebas de difusión en agar, microorganismo indicador: *S. aureus*.  
 a) Extracto crudo liofilizado (cantidad de proteína total por pozo entre 0.8 y 1 mg).  
 b) Precipitado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (cantidad de proteína total por pozo entre 0.13 y 0.18 mg). c) Precipitado con TCA (cantidad de proteína total por pozo entre 0.017 y 0.03 mg). d) Precipitado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y TCA (cantidad de proteína total por pozo entre 0.008 y 0.015 mg) e) Controles, nisina: 0.05 mg.



**Figura 15.** Pruebas de difusión en agar, microorganismo indicador: *E. coli*.  
 a) Extracto crudo liofilizado (cantidad de proteína total por pozo entre 0.8 y 1 mg). b) Precipitado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (cantidad de proteína total por pozo entre 0.13 y 0.18 mg).  
 c) Control.

Presuntamente, la actividad que presentan es bacteriostática, ya que dentro del halo de inhibición se observa una disminución de la carga del césped microbiano, no una ausencia, como es el caso del control positivo Nisaplin®. También, se observa que el medio MRS por sí solo no presenta una actividad inhibitoria. En el caso de las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , incluso el crecimiento del microorganismo indicador fue mayor.

Las muestras precipitadas con TCA y las de las precipitaciones sucesivas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y TCA no presentaron actividad, sin embargo, no aumentaron el crecimiento del microorganismo indicador como en el caso de las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Es posible que no presentaron actividad debido a que la cantidad de proteína total empleada fue muy baja como para tener algún efecto sobre los microorganismos indicadores, o debido a la falta de algún cofactor que se pudo haber eliminado durante la precipitación y la diálisis. También, puede deberse a que algunos compuestos de naturaleza no proteínica contribuyen al efecto antibacteriano en los extractos crudos liofilizados, ya que no se realiza ningún paso de purificación en estas muestras y al emplear métodos de purificación de proteínas, dichos compuestos se eliminan y se reduce la actividad.

#### **7.4. Perfil electroforético e identificación de bandas con actividad**

Las muestras de todos los tratamientos fueron sometidas a una electroforesis, con el fin de separar las proteínas, determinar sus pesos moleculares e identificar, mediante zimogramas, cuáles son las que presentan actividad antibacteriana.

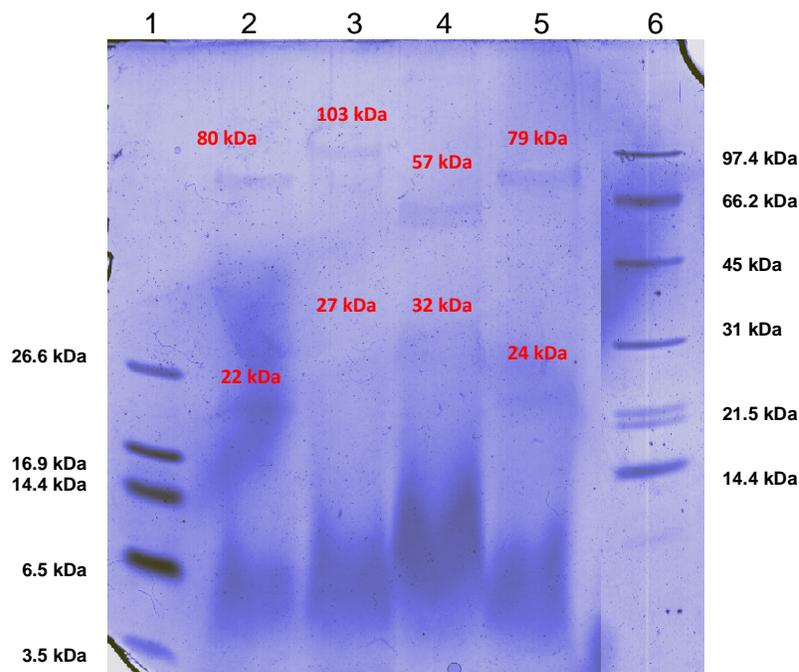
Se intentó colocar 60  $\mu\text{g}$  de proteína total de las muestras de todos los tratamientos en cada pozo del gel para la electroforesis; sin embargo, hubo muestras que debido a su concentración tan baja de proteína, no fue posible cargar esa cantidad. Por lo que se empleó el mayor volumen posible en cada pozo (45  $\mu\text{L}$ ).

##### **7.4.1. Extracto crudo**

Se realizó una electroforesis del extracto crudo extracelular de las cuatro cepas de estudio. Este extracto no se encuentra purificado ni concentrado, sin embargo, se deseaba conocer su patrón de bandas y su intensidad, ya que podía servir como referencia para compararlo con los tratamientos de purificación y concentración.

El perfil electroforético de las muestras del extracto crudo se muestra en la Figura 16.

Se pueden observar pocas bandas definidas para las cuatro cepas. No es un patrón muy claro y definido, porque la concentración de proteína es baja (<0.2 mg/mL, <10 µg de proteína total en cada carril). Además, entre 3 kDa y 17 kDa se observan manchas difusas, que pudieron ser causadas por los carbohidratos presentes en los extractos. El caldo MRS es un medio rico en glucosa (20 g/L), además contiene peptona y extracto de levadura, lo que le confiere un color caramelo intenso después de esterilizarlo (reacciones de Maillard, caramelización, etc.).



**Figura 16.** Perfil electroforético del extracto crudo: *Lb. paracasei* 1 (2), *E. faecalis* (3), *Lb. brevis* (4), *Lb. paracasei* 2 (5), marcador de peso molecular polipéptido (1) y bajo (6). Gel SDS-Tris-Tricina 12%. La cantidad de proteína total cargada en los pozos fue de 7.3 – 8.5 µg.

Para obtener un perfil electroforético más claro fue necesario incrementar la concentración de proteína, y a su vez eliminar los compuestos coloridos.

No se observó actividad antibacteriana en los zimogramas (imagen no mostrada).

#### **7.4.2. Extracto crudo liofilizado**

Como en el perfil electroforético de las muestras del extracto crudo se observaron bandas muy tenues, se concentró por liofilización, esperando obtener bandas más intensas.

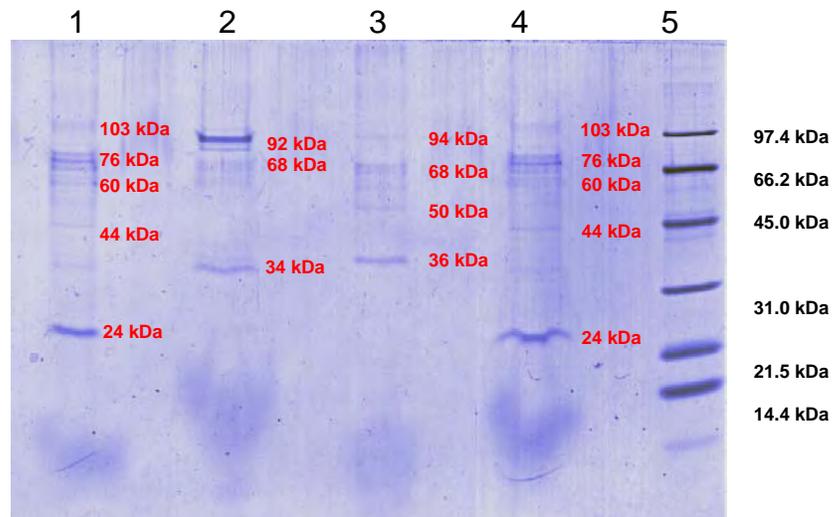
El extracto crudo liofilizado fue el único que presentó actividad inhibitoria en la prueba de difusión en agar, por lo que resultaba interesante conocer el perfil electroforético de las proteínas presentes, así como la identificación de las que tuvieran actividad. Sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados en la electroforesis, ya que los carbohidratos y el color que desarrolló el extracto interfiere en la migración de las proteínas y en la visualización de las bandas (imagen no mostrada).

Como se muestra en las Tablas 3 y 4, mientras que la concentración de proteína se incrementa entre 20 y 30 veces, los carbohidratos lo hacen alrededor de 100 veces. Esto dificulta la electroforesis y da lugar a la formación de manchas que cubren a las bandas de proteínas.

#### **7.4.3. Precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

Las muestras sometidas a este tratamiento presentaron una mayor concentración de proteína y una menor concentración de carbohidratos, por lo que resultó mejor para la visualización de bandas por electroforesis.

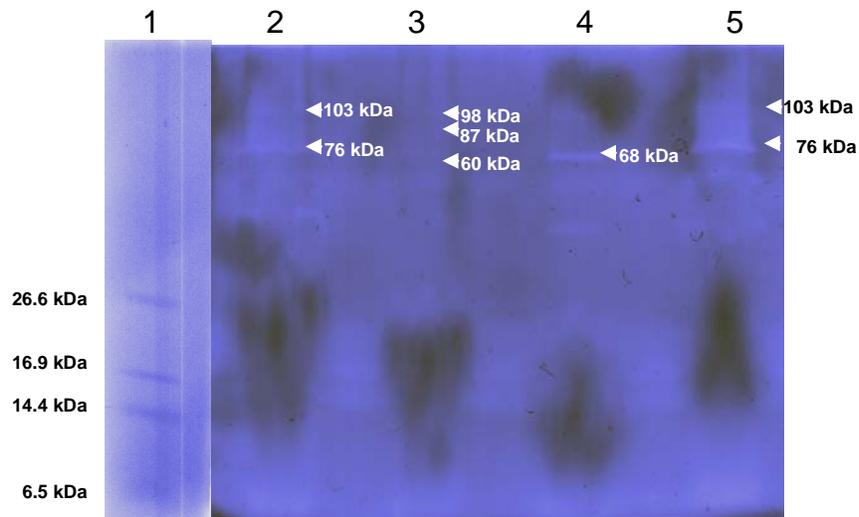
El perfil electroforético de las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se muestra en la Figura 17.



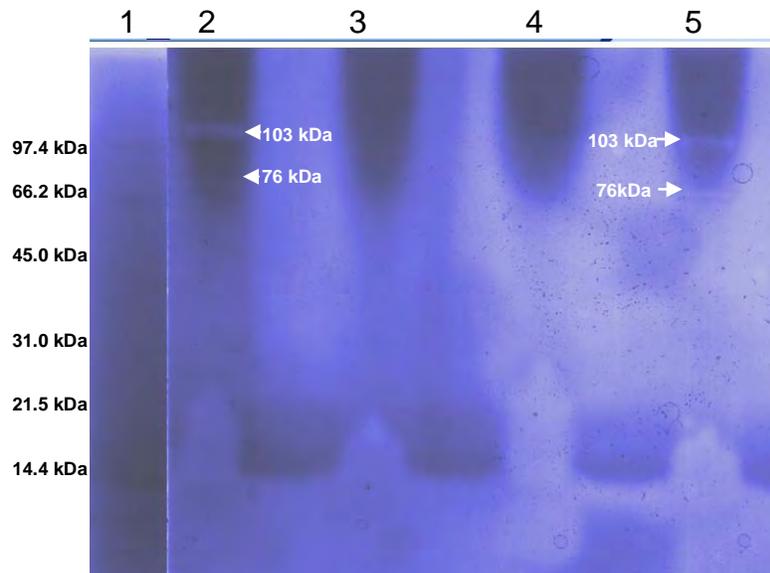
**Figura 17.** Perfil electroforético de los extractos precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : *Lb. paracasei* 1 (1), *E. faecalis* (2), *Lb. brevis* (3), *Lb. paracasei* 2 (4), marcador de peso molecular bajo (5). Gel SDS-Tris-Tricina 12%. La cantidad de proteína total cargada en los pozos fue de 30 – 40  $\mu\text{g}$ .

Con este tratamiento se puede observar un perfil electroforético más completo, hay una mayor cantidad de bandas definidas e intensas, además de que las manchas difusas de bajos pesos moleculares se hacen menos evidentes. Esto se debe a que la proteína se encuentra más pura y a una mayor concentración. Comparadas con el extracto crudo, la concentración de proteína de las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se incrementó más de cinco veces, mientras que la concentración de carbohidratos disminuye a una tercera parte.

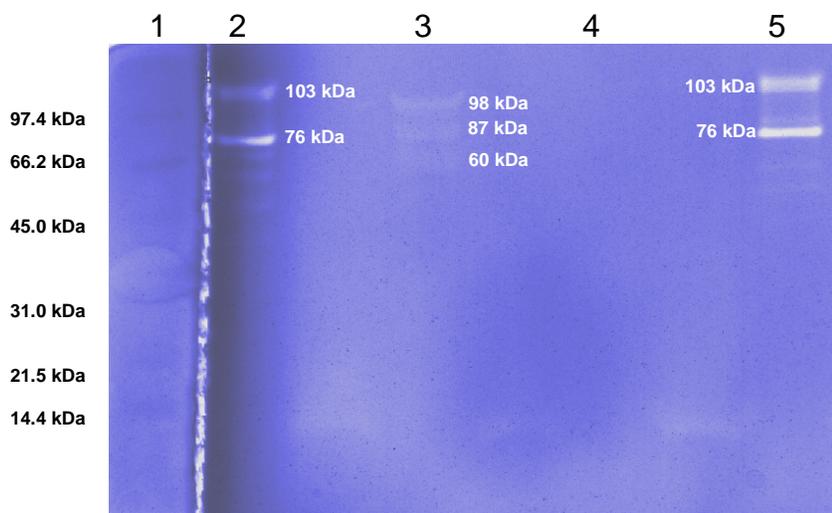
Pese a que no se observó actividad inhibitoria de crecimiento por el método de difusión en agar con este tratamiento, sí se observó actividad antibacteriana en zimogramas contra los tres microorganismos indicadores (Figuras 18, 19 y 20), y por lo que fue posible identificar las bandas que presentaron actividad y sus pesos moleculares aproximados.



**Figura 18.** Zimograma de actividad lítica celular contra *S. aureus* de los extractos precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : *Lb. paracasei* 1 (2), *E. faecalis* (3), *Lb. brevis* (4), *Lb. paracasei* 2 (5), marcador de peso molecular polipéptido (1). Gel SDS-Tris-Tricina 12%. La cantidad de proteína total cargada en los pozos fue de 30 – 40  $\mu\text{g}$ .



**Figura 19.** Zimograma de actividad lítica celular contra *E. coli* de los extractos precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : *Lb. paracasei* 1 (1), *E. faecalis* (2), *Lb. brevis* (3), *Lb. paracasei* 2 (4), marcador de peso molecular bajo (5). Gel SDS-Tris-Tricina 10%. La cantidad de proteína total cargada en los pozos fue de 30 – 40  $\mu\text{g}$ .



**Figura 20.** Zimograma de actividad lítica celular contra *M. lysodeikticus* de los extractos precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : *Lb. paracasei* 1 (2), *E. faecalis* (3), *Lb. brevis* (4), *Lb. paracasei* 2 (5), marcador de peso molecular bajo (1). Gel SDS-Tris-Tricina 12%. La cantidad de proteína total cargada en los pozos fue de 30 – 40  $\mu\text{g}$ .

Se observan las mismas bandas de actividad lítica para *Lb. paracasei* 1 y 2 contra los tres microorganismos indicadores, mientras que la muestra de *Lb. brevis* solamente presentó actividad contra *S. aureus*. Cabe destacar que no fue posible identificar bandas con actividad lítica de *Enterococcus faecalis* contra *E. coli* en el zimograma, aunque sí se observa actividad en la prueba de difusión en agar. Además, sí se identificaron bandas con actividad contra *S. aureus* y *M. lysodeikticus* con el mismo peso molecular (98 kDa, 87 kDa y 60 kDa).

#### 7.4.4. Liofilización y ultrafiltración del precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Con estos dos tratamientos sólo se llevó a cabo la concentración de las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Con ambos se logró incrementar significativamente la concentración de proteína, sin embargo, también se aumentó la concentración de carbohidratos y la intensidad del color, por lo que no fue posible obtener un buen perfil electroforético. Nuevamente, la aparición de manchas impidió observar las bandas.

Con la liofilización de las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ni siquiera se pudo realizar el corrimiento y la separación de las proteínas, ya que la elevada concentración de carbohidratos lo impidió (imagen no mostrada).

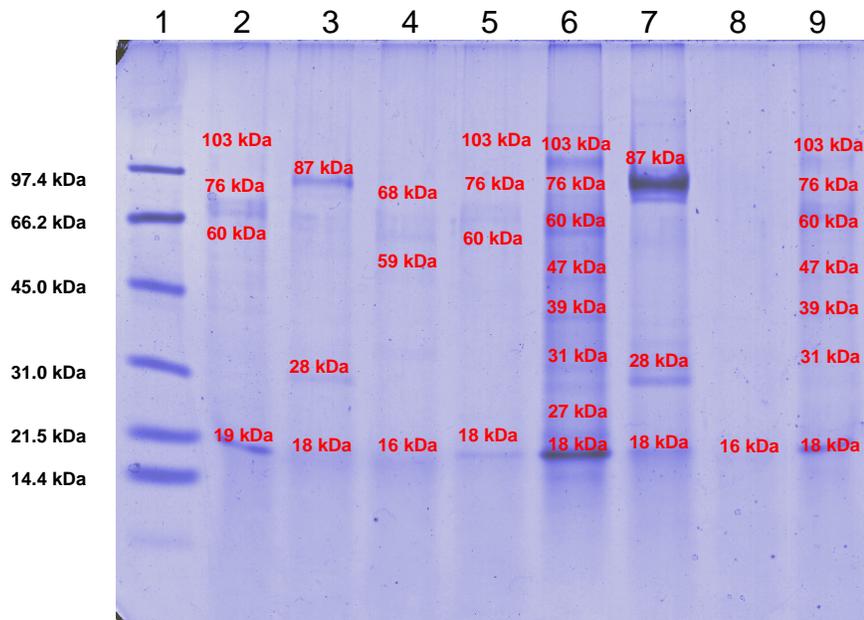
Al realizar una ultrafiltración con una membrana de 10 kDa, se esperaba poder eliminar (o por lo menor reducir) la concentración de carbohidratos que daban lugar a las bandas difusas que aparecían a bajos pesos moleculares y, a su vez, aumentar la concentración de proteína. Sin embargo, esto no fue así, las manchas se intensificaron y no se pudieron observar todas las bandas detectadas con la simple precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (imagen no mostrada).

#### **7.4.5. Precipitado con TCA y precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y TCA**

Se llevó a cabo una segunda precipitación, esta vez con TCA a una concentración final del 10% (v/v), esperando así incrementar la concentración de proteínas sin el inconveniente que presentaron los otros métodos de incrementar también la concentración de carbohidratos y el color.

El perfil electroforético de las muestras precipitadas sólo con TCA y con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , seguido de TCA se muestra en la Figura 21.

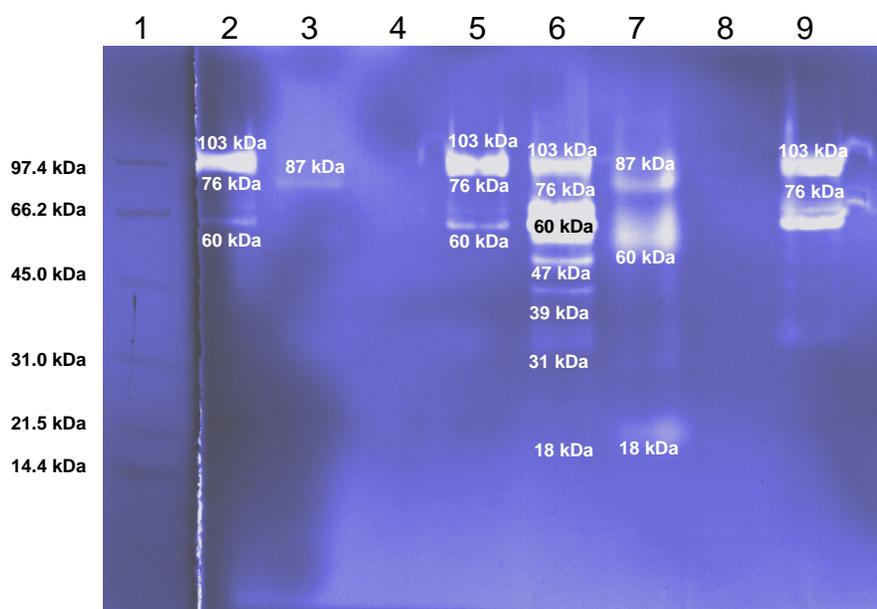
Con estos tratamientos, la cantidad de proteína total empleada en la electroforesis fue similar o menor que la empleada cuando sólo se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; sin embargo, la concentración de carbohidratos se redujo drásticamente, entre 10 y 20 veces. Se pudo obtener un extracto proteínico más puro, ya que fue posible visualizar más bandas y con mayor intensidad a comparación de los tratamientos anteriormente mencionados. Es notorio que la intensidad de las bandas sea mayor a comparación de las que se observaron en la Figura 17, a pesar que la concentración de proteína era similar. Probablemente, el color café y los azúcares presentes interfirieron en la cuantificación de proteína, ocasionando que se sobreestimara su valor.



**Figura 21.** Perfil electroforético. Extractos precipitados con TCA: *Lb. paracasei* 1 (2), *E. faecalis* (3), *Lb. brevis* (4), *Lb. paracasei* 2 (5). La cantidad de proteína total cargada en los pozos fue de 4.8 a 8.4  $\mu\text{g}$ . Muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y TCA: *Lb. paracasei* 1 (6), *E. faecalis* (7), *Lb. brevis* (8), *Lb. paracasei* 2 (9). La cantidad de proteína total cargada en los pozos fue de 23.4 a 43.7  $\mu\text{g}$ . Marcador de peso molecular bajo (1). Gel SDS-Tris-Tricina 10%.

Pese a que las muestras se sometieron a un tratamiento extremo, al precipitar con TCA, éstas conservaron su actividad y se pudo observar en el zimograma contra *M. lysodeikticus*. Además aumentó la intensidad de la actividad y se identificaron más bandas con actividad lítica que en las muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 22).

En la Tabla 5 se muestra un resumen las bandas con actividad lítica y sus pesos moleculares aproximados de las 4 cepas.



**Figura 22.** Zimograma de actividad lítica celular contra *M. lysodeikticus* de los extractos precipitados con TCA: *Lb. paracasei* 1 (2), *E. faecalis* (3), *Lb. brevis* (4), *Lb. paracasei* 2 (5). La cantidad de proteína total cargada en los pozos fue de 4.8 a 8.4  $\mu\text{g}$ . Muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y TCA: *Lb. paracasei* 1 (6), *E. faecalis* (7), *Lb. brevis* (8), *Lb. paracasei* 2 (9). La cantidad de proteína total cargada en los pozos fue de 23 a 44  $\mu\text{g}$ . Marcador de peso molecular bajo (1). Gel SDS-Tris-Tricina 10%.

La mayor actividad antibacteriana se observó en los extractos que fueron precipitados sucesivamente con sulfato de amonio y TCA. También, se observó el mayor número de bandas y éstas tuvieron la mayor intensidad. Esto fue debido a que las proteínas se encontraban más concentradas y había baja concentración de carbohidratos, por lo que no interfirieron con la visualización de las bandas en los perfiles electroforéticos.

**Tabla 5.** Pesos moleculares aproximados de las bandas con actividad antibacteriana.

Cepa	Bandas con actividad (kDa)						
<i>Lactobacillus paracasei</i> (1)	103	76	60	47	39	31	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	98	92	87	60	18		
<i>Lactobacillus brevis</i>	68						
<i>Lactobacillus paracasei</i> (2)	103	76	47	39			

Las cepas *L. paracasei* 1 y 2, al ser la misma especie, generan un perfil electroforético prácticamente idéntico, y tienen una actividad lítica similar; por lo tanto, estos resultados indican que se trata de la misma cepa. Las proteínas con actividad lítica de 103 kDa y 76 kDa, que fueron las más intensas, fueron activas contra los tres microorganismos indicadores, lo que indica que inhiben el crecimiento de microorganismos Gram positivos y Gram negativos. En lo que se refiere a bacteriocinas, existen pocos reportes de las que presentan amplio espectro de inhibición; por lo regular, son activas contra bacterias muy relacionadas, como pudieran ser otras BAL o bacterias Gram positivas. Sin embargo, pueden llegar a presentar actividad de amplio espectro, por lo que son capaces de inhibir bacterias Gram negativas. Otros compuestos que presentan actividad antibacteriana contra Gram positivas y Gram negativas son las PGHs y las BLIS. Para *Lb. brevis* sólo se identificó una banda de 68 kDa contra *S. aureus*, lo que nos indica que tiene especificidad contra este microorganismo. A diferencia de *Lb. paracasei*, no fue capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli*, por lo que se puede pensar que no es activa contra bacterias Gram negativas. Para *E. faecalis* se identificaron 3 bandas con actividad lítica sólo contra las bacterias Gram positivas; no se observó actividad contra *E. coli*.

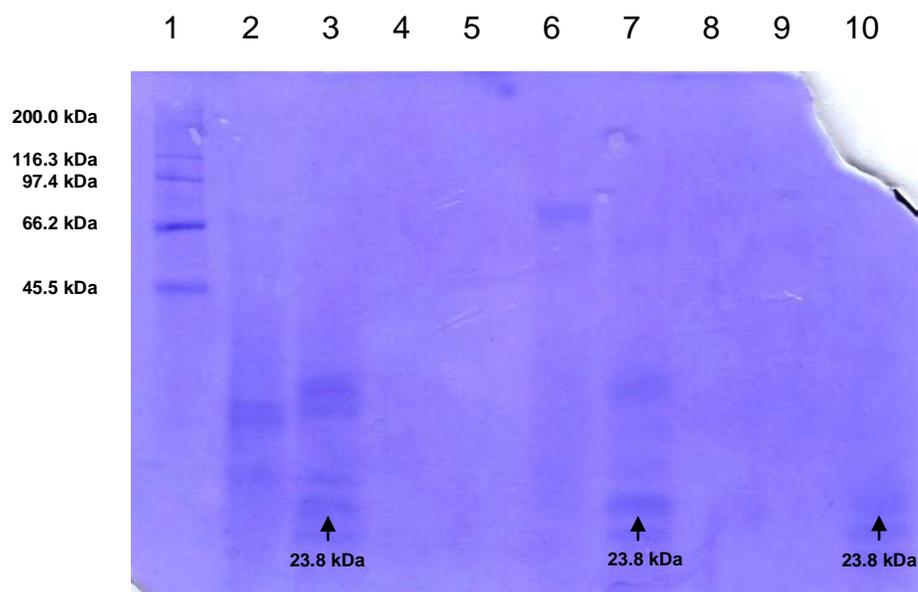
Las proteínas con actividad lítica producidas por las cuatro cepas no son bacteriocinas, debido a su peso molecular tan alto. Éstas se encuentran por arriba de los 30 kDa y las más intensas por arriba de los 60 kDa. Las bacteriocinas, por su parte, tienen pesos moleculares por debajo de los 10 kDa.

#### **7.5. Sensibilidad de los compuestos producidos a enzimas proteolíticas**

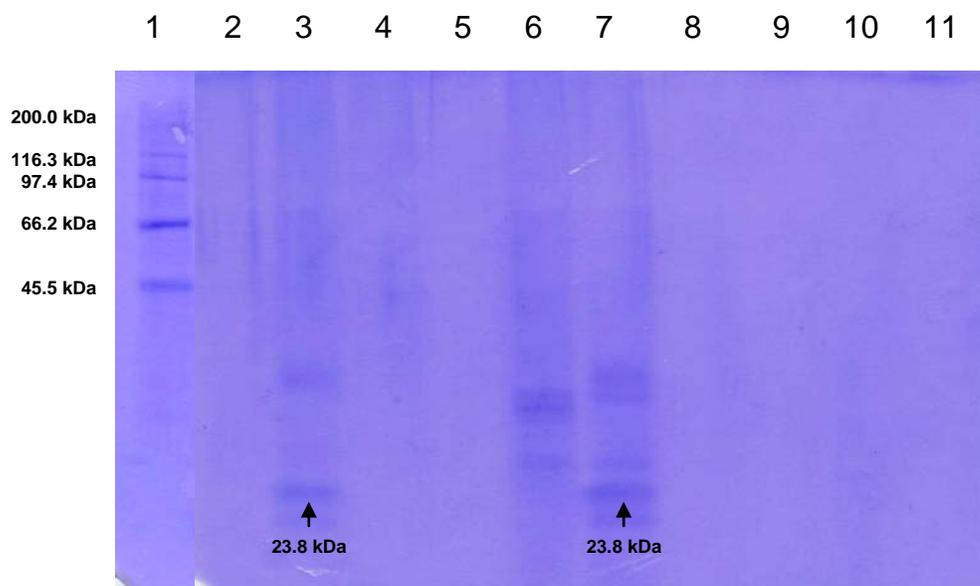
Al tratar las muestras con enzimas proteolíticas, además de comprobar su carácter proteínico, se hizo para determinar si al hidrolizar parcialmente las proteínas, eran capaces de conservar su actividad. En algunas ocasiones, las bandas con

actividad lítica que se observan por debajo de otras de mayor peso molecular, son productos de degradación de las mismas que conservan el sitio activo intacto.

El efecto que tuvieron las enzimas proteolíticas sobre las proteínas con actividad lítica se muestra en los geles de las Figuras 23 y 24 y los zimogramas de las Figuras 25 y 26.



**Figura 23.** Perfil electroforético de los extractos precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y TCA incubadas con enzimas proteolíticas. Marcador de peso molecular alto (1). *Lactobacillus paracasei* 1: sin enzima (2), con tripsina (3), con pronasa E (4), con proteinasa K (5). *Enterococcus faecalis*: sin enzima (6), con tripsina (7), con pronasa E (8), con proteinasa K (9). Cantidad de proteína total cargada en cada pozo: aprox. 20  $\mu\text{g}$ . Tripsina (control). Cantidad de tripsina cargada: 8  $\mu\text{g}$  (10). Gel SDS-Tris-Tricina 10%.



**Figura 24.** Perfil electroforético de los extractos precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y TCA incubadas con enzimas proteolíticas. *Lactobacillus brevis*: sin enzima (2), con tripsina (3), con pronasa E (4), con proteinasa K (5). *Lactobacillus paracasei* 2: sin enzima (6), con tripsina (7), con pronasa E (8), con proteinasa K (9). Cantidad de proteína total cargada en cada pozo: aprox. 20  $\mu\text{g}$ . Controles: pronasa E (10), proteinasa K (11). Cantidad de proteasa cargada: 8  $\mu\text{g}$  (10). Gel SDS-Tris-Tricina 10%.

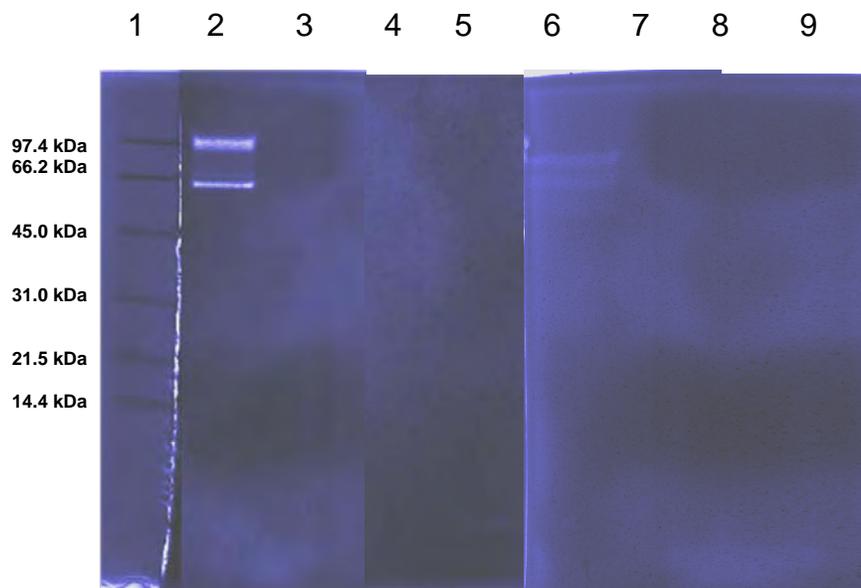
De las tres proteasas empleadas en este ensayo, la única que se pudo identificar en los controles de la electroforesis fue la tripsina. Se observan tres bandas cercanas a los 23.8 kDa que pesa esta proteasa. Con esto podemos asegurar que el corrimiento en los geles SDS-Tris-Tricina de las muestras con respecto a los marcadores de peso molecular es el adecuado. Además, previamente se había probado la metodología para este tipo de geles, utilizando como controles ovoalbúmina y lisozima, y los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

La tripsina fue capaz de degradar todas las proteínas de las 4 cepas, incluyendo las de actividad lítica. Se puede observar en las Figuras 23 y 24, el perfil electroforético de las muestras antes y después del tratamiento. Para las muestras sin proteasa se observa el mismo patrón de bandas que se muestra en la Figura 21. En cambio, para las muestra que fueron tratadas con tripsina se observa una degradación de las bandas, desaparecen las bandas de pesos moleculares altos (principalmente las bandas de 103 y 76 kDa de las dos cepas de *Lb. paracasei*, la banda intensa de 88 kDa de *E. faecalis* y las de 68 kDa de *Lb. brevis*) y aparecen

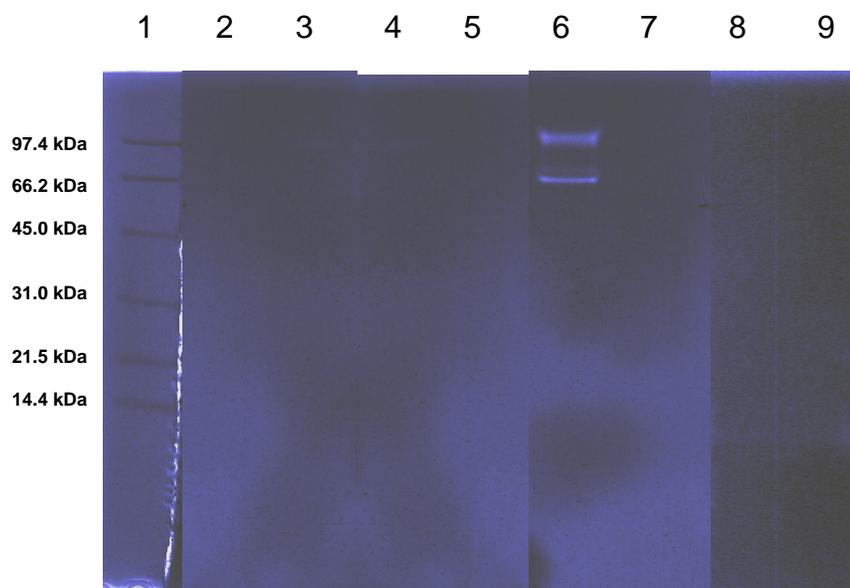
otras bandas a pesos moleculares menores, además de las correspondientes a la propia tripsina.

Además de la hidrólisis de las proteínas, se pudo observar mediante zimogramas (Figuras 25 y 26) que se pierde por completo la actividad lítica que se había observado en la Figura 22.

La tripsina es una serin proteasa que corta péptidos en el extremo carboxilo de la lisina y arginina principalmente. La hidrólisis es más lenta si un residuo ácido está cerca del sitio de corte, y puede no haber corte si enseguida se encuentra una prolina (Sigma-Aldrich Enzyme Explorer). Además, considerando la concentración empleada y el tiempo del tratamiento, se podía esperar que la hidrólisis no fuera tan severa como para producir péptidos demasiado pequeños. De hecho, se pueden observar bandas de los productos de degradación entre los 20 y los 30 kDa.



**Figura 25.** Zimograma de actividad lítica celular contra *M. lysodeikticus* de los extractos precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y TCA incubados con enzimas proteolíticas. Marcador de peso molecular alto (1). *Lactobacillus paracasei* 1: sin enzima (2), con tripsina (3), con pronasa E (4), con proteinasa K (5). *Enterococcus faecalis*: sin enzima (6), con tripsina (7), con pronasa E (8), con proteinasa K (9). Cantidad de proteína total cargada en cada pozo: aprox. 20  $\mu\text{g}$ . Gel SDS-Tris-Tricina 10%.



**Figura 26.** Zimograma de actividad lítica celular contra *M. lysodeikticus* de los extractos precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y TCA incubados con enzimas proteolíticas. Marcador de peso molecular alto (1) *Lactobacillus brevis*: sin enzima (2), con tripsina (3), con pronasa E (4), con proteinasa K (5). *Lactobacillus paracasei* 2: sin enzima (6), con tripsina (7), con pronasa E (8), con proteinasa K (9). Cantidad de proteína total cargada en cada pozo: aprox. 20  $\mu\text{g}$ . Gel SDS-Tris-Tricina 10%.

Las otras dos proteasas, la pronasa E y la proteinasa K, no se pudieron identificar en el perfil electroforético, pese a que tienen pesos moleculares muy parecidos al de la tripsina. Sin embargo, tampoco se observa ninguna banda en los carriles correspondientes a las muestras tratadas con estas enzimas, ni se conserva la actividad inhibitoria en el zimograma.

La proteinasa K posee actividad de endopeptidasa, es una serin proteasa no muy específica; corta entre un aminoácido alifático o aromático y cualquier otro. Es capaz de reducir una proteína a aminoácidos libres dependiendo de la concentración y el tiempo de incubación. Además, se estimula su actividad con SDS, el cual fue empleado para la electroforesis (Sigma-Aldrich Enzyme Explorer).

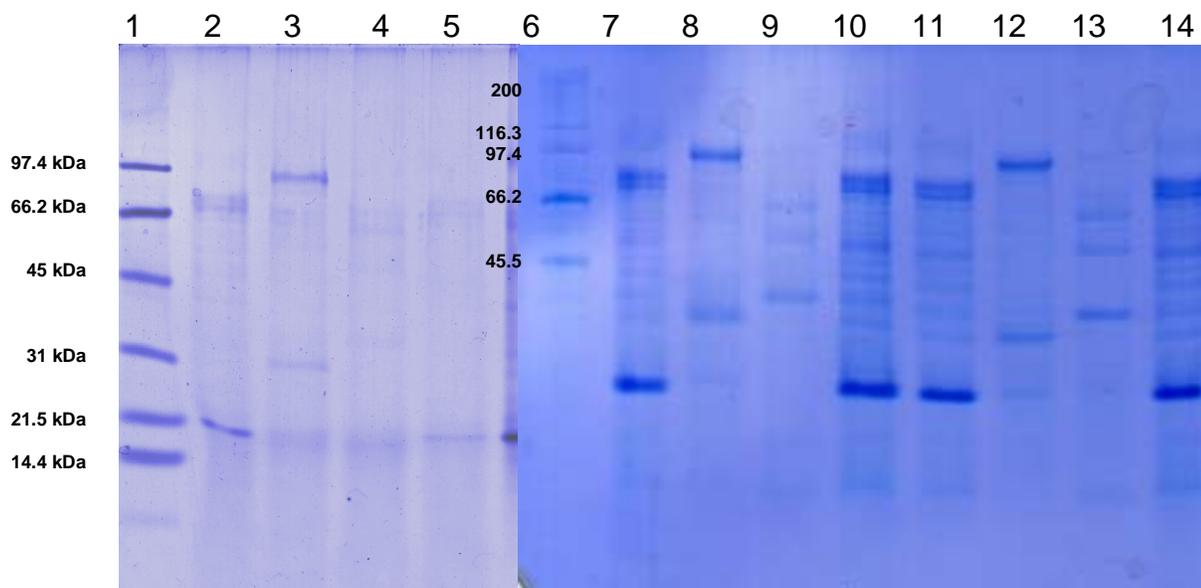
Por su parte, la pronasa E también es una serin proteasa que es estimulada por la presencia de SDS. Hidroliza enlaces peptídicos en el extremo carboxilo del ácido glutámico o aspártico (Sigma-Aldrich Enzyme Explorer).

Con estos resultados se comprueba la naturaleza proteínica de los compuestos generados por las cepas en estudio con actividad antibacteriana, y que además, dicha actividad depende de la estructura completa de la proteína. En ocasiones, se pueden observar bandas de actividad inhibitoria en zimogramas por debajo de otras de mayor intensidad. Éstas pueden ser debidas a la degradación de la proteína original que, pese a perder parte de su estructura primaria, continúa teniendo actividad al permanecer intacto su sitio activo. Lo cual no es el caso para las proteínas de estudio, ya que al hidrolizarlas, ninguna fue capaz de mantener su actividad.

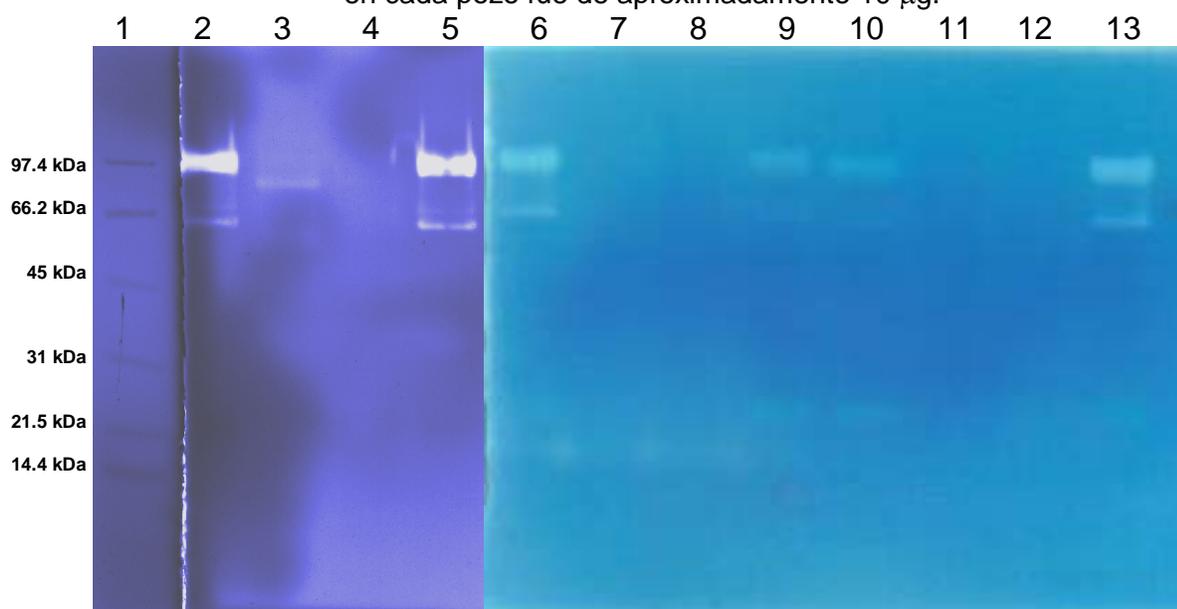
#### **7.6. Sensibilidad a diferentes agentes reductores**

El tratamiento de las muestras con agentes reductores fuertes se realizó para determinar si la actividad antibacteriana es producida por proteínas que forman dímeros, trímeros, tetrámeros, etc., que se estabilizan por la presencia de puentes disulfuro. Al reducir un puente disulfuro, éste se rompe dando lugar a grupos sulfidrilos.

No se observó diferencia en la actividad lítica al tratar las muestras con diferentes agentes reductores (Figuras 27 y 28), por lo que, presuntamente, su actividad no depende de la presencia de puentes disulfuro en la estructura de las proteínas.



**Figura 27.** Perfil electroforético de los extractos precipitados con TCA y tratados con diferentes agentes reductores. 2-Mercaptoetanol: *Lactobacillus paracasei* 1 (2), *E. faecalis* (3), *Lb. brevis* (4), *Lb. paracasei* 2 (5), marcador de peso molecular bajo (1), marcador de peso molecular alto (6). TCEP: *Lactobacillus paracasei* 1 (7), *E. faecalis* (8), *Lb. brevis* (9), *Lb. paracasei* 2 (10). DTT: *Lactobacillus paracasei* 1 (11), *E. faecalis* (12), *Lb. brevis* (13), *Lb. paracasei* 2 (14) Gel SDS-Tris-Tricina 10%. La cantidad de proteína total empleada en cada pozo fue de aproximadamente 10 µg.



**Figura 28.** Gel de actividad lítica celular (zimograma) contra *M. lysodeikticus* de los extractos precipitados con TCA tratados con diferentes agentes reductores. 2-Mercaptoetanol: *Lactobacillus paracasei* 1 (2), *E. faecalis* (3), *Lb. brevis* (4), *Lb. paracasei* 2 (5), marcador de peso molecular bajo (1). TCEP: *Lactobacillus paracasei* 1 (6), *E. faecalis* (7), *Lb. brevis* (8), *Lb. paracasei* 2 (9). DTT: *Lactobacillus paracasei* 1 (10), *E. faecalis* (11), *Lb. brevis* (12), *Lb. paracasei* 2 (13) Gel SDS-Tris-Tricina 10%. La cantidad de proteína total empleada en cada pozo fue de aproximadamente 10 µg.

Pese a que los agentes empleados tienen diferente poder reductor, no se vio reflejado en la actividad antibacteriana de los compuestos en estudio ni en el perfil electroforético. El agente reductor más fuerte es el TCEP y el que presenta menor fuerza es el 2-mercaptoetanol.

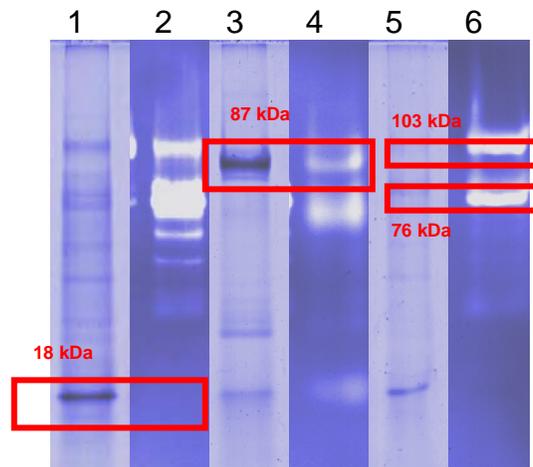
La estructura de los compuestos antibacterianos no está estabilizada por puentes disulfuro, ni son importantes en la formación de una estructura cuaternaria que de lugar a la formación de dímeros, trímeros o tetrámeros, ya que el perfil electroforético muestra las mismas bandas con los mismos pesos moleculares. Tampoco hay puentes disulfuro implicados en la actividad; no participan en la formación del sitio catalítico o en la formación de residuos no comunes dados por la formación de enlaces covalentes entre aminoácidos.

Algunos compuestos antibacterianos que se pudieran ver afectados con estos tratamientos son las bacteriocinas que contienen lantionina o  $\beta$ -metil lantionina, ya que estos residuos se forma por puentes disulfuro, que se rompen al reducirlos.

### **7.7. Secuenciación y análisis de las secuencias**

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la identidad de las proteínas con actividad antibacteriana, por lo cual fue necesario conocer su secuencia de aminoácidos.

Las bandas que se seleccionaron para su secuenciación se muestran en la Figura 29. La banda de 18 kDa de *Lb. paracasei* 1 se seleccionó a pesar de no presentar una actividad inhibitoria tan intensa como otras bandas debido a que tiene un peso molecular relativamente bajo y, además, está presente en todas las cepas. De *E. faecalis* se seleccionó la banda de 87 kDa, que fue la más intensa y la que presentó mayor actividad a lo largo de las determinaciones de esta cepa. Finalmente, de *Lb. paracasei* 2 se seleccionaron dos bandas; una a 103 kDa y otra a 76 kDa, que son, junto con las de *Lb. paracasei* 1, las que presentaron la mayor actividad.



**Figura 29.** Bandas seleccionadas para su secuenciación. La figura muestra en los carriles 1, 3 y 5 el perfil electroforético y en los carriles 2, 4 y 6 el gel de actividad. *Lb. paracasei* 1 (1 y 2), *E. faecalis* (3 y 4), *Lb. paracasei* 2 (5 y 6). Gel SDS-Tris-Tricina 10%.

Las muestras fueron analizadas por el método identificación de proteínas por LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem), el cual permite identificar proteínas a partir del espectro de masas de su huella peptídica, e incluso de secuenciar *de novo* estos péptidos. Posteriormente, las secuencias de los péptidos se analizaron mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center of Biotechnology Information) para encontrar regiones de similitud con secuencias de otras proteínas reportadas en la base de datos.

#### 7.7.1. *Lb. paracasei* 1, banda de 18 kDa

La banda de 18 kDa de *Lb. paracasei* no pudo ser identificada satisfactoriamente, dado que la identidad de la proteína no se relaciona con la actividad lítica observada.

### 7.7.2. *E. faecalis*, banda de 87 kDa

La banda de 87 kDa de *E. faecalis* generó ocho péptidos diferentes. Estos péptidos fueron relacionados mediante el BLAST a un antígeno secretado de *Enterococcus faecium* 1039 (GI:293553685), cuyo peso molecular es de 55.3 kDa.

Para corroborar que los péptidos se encontraran íntegros dentro de la secuencia de la proteína se alinearon empleando el programa ClustalW2 (European Bioinformatics Institute), que permite una rápida identificación de similitudes y diferencias entre las secuencias, encontrando una similitud del 100% para todos los péptidos dentro de la secuencia.

Los péptidos generados fueron los siguientes:

- VQAMTTMVK
- QKAEAEAEQAR
- TSLAAEQATAEDK
- DPSGFDCSGFTR
- QDTLRQESAQLVK
- EAQVSNTSSNYIDAVLNAESLADAIGR
- NQQADAQSQIDALESQVSEINTQAQDLLAK

La secuencia del antígeno SagA es la siguiente (se resalta en negritas la ubicación de los péptidos dentro de la secuencia):

MTLTAVASPIAAAADDFDSQIQQQDQKIADLKN**QQADAQSQIDALESQVSEINTQ**  
**AQDLLAKQDTLRQESAQLVK**DIADLQERIEKREDTIQKQARE**EAQVSNTSSNYIDA**  
**VLNAESLADAIGRVQAMTTMVK**ANNLMEQQKQDKKAVEDKKAENDAKLKELA  
ENQALESQKGDLLSKQADLNVLKT**TSLAAEQATAEDK**KADLNR**QKAEAEAEQA**  
**RIREQQRLAEQARQQAQEKAEKEAREQAEAEAQATQASSTAQSSATEESSAK**  
QSSVTEESSSATQSSVTEESSSATQSSVTEESSSATQSSATEESTTPESSATEES  
TTAPESSATEESTTVPESSSTEESTTVPESSSTEESTTPAPPTPSTDQSVDTGNGT  
GSSTPAPTPTPEQPKPVPAPAPSGSVNGAAIVAEAYKYIGTPYVWGGK**DPS**  
**GFDCSGFTRYVYMQVTGRDIGGWTVPQESAGTKISVSQAKAGDLLFWGSQGGT**  
YHVAIALGGGQYIHAPQPGESVKVGSVQWFAPDFAVSM

Esta proteína se encuentra muy conservada en bacterias. No está caracterizada y se desconoce su función, sin embargo, tiene una región, la NplC/P60, que pertenece a una superfamilia de dominios muy conservada. Las proteínas NplC/P60 definen una familia de peptidasas de pared celular ampliamente representadas en varios linajes de bacterias. De los miembros de esta familia que han sido caracterizados se sabe que pueden hidrolizar enlaces de D-gamma-glutamil-mesodiaminopimelato o de N-acetilmuramato-L-alanina (Anantharaman y Aravind, 2003).

Es por esta actividad de endopeptidasa que la proteína encontrada en *E. faecalis* presenta actividad contra *S. aureus* y *M. lysodeikticus* (Gram positivas). Actúa hidrolizando los enlaces peptídicos que enlazan el esqueleto de peptidoglucano de la pared celular, dando lugar a su degradación y a la consecuente muerte celular. Sin embargo no presenta actividad contra *E. coli*, ya que es una bacteria Gram negativa, y aunque su pared celular es más delgada que la de bacterias Gram positivas, poseen una membrana externa que las protege.

### **7.7.3. *Lb. paracasei* 2, banda de 103 kDa**

La banda de 103 kDa de *Lb. paracasei* 2 generó péptidos que presuntamente pertenecen a dos proteínas diferentes. La primera proteína generó cinco péptidos, los cuales se encuentran íntegros en una muramidasa de *Enterococcus sp.* 7L76 (GI:295112539) que presuntamente tiene actividad de amidasa, ya que su secuencia se encuentra también en una N-acetylmuramoil-L-alanina amidasa de *Enterococcus faecalis* AR01/DG (GI:257417619). Ambas tienen un peso molecular de 54.4 kDa.

Los péptidos generados fueron los siguientes:

- GLNVVSTR
- NGLDSNKDFYHGVWK

- TISADETHLMNYIVPK
- NLYASVMIAQAILESGSGNSK
- AGAAVSFPAGVLGADNTYGHVAFVEK

La secuencia de la muramidasa es la siguiente (se resalta en negritas la ubicación de los péptidos dentro de la secuencia):

MKKQFAMFSTLLLLGSSMPVGAFAEGNNLVAENSSVAETTAEATTAEDTETTATS  
 ETTEATEESTTETESSTESSESTTTTESTETSGTETTDSTTDSTSTSTTESTTDSTS  
 TSTTESTTDSTSTSTTESSTPTPTTSSSKEQPKPGTSTSESKQPAKPVPTAPAE  
 KPVEQPAASTPQPEIVPPVTNETVGLVEDDETFTVSKTKKTEEFIQEIGESARKVA  
 KDKN**NLYASVMIAQAILESGSGNSK**LSQKPNYNLFGIKGDYKGGQSVSFITYEDNGF  
 NLYTVEAKFRQYPTYKESMEDYAKLLK**NGLDSNKDFYHGVWK**TEAKSYKEATRF  
 LTGKYATDKDYHKKLNALIKTYDLTYDKEKATVEPMESNFPAYNGKNYDTFNSY  
 AWGNCTQYVYNRITQLGKRVDLTMGNGQDWGETGRARGYKVSRTPK**AGAAVS**  
**FPAGVLGADNTYGHVAFVEK**VFKDGSILISEMNVK**GLVVSTRTISADETHLMNY**  
**IVPKDK**

La segunda proteína generó dos péptidos, que se encontraron en una muramidasa de *Enterococcus sp.* 7L76 (GI-295113986) diferente a la primera. Tiene un peso molecular de 45.8 kDa

Los péptidos generados fueron los siguientes:

- APNYNLFGIK
- VASAQTFALSPTQSPSEFIAELAR

La secuencia de la muramidasa es la siguiente (se resalta en negritas la ubicación de los péptidos dentro de la secuencia):

MKKESMSRIERRKAQQRKKTPVQWKKSTTLFSSALIVSSVGTPVALLPVTAEATE  
 EQPTNAEVAQAPTTETGLVETPTTETTPGTTEQPTTDSSSTTESTTESKETPTTP  
 STEQPTVDSTTPVELGTTDSSVAEIAPVAPSTTESEAAPAVTPDDEVKVPEAR**VA**  
**SAQTFALSPTQSPSEFIAELAR**CAQPIAQANDLYASVMMAQAIVESGWGASTLS  
 KAPNYNL**FGIK**GSYNGQSVYMDTWEYLNKWLVKKEPFRKYPSYMESFQDNAH  
 VLKTTSFQAGVYYYAGAWKSNTSSYRDATAWLTGRYATDPSYNAKLNNVITAYN  
 LTQYDTPSSGGNTGGGIVNPGTGGSNQSGTNTYYTVKSGDTLNKIAAQYGVSV  
 ANLRSWNGISGDLIFVGQKLIVKKGASGNTGGSGSGGSSNNNQSGTNRTIL

Las muramidasa y amidasa son peptidoglucano hidrolasas (PGH), que son capaces de lisar células mediante la degradación de la pared celular. Las muramidasa hidrolizan el enlace  $\beta$ -1,4-glucosídico entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina, generando un producto con un residuo terminal de ácido N-acetilmurámico reducido. Las amidasa (N-acetilmuramil-L-alanina amidasa) hidrolizan el enlace amida entre el ácido N-acetilmurámico y el residuo N-terminal de la L-alanina del tallo de péptidos (Vollmer *et al*, 2008).

La actividad observada en la banda de 103 kDa de *Lb.paracasei 2* es el resultado de la acción de una peptidoglucano hidrolasa que puede tener más de un tipo de actividad (muramidasa y amidasa). Aunque se identificaron 2 muramidasa diferentes reportadas en el género *Enterococcus*, es posible que se trate de una sola proteína no reportada previamente en *Lactobacillus*. Por tal razón, pese a que la concentración relativa de esta banda observada en la electroforesis es muy baja comparada con otras bandas, es la que presenta una mayor intensidad en la actividad observada en los zimogramas. Además, esta enzima fue activa contra los tres microorganismos indicadores, que incluyen bacterias Gram positivas y Gram negativas.

#### **7.7.4. *Lb. paracasei 2*, banda de 76 kDa**

La banda de 76 kDa de *Lb. paracasei 2* generó péptidos que se encontraron en cuatro proteínas diferentes. Sólo una de ellas es capaz de presentar actividad antibacteriana. Dicha proteína se predijo que puede ser sintetizada por *Enterococcus faecalis* T11 (GI:257418173), con un peso molecular de 48 kDa.

Los péptidos generados fueron los siguientes:

- QLEATEAELETK
- ASLALEQSSAESSK
- AAQVEAGGIPNDHWSR
- VQAVSTIVSANNNDLMQQQK
- QSLGLRPVWWDAGLAASATAR

- VQAVSTIVSANNDLMQQQKEDK

La secuencia de la proteína es la siguiente (se resalta en negritas la ubicación de los péptidos dentro de la secuencia):

MKKRLFASVLLCSLTLSAIATPSIALADNVDKKEEKNQEISSLKAKQGDLASQVSS  
 LEAEVSSVFDESMALREQKQTLKAKSEQLQQEITNLNQRIEKRNEAIKNQARDVQ  
 VNGQSTTMLDAVLDAVDAISR**VQAVSTIVSANNDLMQQQKEDK**QAVVDKKA  
 ENEKMK**QLEATEAELETKR**QDLLSKQSELNVMK**ASLAL****EQSSAESSKAGLEK**  
 QKAAAEAEQARLAAEQKAAAEKAKQAAAKPVQAKAEVKAEAPVASSSTTEAQAP  
 ASSSSATESSTQQTETTTPSTDNSATENTGSSSSEQPVQPTTPSDNGNNGGQT  
 GGGTVTPTPEPTPAPEPTPAPSADPTINALNVL**RQSLGLRPVVDAGLAASATA**  
**RAAQVEAGGIPNDHWSRG**DEVIAMWAPGNSVIMAWYNETNMVTASGSGHRD  
 WEINPGITRVGFGYSGSTIVGHSA

Esta proteína muy conservada en bacterias no ha sido caracterizada ni se conoce su función. Sin embargo, presenta una región que pertenece a la superfamilia de proteínas SCP. El dominio de proteínas del tipo SCP se encuentra tanto en eucariontes como en procariontes. Esta familia incluye la proteína PR-1, relacionada con la patogénesis en plantas, la cual se acumula después de infecciones con patógenos y puede actuar como agente antifúngico o estar involucrada en la degradación de la pared celular. Otro miembro de esta familia es la proteína humana GAPR-1; se ha reportado que se encuentra en forma dimerizada y como tal puede formar un sitio activo que contiene una triada catalítica. Se sabe muy poco acerca del papel biológico que desempeñan los dominios SCP en bacterias y archeas (NCBI).

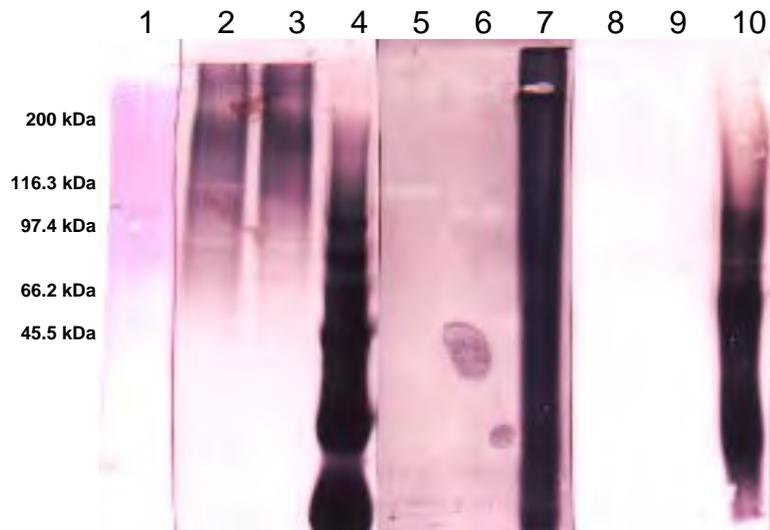
Este dominio puede ser el responsable de la actividad antibacteriana, mediante la degradación de la pared celular. Al igual que la muramidasa de la banda de 103 kDa, es activa contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Es posible que esta proteína extracelular sea secretada por *Lb. paracasei* para reducir o eliminar microorganismos que compitan por los nutrientes del medio, ya que además, es producida durante la fase estacionaria de crecimiento.

Al igual que la proteína GAPR-1, es posible que actúe en forma de dímero, ya que el peso molecular determinado mediante la electroforesis es mucho mayor que el reportado para la proteína extracelular de *E. faecalis* con secuencia similar.

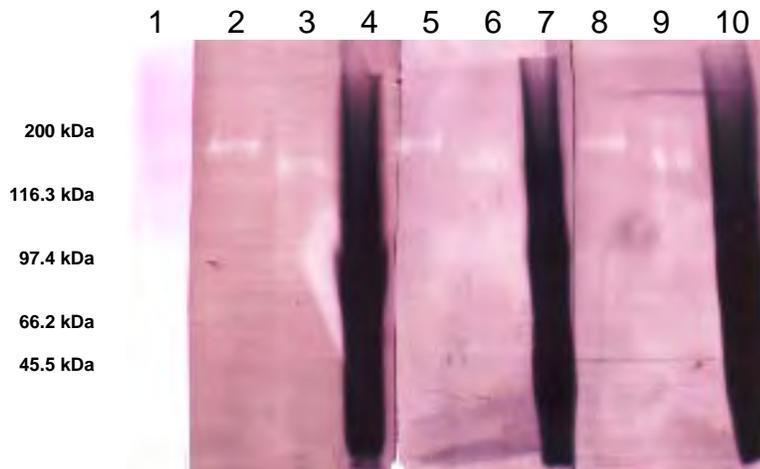
### 7.8. Prueba de glicosilación de las proteínas de interés

Como los pesos moleculares de las proteínas con actividad lítica fueron mayores a los reportados en proteínas similares, se decidió comprobar si el incremento de peso se pudiera deber a que las proteínas se encontraran glicosiladas.

Los resultados de la detección y diferenciación de glicosilaciones para las proteínas de las cepas *E. faecalis* y *Lb. Paracasei 2* se muestran en las Figuras 30 y 31.



**Figura 30.** Resultados de la prueba de glicosilación de los extractos precipitados con TCA. Marcador de peso molecular alto (1). Muestras incubadas con GNA (aglutinina de *Galanthus nivalis*): *Lb. paracasei 2* (2), *E. faecalis* (3), carboxipeptidasa (control positivo) (4). Muestras incubadas con SNA (aglutinina de *Sambucus nigra*): *Lb. paracasei 2* (5), *E. faecalis* (6), transferrina (control positivo) (7). Muestras incubadas con MAA (aglutinina de *Maackia amurensis*): *Lb. paracasei 2* (8), *E. faecalis* (9), fetuina (control positivo) (10).



**Figura 31.** Resultados de la prueba de glicosilación de los extractos precipitados con TCA. Marcador de peso molecular alto (1). Muestras incubadas con PNA (aglutinina de cacahuate): *Lb. paracasei* 2 (2), *E. faecalis* (3), asialofetulina (control positivo) (4). Muestras incubadas con DSA (aglutinina de *Datura stramonium*): *Lb. paracasei* 2 (5), *E. faecalis* (6), fetuina (control positivo) (7), *Lb. paracasei* 2 (8), *E. faecalis* (9), asialofetulina (control positivo) (10).

Como puede observarse en la Figura 30, las proteínas de las cepas *E. faecalis* y *Lb. paracasei* 2 que presentaron actividad antibacteriana tuvieron una reacción positiva con GNA (aglutinina de *Galanthus nivalis*), lo que indica la presencia de manosa unida con un enlace N-glucosídico. Para todos los demás tipos de glicosilaciones probadas no hubo reacción positiva.

En el caso de la carboxipeptidasa Y, la glicosilación con cadenas de manosa incrementa en 10 kDa su peso molecular, de 53 a 63 kDa. El porcentaje en peso de los grupos glucídicos en las diferentes glicoproteínas, puede variar desde menos de un 1%, como en la ovoalbúmina, hasta un 80% en las mucoproteínas (Nelson y Cox, 2008).

El peso molecular de la proteína generada por la cepa *E. faecalis*, que es de aproximadamente 87 kDa, no corresponde con el del antígeno sagA de *E. faecium* E1039, que es de 55.3 kDa. Esto puede deberse precisamente a que la proteína está glicosilada, y las cadenas de manosa incrementan su peso.

Lo mismo ocurre con las dos muramidases de *Lb. paracasei* 2 de 103 kDa, los pesos reportados de las proteínas con secuencia similar son de 54.4 y 45.8 kDa. Esto puede deberse a que están glicosiladas. Sin embargo, también hay que considerar que estas proteínas no han sido reportadas previamente en estos microorganismos y que son diferentes a las proteínas con que se están comparando. Es posible que en los microorganismos en estudio las proteínas con actividad sean de mayor tamaño debido tanto a la glicosilación como a los aminoácidos que las forman. Tampoco la proteína con el dominio SCP, que pesa 76 kDa, coincide con los reportes de proteínas con la misma secuencia que pesan 48 kDa, precisamente a que se trata de otro microorganismo.

Las glicoproteínas, en su mayoría, son extracelulares en su localización y en su función, o son secretadas por las células; de acuerdo con ello, se ha indicado que una de las finalidades de los restos de azúcar ligados es la de marcar a la proteína que ha de ser exportada de la célula (Nelson y Cox, 2008). Las proteínas objeto de este estudio son extracelulares, por lo cual no sería extraño que se encontraran glicosiladas.

Aunque se conoce la secuencia parcial de las proteínas con actividad antibacteriana, ésta se encuentra relacionada únicamente con proteínas putativas y en algunos casos poco caracterizadas. Además, tampoco se han reportado en los microorganismos con los que se trabajó, lo que puede explicar, en parte, las diferencias que existen en peso molecular entre las proteínas estudiadas y las reportadas en la literatura.

## 8. Conclusiones

La actividad antibacteriana extracelular producida por BAL aisladas del queso Cotija es de carácter proteínico.

La proteína de 103 kDa de *Lactobacillus paracasei* 2 presenta actividad de muramidasa que actúa degradando la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La banda de 87 kDa producida por *Enterococcus faecalis*, corresponde a una proteína con una región NplC/P60 muy conservada en bacterias que, aunque no está muy caracterizada, se sabe que está involucrada en la degradación de pared celular. De esta proteína sólo pudo identificarse actividad en contra de bacterias Gram positivas.

La actividad producida por la banda de 76 kDa de *Lactobacillus paracasei* 2 es debida a una proteína con un dominio SCP, que tampoco está muy caracterizada en bacterias, sin embargo, también actúa degradando la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Ninguna de las proteínas debe su actividad antibacteriana a la presencia de puentes disulfuro en su estructura, ya que ésta no se vio afectada al llevar a cabo tratamientos reductores.

También, pudo determinarse que las proteínas extracelulares con actividad inhibitoria se encuentran glicosiladas con cadenas de manosa, lo que podría explicar la diferencia entre el peso molecular reportado en proteínas con secuencia similar y el observado experimentalmente.

## 9. Bibliografía

- Alberts, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Watson, JD. 2002. Biología molecular de la célula. 3ª edición. Ediciones Omega. España. pp. 176-181.
- Álvarez-Barajas, R. Barragán-López, E. Chombo-Morales, P. 2005. Reglas de uso. Marca Colectiva. Queso Cotija Región de Origen. México. pp. 5-10.
- Anantharaman, V. Aravind, L. 2003. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biology*. 4:87-98.
- Atanassova, M. Choiset, Y. Dalgalarondo, M. Chobert, JM. Dousset, X. Ivanova, I. Haertlé, T. 2003. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology*. 83:63-73.
- Barboza-Corona, J. Vázquez-Acosta, H. Bideshi, D. Salcedo-Hernández, R. 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*. 187: 117-126.
- Bazán-Gómez, AB. 2007. Detección de la albúmina 2S en aislados de ajonjolí. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F. pp. 42-45.
- Berg, JM. Stryer, L. Tymoczko, JL. 2008. Bioquímica. 6ª edición. Editorial Reverté. España. pp. 69.
- Bradford, MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Bravo-Mendoza, A. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F. pp. 5-14, 46-72.

- Cervantes-Escoto, F. Villegas-de Gante, A. Cesin-Vargas, A. Espinoza-Ortega, A. 2008. Los Quesos Mexicanos Genuinos –Patrimonio cultural que debe rescatarse-. 1ª edición. Mundi-Prensa México. pp. 149-162.
- Cotter, PD. Hill, C. Ross, RP. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 777-788.
- De Kwaadsteniet, M. Todorov, SD. Knoetze, H. Dicks, LMT. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 105:433–444.
- Delgado-Arciniega, E. 2010. Producción de compuestos antibacterianos por bacterias ácido lácticas aisladas de queso Cotija. Tesis de Licenciatura (en revisión). Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Dubois, M. Giles, KA. Hamilton, JK. Rebers, PA. Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28:350-356.
- Eijsink, VG. Skeie, M. Middelhoven, PH. Brurberg, MB. Nes, IF. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:3275–3281.
- Gänzle, MG. 2004. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64:326-332.
- García-Cano, I. Mendoza, G. Farrés, A. 2009. Peptidoglucano Hidrolasa de *Pediococcus Acidilactici* ATCC 8042: Purificación y Caracterización Bioquímica. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, Guerrero. CI-03.
- González-Martínez, MO. 2010. Proteínas heterólogas en soya: identificación y aislamiento. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM, México, D.F. pp. 43-45.
- Hermanson, GT. 2008. Bioconjugate techniques. 2ª edición. Elsevier. Estados Unidos. pp. 90, 187-190.

- Hernández-Alcántara, AM. 2010. Caracterización de la actividad bactericida de péptidos producidos por bacterias ácido lácticas aisladas de un queso tradicional mexicano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Hunter, RL. Markert, CL. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*. 125: 1294-1295.
- Klaenhammer, TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12:39–85.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Leclerc, D. Asselin, A. 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*. 35:749-753.
- Line, JE. Svetoch, EA. Eruslanov, BV. Perelygin, VV. Mitsevich, EV. Mitsevich, IP. Levchuk, VP. Svetoch, OE. Seal, BS. Siragusa, GR. Stern, NJ. 2008. Isolation and Purification of Enterocin E-760 with Broad Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52:1094-1100.
- Lortal, S. Chapot-Chartier, MP. 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*. 15: 857-871.
- Magnusson, J. Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1-5.
- Magnusson, J. 2003. Antifungal activity of lactic acid bacteria. Ph. D. dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences. pp. 3-10.
- Manchenko, P. 1994. A Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press. Estados Unidos. pp. 1-22.
- Matsudaira, PT. 1993. A Practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. 2ª edición. Academic Press, Inc. Estados Unidos. pp. 48.

- Nandakumar, MP. Shen, J. Raman, B. Marten, MR. 2002. Solubilization of Trichloroacetic Acid (TCA) Precipitated Microbial Proteins via NaOH for Two-Dimensional Electrophoresis. *Journal of Proteome research*. 2:89-93.
- Nelson, DL. Cox, MM. 2008. Lehninger. Principles of Biochemistry. 5ª edición. W. H. Freeman and Company. Estados Unidos. pp. 85-91.
- Nes, IF. Diep, DB. Havarstein, LS. Brurberg, MB. Eijsink, V. Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 70:113–128.
- Nielsen, SS. 2003. Food Analysis. 3ª edición. Kluwer Academic / Plenum Publishers. Estados Unidos. pp. 148-149.
- Papagianni, M. Avramidis, N. Filioussis, G. Dasiou, D. Ambrosiadis, I. 2006. Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor “indicator microorganism”. *Microbial Cell Factories*. 5:30-37.
- Prado-Barragán, LA. Huerta-Ochoa, S. Rodríguez-Serrano, G. Saucedo-Castañeda, G. 1999. Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología. Colección Tópicos en Biotecnología. 1ª edición. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. pp. 33-87.
- Rang, HP. Dale, MM. Ritter, JM. Flower, RJ. 2008. Farmacología. 6ª edición. Elsevier. España. pp. 256.
- Salminen, S. von Wright, A. Ouwehand, A. 2004. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3ª edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos. pp. 375-398.
- Savijoki, K. Ingmer, H. Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 394-406.
- Schägger, H. von Jagow, G. 1987. Tricine – Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166: 368-379.

- Shin, MS. Han, SK. Ryu, JS. Kim, KS. Lee, WK. 2008. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*. 105:331-339.
- Simpson, RJ. 2003. Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos. pp. 349-350.
- Stern, NJ. Svetoch, EA. Eruslanov, BV. Perelygin, VV. Mitsevich, EV. Mitsevich, IP. Pokhilenko, VD. Levchuk, VP. Svetoch, OE. Seal, BS. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* Strain and Purification of its Bacteriocin, Which is Inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the Chicken Gastrointestinal System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 3111–3116.
- Vollmer, W. Joris, B. Charlier, P. Foster, S. 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*. 32:259–286.

### **Páginas de internet**

- European Bioinformatics Institute. ClustalW2. <http://www.ebi.ac.uk>
- National Center of Biotechnology Information (NCBI). Basic Local Alignment Search Tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- Sigma-Aldrich Enzyme Explorer. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer.html>
- Urbina, C. Rodríguez, P. Finol, H. Mérida, T. Ogura, Mitsuo. 1997. Introducción a la microscopía electrónica -guía teórico-práctica- (Curso de Pregrado Licenciaturas en Biología y Química) Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Centro de Microscopía-Electrónica.  
<http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/prodrigu/archivos/Guia%20completa%20ME.pdf>