



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO.

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

“Localización y caracterización de la actividad proteolítica  
de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

GUADALUPE XIMENA CASALES CABRERA



MÉXICO, D.F.

2012



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: OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO**

**VOCAL: J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS**

**SECRETARIO: AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ SARAVIA**

**1° SUPLENTE: SANDRA PAOLA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**

**2° SUPLENTE: ISRAEL GARCÍA CANO**

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 312 Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

### **ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dra. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ SARAVIA**

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Q.A. ISRAEL GARCÍA CANO**

### **SUSTENTANTE:**

---

**GUADALUPE XIMENA CASALES CABRERA**

Comprender las cosas que nos rodean es la mejor preparación  
para comprender las cosas que hay más allá. Hipatía

# AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Alicia Cabrera, por su gran apoyo durante todas las etapas de mi vida, por sus grandes consejos en los momentos que más los necesite, por enseñarme su fortaleza ante los momentos difíciles, por siempre tener un chiste que contarme, pero sobre todo por ser una gran mujer y madre.

A mi papá Roberto Casales, por enseñarme a nunca rendirme y darme su apoyo en todo momento, por enseñarme que siempre hay que dar lo mejor de nosotros en todo lo que hagamos en la vida.

A mi manita Evelia, por siempre darme buenos consejos, porque sin ti mi vida sería aburrida, por darme un ejemplo de superación y admiración.

A mi abuelita Alicia, por ser la que inspiro que estudiara química.

A mi mejor amiga, Patty por ayudarme en todo momento dándome su apoyo incondicional, pero sobre todo por ser parte de todos los momentos maravillosos que pasamos fuera y dentro de la Facultad, por enseñarme que los malos momentos pasan y te dejan grandes enseñanzas y por ser como mi segunda hermana. A sus padres y tía (Carmen Miguel y Lola) por abrirme las puertas de su casa como si fuera la mía y por hacerme sentir que soy parte de su familia.

A mis amigas de la facultad, Isabel Ameyalli, Sandra, Roxana, Dulce, Angélica y todos aquellos con los que compartí muchas horas de clase y locura en esta carrera.

A la Dra. Amelia Farrés por permitirme ser parte de su grupo de trabajo. Por su dedicación, apoyo y tiempo brindados durante mi estancia en el laboratorio.

A Israel García Cano por compartirme todos sus conocimientos, por dedicar muchas horas de trabajo para que este proyecto saliera adelante, por las palabras de aliento y confianza cuando las necesite, pero sobre todo por ser más que mi asesor, por ser mi amigo.

A mi hermana de laboratorio 312 Aline por compartir tantas y tantas horas de trabajo arduo, pero sobre todo por tu valiosa amistad y por enseñarme que siempre hay que enfrentar las cosas malas que te da la vida con valor y buena cara.

A mis compañeros del laboratorio 312: Lau, Lilita, Serch, Mary, Minos, Gaby, Ales y Kati por su compañerismo y buenos consejos.

A todo mi jurado por su asesoría y confianza depositadas en este trabajo.

A la Facultad de Química porque es un orgullo pertenecer a ella.

A la H. Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas para obtener una educación de excelencia y por sentirme orgullosa de pertenecer a la máxima casa de estudios.

---

**CONTENIDO:**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
1.1 Alimentos fermentados .....	4
1.2 Cultivos iniciadores .....	5
1.3 Bacterias Ácido Lácticas .....	5
1.4 Cultivos iniciadores en productos cárnicos .....	7
1.5 Enzimas industriales .....	9
1.6 Proteasas .....	10
1.7 Clasificación .....	12
1.8 Usos de las proteasas .....	17
1.9 Sistema proteolítico .....	24
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>25</b>
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
4.1 Objetivo general .....	28
4.2 Objetivos particulares .....	28

---

<b>V. METODOLOGÍAS:</b> .....	<b>29</b>
5.1 Primera fase experimental. Localización de la actividad proteolítica durante la cinética de crecimiento. ....	30
5.1.1 Material biológico .....	30
5.1.2 Medio de cultivo y condiciones de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 .....	30
5.1.3 Medio MRS modificado .....	30
5.1.4 Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> y obtención de células	31
5.1.5 Localización de la enzima con actividad proteolítica en <i>P. acidilactici</i> .....	32
5.1.6 Cuantificación de proteína .....	33
5.1.7 Determinación del perfil electroforético y de la actividad proteolítica por zimogramas .....	33
5.1.8 Actividad proteolítica sobre diferentes sustratos .....	35
5.1.8.1 Método de actividad caseinolítica.....	35
5.1.8.2 Método de actividad elastinolítica .....	36
5.1.8.3 Método de actividad colagenolítica.....	36
5.1.8.4 Método de actividad gelanolítica. ....	36
5.2 Segunda fase experimental. Purificación parcial y caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de interés ..	38
5.2.1 Purificación parcial de la proteasa .....	39
5.2.2 Caracterización bioquímica de la proteasa citosólica de <i>P. acidilactici</i> .....	39

---

<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:</b> .....	<b>42</b>
6.1 PRIMERA FASE EXPERIMENTAL .....	42
6.1.1 Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 .....	42
6.1.3 Determinación de la actividad proteolítica sobre diferentes sustratos. ....	45
6.2 SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL .....	55
6.2.1 Purificación parcial de la proteasa de 97 kDa .....	55
6.2.2 Caracterización bioquímica de la proteasa citosólica de <i>P.</i> <i>acidilactici</i> .....	57
<b>VII. CONCLUSIONES:</b> .....	<b>62</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>63</b>
<b>ANEXO A.</b> Valores absolutos de actividad espectrofotométrica sobre diversos sustratos. ....	76

---

## RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se usan en productos fermentados como quesos, yogures y salchichas. Sus metabolitos desempeñan funciones que impactan en procesos como la conservación, desarrollo del sabor y maduración (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Una de las BAL más utilizadas como cultivo iniciador de productos cárnicos es *Pediococcus acidilactici*. Se ha reportado que esta especie presenta una banda de actividad proteolítica extracelular a los 200 kDa (Llorente *et al.*, 2008), la cual fue purificada y caracterizada por Granados-Pérez (2009). Además de la actividad proteolítica anteriormente descrita se reportó actividad proteolítica a los ~90 kDa en extractos celulares, en condiciones de incubación estática (Llorente *et al.*, 2008), mientras que otros autores han reportado la misma actividad a los ~90 kDa adherida a membrana en condiciones de incubación con agitación (Granados-Pérez, 2009).

El propósito de este estudio fue profundizar en el conocimiento del sistema proteolítico de este microorganismo.

Se encontró que las mejores condiciones de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 para la detección de la actividad proteolítica fue con agitación a 120 rpm. La fracción que presentó actividad cercana a los 90 kDa fue la citosólica, la cual tiene la capacidad de hidrolizar colágeno y caseína. La precipitación diferencial con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 60% ayudó a que la actividad se incrementara en 2 órdenes de magnitud.

-----

Se determinó que el peso molecular de la proteasa citosólica es de 97 kDa. Presenta mayor actividad a pH alcalinos, es estable en un intervalo de temperaturas entre 37 y 60°C, se inhibe por PMSF (por lo que se puede decir que es una serin proteasa) y se activa por iones monovalentes como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup>. Sus propiedades son diferentes a las reportadas para la enzima extracelular de 200 kDa, por lo que conjuntamente pueden degradar una mayor gama de sustratos.

---

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Alimentos fermentados

La producción de alimentos fermentados es una de las tecnologías de preservación más antiguas conocidas por el hombre. Desde el comienzo de la civilización se han desarrollado métodos para fermentar leche, carne y vegetales, cuyos antecedentes más antiguos se remontan al año 6000 a.C. Los procesos de fermentación eran empíricos, artesanales y se desconocía el papel que los microorganismos desempeñaban en el proceso. En la mayoría de los casos los conocimientos sobre la fabricación de estos productos eran transmitidos de generación en generación dentro de comunidades locales (Hui *et al.*, 2006).

El nacimiento de la microbiología como ciencia a mediados del siglo XIX, sentó las bases biológicas de la fermentación, entendiéndose por primera vez el proceso fermentativo. Conociendo el papel esencial que llevan a cabo las bacterias y hongos en la fermentación de alimentos, fue posible establecer procesos más eficientes y controlados por la adición directa de cultivos iniciadores a las materias primas, y se logró estandarizar los productos finales (Oberman y Libudzisz, 1998). La Revolución Industrial y la llegada de la producción y venta de alimentos en masa, exigieron que los productos estuvieran disponibles en cantidad, calidad y seguridad (Hui *et al.*, 2006)

---

## 1.2 Cultivos iniciadores

Un cultivo iniciador se puede definir como una preparación microbiológica de un gran número de células que es añadido a un alimento para producir su rápida fermentación, así como, para controlar la dirección del proceso (Caplice y Fitzgerald, 1999).

El grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) ocupa un papel fundamental en este proceso, y tienen una larga historia de aplicaciones en las que se ha demostrado su seguridad, así como de consumo en la producción de alimentos y bebidas fermentados (Caplice y Fitzgerald, 1999). Las BAL causan la rápida acidificación de la materia prima por la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, además, de la producción de ácido acético, etanol, compuestos de aroma, bacteriocinas, exopolisacáridos, y varias enzimas. Este proceso ayuda a aumentar la vida de anaquel, la seguridad microbiana, a mejorar la textura y contribuye a mejorar el perfil sensorial del producto final (Leroy y De Vuyst, 2004).

## 1.3 Bacterias Ácido Lácticas

Las BAL son muy utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por la capacidad de acidificar y preservar alimentos, sino también su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aromas en alimentos fermentados.

Son un conjunto de bacterias Gram positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones, catalasa negativa, con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los carbohidratos. Estas bacterias tienen necesidades complejas de factores de crecimiento,

.....  
como vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. A nivel de laboratorio se deben emplear medios de enriquecimiento selectivo que posean estas características para su aislamiento (MRS, APT, M17, etc.) (Salminen *et al.*, 2004; Cabeza, 2005).

La clasificación de las BAL está basada en su morfología, modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, la capacidad para crecer a altas concentraciones de sal y tolerancia ácida o alcalina.

Históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* forman la parte central de este grupo. En la clasificación actual, los géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, se han incluido como parte del grupo de BAL (Salminen *et al.*, 2004).

Lyhs (2002) divide a las BAL en tres grupos de acuerdo con sus características fermentativas: las homofermentativas estrictas, heterofermentativas estrictas, y las heterofermentativas facultativas. Las BAL homofermentativas estrictas degradan las hexosas exclusivamente de ácido láctico y no fermentan las pentosas o el gluconato. Las heterofermentativas estrictas degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub>, y las pentosas a ácido láctico y ácido acético. Las facultativas heterofermentativas fermentan las hexosas a ácido láctico y puede producir CO<sub>2</sub> a partir del gluconato pero no de la glucosa. Ellas también fermentan las pentosas para producir ácido láctico y acético (Cabeza, 2005).

-----

Las BAL se consumen en alimentos como yogur, jocoque, quesos madurados, productos cárnicos y hasta en algunas hortalizas. Las más importantes en la industria de alimentos pertenecen a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella*. De ellas, son homofermentativas algunas especies de *Streptococcus* (*St. thermophilus* y *St. lactis*) y *Pediococcus* (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), y heterofermentativas, algunas especies de *Lactobacillus* (*L. brevis* y *L. buchnerii*) y *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*, *L. dextranicum* y *L. cremoris*) (Cabeza, 2005).

#### 1.4 Cultivos iniciadores en productos cárnicos

De acuerdo a la definición de Hammes *et al.* (1990), los cultivos iniciadores en la carne son preparaciones que contienen microorganismos activos o en latencia que desarrollan la actividad metabólica deseada en la carne, y son utilizados para cambiar propiedades sensoriales en los alimentos.

Las BAL se encuentran particularmente bien adaptadas al nicho ecológico de la carne fermentada (Hugas y Monfort, 1997). En la industria cárnica los cultivos iniciadores se emplean principalmente con fines tecnológicos más que biológicos, pues originan cambios deseables en los embutidos durante el proceso de maduración (Larpen, 1995).

Los productos cárnicos pertenecen al grupo de alimentos fermentados que pueden ser elaborados también sin el empleo de cultivos iniciadores. Son utilizados debido a que ofrecen varias ventajas como son: (i) disminuyen el tiempo de maduración, (ii) garantizan seguridad permitiendo controlar la microbiota contaminante gracias al ácido

.....

láctico producido y al crecimiento de los hongos superficiales no micotoxigénicos, (iii) aseguran la calidad y la aceptabilidad del producto final y (iv) permiten obtener productos homogéneos y de alta calidad (Zeuthen, 2007).

Las especies de BAL más empleadas en la industria cárnica pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (*Lb. Sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, y ocasionalmente *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. paracasei*) y *Pediococcus* (*P. pentosaceus*, *P. acidilactici*) (Leroy y De Vuyst, 2004). Las principales BAL aisladas de salchichas secas son *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella* y *Enterococcus* (Ammor *et al.*, 2005).

En la fermentación de la carne, la principal función de las BAL es obtener un rápido descenso de pH que a su vez favorece, (i) un producto saludable al inactivar patógenos, (ii) estabilidad del producto y vida de anaquel al inhibir cambios indeseables provocados por microorganismos de descomposición y (iii) crear las condiciones bioquímicas para alcanzar nuevas propiedades sensoriales de los productos madurados a través de la modificación de los materiales crudos (Lücke, 2000).

Las BAL tienen una débil acción proteolítica sobre las proteínas miofibrilares (Hammes *et al.*, 1998; Molly *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 1998). Sin embargo, algunas cepas como *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* y *L. sakei* contribuyen activamente a la hidrólisis de las proteínas sarcoplásmicas y la subsecuente descomposición de péptidos en aminoácidos. Varias actividades de peptidasa han sido reportadas en *L. sakei*, *L. curvatus* y *L. plantarum* las cuales fueron aisladas de salchichas (Fadda *et al.*, 1999a, 1999b).

## 1.5 Enzimas industriales

El valor estimado actual de la venta a nivel mundial de enzimas industriales es de un billón de dólares (Godfrey y West, 1996). Del total de las enzimas industriales, 75% son hidrolíticas. Las proteasas representan uno de los tres grandes grupos de enzimas industriales y representan el 60% del total de las enzimas industriales vendidas (Figura 1).

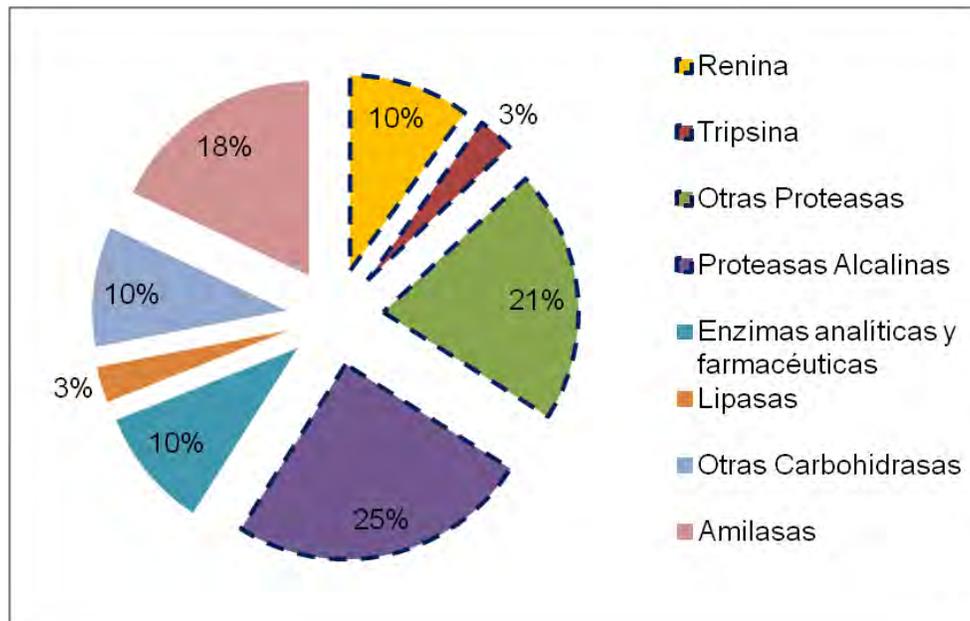


Figura 1. Distribución de la venta de enzimas. Se indica la contribución en la venta de las diferentes enzimas. Las figuras con líneas punteadas indican el total de ventas de proteasas (Tomado de Godfrey y West, 1996).

Aunque las enzimas de las plantas, animales y de fuentes microbianas se han utilizado por décadas, el uso a gran escala de enzimas microbianas creció solamente en los años sesenta, siguiendo la introducción de tecnología de la fermentación (Rao *et al.*, 1998).

En la actualidad, las bacterias productoras de proteasa han adquirido especial relevancia, ya que pueden ser utilizadas en procesos productivos como la industria de los detergentes, alimentos y

-----  
bebidas, así como la clarificación de cerveza y otras bebidas, ablandamiento de carnes rojas, industria del cuero, entre otras (Schmidt *et al.*, 1995).

Las BAL producen un amplio rango de peptidasas que pueden hidrolizar tripéptidos. La purificación y caracterización de una tripeptidasa intracelular en *Lactobacillus sake* ha sido descrito por Sanz *et al.* (1998). También Montel *et al.* (1995) reportaron la presencia de una proteasa intracelular con actividad dipeptidasa en este mismo microorganismo, y las dos fueron caracterizadas como metalo proteasas. En el género *Pediococcus* se ha reportado una tripeptidasa intracelular en *P. pentosaceus* (Simitsopoulou *et al.*, 1997).

## 1.6 Proteasas

El término proteasa surgió a finales del siglo XVIII, aunque las enzimas con esta actividad también se conocen como peptidasas. Son enzimas que catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas en polipéptidos, degradando estas moléculas grandes a péptidos y aminoácidos. Esta hidrólisis difiere entre proteasas, dependiendo de la especificidad de sustrato, sitio activo, estabilidad, mecanismo catalítico, pH y temperatura óptima (Sumantha *et al.*, 2006).

La especificidad de las enzimas está regulada por la naturaleza de aminoácidos y otros grupos funcionales (aromáticos y alifáticos o contenido de grupos sulfuro) que están cerca al enlace peptídico donde son hidrolizados (Sumantha *et al.*, 2006).

.....

En productos cárnicos fermentados la proteólisis es generada por mecanismos endógenos (catepsinas y calpaínas) y parcialmente atribuida a peptidasas producidas por bacterias inoculadas o de la microbiota natural (Sanz *et al.*, 1998). La comprensión del tipo y extensión de la proteólisis generada, puede ayudar a lograr productos más homogéneos, con una textura deseada y con mejores características de aroma y textura (Fadda *et al.*, 2002)

La proteólisis que ocurre durante la maduración de los embutidos cárnicos resulta en un incremento de péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos que participan en reacciones de descarboxilación y desaminación, generando ácidos orgánicos y aminas, respectivamente, que posteriormente pueden reaccionar químicamente y generar otros compuestos volátiles, cuya composición y concentración han sido correlacionadas con el sabor y aroma de los productos fermentados (Rizzi, 1988; Hierro *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1994).

El catabolismo de aminoácidos como valina, leucina e isoleucina mediante rutas no enzimáticas como reacciones de desaminaciones oxidativas y descarboxilaciones, generan aldehídos como 3-metilbutanal, 2-metilbutanal y fenilacetaldehído, que presentan un importante impacto en el aroma de los productos cárnicos (Rizzi, 1988; Hagen *et al.*, 1996; Ansorena *et al.*, 2000).

La degradación de aminoácidos tales como metionina, cistina y cisteína, genera la liberación de compuestos sulfurosos que presentan un importante impacto en el aroma de los productos cárnicos por su bajo umbral de detección (Rizzi, 1988; Hagen *et al.*, 1996; Ansorena *et al.*, 2000).

---

## 1.7 Clasificación

Las proteasas no cumplen fácilmente con el sistema de nomenclatura de las enzimas debido a su gran diversidad de acción y estructura. Las proteasas se clasifican con base en tres criterios principales: (i) el tipo de reacción que catalizan, (ii) la naturaleza química del sitio catalítico (iii) relación evolutiva con referencia a la estructura (Barett, 1994).

Se distinguen dos grupos de proteasas: en el primero están las enzimas que son capaces de cortar internamente la cadena polipeptídica para producir largos fragmentos, llamadas proteinasas o endopeptidasas. En el segundo grupo, las que actúan cerca del final de la cadena polipeptídica para liberar residuos de aminoácidos, que se llaman exopeptidasas (Bergmann y Ross, 1936).

A su vez, las carboxipeptidasas se clasifican según la naturaleza de su centro activo en: serin peptidasa, cisteín peptidasa, aspártico peptidasa, y metalo peptidasa; entre las cuales encontramos ejemplos importantes como son: (serin peptidasas) quimotripsina y subtilisina; (cisteín peptidasa) papaína; (aspártico peptidasa) pepsina; (metalo péptidas) termolisina. Cada familia tiene residuos activos característicos del sitio y se cree que por esta razón, descienden de un ancestro común y divergen en la evolución (Rawlings y Barrett, 1993).

### **Exopeptidasas**

Las exopeptidasas actúan sólo cerca de los extremos de la cadena del polipéptido. De acuerdo a su sitio de acción se localiza en el extremo amino terminal o en el carboxilo terminal, se les clasifica como amino y carboxipeptidasas, respectivamente (Tabla 1) (Rao *et al.*, 1998).

---

### Aminopeptidasas

Éstas actúan sobre el grupo amino libre terminal de la cadena polipeptídica liberando a un único residuo de aminoácido, un dipéptido o un tripéptido (Tabla 1). Las aminopeptidasas se producen en una amplia variedad de microorganismos como bacterias y hongos (Watson, 1976). En general, son enzimas intracelulares, pero existe un reporte de una aminopeptidasa extracelular producida por *Aspergillus oryzae* (Labbe *et al.*, 1974).

### Carboxipeptidasas

Éstas actúan sobre el carboxilo terminal de la cadena polipeptídica liberando un solo aminoácido o un dipéptido. Las carboxipeptidasas se pueden dividir en tres grupos principales: serin carboxipeptidasas, metalo carboxipeptidasas y cisteína carboxipeptidasas. Esta clasificación está basada en la naturaleza de los residuos de aminoácidos en el sitio activo de las enzimas.

Las serin carboxipeptidasas aisladas de *Penicillium* spp., *Saccharomyces* spp., y *Aspergillus* spp. son similares en la especificidad del sustrato pero difieren en otras propiedades como pH óptimo, estabilidad, peso molecular y efecto de inhibidores (Rao *et al.*, 1998).

### **Endopeptidasas**

Las endopeptidasas se caracterizan por su acción preferencial en los enlaces peptídicos de las regiones interiores del polipéptido. La presencia del grupo amino o carboxilo libre tiene una influencia negativa sobre la actividad de la enzima (Tabla 1) (Rao *et al.*, 1998).

---

### Serin proteasas

Se caracterizan por la presencia del grupo serina en su sitio catalítico. El mecanismo catalítico de estas enzimas requiere, además del residuo de serina, otros residuos de histidina, aspártico o lisina para su actividad (Supuran *et al.*, 2002). Se pueden encontrar en un amplio número de virus, bacterias y eucariontes, lo que sugiere que son vitales para los organismos (Chang *et al.*, 1990).

Una forma de clasificar las serin-proteasas es la naturaleza del sustrato al que hidrolizan. Así, se destacan las análogas a tripsina, que se caracterizan por hidrolizar inmediatamente detrás de residuos cargados positivamente; las análogas a quimiotripsina, que se caracterizan por cortar las cadenas peptídicas después de una cadena hidrofóbica larga y las análogas a elastasa que cortan después de cadenas hidrofóbicas cortas (Sánchez-Porro, 2005).

Estas enzimas son activas a valores de pH neutros o alcalinos y suelen tener pesos moleculares de 18 - 35 kDa, aunque se ha descrito algunas excepciones en enzimas bacterianas como la serin proteasa de *Bacillus subtilis*, la cual presenta un peso molecular de 90 kDa (Kato *et al.*, 1992). Son inhibidas irreversiblemente por 3,4 dicloroisocumadín (3,4 DCI), L-3 carboxitrans 2,3 epoxipropil-leucilamida, 4-guanidina, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) (Rao *et al.*, 1998).

### Aspartato proteasas

Comúnmente conocidas como proteasas ácidas, son endopeptidasas que dependen de un residuo de ácido aspártico en el sitio catalítico para su actividad. Son activas en un intervalo de valores de pH de 2 a 6. Sus pesos moleculares oscilan alrededor de 40 kDa (Rao *et al.*, 1998). Son fuertemente inhibidas por pepstatina y presentan alta

.....  
sensibilidad a compuestos diazocetónicos como diazocetil-DL-norleucina metil éster (DAN) (Fitzgerald *et al.*, 1990).

#### Cisteína proteasas

Se producen tanto por procariontes como eucariontes y se caracterizan por poseer en su sitio activo aminoácidos como cisteína e histidina. Son activas generalmente a pH neutro y son sensibles a *p*-cloromercuribenzoato (PCMB) y quelantes de metales. Con base en su especificidad por la cadena polipeptídica que hidrolizan, se clasifican en cuatro grupos: (i) análogas de papaína; (ii) análogas de tripsina con preferencia por hidrolizar residuos de arginina; (iii) las que hidrolizan específicamente el ácido glutámico y (iv) otras cisteína proteasas. La papaína es un ejemplo de este grupo de proteasas (Rao *et al.*, 1998).

#### Metaloproteasas

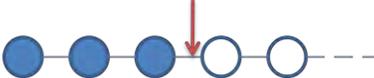
Son las proteasas más diversas en su sitio catalítico activo (Barret, 1995). Se caracterizan por requerir un ion divalente para su actividad y el  $Zn^{2+}$  es el metal más frecuente, aunque también se ha descrito la presencia de  $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ . Son inhibidas por quelantes como etilendiaminotetracético (EDTA), ácido etilen bis tetracético (EGTA), 1,10 ortofenantrolina, fosfamidón (Supuran *et al.*, 2002).

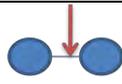
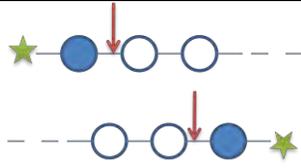
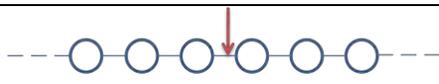
La clasificación de las metaloproteasa es bastante compleja, pues existe una gran variedad de familias. De acuerdo al pH requerido para su actividad, se clasifican en:

✓ Neutras: un ejemplo es la termolisina, producida por el género *Bacillus*, la cual muestra especificidad por aminoácidos hidrofóbicos; son termoestables y presentan un peso molecular de 34 kDa.

✓ Alcalinas. la colagenasa, producida por *Clostridium histolyticum* que tiene un mecanismo de acción muy específico, ya que actúa solo en colágeno y gelatina. La elastasa producida por *Pseudomonas aeruginosa* es otro miembro importante de este grupo. Estas proteasas son activas en un intervalo de pH de 7 a 9 y son de un peso molecular promedio de 14 kDa, sin embargo se han encontrado algunas entre 48 y 60 kDa (Matsumoto y Yamamoto, 1984; Rawlings y Barret, 1993).

Tabla 1. Los círculos abiertos representan los residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Círculos negros indican los aminoácidos terminales, y las estrellas representan un extremo sustituido. Las flechas indican los sitios de acción de la enzima (Modificado de Rao *et al.*, 1998).

PROTEASA	MODO DE ACCIÓN	
<b>Exopeptidasas</b>		
<b>Aminopeptidasas</b>		Hidrolizan el extremo amino terminal sustituido, liberando un solo aminoácido y un di o tripéptido
Dipeptidil peptidasa		Hidrolizan el extremo amino terminal insustituido, liberando dipéptidos
Tripeptidil peptidasa		Hidrolizan el extremo amino terminal insustituido, liberando tripéptidos

<b>Carboxipeptidasa</b>		Hidrolizan el extremo carboxilo terminal insustituido
Serin Proteasa		Hidrolizan el extremo carboxil terminal donde haya un aminoácido serina
Metaloproteasa		Hidrolizan el extremo carboxilo terminal donde haya un ion metálico
Cisteína Proteasa		Hidrolizan el extremo carboxilo terminal donde haya un aminoácido cisteína
Peptidil dipeptidasa		Hidrolizan el extremo carboxilo terminal insustituido, liberando dipéptidos
Dipeptidasas		Hidrolizan péptidos de dos residuos
Omega peptidasas		Hidrolizan el extremo carboxilo o amino terminales insustituidos
<b><u>Endopeptidasas</u></b>		Hidrolizan dentro de la cadena polipeptídica

### 1.8 Usos de las proteasas

Las proteasas microbianas han sido utilizadas industrialmente desde hace décadas y constituyen las proteínas más importantes del mercado industrial. Son enzimas con aplicaciones prácticas variadas. Uno de sus usos más conocidos es en la formulación de los llamados

-----

detergentes biológicos, pero también se emplean en la industria alimentaria para la fabricación de productos fermentados de soya y de pescado, de saborizantes y ablandadores de carne; en la producción de hidrolizados y concentrados proteínicos, en la elaboración de quesos, en la producción de pan, galletas, así como para la clarificación de la cerveza. En la industria farmacéutica se usan para formular antitrombóticos, antiinflamatorios y aceleradores de coagulación sanguínea (Lyons, 1988).

Esta versatilidad de aplicaciones es explicable por la gran diversidad de enzimas proteolíticas que se conocen, por eso hay posibilidad de encontrar tipos de proteasas activas casi a cualquier intervalo de pH y temperatura.

*Bacillus* sp. es uno de los mayores productores de proteasas extracelulares, por lo que sus enzimas han alcanzado un gran número de aplicaciones en la industria, incluyendo la farmacéutica, la del cuero, manufactura de proteínas hidrolizadas y en la alimentaria (Rao *et al.*, 1998).

Otras especies productoras de proteasas extracelulares son alrededor de 15 cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*. Su actividad proteolítica está dirigida a la hidrólisis de caseína. La cepa *Lactobacillus* IH8 es la que ha demostrado la mayor actividad proteolítica luego de 48 horas de incubación comparado con las otras cepas de este mismo género (Ikram and Hamid, 2006).

-----  
Industria de detergentes y cuero.

La preparación del primer detergente enzimático fue en 1912; consistió en carbonato de sodio y extracto pancreático puro. Luego se involucraron las proteasas microbianas (1956) con el nombre de BIO-40; en 1960, se introdujo una alcalasa producida por *Bacillus licheniformis* con el nombre comercial de BIOTEX.

Las proteasas constituyen un ingrediente estandarizado en el proceso de obtención de detergentes usados para lavandería y agentes para limpiar lentes de contacto y dentaduras. La actividad y estabilidad a altas temperaturas y valores de pH, la compatibilidad con otros agentes quelantes y oxidantes adicionados a los detergentes son un parámetro de selección de las proteasas dentro de los detergentes (Rao *et al.*, 1998).

En la industria del cuero, durante los procesos de pre-teñido, se usan un grupo de enzimas proteolíticas, las cuales se han obtenido por la fermentación microbiana, especialmente de *Aspergillus flavus*. Estas ayudan en la humectación, depilado y refinado de pieles (Kamini *et al.*, 1999).

En la tabla 2 se muestra la lista de las proteasa animales y microbianas más usadas para el proceso de pre-teñido en la manufactura del cuero, especialmente proteasas neutras y alcalinas (serin proteasas) derivadas de bacterias y proteasa ácidas obtenidas de hongos como *A. satoi*. Queratinasas producidas por *Streptomyces fradiae*, que pueden ser usados en el proceso de depilado de las pieles (Kamini *et al.*, 1999). El criterio más importante para su selección es la especificidad, la actividad en un amplio rango de pH y termoestabilidad.

Tabla 2. Enzimas usadas en el proceso de manufactura del cuero (Kamini *et al.*, 1999).

Enzimas usadas en el proceso de pre-teñido del cuero		
Proceso	Enzima	Microorganismo
Hidratación	Proteasas	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Rhizopus rhizopodiformis</i>
	Carbohidrasas	<i>Aspergillus awamori</i> , <i>A. flavus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Lactobacillus</i> sp.
Depilado	Proteasas	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Streptomyces griseus</i> , <i>S. moderatus</i>
Refinado	Proteasas	<i>A. parasiticus</i> , <i>S. rimosus</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>
Desengrasado	Lipasas	<i>Rhizopus nodosus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. flavus</i>

### Industria alimentaria

El uso de proteasas en este sector proviene desde la antigüedad y así han sido utilizadas rutinariamente en la elaboración de quesos, hidrolizados de soya, elaboración del pan y ablandamiento de carnes.

Las proteasas más usadas pertenecen a la familia de las aspartato proteasas con un peso molecular que oscila entre 30 - 40 kDa (Sumantha *et al.*, 2006).

Lácteos: la mayor aplicación de las proteasas en la industria láctea es en la manufactura del queso; las enzimas utilizadas se ubican en tres categorías: (i) quimosina animal, (ii) enzimas microbianas coagulantes de la leche (iii) quimosina modificada genéticamente (Perea *et al.*, 1993). La proteólisis es el evento más complejo en la maduración de los quesos y es probablemente el más importante en

.....

el desarrollo de aroma y textura. Contribuye directamente al aroma por la generación de nuevos derivados de péptidos, como aminos, ácidos, tioles y tioésteres, etc. Otra de las funciones importantes en la elaboración del queso es la provisión de aminoácidos para el crecimiento bacteriano en el sustrato de la leche (Law y Mulholland, 1995). Los géneros bacterianos más usados para llevar a cabo la proteólisis en productos lácteos son: *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Farnworth, 2008).

Productos de panadería: la harina de trigo es el mayor componente del proceso de elaboración de productos horneados; tiene una proteína insoluble llamada gluten, la cual es la encargada de dar características propias de la masa. Las endo y exo proteasas de *A. oryzae* han sido utilizadas para modificar el gluten de la masa, facilitando el manejo y permitiendo la producción de un amplio rango de productos. Además ayuda a reducir el tiempo de mezclado resultando barras voluminosas de pan. Las proteasas microbianas mejoran la extensibilidad y fuerza de la masa (Rao *et al.*, 1998).

También se destacan los hidrolizados proteicos, producidos por la acción de diversas proteasas, las cuales son ampliamente utilizados en la elaboración de alimentos de bebés, productos dietéticos y en la alimentación hospitalaria. Existen hidrolizados proteicos industriales de caseína, de suero o de soya; siendo este último el más común (Sánchez-Porro, 2005).

Industria Cárnica: las proteínas son los componentes estructurales y funcionales de las carnes procesadas. Entre sus características sensoriales, la palatabilidad es el factor más importante. Un acercamiento a la palatabilidad de la carne es reducir perceptiblemente la cantidad de tejidos conectivos sin causar la

-----

degradación extensa de proteínas miofibrilares. Este objetivo se puede alcanzar por la destrucción mecánica o, alternativamente con el uso de enzimas proteolíticas, tales como papaína, bromelina y ficina, derivadas de las plantas. Sin embargo, estas enzimas, usadas comercialmente como ablandadores de la carne en América y Europa, llevan a menudo al sobre ablandamiento y por eso, al mal gusto debido a la amplia especificidad del substrato y a los péptidos amargos producidos. Un ablandador ideal de la carne sería específico para hidrolizar las proteínas colágeno y elastina. Las proteasas microbianas son otra fuente de ablandadores potentes de la carne. Una elastasa alcalina microbiana, YaB (subtilisina YaB) producida extracelularmente por *Bacillus* YaB, se muestra como buen ablandador de la carne debido a su especificidad marcada por la elastina y el colágeno comparados a otras proteasas microbianas comerciales (Chuan-Mei *et al.*, 2002).

En los embutidos, la proteólisis se debe a la acción conjunta de los sistemas enzimáticos muscular y microbiano (Figura 2) pero hasta la fecha no se conoce totalmente cuál es la participación de cada uno de estos sistemas ni como se complementan (Toldrá y Verplaetse, 1995; Molly *et al.*, 1997; Ordoñez *et al.*, 1999).

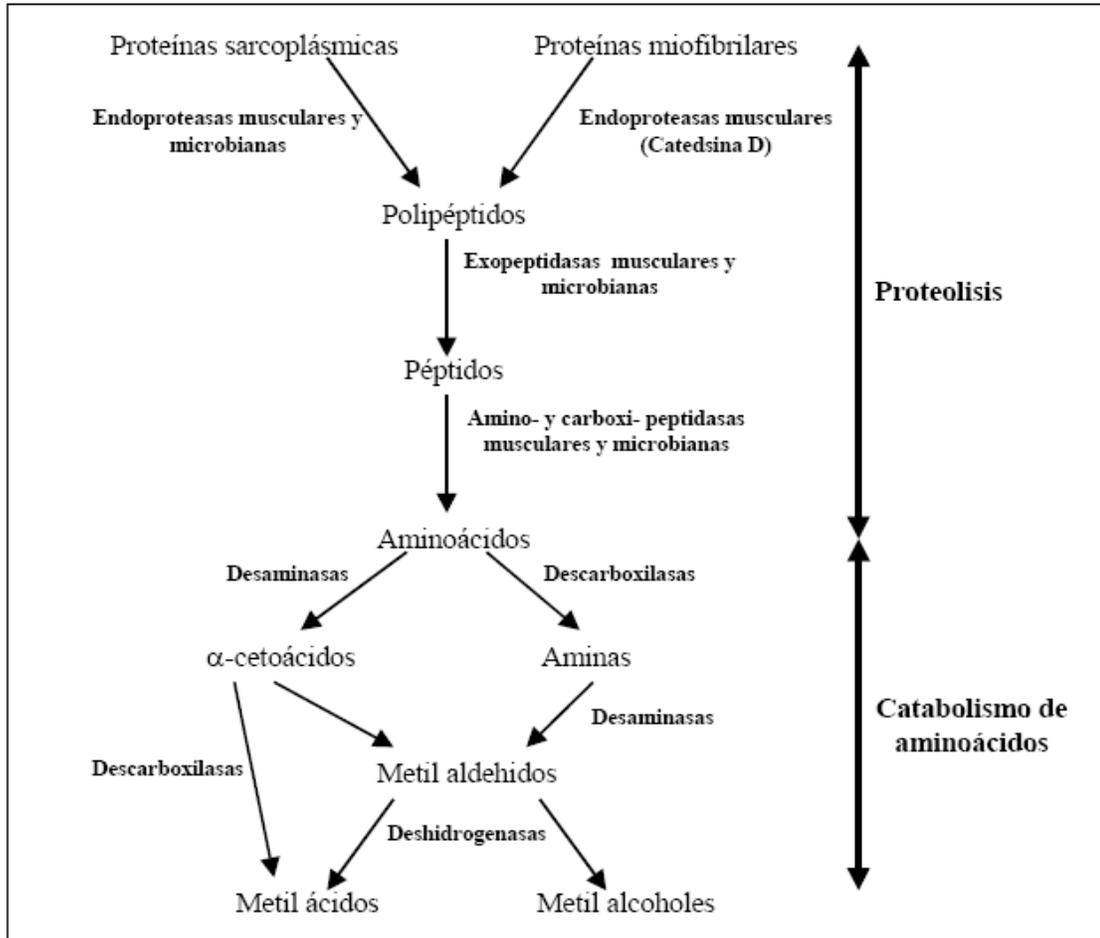


Figura 2. Principales mecanismos y enzimas involucradas en la degradación de las proteínas musculares y en el catabolismo de aminoácidos (Talon *et al.*, 2002).

Industria farmacéutica: las proteasas tienen un papel importante en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos, por ejemplo, se usan por vía oral para la corrección de ciertas deficiencias enzimáticas, como es el caso de la nortasa producida por *A. oryzae*, la colagenasa producida por el género *Clostridium* y la subtilisina (*B. subtilis*) las cuales se usan en combinación con antibióticos en el tratamiento de quemaduras y heridas. Una asparaginasa aislada de *E. coli* se usa para eliminar asparagina del torrente sanguíneo en leucemia linfocítica (Kumar y Tagaki, 1999).

## 1.9 Sistema proteolítico

El sistema proteolítico consiste en proteasas extracelulares, transportadores de péptidos y proteasas intracelulares (Kunji *et al.*, 1996).

En las bacterias ácido lácticas el sistema proteolítico puede ser dividido en tres grupos según sus funciones: (i) proteasas localizadas extracelularmente, en su mayoría asociadas a la pared celular, (ii) un mecanismo para el transporte específico de dipéptidos, tripéptidos y oligopéptidos (>3 residuos) a través de la membrana citoplasmática y (iii) una multitud de peptidasas intracelulares. *Lactococcus lactis*, es el organismo más estudiado entre los cultivos iniciadores usados en la producción de queso y su sistema proteolítico es el más complejo e importante en el proceso de maduración (Figura 3) (Savijoki e Ingmer, 2006).

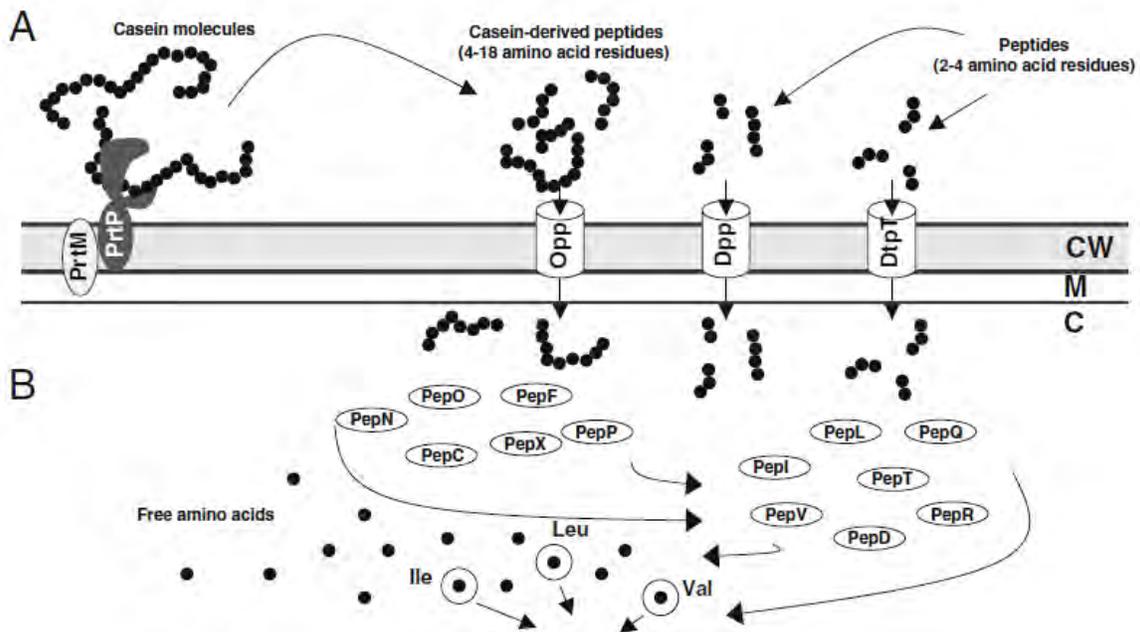


Figura 3. Presentación simplificada de la función del sistema proteolítico de *Lactococcus* en la degradación de la caseína. (A) espacio extracelular, (B) espacio intracelular, (CW) pared celular bacteriana, (M) membrana y (C) citoplasma (Modificado de Savijoki e Ingmer, 2006)

---

## II. ANTECEDENTES

Las BAL tienen un sistema proteolítico muy complejo. En cepas como, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Streptococcus thermophilus* se han encontrado proteasas del tipo PI y PIII, así como dipeptidasas. (Law y Kolstad, 1983; Pritchard y Coolbear, 1993; Kunji *et al.*, 1996; Savijoki e Ingmer, 2006).

*Pediococcus sp.* es una BAL Gram positiva, no móvil, no esporulado, anaerobio facultativo, quimiorganotrófico, requiere de un medio rico en nutrientes y carbohidratos fermentables. Forma tétradas en condiciones favorables, a veces solo se puede encontrar en forma de pares. Se ha reportado que es homofermentativa, produciendo ácido láctico a partir de glucosa, galactosa, arabinosa, manitol y dextrinas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 45°C. Se puede encontrar en material vegetal y productos alimenticios (Salminen *et al.*, 2004).

Filogenéticamente las especies de *Pediococcus*, pertenecen a la familia *Lactobacillaceae*. El género consiste de siete especies: *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. halophilus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* y *P. urinaeequi* (Salminen *et al.*, 2004).

Antes de la introducción y el uso subsecuente de las cepas de *Pediococcus* como cultivos iniciadores predominantes de la carne, la mayoría de microorganismos aislados de forma natural de las carnes fermentadas consistían de varias especies de *Lactobacillus*. Estos siguen siendo la microbiota predominante cuando se busca una fuerte reducción del nitrato.

-----

Sin embargo, en Estados Unidos se encontraron problemas a la hora de preparar los liofilizados puros de *Lactobacillus* sp. así que la inoculación de este microorganismo fue reemplazado con cepas de *Pediococcus* sp. el cual era resistente a la liofilización (Doyle *et al.*, 1997).

Otra razón para utilizar *Pediococcus* sp. en la fermentación de salchichas residía en que la temperatura para su elaboración era generalmente más alta que las temperaturas usadas en Europa, lo que implicó de manera imprescindible que la disminución del pH se llevara a cabo más rápidamente durante la fermentación para evitar así el crecimiento y la formación de la toxina de *Staphylococcus aureus* (Bacus y Brown, 1981).

*P. acidilactici* y *P. pentosaceus* son BAL homofermentativas involucradas en la preparación de cultivos iniciadores en productos cárnicos y vegetales fermentados. A pesar de la importancia comercial de *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* en productos fermentados, el fenotipo autolítico de estas especies nunca han sido investigados (Mc Kay y Baldwin, 1990).

*Pediococcus* es una BAL de gran importancia industrial, usada principalmente para la producción de embutidos fermentados. Benito *et al.* (2007) reportaron que más del 50% de las especies aisladas de salchichas españolas eran *Pediococcus pentosaceus* o *Pediococcus acidilactici*. Tres de estas cepas mostraron débil actividad proteolítica hacia las proteínas miofibrilares. Una tripeptidasa intracelular ha sido encontrada en *P. pentosaceus* por Simitopoulou *et al.* (1997), y en el genoma completo de esta especie (Makarova *et al.*, 2006) parece contener al menos 60 peptidasas o proteasas que aún no se han demostrado y caracterizado bioquímicamente.

-----

En el grupo de trabajo Llorente (2008) reportó que durante la fase logarítmica de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se localizaba en el medio de cultivo actividad proteolítica extracelular, con un peso molecular cercano a los 200 kDa. Esta proteasa fue purificada y caracterizada por Granados-Pérez (2009). Cabe aclarar que en el genoma de *Pediococcus* no se ha reportado un gene para una proteína de este tamaño. No se descarta que esta actividad se debiera a la interacción de oligómeros o a fenómenos de agregación. En ciertas condiciones, la misma autora detectaba actividad proteolítica a los 80 kDa en extractos celulares en condiciones de fermentación sin agitación, y tras tiempos largos de incubación con el sustrato. Este resultado no pudo ser reproducido por Granados-Pérez (2009), quien, en cambio, encontró actividad a los 80 kDa en la fracción adherida a membrana cuando el microorganismo se cultivaba con agitación. El presente trabajo pretende resolver las dudas acerca del tipo de enzimas proteolíticas producidas y su localización, empleando únicamente las condiciones de cultivo con agitación.

### III. HIPÓTESIS

Se encontrarán proteasas con actividades y propiedades diferentes, localizadas tanto en el interior como en el medio de crecimiento de *P. acidilactici*, lo que le permitirá degradar una amplia gama de sustratos proteicos.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Determinar si existen proteasas menores a 200 kDa en *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, localizarlas y, en su caso, caracterizarlas.

#### 4.2 Objetivos particulares

- Evaluar la producción de la proteasa en diferentes etapas de crecimiento.
- Determinar la presencia de bandas de proteína con actividad proteolítica en diferentes fracciones celulares (extracelular, intracelular o membranal).
- Determinar la actividad proteolítica de cada fracción utilizando diferentes sustratos.
- Caracterizar bioquímicamente la fracción proteolítica de mayor interés en función de temperatura, pH, iones e inhibidores.

V. METODOLOGÍAS:

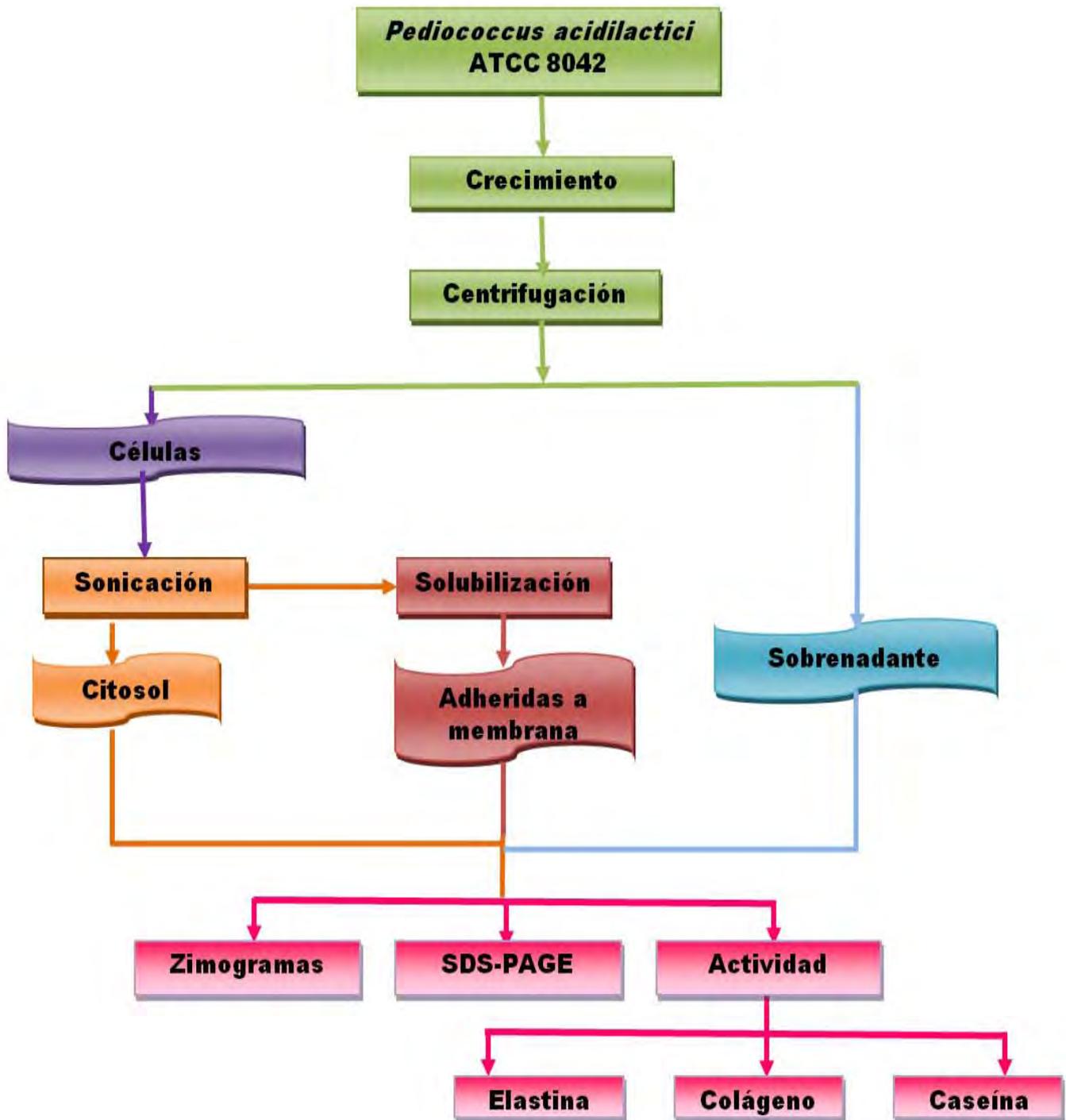


Figura 4. Diagrama de trabajo de la primera fase experimental. Localización de la actividad proteolítica de *P. acidilactici* ATCC 8042

-----  
5.1 Primera fase experimental. Localización de la actividad proteolítica durante la cinética de crecimiento.

#### 5.1.1 Material biológico

*P. acidilactici* ATCC 8042 se obtuvo del cepario del CINVESTAV, México. Las células se almacenaron a -20°C en viales de vidrio y en caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, Oxoid) con glicerol (80-20%, v/v).

#### 5.1.2 Medio de cultivo y condiciones de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042

*P. acidilactici* se cultivó en caldo MRS modificado (Llorente, 1998). Se realizó un pre-inóculo partiendo de la cepa conservada a -20°C, adicionando 2-3 esferas de vidrio por cada 10 mL de caldo MRS modificado. El pre-inóculo se incubó, con agitación recíproca de 120 rpm, a 30°C durante 24 h (New Bruswick Scientific Edison).

#### 5.1.3 Medio MRS modificado

Se pesaron los ingredientes del medio MRS modificado (tabla 3) con excepción del ácido ascórbico y la sacarosa, que fueron preparados y esterilizados por separado en autoclave a 121°C/10 lbs/ 15 min (Yamato SM 300). Posteriormente se mezclaron todos los componentes estériles y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL (Llorente, 1998).

Tabla 3. Formulación del medio MRS modificado.

INGREDIENTE	g/L
Extracto de carne	10.0
Peptona de proteasa	10.0
Extracto de levadura	5.0
Citrato de Amonio	2.0
Tween 80	1.0
Sulfato de manganeso	0.25
Sulfato de magnesio	0.1
Fosfato de potasio dibásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Ácido ascórbico	1.5
Sacarosa	10.0

#### 5.1.4 Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* y obtención de células

Se realizó una cinética de crecimiento, tomando 3 esferas perforadas y se adicionaron a 20 mL de caldo MRS modificado y se incubó a 30°C durante 24 h con agitación recíproca a 120 rpm. Posteriormente se le adicionó el 1% del preinóculo a un matraz con 20 mL de medio fresco y se incubó en las mismas condiciones. Finalmente se tomaron 100 µL (1%) del inóculo anterior y se adicionaron a 100 mL de medio MRS modificado, tomando alícuotas a las de 8, 12, 16 y 24 h de fermentación, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (Perkin Elmer Lambda 3A) y se determinó el pH (Hanna Instruments HI 4211)

-----

### 5.1.5 Localización de la enzima con actividad proteolítica en *P. acidilactici*

Cada una de las muestras tomadas a los tiempos de crecimiento (8, 12, 16 y 24 h), se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min a 4°C. El paquete celular se lavó dos veces con un buffer 50 mM Tris-HCl, pH 7.6 (buffer de trabajo), con las condiciones anteriormente descritas.

De las muestras cosechadas en cada tiempo se obtuvieron dos fracciones: células y extracto crudo. El sobrenadante se neutralizó con NaOH y se filtró con una membrana de 0.22 µm con la finalidad de eliminar células. Para su concentración se sometió a liofilización y se guardó a -20°C hasta su uso.

Una alícuota de células se resuspendió en Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 4% se agitó y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, se centrifugó a 50,000 rpm por 45 min con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de Tritón posible y, se obtuvieron dos fracciones: pellet y solubilizado, las cuales se congelaron a -20°C hasta su uso (Schnaitman, 1971).

La otra alícuota de células se ajustó a una densidad óptica de 5.0, a una longitud de onda de 600 nm, y se sonicó a una amplitud de 30 Hz, con 20 ciclos de 20 segundos cada uno e intervalos de descanso de 20 segundos a 4°C (Sonicador Fisher Scientific modelo 550) (Cibik y Chapot-Chartier, 2004). Posteriormente, se centrifugó a 17,000 rpm por 30 min a 4°C, se obtuvieron dos fracciones: citosólica y células rotas, las cuales fueron tratadas con Tritón, como se describió anteriormente.

.....  
De la metodología anterior, se obtuvieron tres fracciones celulares de tratamiento:

- a) Sobrenadante
- b) Proteínas adheridas a membrana y
- c) Citosol

Posteriormente las fracciones se liofilizaron y se les realizaron las pruebas para detección de actividad proteolítica espectrofotométricamente y por medio de zimografía.

#### 5.1.6 Cuantificación de proteína

Se determinaron las concentraciones de proteína de las muestras obtenidas, por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) a una longitud de onda de 595 nm (Espectrofotómetro Biomate 3). Se colocaron 800 µL de cada muestra en un tubo limpio y seco. Se adicionaron 200 µL del reactivo de Bradford concentrado y se homogenizó la muestra. Luego se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Las mediciones se realizaron por triplicado. Se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) (Bradford *et al.*, 1976).

#### 5.1.7 Determinación del perfil electroforético y de la actividad proteolítica por zimogramas

El peso molecular de la proteasa se determinó por geles en condiciones desnaturizantes, ya que es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas (Heusen and Dowdle, 1980). Se prepararon geles al 10% de poliacrilamida co-polimerizada (Bis-acrilamida 30%, 2M Tris-HCl pH 8.8, SDS 10%, H<sub>2</sub>O, TEMED y APS 10%) (Manual Bio-Rad).

-----

Se tomaron 30  $\mu$ L de cada una de las fracciones de tratamiento, se les adicionaron 5  $\mu$ L de buffer de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 2.5% glicerol, 0.5%  $\beta$ - mercaptoetanol y 0.5% de azul de bromofenol). Las muestras sometieron a electroforesis en gel (Bio-Rad, Power-Pac 300) a 120 V durante 1.5 h.

Después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada en agitación suave durante 30 min, se tiñó con azul de Coomasie (0.1% azul de Coomassie R-250, 45% metanol, 10% ácido acético glacial y 45% de agua) durante 2 h en agitación suave y finalmente el gel se destiñó con solución que contenía 10% de metanol, 10% ácido acético glacial y 80% de agua. El peso molecular de las bandas de proteína se determinó por la comparación con marcadores de alto peso molecular (Bio-Rad).

Para la elaboración de zimogramas, se prepararon geles con SDS al 10% de poliacrilamida co-polimerizada con 0.1% del sustrato proteico (gelatina o caseína) (Lodemel y Olsen, 2003; Heusen y Dowdle, 1980). Posteriormente el sustrato se resuspendió con los reactivos necesarios para la elaboración del gel.

Después de someter las muestras a electroforesis con las mismas condiciones anteriormente descritas, el gel se lavó con agua desionizada en agitación suave durante 30 min y, posteriormente se lavaron por 30 min en una solución de Tritón 2.5%. Se incubó a 37°C en buffer de renaturalización (50 mM Tris- HCl pH 7.6, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 200 mM) por un periodo de 12-16 h con agitación (50 rpm). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. La actividad proteolítica fue identificada como una zona clara en contra de un fondo azul (Lantz y Ciborowski, 1994).

---

### 5.1.8 Actividad proteolítica sobre diferentes sustratos

La actividad proteolítica se determinó por técnicas espectrofotométricas y por zimogramas. Se utilizaron diferentes sustratos proteicos con la finalidad de evaluar la afinidad por sustrato.

#### 5.1.8.1 Método de actividad caseinolítica

Se determinó mediante el método de Kunitz (1947), empleando como sustrato caseína al 1%. Para realizar la medición de la actividad proteolítica se prosiguió de la siguiente manera; en un baño a temperatura de 35°C, se colocaron los tubos de ensayo conteniendo 1.9 mL de caseína para su incubación durante 10 min. Se agregó 0.1 mL de la preparación enzimática y se dejó actuar durante 10 min. La reacción se detuvo adicionando 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Simultáneamente se corrió un testigo al que se adicionó primero el TCA y al final la preparación enzimática. Al término de la reacción los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm.

Finalmente, los productos de la hidrólisis enzimática que se encontraba en la preparación enzimática, aminoácidos libres y péptidos pequeños, se determinaron mediante absorbancia en un espectrofotómetro a 280 nm, ajustando el aparato con un blanco de 2 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.6 y 3 mL de TCA al 5%. El ensayo se realizó por triplicado. Una unidad de actividad enzimática se definió como el cambio en la absorbancia por unidad de tiempo de la reacción por miligramo de proteína total.

---

#### 5.1.8.2 Método de actividad elastinolítica

La actividad sobre elastina fue determinada con el sustrato Elastin-Congo Red (Elastin Products) en una concentración de 5 mg/ml resuspendido en buffer de trabajo 50 mM Tris-HCl pH 7.6. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 2 h en agitación controlada. El cálculo de las unidades de actividad específica se hizo con base en una hora de la reacción. Ésta se detuvo a 4°C por 10 min y luego se centrifugó en refrigeración (Centrifuga Biofuge PRIMO R) a 8,500 rpm. Las unidades de solubilización de la elastina se determinaron midiendo la absorbancia del sobrenadante a 495 nm (Kessler *et al.*, 1997).

#### 5.1.8.3 Método de actividad colagenolítica.

Se utilizó el sustrato proteico del colágeno Hide Powder Azure (Sigma) en una concentración de 5 mg/mL. Este es insoluble en agua y está unido covalentemente al colorante Remazol azul brillante; cuando el sustrato es hidrolizado por una proteasa, se libera el colorante y se tiñe de color azul el medio (Riderknecht *et al.*, 1968). La metodología usada fue la misma de la Elastina Congo Red.

#### 5.1.8.4 Método de actividad gelanolítica.

El ensayo se basa en el uso de gelatina succinilada como sustrato y la medición de aminas primarias expuestas por la hidrólisis del sustrato por actividad proteolítica. La gelatina se trata con anhídrido succínico para bloquear todos los grupos amino libres de la proteína. La hidrólisis de los enlaces peptídicos por el ataque proteolítico expone las aminas primarias, que se detectan al reaccionar con el ácido 2,4,6- trinitrobenzen sulfónico (TNBS) (Sigma Aldrich) que produce una reacción colorida que se puede leer a una longitud de onda de 450 nm y, que es directamente proporcional a la actividad gelanolítica (Baragi *et al.*, 2000).

-----  
La actividad sobre gelatina se determinó con la gelatina succinilada en una concentración de 200 µg/mL, resuspendida en 50 mM buffer de boratos pH 8.5. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 10 min. Una vez transcurrido dicho tiempo se agregaron 50 µl de una solución de TNBS a 0.03% y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. La densidad óptica de cada reacción se determinó a una longitud de onda de 450 nm con un lector de microplacas (Epoch Biotek).

5.2 Segunda fase experimental. Purificación parcial y caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de interés

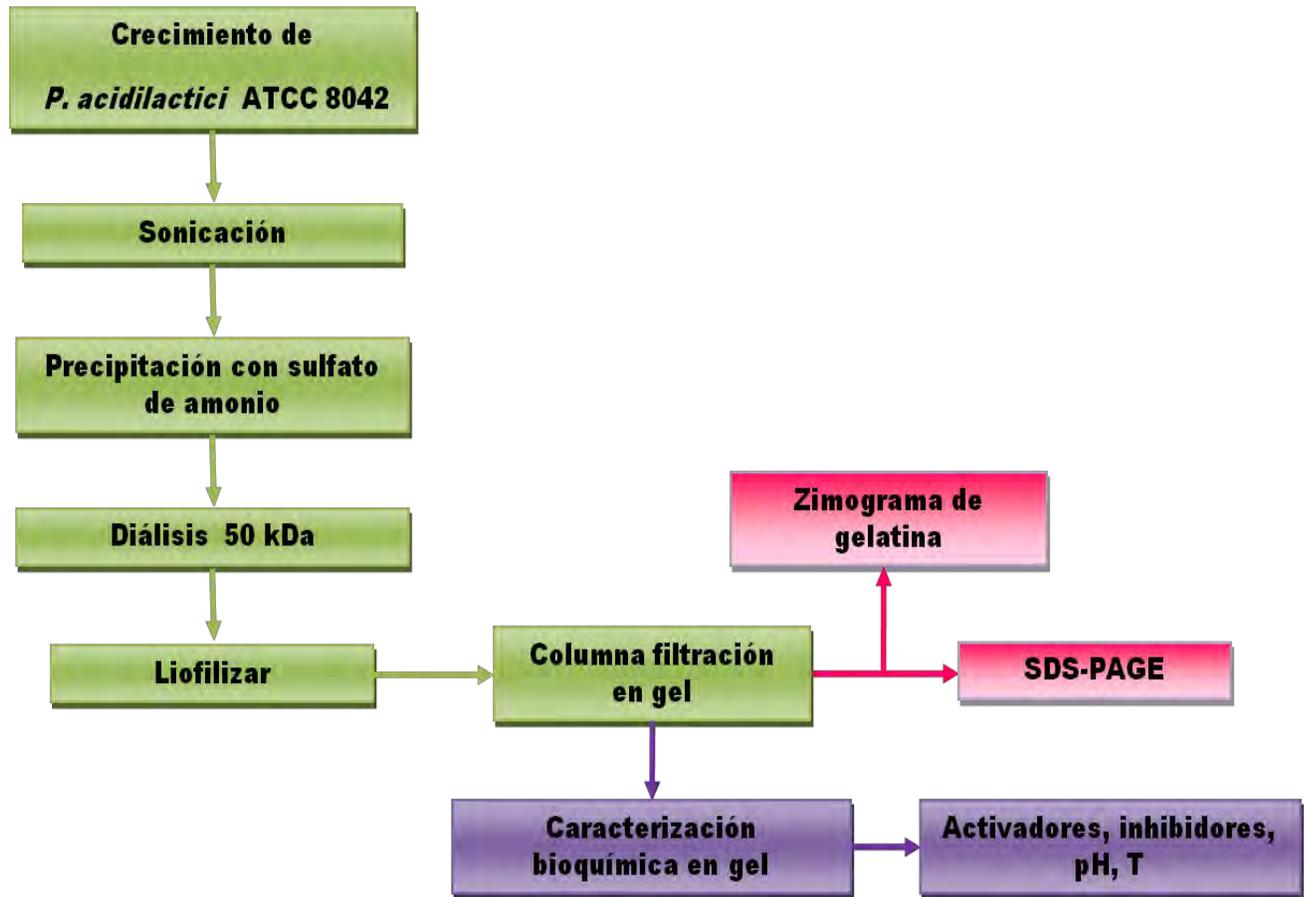


Figura 5. Purificación parcial y caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de *P. acidilactici* ATCC 8042.

---

### 5.2.1 Purificación parcial de la proteasa

Una vez obtenido el tiempo y la fracción donde se encontró la mayor actividad proteolítica, la muestra se precipitó con sulfato de amonio al 60% (p/v). Posteriormente se dializó con una membrana de corte de 50 kDa. Por último se hizo pasar la muestra por una columna de exclusión molecular (Bio-Gel P-100 Gel) Con la fracción de mayor actividad se realizaron pruebas espectrofotométricas y zimografía.

### 5.2.2 Caracterización bioquímica de la proteasa citosólica de *P. acidilactici*

#### Determinación de pH óptimo

Para la determinación de la actividad proteolítica se realizó un zimograma contra gelatina, en cada pozo se cargaron 30µL de la muestra proteica, después de la electroforesis cada carril fue cortado y lavado dos veces con 50 mL de agua desionizada en agitación durante 15 minutos, posteriormente se lavaron por 30 min en una solución de Tritón 2.5%, seguido de la adición de 50 mL del buffer de renaturalización modificado (Tris-HCl 20 mM, ácido acético 20 mM CHES 20 mM, HEPES 20 mM, MES 20 mM) ajustado a los diferentes pH (2,3,4,5,6,7,8,9).

La renaturalización se realizó en agitación suave en un periodo de 12 h a 37°C. Trascurrido este tiempo se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada y se tiñó el gel como se describió anteriormente.

---

### Determinación de temperatura óptima

De la enzima semipurificada se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  las cuales fueron sometidas a un calentamiento en un baño de agua a diferentes temperaturas: 37°, 50, 60, 70, 90 y 99°C en dos tiempos: 1 h y 2 h, posteriormente a cada tratamiento se determinó la actividad proteolítica por medio de zimografía.

### Efecto de activadores

Para determinar el efecto que tiene cada ion evaluado,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Li}^+$  sobre la actividad de la muestra proteica se realizaron pruebas de actividad en gel.

Se realizó un zimograma contra gelatina, en el cual se cargaron 30  $\mu\text{L}$  de la muestra, se realizó la electroforesis y cada carril fue cortado, lavado y renaturalizado con buffer de renaturalización al que previamente se le ajustó la concentración de cada ión a evaluar. De cada uno se probaron concentraciones de 1 y 10 mM para los iones divalentes, así como, 2 y 200 mM para los iones monovalentes en concentración final. Cada gel se lavó con 50 mL de agua desionizada y se tiñó en las condiciones descritas.

---

### Efecto de inhibidores

Para la clasificación de la proteasa se utilizaron diferentes agentes quelantes, por lo cual se realizó un zimograma en el que se cargaron 30  $\mu$ L de la muestra y se realizó la electroforesis en las condiciones ya mencionadas. Posteriormente, cada carril fue cortado, lavado y renaturalizado con buffer de renaturalización al que previamente se le ajustó la concentración de cada inhibidor (EDTA, EGTA, PMSF y 1,10-orto fenantrolina). Se utilizaron dos concentraciones de cada inhibidor, 1 y 10 mM. Cada gel se lavó con 50 mL de agua desionizada y se tiñó en las mismas condiciones descritas para un zimograma.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

### 6.1 PRIMERA FASE EXPERIMENTAL

#### 6.1.1 Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042

En primera instancia se evaluó el crecimiento del microorganismo para determinar el tipo de comportamiento que sigue en Medio de cultivo MRS modificado por Llorente (1998). Se presentó la fase de latencia de las 0 a las 6 h, la fase logarítmica entre las 6 y las 12 h, y la fase estacionaria a partir de las 14 h. Además se observó el decaimiento del pH a medida que se incrementaba el tiempo de cultivo, lo que se puede atribuir al tipo de metabolismo homofermentativo, es decir, a la producción de ácido láctico (Figura 6).

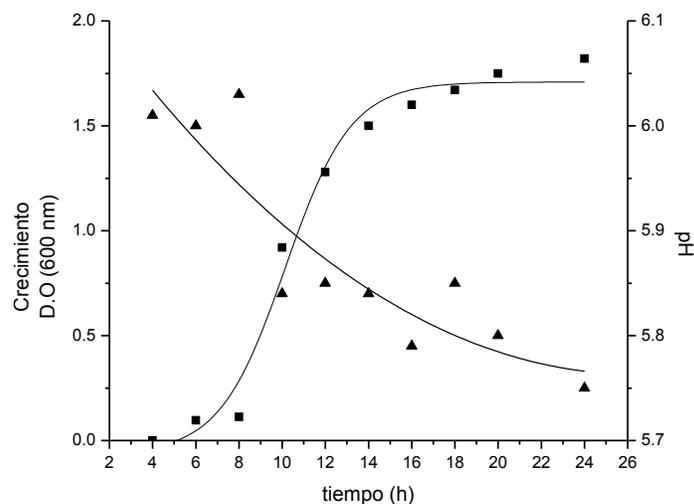


Figura 6. Curva de crecimiento de *P. acidilactici*. Se realizaron previamente 2 resiembras, inoculando el 1% del cultivo en medio MRS- modificado fresco a 30°C con una agitación de 120 rpm. Se monitoreó la D.O.<sub>600nm</sub> (■) y el pH (▲) durante la cinética de crecimiento.

6.1.2 Perfil electroforético y actividad proteolítica por zimogramas

Después de la obtención de cada fracción celular se hicieron un perfil electroforético y geles de actividad, según las técnicas descritas en el capítulo de Metodologías. Se deseaba conocer en qué etapa de crecimiento se encuentra la actividad proteolítica, el peso molecular y su localización en la célula.

A continuación se muestran los correspondientes geles SDS-PAGE y zimogramas, para cada fracción celular obtenida, empleando gelatina como sustrato. (Figura 7 a 9).

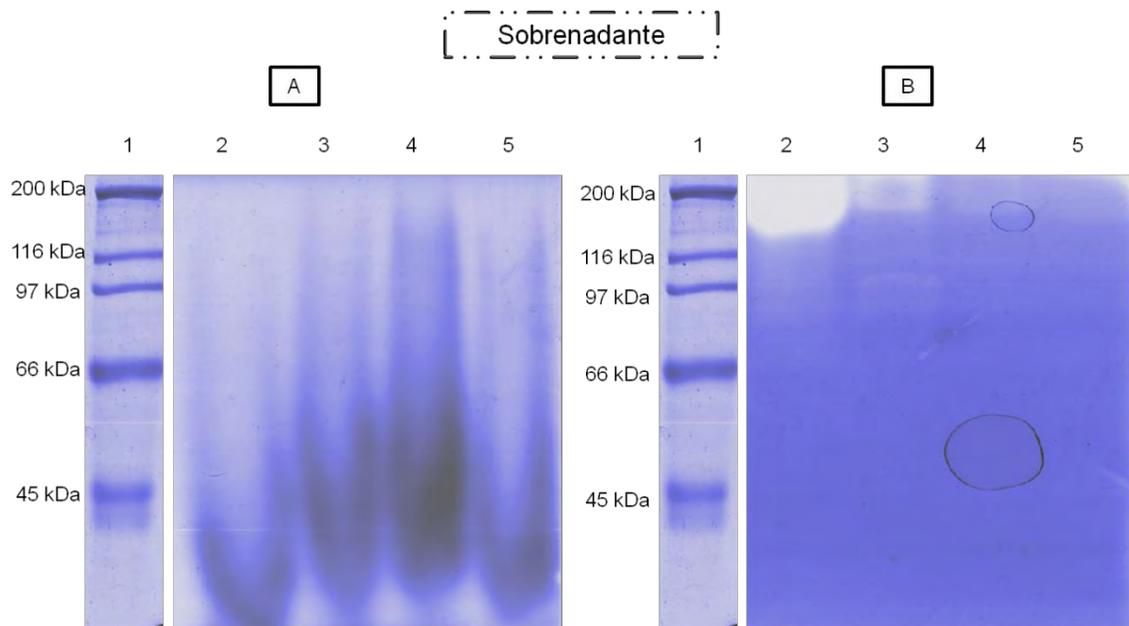


Figura 7. Perfil de proteínas del Sobrenadante de muestras obtenidas a diferentes tiempos de crecimiento. SDS-PAGE 10% (A) y Actividad Proteolítica en Zimograma con gelatina (B). Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, 8 h; carril 3, 12 h; carril 4, 16 h; carril 5, 24 h.

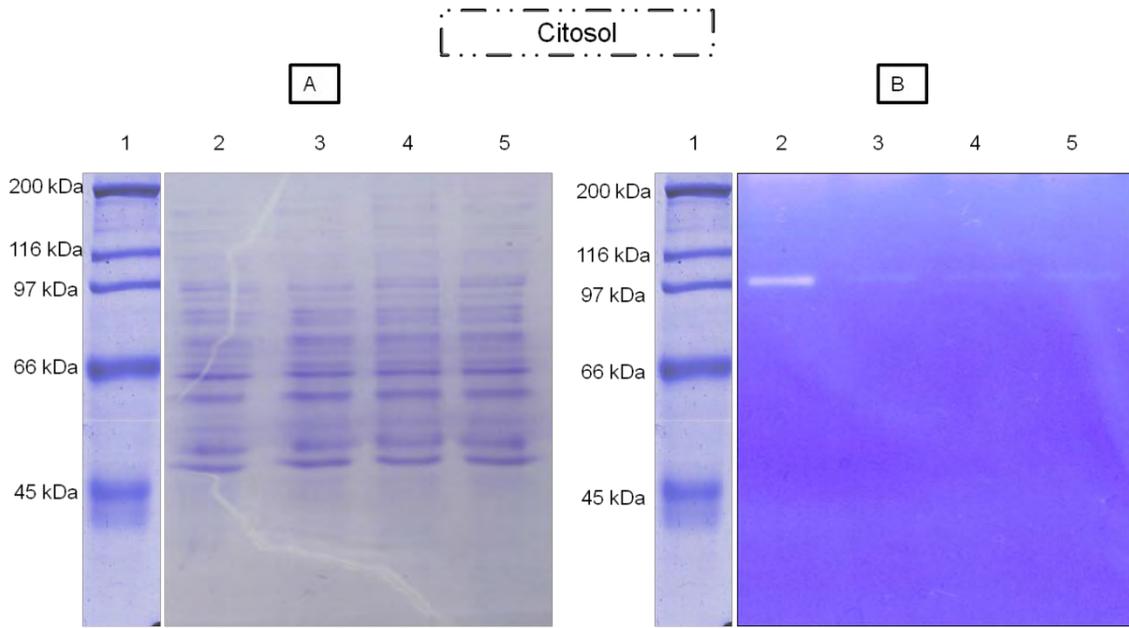


Figura 8. Perfil de proteínas del Citosol de muestras obtenidas a diferentes tiempos de crecimiento. SDS-PAGE 10% (A) y Actividad proteolítica en Zimograma con gelatina (B). Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, 8 h; carril 3, 12 h; carril 4, 16 h; carril 5, 24 h.

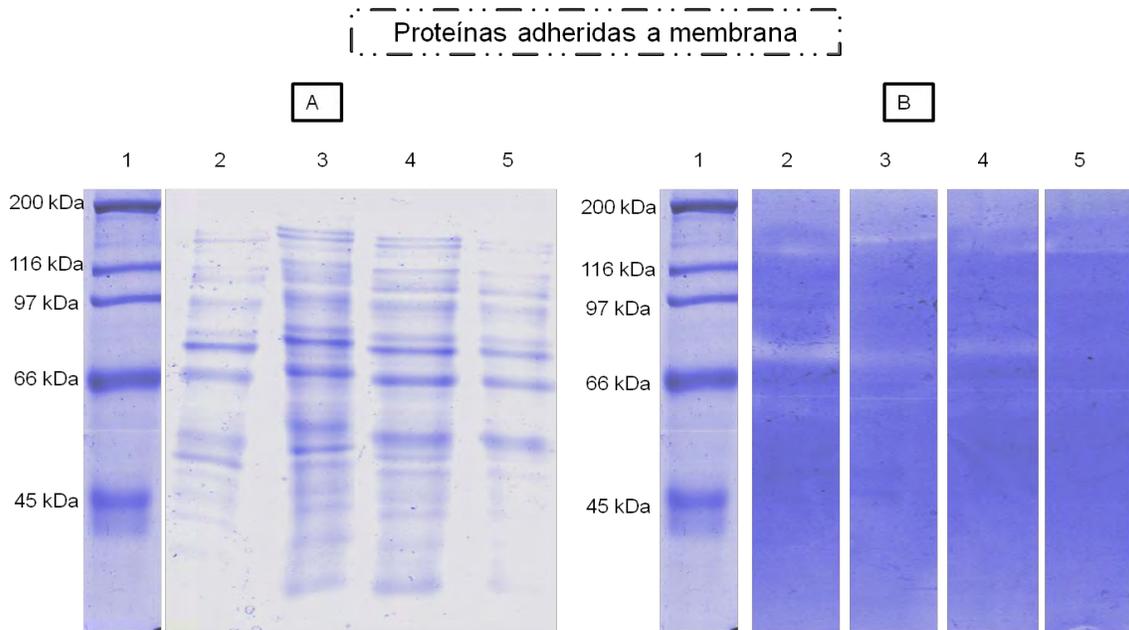


Figura 9. Perfil proteínico y actividad proteolítica de proteínas adheridas a membrana, SDS-PAGE 10% (A) y Actividad proteolítica en Zimograma con gelatina (B). Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, 8 h; carril 3, 12 h; carril 4, 16 h; carril 5, 24 h.

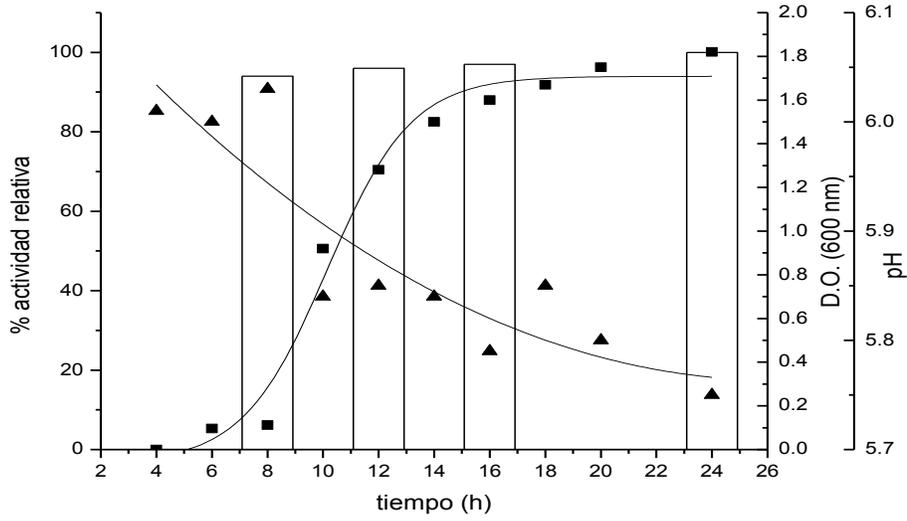
Se puede observar en las figuras anteriores que se encuentra actividad proteolítica en bandas de diferente peso molecular. En el caso del sobrenadante, (figura 7) se observa actividad a los 200 kDa, correspondiente con la proteasa encontrada por Llorente (2008). En la fracción de proteínas adheridas a membrana (figura 9) se encontró actividad proteolítica en bandas de aproximadamente 116 kDa y 60 kDa. En el citosol (figura 8) se encontró una banda muy marcada a los 97 kDa a las 8h de crecimiento. Considerando que se colocó en cada carril la misma cantidad de proteína, se puede afirmar que en el caso de las proteasas presentes en el sobrenadante y adheridas a membrana son más activas en las primeras horas de crecimiento. En la fracción citosólica la intensidad se mantiene en todas los tiempos y decae en la etapa final del crecimiento.

#### 6.1.3 Determinación de la actividad proteolítica sobre diferentes sustratos.

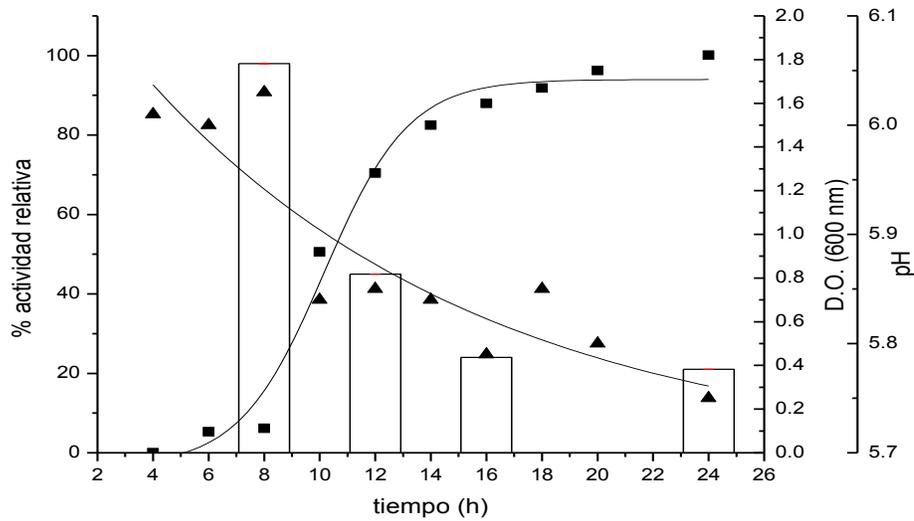
Una vez determinada la presencia de al menos cuatro tipos de enzimas de diferente peso molecular y localización, se procedió a determinar si la afinidad por sustratos proteicos era la misma para todas. Se emplearon como sustratos caseína, colágeno, elastina y gelatina y se evaluó cada fracción en forma independiente, considerando que las proteasas presentes son diferentes en cada una y que en la fracción adherida a membrana hay dos bandas. La evaluación fue cuantitativa por técnicas espectrofotométricas. Es de importancia mencionar que al medir la actividad proteolítica en el sobrenadante se presentaron algunos problemas debido al color que éste presenta.

Actividad caseinolítica

**Sobrenadante**



**Citosol**



## Adheridas a Membrana

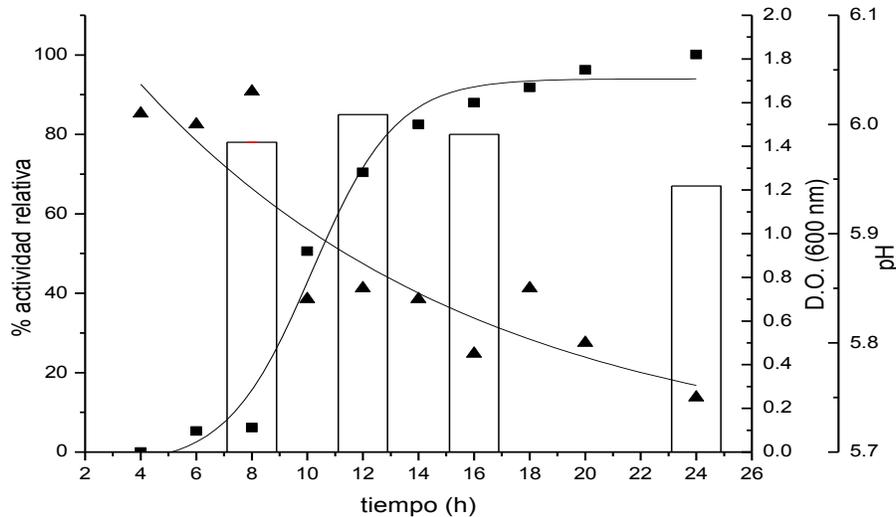
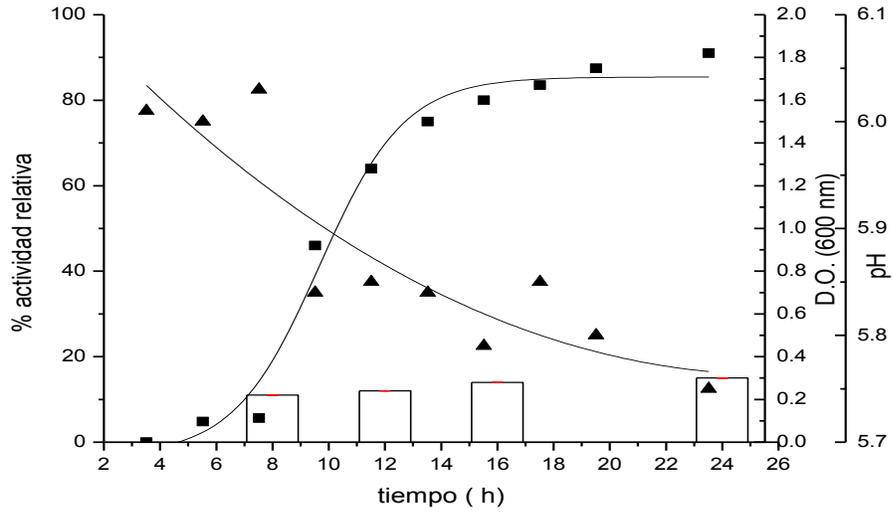


Figura 10. Actividad proteolítica relativa (%) (barras), contra caseína de diferentes fracciones celulares. D.O.<sub>600 nm</sub> (■) y pH (▲).

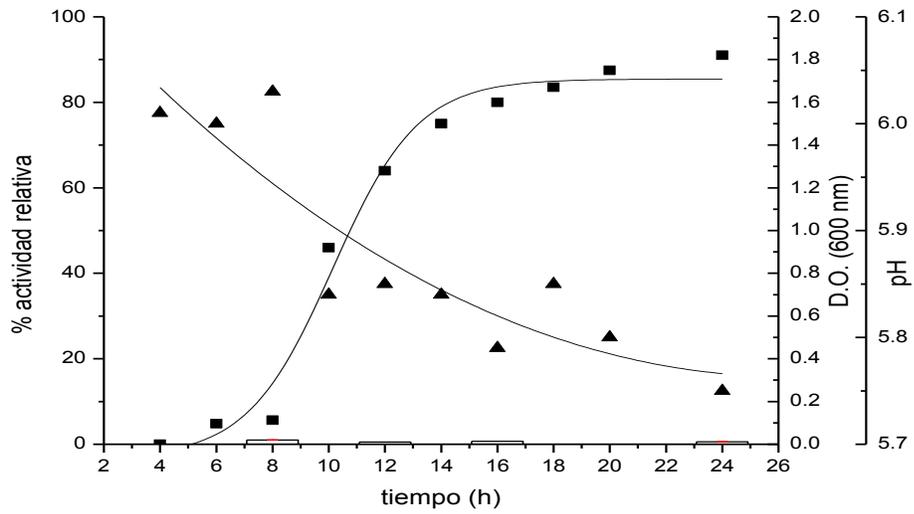
Los resultados se expresan en actividad relativa (los valores absolutos se encuentra en el Anexo A), considerando como 100% la máxima obtenida (sobrenadante, 24h). En todas las fracciones se presenta actividad sobre caseína, aunque es menor en la fracción de proteínas adheridas a membrana. Los resultados coinciden con lo que se aprecia en los geles, en donde se observa un máximo a las 8 h en el sobrenadante, pero no en el hecho de que la actividad evaluada por métodos espectrofotométricos parece mantenerse a lo largo del período de crecimiento en el caso del sobrenadante, lo que también ocurre en la fracción adherida a membrana. En el caso de la fracción citosólica la actividad disminuye claramente después de las 8 h

Actividad elastinolítica

**Sobrenadante**



**Citosol**



## Adheridas a Membrana

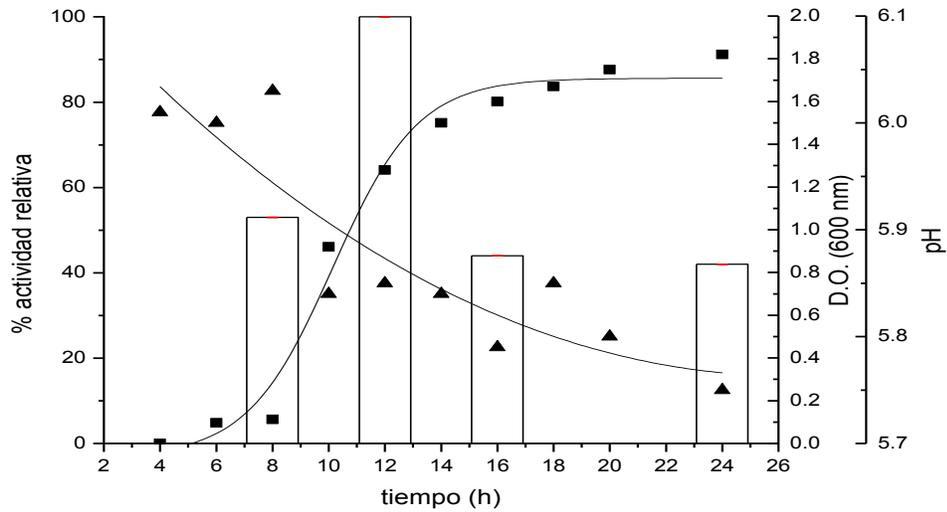
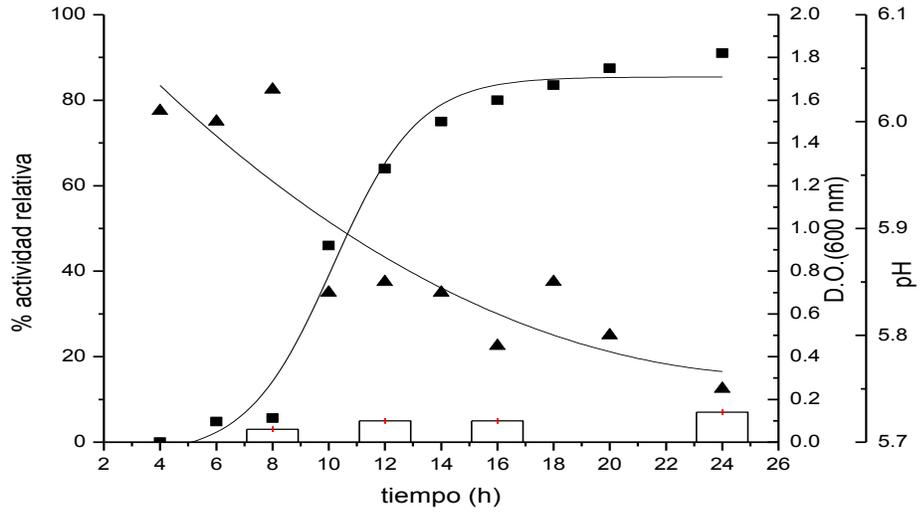


Figura 11. Actividad proteolítica relativa (%) (barras), contra elastina de diferentes fracciones celulares. D.O.<sub>600 nm</sub> (■) y pH (▲).

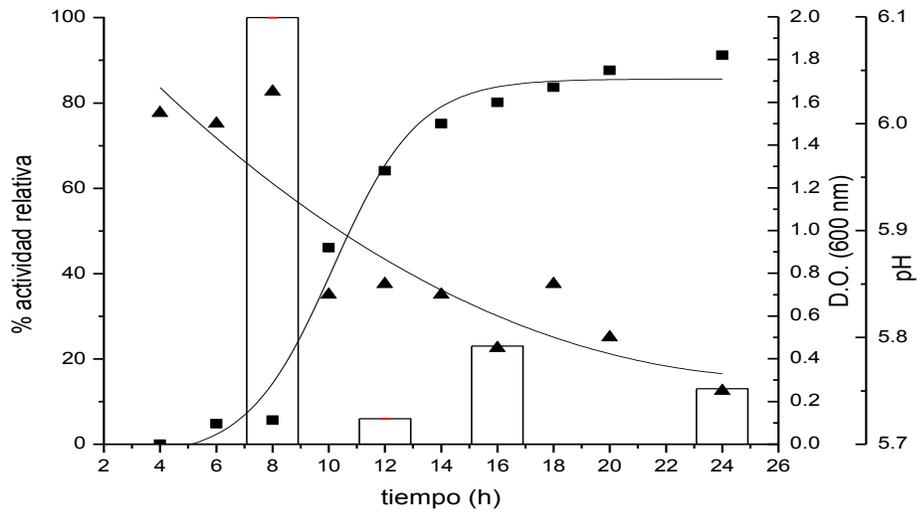
Los resultados se expresan en actividad relativa (los valores absolutos se encuentra en el Anexo A), considerando como 100% la máxima obtenida (adheridas a membrana, 12h). La actividad sobre elastina no está presente en el citosol y es baja en el sobrenadante. En la fracción de proteínas adheridas a membrana se alcanzan los valores máximos a las 12 h.

Actividad colagenolítica

**Sobrenadante**



**Citosol**



**Adheridas a Membrana**

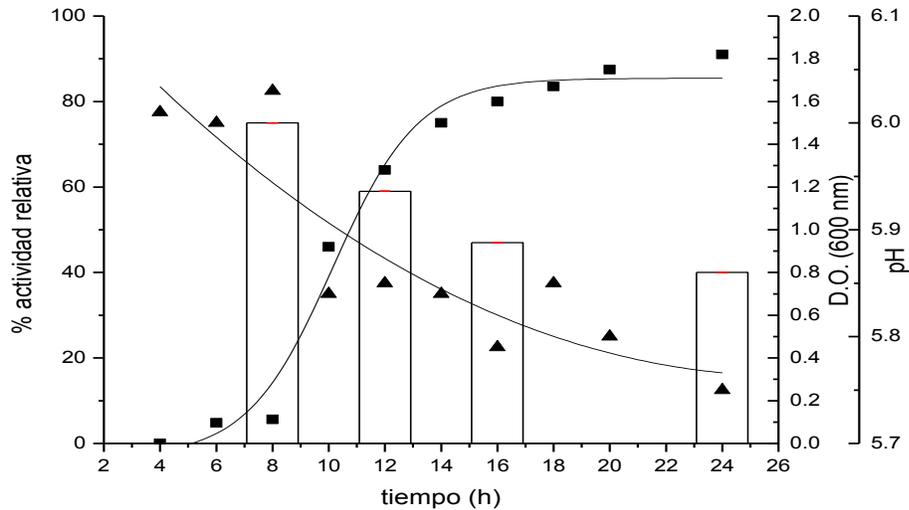
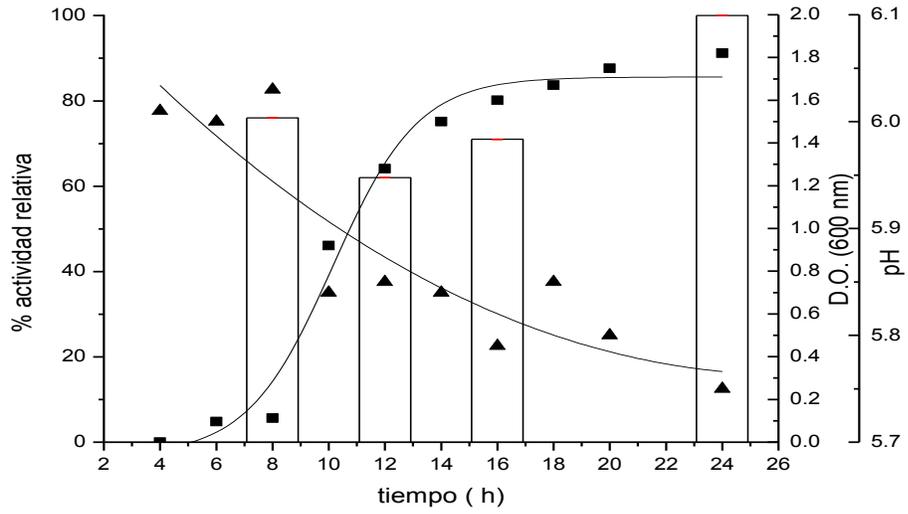


Figura 12. Actividad proteolítica relativa (%) (barras), contra colágeno de diferentes fracciones celulares. D.O.<sub>600 nm</sub> (■) y pH (▲).

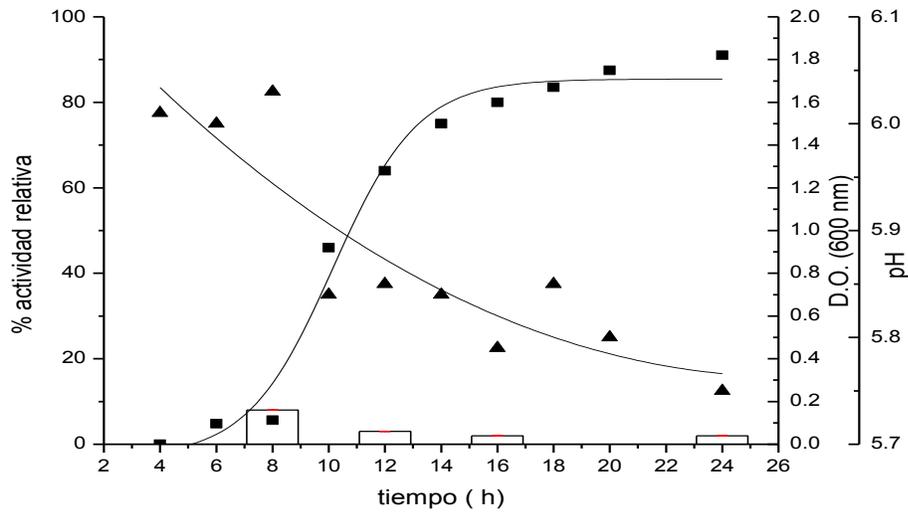
Los resultados se expresan en actividad relativa (los valores absolutos se encuentra en el Anexo A), considerando como 100% la máxima obtenida (citosol, 8h). La actividad sobre colágeno se presenta máxima en la fracción adherida a membrana, es casi nula en el sobrenadante y en el citosol se presenta en las etapas tempranas de crecimiento.

Actividad gelatinolítica

**Sobrenadante**



**Citosol**



## Adheridas a Membrana

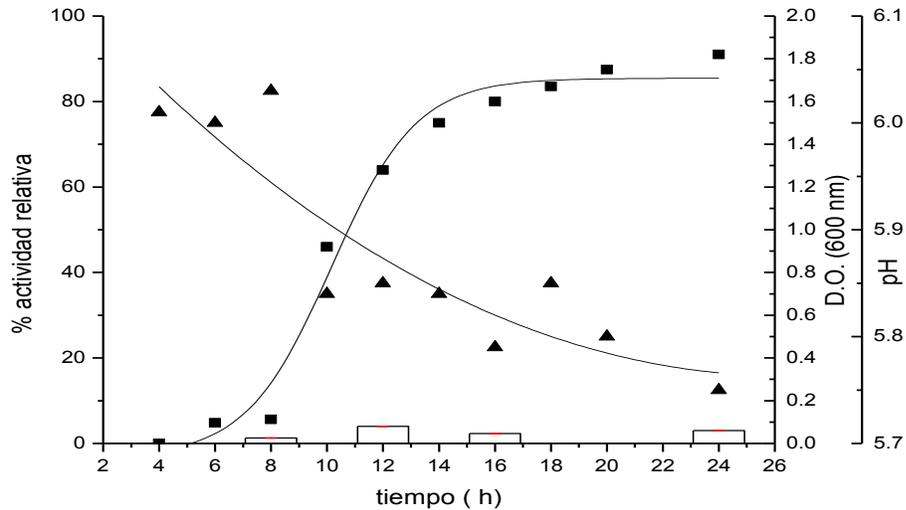


Figura 13. Actividad proteolítica relativa (%) (barras), contra gelatina de diferentes fracciones celulares. D.O.<sub>600 nm</sub> (■) y pH (▲).

Los resultados se expresan en actividad relativa (los valores absolutos se encuentra en el Anexo A), considerando como 100% la máxima obtenida (sobrenadante, 24h). La actividad sobre gelatina es máxima en el sobrenadante y se manifiesta poco en las otras localizaciones celulares. Cabe aclarar que se considera que los zimogramas son mucho más sensibles y sus tiempos de contacto con el sustrato son mayores, por eso no se aprecia tanta diferencia entre las diferentes condiciones evaluadas en los geles como la que hay en el ensayo espectrofotométrico.

Tabla 4. Actividad proteolítica sobre diversos sustratos cuantificada cuatitativamente por métodos espectrofotométricos (se muestran valores absolutos).

	<b>Caseína</b> (U/min*mg prot.total)	<b>Elastina</b> (U/min*mg prot.total)	<b>Colágeno</b> (U/min*mg prot.total)	<b>Gelatina</b> (U/min*mg prot.total)	<b>Tiempo</b> (actividad máxima, h)	<b>Peso</b> <b>Molecular</b> (kDa)
<b>Sobrenadante</b>	4.030	1.072	0.103	76.022	24	200
<b>Citosol</b>	3.949	0.083	1.493	6.375	8	97
<b>Adheridas a Membrana</b>	3.425	7.156	1.114	3.054	12	60 y 116

Se puede observar que la proteasa que se encuentra a los 200 kDa tiene actividad mayoritariamente contra gelatina, lo que coincide con lo observado en los zimogramas. No coinciden los datos de máxima actividad en zimogramas y espectrofotométricos en el tiempo en el que se presenta la máxima actividad. También presenta actividad contra caseína y elastina, aunque en un porcentaje mucho menor. La proteasa que se encuentra en la fracción citosólica tiene un peso molecular de 97 kDa, tiene actividad en mayor porcentaje contra gelatina a las 8h de crecimiento, que se puede observar claramente en los zimogramas, y también presenta actividad contra caseína y colágeno. Para la fracción de proteínas adheridas a membrana se presenta una mayor actividad contra elastina, en un porcentaje mucho mayor que el presentado por las otras fracciones, aunque también posee actividad contra gelatina, colágeno y caseína.

En virtud de que no hay ninguna información sobre proteasas intracelulares producidas por *P. acidilactici*, en la segunda etapa del proyecto se procedió a profundizar en su caracterización.

## 6.2 SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL

### 6.2.1 Purificación parcial de la proteasa de 97 kDa

La caracterización de una enzima requiere su purificación. En este trabajo no se pretendía alcanzar una purificación a homogeneidad, pero si adquirir elementos que permitieran comparar las propiedades de la enzima de 97 kDa con las reportadas para la de 200 kDa y comprender mejor el sistema proteolítico de este microorganismo.

Con el fin de contar con una preparación más pura, una vez obtenida la fracción citosólica por sonicación, se eligió la precipitación con sulfato de amonio como una técnica que permite reducir significativamente el volumen a manejar. Generalmente la precipitación se emplea en los primeros pasos de purificación como un método de concentración de proteínas antes del análisis o etapas subsecuentes de purificación (Prado *et al.*, 1999).

Los métodos más sólidos para el fraccionamiento de proteínas son los que utilizan la cromatografía en columna, que aprovechan las diferencias de carga, tamaño, afinidad de unión y otras propiedades de las proteínas (Nelson y Cox, 2006). Por esta razón se utilizó una columna de filtración en gel que permitió la semipurificación de la proteasa de interés y mantener la actividad proteolítica. Con las técnicas de purificación utilizadas, se logró una semipurificación, ya que hubo una disminución en el número de bandas totales presentes

en el gel SDS PAGE y en las que se encuentran por debajo del peso molecular de la proteasa de 97 kDa (Figura 14).

En el zimograma se aprecia que persiste una sola banda con actividad proteolítica en el peso molecular esperado, aunque hay una reducción en el número de bandas de proteína.

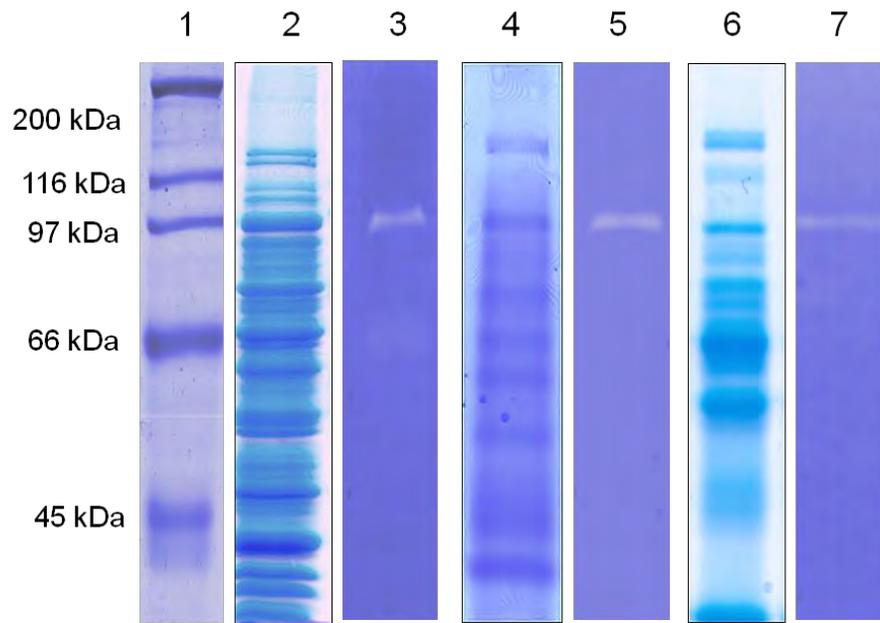


Figura 14. Purificación parcial. SDS-PAGE 10% (1) marcador de peso molecular; carril 2 citosol; carril 4, precipitación con sulfato de amonio al 60%; carril 6, columna filtración en gel; carriles 3,5 y 7 actividad proteolítica en zimogramas con gelatina de cada fracción.

6.2.2 Caracterización bioquímica de la proteasa citosólica de *P. acidilactici*

Como una primera aproximación a la caracterización bioquímica de la enzima, se presenta la realizada con métodos zimográficos.

Determinación del pH óptimo

El efecto del pH sobre la actividad se observa en la Figura 15. La proteasa mostró ser capaz de actuar en un amplio intervalo de pH. De 6 a 9 presentó mayor actividad, pero se puede observar que es activa a pH ácidos por lo cual podría ser utilizada en productos cárnicos, tanto a pH ácidos como alcalinos. Debido a que *P. acidilactici* tiene la capacidad de acidificar el medio, al ser liberada esta proteasa intracelular (fase estacionaria, muerte celular) podría seguir activa gracias a dicha característica.

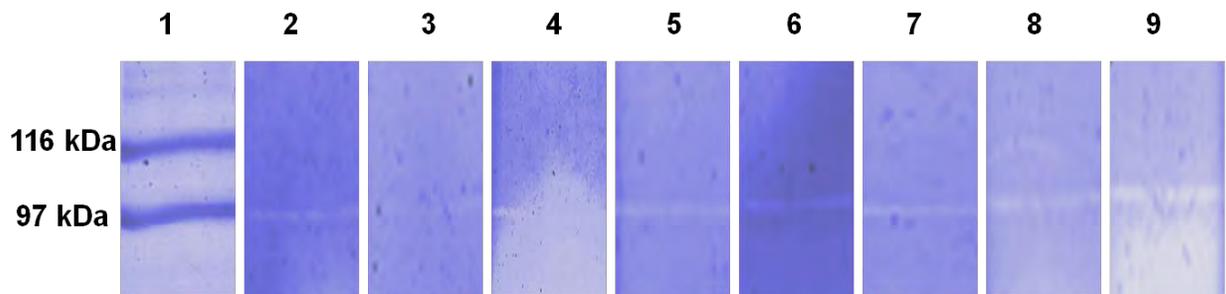


Figura 15. Determinación del pH óptimo de la proteasa de 97 kDa. Zimogramas contra gelatina. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, citosol a pH de trabajo 7.6; carril 3, pH 4; carril 4, pH 5; carril 5, pH 6, carril 7, pH 8; carril 8, pH 9 y carril 9, pH 10.

Determinación de temperatura óptima

Al evaluar la actividad enzimática en un intervalo de temperatura entre 37 y 99°C, se encontró que la enzima permanece activa en un amplio intervalo de temperaturas, en el cual mantiene su actividad hasta por dos horas, desde 37 hasta 60°C. (Figura 16)

Los resultados indican que la temperatura de crecimiento celular (30°C), no es la misma que la óptima para la actividad proteolítica (50°C). El resultado es similar a lo reportado por Gori *et al.* (1985) quien en estudios de proteólisis en bacterias ácido lácticas observa que, en *S. lactis spp. diacetylactis* tiene una temperatura óptima de crecimiento a 45°C, sin embargo, su sistema proteolítico es más activo a 37 °C. En el caso de *L. casei*, éste crece en temperaturas de 30-37°C y su temperatura óptima para hidrólisis de caseína es de 45 °C.

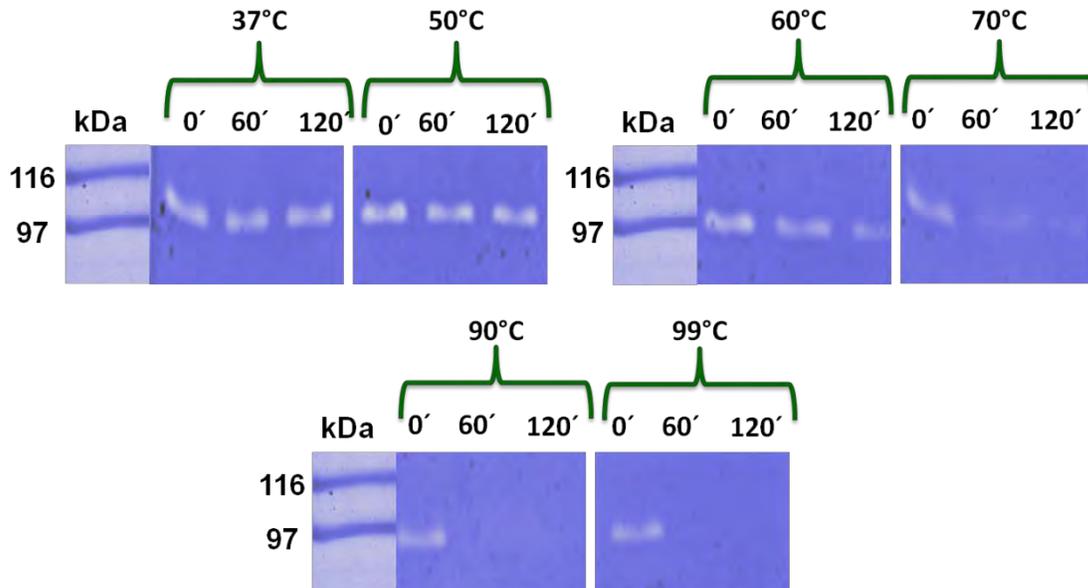


Figura 16. Determinación de la temperatura óptima de la proteasa de 97 kDa. Zimogramas contra gelatina.

Efecto de activadores

Los cationes monovalentes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Li}^+$  incrementan la actividad proteolítica en concentraciones de 2 y 200 mM, pero sobre todo con  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se logró un mayor incremento en la actividad proteolítica de la proteasa citosólica de 97 kDa. En las figuras 17 y 18, se observa una fuerte inhibición con el catión divalente  $\text{Zn}^{2+}$  en ambas concentraciones y también por  $\text{Ca}^{2+}$  en una concentración de 1 mM. La incubación de la proteasa con  $\text{Mg}^{2+}$  no tuvo mucho efecto sobre la misma.

La mayor actividad enzimática se observó cuando se usó una concentración de 200 mM de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  en el buffer de renaturalización, lo que indica que las fuerzas iónicas juegan un papel importante en mantener la estructura enzimática y la actividad. Simitsopoulou *et al.* (1997) reportó que la actividad de la tripeptidasa intracelular producida por *P. pentosaceus* fue estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$  y fuertemente inhibida por  $\beta$ -mercaptoetanol.

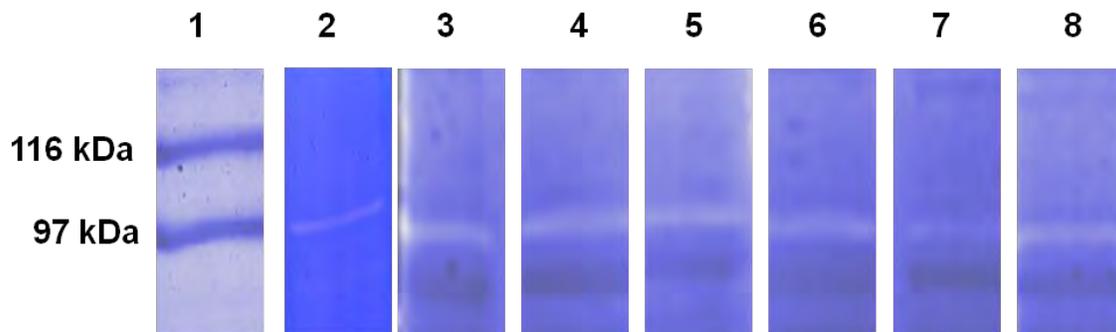


Figura 17. Efecto de sales monovalentes sobre la actividad proteolítica. Zimogramas contra gelatina. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, citosol sin ninguna sal; carril 3, 2 mM de NaCl; carril 4, 200 mM de NaCl, carril 5, 2 mM de KCl; carril 6, 200 mM de KCl; carril 7, 2 mM de LiCl ; carril 8, 200 mM de LiCl.

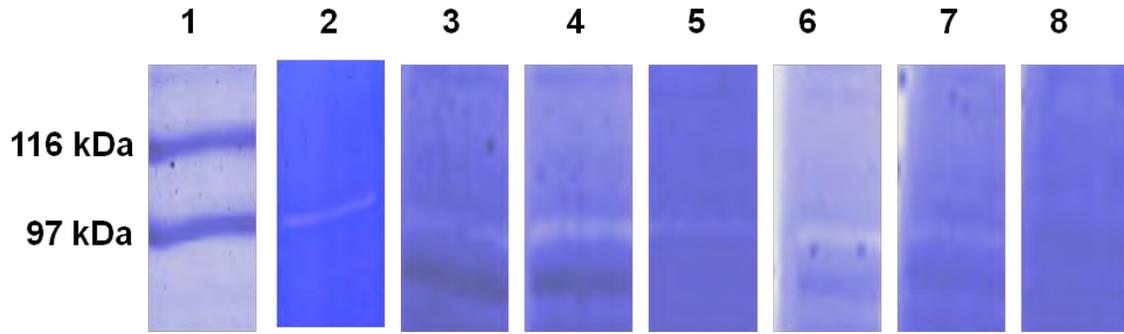


Figura 18. Efecto de sales divalentes sobre la actividad proteolítica. Zimogramas contra gelatina. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 citosol sin ninguna sal; carril 3, 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ ; carril 4 10mM de  $\text{CaCl}_2$ ; carril 5, 1mM de  $\text{MgCl}_2$ ; carril 6, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; carril 7, 1 mM de  $\text{ZnCl}_2$ ; carril 8, 10 mM de  $\text{ZnCl}_2$ .

La confirmación de los resultados anteriores requerirá de métodos cuantitativos.

#### Efecto de inhibidores

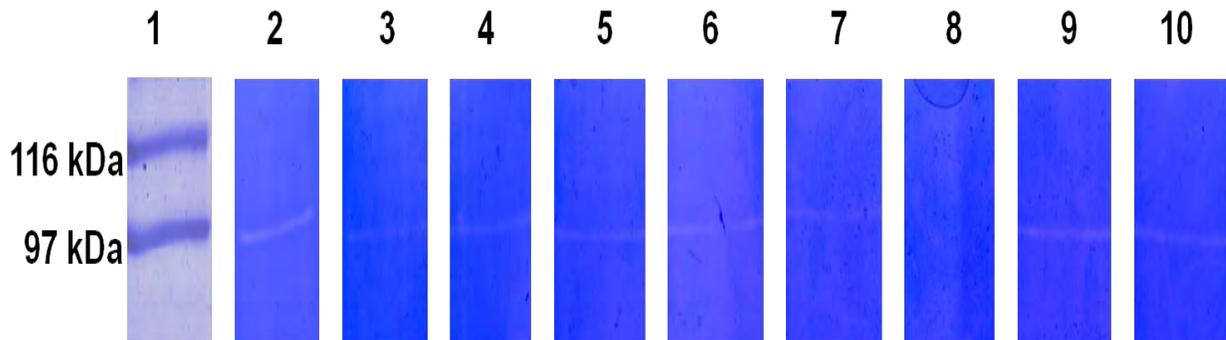


Figura 19. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica. Zimogramas contra gelatina. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, citosol sin inhibidor; carril 3, 1 mM de EDTA; carril 4, 10 mM de EDTA; carril 5, 1 mM de EGTA; carril 6, 10 mM de EGTA; carril 7, 1 mM de PMSF; carril 8, 10 mM de PMSF; carril 9, 1 mM de *o*-fenantrolina y carril 10, 10 mM de *o*-fenantrolina.

-----

Al evaluar diferentes inhibidores para conocer cuál es el tipo de proteasa que se encuentra en la fracción citosólica, se analizaron inhibidores quelantes de iones monovalentes y divalentes, como lo son el EDTA y el EGTA, respectivamente, inhibidores de serin-proteasas y también un inhibidor quelante de hierro. Al evaluar la actividad proteolítica por medio de zimografía se aprecia que ésta es drásticamente inhibida por PMSF a una concentración de 10 mM, lo que sugiere que pertenece a la familia de las serin-proteasas (Figura 19).

---

## VII. CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen al conocimiento del sistema proteolítico de la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042.

Además de verificar la presencia de enzimas extracelulares de alto peso molecular y de dos enzimas adheridas a membrana, se encontró una proteasa que se encuentra a 97 kDa en la fracción citosólica.

La proteasa citosólica se produce durante la fase logarímicamente de crecimiento, con un máximo a las 8 h de crecimiento. Tiene mayor capacidad para hidrolizar la gelatina que las otras proteasas presentes en el microorganismo, aunque también tiene actividad sobre caseína, colágeno y es casi nula sobre elastina. El conjunto de proteasas presente explica la capacidad de crecimiento del microorganismo en productos cárnicos.

Tras llevar a cabo algunos pasos de purificación de la proteasa de 97 kDa, se determinó que entre sus principales características bioquímicas están:

- ❖ presenta mayor actividad a pH alcalinos
- ❖ es estable en un intervalo de temperaturas entre 37 y 60°C.
- ❖ se puede decir que es una serín proteasa pues se inhibe por el PMSF
- ❖ los mejores activadores fueron NaCl, KCl, LiCl, así como CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 10 mM

---

**REFERENCIAS**

- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M, Dufour, E. and Chevallier, I. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*. 22: 373–382.
- Ansorena, D., Astiasarán, I. and Bello, J. (2000). Influence of the simultaneous addition of the protease Flavourzyme and lipase Novozym 677BG on dry fermented sausage compounds extracted by SDS and analyzed by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:2395-2400.
- Bacus, J.N. and Brown, W.L. (1981). Use of microbial cultures: Meat products. *Food Technology*. 36:74-78,83.
- Baragi, V.M., Shaw, B.J., Renkiewicz R.R., Kuipers, P.J., Welgus, H.G., Mathrubutham, M., Cohen, J.R., Rao, S.K. (2000). A versatile assay for gelatinases using succinylated gelatin. *Matrix Biology*. 19:267-273.
- Barrett, A.J. (1994). Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*. 244:1–15.
- Barrett, A.J. (1995). Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. *Methods in Enzymology*. 248:183.

- 
- Benito, M.J., Martin, A., Aranda, E., Pérez- Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., and Córdoba, M.G. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichon and chorizo sausages. *Journal of Food Science*. 72(6):M193-M201.
  - Bergmann, M. and Ross, W. (1936). On proteolytic enzymes. The enzymes of papain and their activation. *Journal of Biological Chemistry*. 114:717-726.
  - Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
  - Cabeza Herrera, E (2005). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Universidad de Pamplona, Colombia.
  - Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50: 131–149.
  - Chang, P.C., Kuo, T.C., Tsugita A., and Lee, Y.H.W. (1990). Extracellular metalloprotease gene of *Streptomyces cacaoi*: structure, nucleotide sequence and characterization of the cloned gene product. *Gene*. 88:87–95.

- 
- Chuan-Mei, Y. (2002). Application potency of engineered G159 mutants on P1 substrate pocket of subtilisin YaB as improved meat tenderizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:6199-6204.
  - Cibik, R. and Chapot-Chartier M.P. (2004). Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Letters in Applied Microbiology*. 38:459-463.
  - Doyle, M.P. (1997). Microbiología de los alimentos - Fundamentos y fronteras. Acribia, Zaragoza (España).pp.643-652.
  - Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M., Oliver, G. and Toldrá, F. (1999a). Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(8): 3540–3546.
  - Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M., Oliver, G., and Toldrá, F. (1999b). Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(2): 578–584.
  - Fadda, S., Oliver, G. and Vignolo, G. (2002). Protein degradation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in sausage model system. *Journal of Food Science*. 67(3):1179-1183.

- 
- Farnworth, E. (2008). Handbook of fermented functional foods. *Functional foods and nutraceutical series*. CRC Press LLC, 2<sup>a</sup> Ed., Boca Raton, Florida, USA. pp. 291-320.
  - Fitzgerald, P., McKeever, B., Van Middlesworth, J., Springer, J., Heimbach, J., Leu, C., Herber, W., Dixon, R. and Darke, P. (1990). Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type I protease and acetyl-pepstatin at 2.0- Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*. 265(24):14209-14219.
  - Granados-Pérez, E. (2009) Caracterización de la actividad proteolítica extracelular de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM
  - Godfrey, T., and West, S. (1996). Industrial enzymology. Macmillan Publishers Inc. 2<sup>a</sup> Ed., New York, N.Y. p.3.
  - Gori, G., Valdez, G., Holgado, A., Oliver, G. (1985). Effect of pH and temperatura on the proteolytic activity of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*. 68:2160-2164.
  - Hagen, B.F., Berdagué, J.L., Holck, A.L., Naes, H. and Blom, H. (1996). Bacterial proteinase reduces maturation time of dry fermented sausages. *Journal of Food Science*. 61(5):1024-1029.
  - Hammes, W.P., and Hertel, C. (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat Science*. 49: S125–S138.

- 
- Hammes, W.P., Bantleon, A., and Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters*. 87:165-173.
  - Heusen, C. and Dowdle, E. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*. 102:196-202.
  - Hierro, E., De la Hoz, L. and Ordoñez, J.A. (1999). Contribution of the microbial and meat endogenous enzymes to the free amino acid and amine contents of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:1156-1161.
  - Hugas, M. and Monfort, J.M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*. 59: 547–554.
  - Hui, Y.H., Guerrero I. y Rosmini M. (2006). Ciencia y Tecnología de Carnes. Limusa. México, D.F. p.p 521-562.
  - Ikram, H. and Hamid, M. (2006). Protease biosynthesis from *Lactobacillus* species: fermentation parameters and kinetic. *Journal of Food Processing Preservation* 31:102-115.

- 
- Johansson, G., Berdagué, J.L., Larsson, M., Tran, N. and Borch, E. (1994). Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Science* 38:203-218.
  - Kamini, C., Hemachander, J. and Puvanakrishnan, R. (1999). Microbial enzyme technology as an alternative to conventional chemicals in leather industry. *Current Science*. 77:80-87.
  - Kato T., Yamagata, Arai, T. and Ichishima, E. (1992). Purification of a new extracellular 90 kDa serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from *Bacillus subtilis* and elucidation of its distinct mode of action. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 56:1166-1168.
  - Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W., Rosenbloom, J. and Ohman, D. (1997). Inhibitors and Specificity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 272:9884-9889.
  - Kumar, C and Tagaki, G. (1999). Microbial alkaline proteases: from by bioindustrial view point. *Biotechnology Advances*. 17:561-594.
  - Kunitz, M. (1974). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *Journal of General Physiology*. 30:291-310.

- 
- Kunji, E., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. and Konings, W. (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70:187-221.
  - Labbe, J.P., Rebegrotte P. and Turpine, M. (1974). Demonstrating extracellular leucine aminopeptidase (EC 3.4.1.1) of *Aspergillus oryzae* (IP 410): leucine aminopeptidase 2 fraction. *C. R. Academy of Science*. (Paris) 278D: 2699.
  - Lantz, M.S. and Ciborowski, P. (1994). Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. In: *Methods in enzymology. Bacterial pathogenesis. Part A. Identification and regulation of virulence factors*. Edited by V.L. Clark and P.M. Bavoil. Academic Press Inc., New York. pp. 563-594.
  - Larpent, J.P. (1995). Parte III: La fermentación de los productos animales. Capítulo 4: Productos cárnicos fermentados. En *ICMSF, Microbiología Alimentaria Vol. 2., Las fermentaciones alimentarias*. Acribia, Zaragoza. España. p.p 271-279.
  - Law, B.A. and Kolstad, J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49:225-245.
  - Law, B.A. and Mulholland, F. (1995). Enzymology of Lactococci in relation to flavor development from milk proteins. *International Dairy Journal*. 5:833-845.

- 
- Leroy, F. and De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacterial as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 67-78.
  - Llorente B.A. (1998). Evaluación de la producción de bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici* ATCC8042 bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Maestría en Microbiología, FESC, UNAM. pp.33, 89.
  - Llorente, B.A., Pérez Munguía, S. and Farrés, A. (2008). A Novel Extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Canadian Journal of Microbiology*. 54, 604-609.
  - Lodemel, J.B. and Olsen, R.L. (2003). Gelatinolytic activities in muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*), spotted wolffish (*Anarhichas minor*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83:1031-1036.
  - Lücke, F. K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*. 56: 105–115.
  - Lyhs, U. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki.
  - Lyons, T. (1988). Proteinases in industry. *Critical Reviews in Biotechnology*. 8:99-110.

- 
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 15611-15616.
  - Matsumoto, K. and Yamamoto, T. (1984). In: *Microbiology of Fermented Foods Vol.II*. BJB Wood. London, pp.41-83.
  - Mc Kay, L.L. and Baldwin, K.A. (1990) Application for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 87: 3-14.
  - Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. and Geenen, I. (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavor generation in dry fermented sausages. *Food Chemistry*. 59:539-545.
  - Montel, M., Seronie, M., Talon, R. and Hebraud, M. (1995). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus sake*. *Applied and Environmental Microbiology* 61:837-839.
  - Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2006). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Omega, Barcelona, España. p.p 89-96.
  - Oberman, H. and Libudzisz, Z. (1998). Fermented milks. In B. J. B. Wood, *Microbiology of fermented foods*, Vol. 1. London: Blackie Academic and Professional. pp. 308–350.

- 
- Ordóñez, J., Hierro, E., Bruna, J. and de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 39:329-367.
  - Perea, E., Ugalde, U. and Rodríguez, I. (1993). Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: application in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme and Microbial Technology*. 15:418-423.
  - Prado Barragán, L.A., Huerta Ochoa, S., Rodríguez Serrano, G. y Saucedo Castañeda, G. (1999). Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. UAM Iztapalapa, México, p.p 89-100.
  - Pritchard, G.C. and Coolbear, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology. Reviews*. 12:179-206.
  - Rao, M., Tanksale A., Ghatge, M. and Deshpande, V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:597-635.
  - Rawlings, N.D. and Barret, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*. 290: 205-218.

- 
- Riderknecht, R., Geokas, M., Silverman, P. and Haverback, B. (1968). A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clinica Chimica Acta*. 21:197-203.
  - Rizzi, G.P. (1988). Formation of pyrazines from acroleine precursors under mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36:349-352.
  - Salminen S., Von Wright A. and Ouwehand A. (2004). Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3d Ed., Marcel Dekker. U.S.A. pp.5-24,375-387.
  - Sánchez-Porro, C. (2005). Caracterización bioquímica y molecular de la haloproteasa CP1 producida por *Pseudoalteromonas ruthenica*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla, España.
  - Sanz, Y., Mulholland, F. and Toldrá, F. (1998). Purification and characterization of a tripeptidase from *Lactobacillus sake*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:349-353.
  - Savijoki, K. and Ingmer, H. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 394-406.

- 
- Schmidt B. F., Woodhouse L., Adams, R.M., Ward, T., Mainzer, S.E., and Lad, P.J. (1995). Alkalophilic *Bacillus sp.* strain LG12 has a series of serine protease genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:4490–4493.
  - Schnaitman, C. (1971). Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *Journal of Bacteriology*. 81:545-552.
  - Smitsopoulou, M., Vafopoulou, A., Choli-Papadopoulou, T. and Alichanidis, E. (1997). Purification and partial characterization of a tripeptidase from *Pediococcus pentosaceus* K9.2. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:4872-4876.
  - Sumantha, A., Larroche, C. and Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of Food Grade Proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology*. 44:211-220.
  - Supuran, C., Scozzatava, A. and Clare, B. (2002). Bacterial protease inhibitors. *Medical Care Research and Review*. 22:329-372.
  - Talon, R., Leroy-Sétrin, S. and Fadda, S. (2002). Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In Toldrá, F. Reserchers advances in the quality of meat and meat products. Research Signpost, Kerela, India. p.p 175-191.

- Toldrá, F. and Verplaetse, A. (1995). Endogenous enzyme activity and quality for raw product processing. In: *Composition of Meat in Relation to Processing, Nutritional and Sensory Quality*. ECCEAMST, Utrecht, The Netherlands. p.p. 41-55.
- Watson, R.R. (1976). Substrate specificities of aminopeptidases: a specific method for microbial differentiation. *Methods in Microbiology*. 9:1–14.
- Zeuthen, P. (2007) A historical perspective of meat fermentation in meat fermentations. In Toldrá, F. (Ed.) (2007). *Handbook of fermented meat and poultry*. USA. Blackweell publishing, pp. 3-15.

**ANEXO A.** Valores absolutos de actividad espectrofotométrica sobre diversos sustratos.

<b>Sustrato</b>	<b>Caseína</b>			
<b>Fracción celular</b>	8 h (U/min*mg prot.total)	12 h (U/min*mg prot.total)	16 h (U/min*mg prot.total)	24 h (U/min*mg prot.total)
<b>Sobrenadante</b>	3.396	3.609	3.740	4.030
<b>Citosol</b>	3.949	1.814	0.967	0.846
<b>Adheridas a membrana</b>	3.143	3.425	3.224	2.700

<b>Sustrato</b>	<b>Elastina</b>			
<b>Fracción celular</b>	8 h (U/min*mg prot.total)	12 h (U/min*mg prot.total)	16 h (U/min*mg prot.total)	24 h (U/min*mg prot.total)
<b>Sobrenadante</b>	0.753	0.836	0.983	1.072
<b>Citosol</b>	0.083	0.037	0.050	0.041
<b>Adheridas a membrana</b>	3.825	7.156	3.158	2.991

Sustrato	Colágeno			
	8 h (U/min*mg prot.total)	12 h (U/min*mg prot.total)	16 h (U/min*mg prot.total)	24 h (U/min*mg prot.total)
<b>Sobrenadante</b>	0.037	0.074	0.079	0.103
<b>Citosol</b>	1.494	0.083	0.338	0.198
<b>Adheridas a membrana</b>	1.114	0.881	0.727	0.887

Sustrato	Gelatina			
	8 h (U/min*mg prot.total)	12 h (U/min*mg prot.total)	16 h (U/min*mg prot.total)	24 h (U/min*mg prot.total)
<b>Sobrenadante</b>	57.412	47.486	53.600	76.022
<b>Citosol</b>	6.376	1.841	1.138	1.605
<b>Adheridas a membrana</b>	1.004	3.055	1.785	2.221