



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS: ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA INTRACELULAR DE
***Pediococcus acidilactici* ATCC 8042**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

STEFANIA VENDRAMIN ALEGRE

MÉXICO, D.F.

2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María Mercedes Palao Rincón

VOCAL: Profesor: Rosario Adelaida Muñoz Clares

SECRETARIO: Profesor: Amelia María de Guadalupe Farrés González-Saravia

1er. SUPLENTE: Profesor: María del Pilar Granada Macías

2° SUPLENTE: Profesor: Norma Angélica Camacho De la Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 312, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO "E", FACULTAD DE QUÍMICA, CIRCUITO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. AMELIA MA. DE GUADALUPE
FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.A. ISRAEL GARCÍA CANO

SUSTENTANTE:

STEFANIA VENDRAMIN ALEGRE

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Productos fermentados.....	2
1.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	3
1.3 Las BAL y su importancia en productos fermentados	6
1.4 Actividad proteolítica en bacterias ácido lácticas.....	8
1.5 El género <i>Pediococcus</i>	9
1.6 El género <i>Pediococcus</i> en productos cárnicos fermentados.....	11
1.7 Proteasas.....	12
1.8 Clasificación de las proteasas	15
1.9 El sistema proteolítico en bacterias ácido lácticas.....	22
II. ANTECEDENTES	25
iii. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo general.....	29
3.2 Objetivos particulares	29
IV. METODOLOGÍA	30
4.1 Primera fase experimental. Localización de la actividad proteolítica.....	30
4.1.1 Material biológico	31
4.1.2 Medio de cultivo y condiciones de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042:.....	31
4.1.3 Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 y obtención de células	32
4.1.4 Localización de la enzima con actividad proteolítica en <i>P. acidilactici</i>	33
ATCC 8042.....	33
4.1.5 Cuantificación de proteína.....	34
4.1.6 Determinación del perfil electroforético y de la actividad proteolítica por zimogramas.....	35
4.2 Segunda fase experimental: Actividad proteolítica sobre diferentes sustratos y caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de interés	37

4.2.1	Especificidad por sustrato: actividad espectrofotométrica	38
4.2.2	Caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de interés..	40
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1	Primera fase experimental: selección de la proteasa a estudiar	43
5.1.1	Cinética de crecimiento de P. acidilactici ATCC 8042	43
5.1.2	Perfil electroforético y actividad proteolítica por zimogramas	44
5.2	Segunda fase experimental: Actividad proteolítica sobre diferentes sustratos y caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de interés	50
5.2.1	Determinación de la actividad proteolítica sobre diferentes sustratos	50
5.2.2	Caracterización bioquímica de la proteasa citosólica de P. acidilactici	53
VI.	CONCLUSIONES	62
VII.	REFERENCIAS.....	63

RESUMEN

La fermentación es una de las tecnologías de preservación de alimentos más antigua. En este proceso las bacterias ácido lácticas (BAL) desempeñan un papel sumamente importante ya que imparten sabor, modifican la textura, participan en el proceso de maduración y conservan el alimento gracias a diferentes capacidades metabólicas, en especial gracias a las actividades enzimáticas de proteasas y lipasas. Uno de los cultivos iniciadores más utilizados en productos cárnicos fermentados es *Pediococcus acidilactici*. Su sistema proteolítico no se conoce aún en su totalidad pero se puede relacionar al ya descubierto para *Lactococcus lactis*. Por lo tanto, este proyecto plantea avanzar en el conocimiento de las enzimas que forman parte del sistema proteolítico de *Pediococcus acidilactici*, su localización y sus características bioquímicas. En el grupo de trabajo se reportó anteriormente que esta especie tiene proteínas con actividad proteolítica extracelular con una masa molecular de 200 kDa y 116 kDa (Llorente *et al.*, 2008), una intracelular de 97 kDa (Casales-Cabrera, 2012) y otras tres posibles proteasas: dos proteasas adheridas a membrana con una masa molecular de 80 kDa (Granados-Pérez, 2009), otra superior a 66 kDa (Casales-Cabrera, 2012) y otra encontrada en células enteras recientemente por Contreras-Cruz (2013) cuya masa molecular es de 120 kDa aproximadamente. Inicialmente se determinaron las condiciones y metodología que permitieran obtener consistentemente la proteasa de interés para caracterizarla bioquímicamente. La caracterización se realizó en función de pH, temperatura, activadores e inhibidores o agentes quelantes. Se buscó también determinar su especificidad por diferentes sustratos. Las condiciones más favorables para el crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC8042 y la producción de la proteasa intracelular de 120 kDa fueron mediante el uso del medio TSB (Caldo Soya Tripticaseína) sin agitación incubando a 29 °C durante 16 h. La proteasa tiene actividad sobre colágeno y caseína y es estable a intervalos amplios de temperatura y de pH, presentando actividad proteolítica desde 37 a 60 °C y en un rango de pH de 7 a 10. Su actividad se incrementa en presencia de CaCl₂ a una concentración 10 mM y se puede considerar como una serin proteasa debido a que es inhibida por PMSF 1 y 10 mM.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Productos fermentados

La integración del conocimiento tradicional ha transformado al arte gastronómico en ciencia durante toda la historia de la humanidad mediante la búsqueda constante de técnicas para preservar los alimentos; estas técnicas dependían de la disponibilidad de ingredientes, necesidades especiales, religión o etnicidad. La evolución de la tecnología antimicrobiana, que va desde la fermentación hasta la pasteurización, comenzó con la elaboración del vino y del queso y se extendió hasta revolucionar la medicina. La fermentación alcohólica de la cebada a la cerveza o de las uvas al vino data de hace 5000 años y además existen más de 1000 tipos diferentes de queso en Europa y Medio Oriente. Los vegetales fermentados también fueron alimentos tradicionales en el Este de Asia por miles de años y lo siguen siendo: el *kimchi* en Corea se sirve en cada comida y en Indonesia se consume aún el *tempe* y el *oncom* (Naidu, 2000).

La fermentación es un proceso en el que los alimentos son modificados por la acción de microorganismos o enzimas para obtener un cambio bioquímico deseado. Es un proceso muy complejo que involucra a bacterias ácido lácticas, levaduras y hongos (Law *et al.*, 2011). Los principales objetivos de la fermentación incluyen extender la vida útil del alimento, potenciar las características organolépticas e inhibir la presencia de microorganismos de descomposición y patógenos (Rahman, 2007). Contribuye también a mejorar la textura, la estabilidad del color, previene la oxidación de ácidos grasos insaturados libres y produce compuestos volátiles y no volátiles mediante la degradación de aminoácidos libres (Talon *et al.*, 2002).

De los microorganismos encontrados en alimentos fermentados, los principales son las bacterias ácido lácticas (BAL) (Mandal *et al.*, 2011). Estas tienen muchas aplicaciones y una larga historia en la elaboración de productos fermentados (Leroy y Devuyst, 2004), por lo que a lo largo de los años se han generado diversas ramas de investigación para la manipulación de estas bacterias relacionadas en este tipo de procesos (Savijoki *et al.*, 2006).

1.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL constituyen un grupo de bacterias gram-positivas que están relacionadas por sus características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. En general, son cocos o bacilos no esporulados que generan ácido láctico como producto principal durante la fermentación de carbohidratos. Se reconocen por ser oxidasa, catalasa y bencidina negativas, desprovistas de citocromos, no reducen los nitratos a nitritos, son gelatinasa negativa y no tienen la capacidad de utilizar lactato (Carr *et al.*, 2002).

El grupo de las BAL incluye bacterias que son anaerobias facultativas con un metabolismo fermentativo, varían en cuanto a su temperatura óptima de crecimiento, en la manera en la que fermentan glucosa y los azúcares fermentables que utilizan. Los géneros principales son: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Existen dos vías de fermentación de azúcares en BAL, la primera es glicólisis (Embden-Meyerhod-Parnas) y la segunda vía es la de pentosas fosfato (Axelsson, 2004).

Todas las BAL tienen en común la propiedad de producir ácido láctico a partir de hexosas y obtienen su energía mediante la fosforilación a nivel de sustrato durante la oxidación de carbohidratos. Klyuver y Donker en 1926 clasificaron a las BAL a partir del producto final de la fermentación de la glucosa. Aquéllas que producen ácido láctico como principal o único producto se designan bacterias homofermentativas y son capaces de obtener el doble de energía que el otro grupo a partir de la glicólisis, ya que poseen la enzima aldolasa y la hexosa fosfato isomerasa (*Figura 1*). Una molécula de glucosa es degradada por la vía Embden-Meyerhof para producir dos moléculas de piruvato que dan lugar por medio de la enzima lactato deshidrogenasa a dos moléculas de lactato (Gottschalk, 1985).

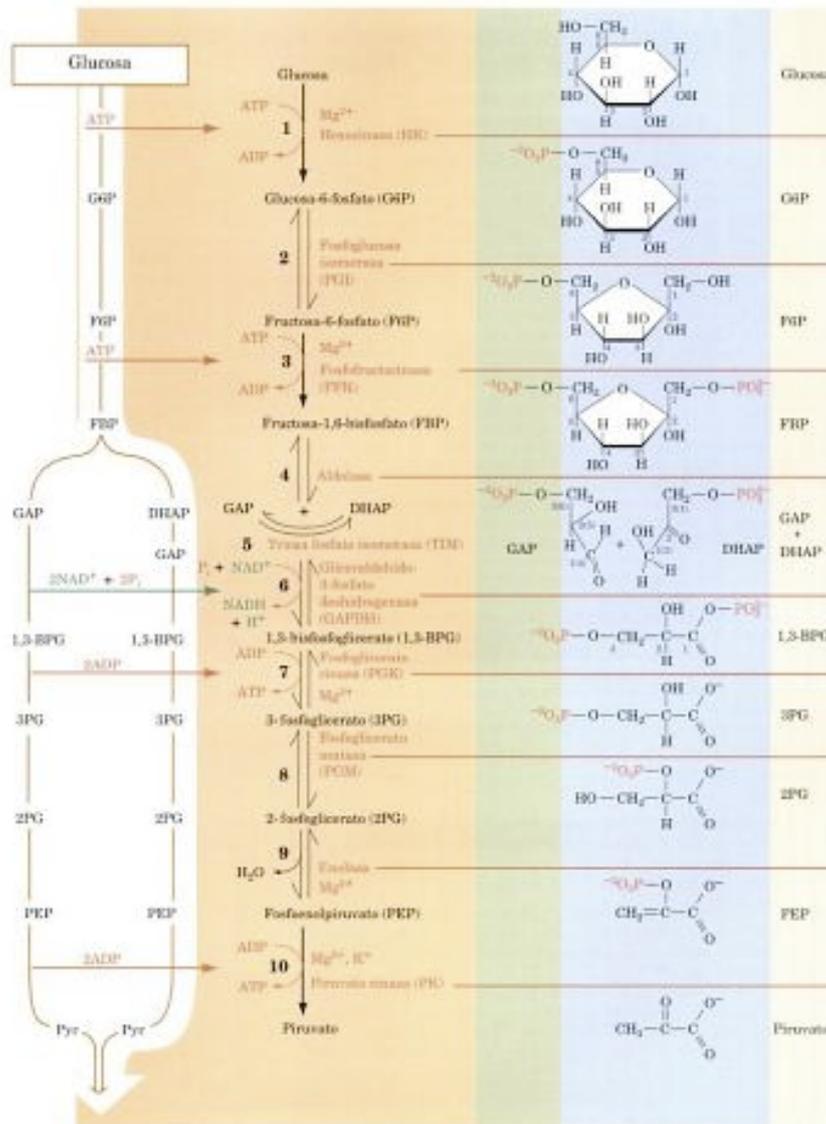


Figura 1. Vía de Embden-Meyerhof. En su primera fase, una molécula de glucosa se convierte en dos moléculas de gliceraldeído-3-fosfato por una serie de reacciones que consumen 2 ATP. En la segunda fase, las dos moléculas de gliceraldeído-3-fosfato se convierten en dos moléculas de piruvato con la generación de 4 ATP y 2 NADH (Tomado de Voet *et al.*, 2007).

Los heterofermentativos, en cambio, siguen la ruta de las pentosas fosfato utilizando la D-xilulosa 5-fosfato fosfoacetolasa para convertir hexosas a pentosas (Figura 2). A partir de glucosa generan, además de ácido láctico, una gran variedad de productos como dióxido de carbono, ácido acético, etanol y compuestos aromáticos deseables y potenciadores de sabores como lo son el acetaldehído y el diacetilo, por lo que estas bacterias son altamente utilizadas en la industria alimenticia.

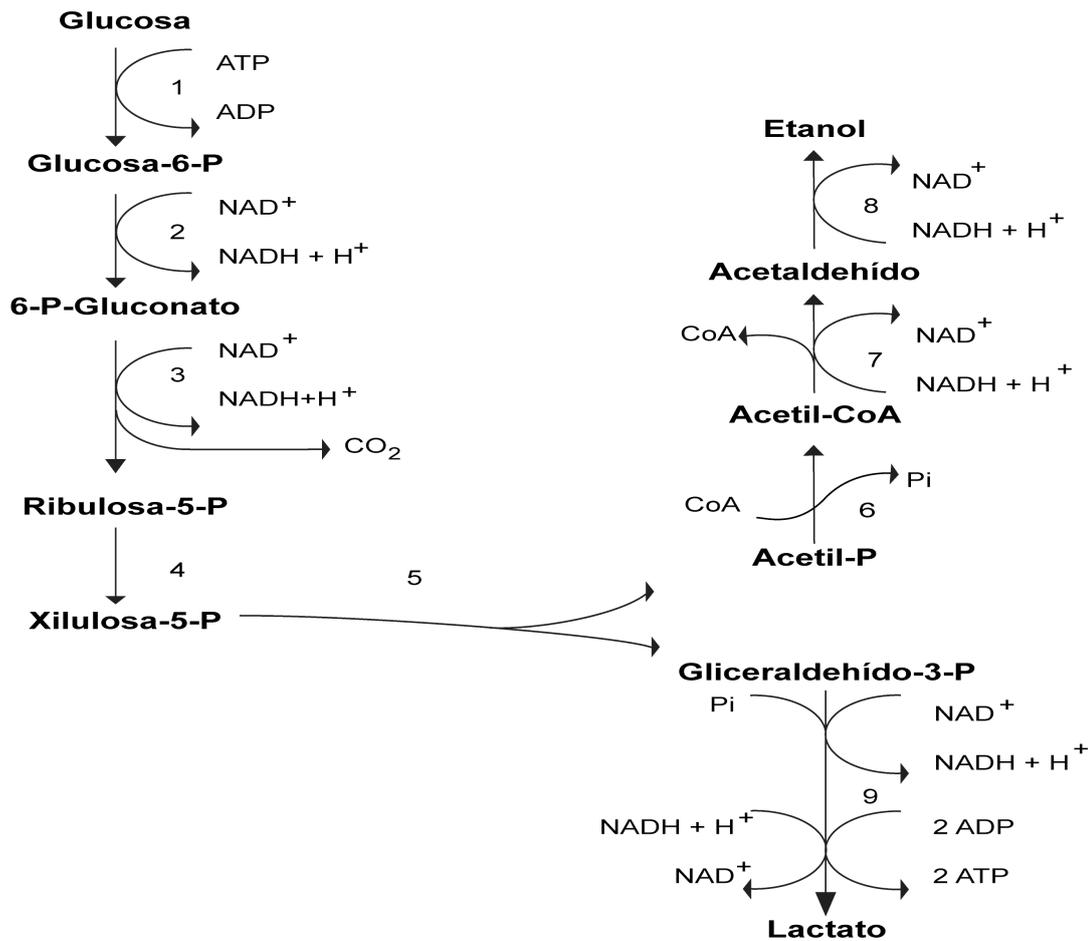


Figura 2. Ruta de las pentosas fosfato, vía heterofermentativa. Formación de CO₂, lactato y etanol a partir de la glucosa. 1, Hexoquinasa; 2, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 3, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; 4, ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa; 5, fosfocetolasa; 6, fosfotransacetilasa; 7, acetaldéhido deshidrogenasa; 8, alcohol deshidrogenasa; 9, enzimas de la ruta homofermentativa (Modificado de Gottschalk, 1985).

Los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* son homofermentadores, en cambio los heterofermentadores incluyen géneros como *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* y *Aerococcus*, el género *Lactobacillus* presenta especies con ambas vías de fermentación (Jay, 2000). En la *Tabla 1*. se pueden observar algunas diferencias entre los géneros de BAL en cuanto a su morfología y la clasificación según su metabolismo.

Tabla 1. Diferenciación de los principales géneros de bacterias ácido lácticas (Tomado de Adams y Robert Nout, 2001).

Género	Bacilo	Coco	Homofermentador	Heterofermentador
<i>Lactobacillus</i>	+		+	+
<i>Lactococcus</i>		+	+	-
<i>Enterococcus</i>		+	+	-
<i>Carnobacterium</i>	+		-	+
<i>Leuconostoc</i>		+	-	+
<i>Weisella</i>		+	-	+
<i>Oenococcus</i>		+	-	+
<i>Pediococcus</i>		+	+	-
<i>Streptococcus</i>		+	+	-
<i>Tetragenococcus</i>		+	+	-

1.3 Las BAL y su importancia en productos fermentados

Desde los inicios del siglo XX se marcó el incremento mundial en la producción de quesos y leches fermentadas. La tecnología comenzó a desarrollarse teniendo como objetivo el incremento de la mecanización, el tamaño de las fábricas y la disminución del tiempo de proceso para la producción a gran escala. Esto se ve reflejado en la gran demanda de cultivos iniciadores y su interés en su actividad, en su calidad estable y en su resistencia a bacteriófagos (Mäyry-Mäkinen y Bigret, 2004).

La producción de alimentos fermentados está basada en el uso de cultivos iniciadores, bacterias ácido lácticas que inician la acidificación rápida de las materias primas (Leroy y Devuyst, 2004). Un cultivo iniciador es un inóculo de microorganismos benéficos que es adicionado a productos cárnicos, lácticos y vegetales para mejorar y asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos. Éstos producen ácido láctico de manera muy acelerada a partir de la fermentación de azúcares (Visessanguan *et al.*, 2004), lo que resulta en la disminución de pH que potencia el sabor y la textura del producto final e inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos (Leistner, 2000).

Las BAL son reconocidas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados así como en la producción de bebidas alcohólicas (Carr *et al.*, 2002). Las BAL han sido utilizadas como probióticos desde la antigüedad. En la actualidad siguen teniendo el mismo uso y aunado a esto se han desarrollado como cultivos iniciadores para llevar a cabo funciones con importancia industrial, éstas están relacionadas con la inocuidad microbiana y con cambios organolépticos, tecnológicos y nutricionales en el alimento. Algunos de estos productos son sustancias antimicrobianas, polímeros de carbohidratos, edulcorantes, compuestos aromáticos, vitaminas o enzimas con una gran variedad de usos (Leroy y Devuyt, 2004). Debido a su capacidad para otorgar al consumidor beneficios a la salud y para preservar los alimentos, las BAL formaron parte importante de la microbiología desde sus inicios (Axelsson, 2004).

Las sustancias antimicrobianas que son producidas durante la fermentación son compuestos bacteriocidas o bacteriostáticos como, por ejemplo, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Mandal *et al.*, 2011). La resistencia desarrollada por parte de los patógenos a antimicrobianos sintéticos ha llamado la atención de consumidores, tecnólogos y científicos relacionados con los alimentos (Naidu, 2000), por lo que los consumidores en el presente demandan alimentos que tengan la mínima cantidad de conservadores y aditivos; de esta manera la bioconservación mediante la fermentación es una excelente solución para extender la vida útil del alimento y para asegurar su inocuidad. Además de otorgarle propiedades organolépticas al producto, desarrolla nutrientes y le da mayor digestibilidad (Norma y Hotchkiss, 1998). Algunos de los microorganismos asociados con productos cárnicos han presentado actividad antagónica hacia patógenos y bacterias de descomposición. Las BAL se encuentran como las mejores candidatas para usarse en bioconservación debido a su prevalencia durante el almacenamiento y a su estatus GRAS (Generally recognized as safe) (Fadda *et al.*, 2010).

1.4 Actividad proteolítica en bacterias ácido lácticas

Las especies que se utilizan como cultivos iniciadores son demandantes de nutrientes. Esto quiere decir que necesitan una gran cantidad de aminoácidos y diversos factores de crecimiento para un desarrollo adecuado. Para obtener estos nutrientes necesarios poseen un sistema proteolítico que, al incluir proteasas y peptidasas, hace uso de proteínas dentro del medio en el que se encuentren para poder crecer. Estas proteínas proporcionan los péptidos y aminoácidos libres que son transportados a través de la membrana celular por sistemas de transporte específico y que son posteriormente hidrolizados por proteasas citoplásmicas (Mäyra-Mäkinen y Bigret, 2004).

En las bacterias existen varios procesos celulares que involucran la degradación proteolítica. Algunos de éstos son la maduración de proteínas, el equilibrio entre síntesis e hidrólisis de proteínas, el procesamiento del péptido señal, la regulación de la expresión genética y la nutrición. El papel del sistema proteolítico en bacterias ácido lácticas está bien establecido; éste está integrado principalmente por proteasas integrales de membrana, sistemas de transporte de péptidos y un gran número de proteasas intracelulares (Sanz y Toldrá, 2002).

El único sistema proteolítico completamente elucidado dentro del grupo de las BAL es el de *Lactococcus lactis*, el cual explica la utilización de caseína en productos lácteos durante el proceso de fermentación (Kunji *et al.*, 1996). La actividad proteolítica, además, desempeña un papel tecnológico muy importante debido a la producción de péptidos pequeños y aminoácidos que desarrollan textura, potencian el sabor y son precursores de otros compuestos organolépticos (Sanz *et al.*, 1999). El modelo del sistema proteolítico de esta BAL en la producción de quesos se supone similar a aquél involucrado en la fermentación y maduración de productos cárnicos fermentados como las salchichas fermentadas; por lo que estudios de enzimas bacterianas presentes en estos procesos han sido y están siendo desarrollados (Savijoki *et al.*, 2006).

Las propiedades organolépticas en salchichas curadas fermentadas son el resultado de un equilibrio adecuado entre compuestos volátiles y no volátiles

que provienen de materia prima como carne, especias, nitritos y aditivos, o que son generados a partir de reacciones bioquímicas durante la fermentación y maduración. Los compuestos volátiles incluyen alcoholes, cetonas, aldehídos y furanos. Los no volátiles incluyen aminoácidos, péptidos, azúcares y nucleótidos que proveen al producto con sabores básicos como el dulce, salado, amargo y ácido (Toldrá, 1998).

La proteólisis en salchichas puede ser realizada por enzimas endógenas del tejido cárnico o por enzimas provenientes del cultivo iniciador. Las proteínas de la carne se hidrolizan primero por enzimas endógenas del músculo, como las catepsinas o calpaínas, a polipéptidos y posteriormente a péptidos más pequeños por la acción de peptidasas. La etapa final es la generación de aminoácidos libres a partir de péptidos por la acción de aminopeptidasas (Casaburi *et al.*, 2008). Tres de las BAL utilizadas comúnmente como cultivos iniciadores en alimentos cárnicos fermentados son *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus*, de quienes se sabe tienen una actividad proteolítica considerable (Candogan *et al.*, 2009). Se debe hacer notar que existen estudios que muestran que ciertas BAL presentan actividad sobre gelatina lo que las hace útiles en la producción de cárnicos fermentados (Monteagudo-Mera, 2011).

1.5 El género *Pediococcus*

El género *Pediococcus* incluye a BAL que se encuentran comúnmente en productos cárnicos, lácteos y vegetales fermentados (Barros *et al.*, 2001). Son exclusivamente cocos de 1.0-2.0 μm de diámetro, que realizan una división a lo largo de dos planos de simetría formando así tétradas en condiciones favorables. También se pueden encontrar en pares pero no se observan como células aisladas y no forman cadenas. Son Gram-positivos, no móviles, no esporulados y anaerobios facultativos. Requieren medios de cultivo que contengan fuentes considerables de nitrógeno y carbohidratos, principalmente mono y disacáridos. Durante la fermentación de la glucosa hay producción de ácido pero no de CO_2 , el principal producto es D-L- o L(+)-Lactato. Su

temperatura óptima de crecimiento va de 25 a 40 ° C y no es patógeno para animales o plantas (Holt *et al.*, 1999).

Los pediococos son importantes en tecnología de alimentos por varias razones. *P. damnosus* por ejemplo es un microorganismo que produce diacetilo y acetoína durante la elaboración de la cerveza, productos que le otorgan un sabor desagradable. Por otro lado *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* son utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración de salchichas y como organismos secundarios durante la maduración de quesos. Para diferenciar entre especies dentro de este género se observan los azúcares que fermenta cada una, la hidrólisis de arginina que posee, el crecimiento que tienen a pHs diferentes (de 7.0 a 4.5) y la configuración del ácido láctico que producen (Axelsson, 2004).

Las especies que pertenecen al género son 12: *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus argentanicus*, *Pediococcus cellicola*, *Pediococcus clausenii*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus ethanolidurans*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus lolii*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus siamensis* y *Pediococcus stilesii* (Holland *et al.*, 2011). *Pediococcus acidilactici* en específico fue la primera bacteria ácido láctica que se desarrolló como cultivo iniciador puro en Estados Unidos (Niven, 1959).

En la *Figura 3* se muestra un árbol filogenético realizado a partir del método Neighbor-joining de secuencias parciales de rADN del gen 16S a partir de secuencias contenidas en GenBank. Se muestra la relación filogenética entre las especies de *Pediococcus spp.* y algunas especies de *Lactobacillus spp.* que muestran que comparten un origen común. Se utilizó el organismo *Bacillus subtilis* como referente externo.

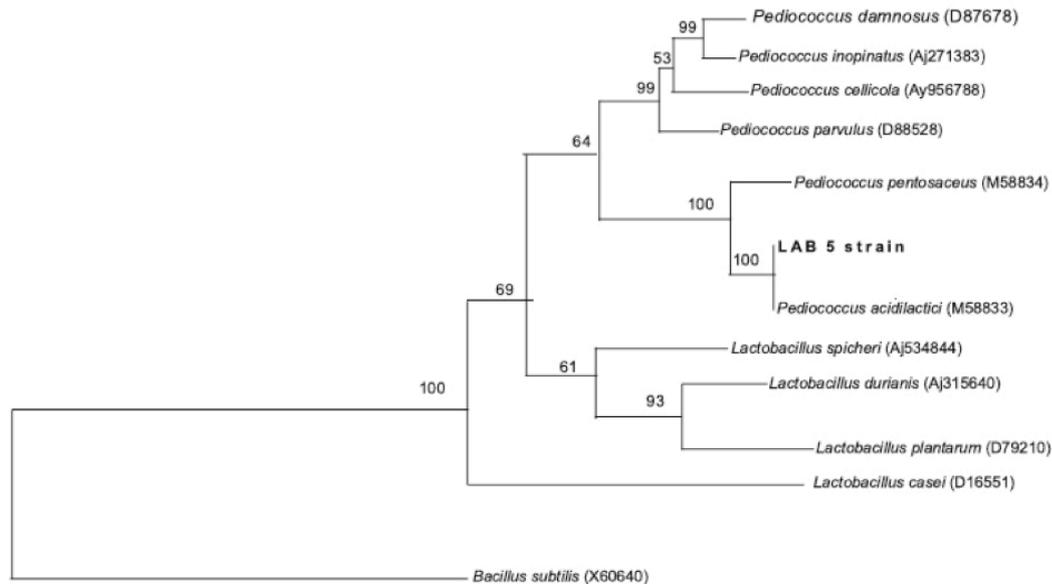


Figura 3. Árbol filogenético que relaciona algunas especies del género *Pediococcus* y *Lactobacillus* por medio de las secuencias del gen 16S. (Tomado de Mandal *et al.*, 2011)

1.6 El género *Pediococcus* en productos cárnicos fermentados

Las BAL más utilizadas como cultivos iniciadores en la fermentación de cárnicos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Estos géneros, siendo homofermentativos, generan ácido láctico como producto principal y disminuyen así los valores de pH del medio. Esto causa la agregación de las proteínas de la carne lo que, junto con la liberación de péptidos a partir de la hidrólisis de proteínas previene la oxidación lipídica y forma ésteres y otros compuestos aromáticos. La interconexión de todas estas actividades y productos le da al alimento además de estabilidad, la textura, color, sabor y olor deseados (Petäjä-Kanninen y Puolanne, 2007; Garriga y Aymerich, 2007).

Bacus and Brown (1981) reportan que antes de que *Pediococcus* fuera el cultivo iniciador predominante en cárnicos, el género *Lactobacillus* era el más utilizado. Al no poder liofilizar las cepas puras de este género de manera satisfactoria en Estados Unidos se encontró que las cepas de *Pediococcus*, principalmente de *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici*,

resisten el proceso de liofilización. Estas especies toleran temperaturas más altas y acidifican rápidamente el medio durante la fermentación. Todas estas características hacen que sean útiles en el proceso de elaboración de salchichas en Estados Unidos, el cual se realiza a temperaturas más altas que en Europa y necesita pHs más bajos para evitar el crecimiento y producción de toxinas por parte de *Staphylococcus aureus*. Además de inhibir el crecimiento de esta bacteria, inhibe también el crecimiento de los géneros *Salmonella* y *Clostridium botulinum*, así como de bacterias entéricas gram-negativas y de levaduras (Zeuthen, 2007; Cocconcelli, 2007).

El género *Pediococcus* garantiza la inocuidad del alimento mediante la disminución del pH del medio y la producción de bacteriocinas, sustancias antimicrobianas, durante tiempo prolongado inhibiendo así el crecimiento de microorganismos no deseables (Petäjä-Kanninen y Puolanne, 2007). Además *Pediococcus pentosaceus* ha sido usado satisfactoriamente como probiótico (Ansorena y Astiasarán, 2007). La importancia de las proteasas en sus funciones tecnológicas permite que sea fundamental avanzar en el estudio del sistema proteolítico de este género.

1.7 Proteasas

Las enzimas son biocatalizadores que llevan a cabo una gran variedad de reacciones químicas. Son explotadas comercialmente en la industria alimenticia, farmacéutica, química, de detergentes y de diagnóstico. De todas las enzimas que existen en la actualidad la mayoría han sido aisladas de organismos mesófilos. Estas enzimas tienen actividad en un intervalo muy restringido de pH, temperatura y fuerza iónica (Kumar y Takagi, 1999). Las enzimas permiten reacciones químicas en organismos vivos en condiciones ambientales normales, pero a muy altas velocidades, no se consumen durante la reacción y en general presentan un elevado grado de especificidad. Todas las células producen enzimas que están involucradas mayoritariamente en reacciones metabólicas (Badui, 2006).

Las proteasas representan el segmento más grande del mercado industrial de enzimas, en donde son utilizadas en la industria de detergentes, de alimentos, de cuero y textil, así como en síntesis orgánica como catalizadores. Éstas constituyen aproximadamente el 60% del mercado total de enzimas, generan 1.5-1.8 mil millones de dólares por año, de los cuales mil millones son producidos por la venta de proteasas alcalinas, las cuales representan el 25% de la distribución total de la venta de enzimas industriales y son dirigidas principalmente a la industria de detergentes. Alrededor de un 65% de las enzimas producidas en el ámbito industrial se relacionan con la industria alimenticia, donde están involucradas principalmente en maceración de cereales y clarificación de cerveza, en la coagulación durante la elaboración del queso, en el cambio de las propiedades viscoelásticas de la masa en panificación, como ablandadoras de carne y en la producción de hidrolizados protéicos. (García-Garibay *et al.*, 2000; Ward, 2011).

Las proteasas microbianas son las que poseen aplicaciones más variadas y son utilizadas en sectores muy diferentes. En la industria del cuero se utilizan para remover pelo, también se emplean como componentes de detergentes comerciales y de líquido para lentes de contacto. En la industria farmacéutica se utilizan para determinar el grupo sanguíneo, para eliminar parásitos gastrointestinales como antihelmínticos o para remover la piel muerta en pacientes con quemaduras graves. En la industria alimenticia son utilizadas para la elaboración de queso, el ablandamiento de carne, la clarificación de cervezas y como potenciador de sabor y olor en quesos. Además, las proteasas son utilizadas como reactivos en el laboratorio para investigación en las áreas de biología, investigación médica y biotecnología (Rawlings *et al.*, 2007).

Para todos estos diferentes usos existe una gran variedad de proteasas que funcionan a intervalos específicos de pH y temperatura y que además necesitan un grado de pureza diferente dependiendo de la industria que la requiera (Prado *et al.*, 1999). Debido a la incapacidad de las proteasas de origen animal o vegetal de satisfacer las necesidades mundiales se utilizan proteasas de origen microbiano. Los microorganismos, al poseer una gran

diversidad bioquímica y debido a su susceptibilidad a la manipulación genética, son la mejor opción para utilizarse como fuente de enzimas (Rao *et al.*, 1998).

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de cadenas polipeptídicas. Aunque se sabe que éstas tienen funciones en procesos bioquímicos y eventos de regulación post-traducciona, la función principal de estas enzimas es mantener el equilibrio entre síntesis y degradación de proteínas, el cual es un proceso importante en los organismos vivos. Las proteínas que han cumplido con su propósito deben de ser degradadas para que los aminoácidos que las constituyen puedan ser reutilizados para la síntesis de nuevas proteínas. Aquéllas que son consumidas en la dieta pueden ser hidrolizadas en péptidos más pequeños y en aminoácidos para su posterior absorción. Por lo tanto el sistema proteolítico es importante en la regulación de ciertas enzimas y de otras proteínas (Berg *et al.*, 2002).

El mecanismo de catálisis ocurre de la siguiente manera (*Figura 4*):

- 1) Formación del complejo de Michaelis entre sustrato y enzima
- 2) Hidrólisis de enlace peptídico liberando péptidos y la enzima

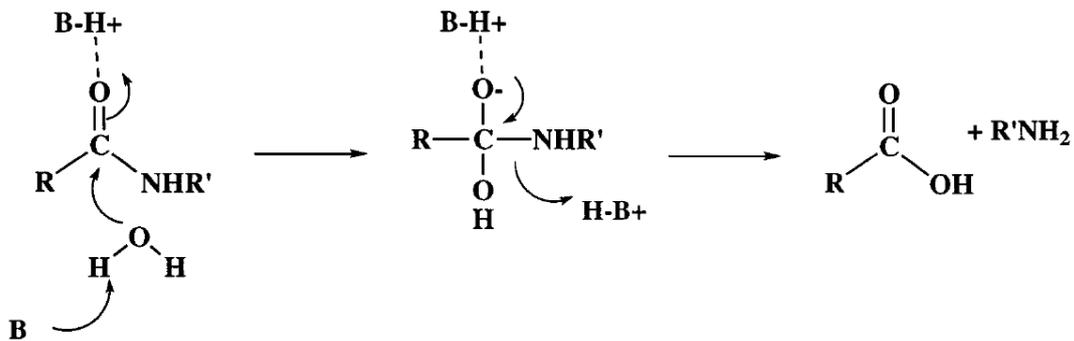


Figura 4. Catálisis de la hidrólisis de péptidos. Activación del carbonilo mediante un ácido general, activación de una molécula de agua mediante una base general y protonación del grupo amina saliente (Tomado de Hedstrom, 2002).

1.8 Clasificación de las proteasas

Las proteasas se clasifican utilizando los siguientes criterios:

- 1) Su origen (animal, vegetal, bacteriano o fúngico)
- 2) La naturaleza de su sitio catalítico
- 3) La acción catalítica que posean

Dependiendo de su acción catalítica, es decir del sitio donde actúan, pueden dividirse en dos grupos fundamentales: exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas realizan la hidrólisis de un solo aminoácido o dipéptido por vez, desde el extremo N terminal (aminopeptidasas) o desde el extremo C terminal (carboxipeptidasas). Las endopeptidasas o proteinasas son utilizadas principalmente en el procesamiento de alimentos. Éstas hidrolizan enlaces polipeptídicos a lo largo de la cadena polipeptídica (*Figura 5*) (Adler-Nissen, 1993).

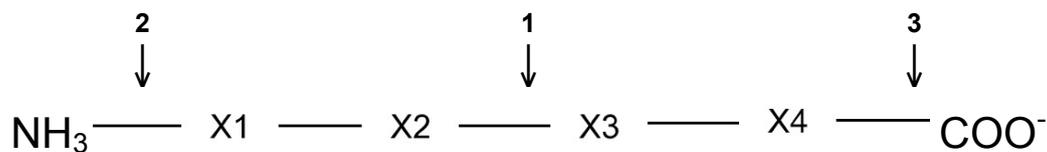


Figura 5. Clasificación de las proteasas. Las exopeptidasas hidrolizan residuos localizados en la posición N-terminal (aminopeptidasas (2)) o la posición C-terminal (carboxipeptidasas (3)) del polipéptido. Las endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos dentro de los polipéptidos (1). (Tomado de Gonzales y Robert-Baudouy, 1996).

a) Exopeptidasas

i. *Aminopeptidasas:*

Catalizan la liberación de un aminoácido en el grupo amino terminal de una proteína o péptido. Las aminopeptidasas son más abundantes en la naturaleza pero menos utilizadas como productos comerciales debido a que la mayoría son intracelulares o se encuentran adheridas a membrana (Adler-Nissen, 1993).

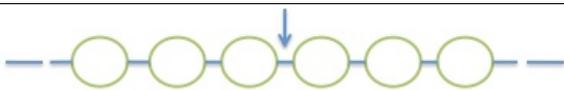
El 97% de las aminopeptidasas se encuentra en fracciones solubles, en el citoplasma (65%), embebidas en la pared celular de bacterias gram-positivas (16%) o en el ambiente externo (16%). Las aminopeptidasas están involucradas en el metabolismo de péptidos exógenos, en el movimiento de proteínas intracelulares y en la eliminación de proteínas anormales (Gonzales y Robert-Baudouy, 1996).

ii. Carboxipeptidasas

Catalizan la liberación de un aminoácido en el grupo carboxilo terminal de una proteína o péptido (Rao *et al.*, 1998). Dependiendo de su sitio catalítico se dividen en serin carboxipeptidasas, metalocarboxipeptidasas y cisteína carboxipeptidasas (Adler-Nissen, 1993).

En la *Tabla 2* se muestra la clasificación de las proteasas a partir de la acción catalítica que posea la enzima. Los círculos vacíos representan los residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica, los círculos rellenos indican los aminoácidos terminales y las flechas indican los sitios de acción de la enzima.

Tabla 2. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS (Tomado de Rao *et al.*, 1998)

PROTEASA	MODO DE ACCIÓN	No. de E.C.
Exopeptidasas		
<i>Aminopeptidasas</i>		3.4.11
• Dipeptidilpeptidasas		3.4.14
• Tripeptidilpeptidasas		3.4.14
<i>Carboxipeptidasas</i>		3.4.16–3.4.18
Endopeptidasas		3.4.21–3.4.34

b) Endopeptidasas

Son enzimas que actúan en la región intermedia de la cadena polipeptídica lejos de los fragmentos de amino libre y carboxilo terminales (Gonzales y Robert-Baudouy, 1996). Debido a su mecanismo catalítico se pueden dividir en cuatro grupos (Rao *et al.*, 1998). El mecanismo de reacción de cada uno de los grupos se presenta en la Figura X y las estructuras y cierta información adicional se presentan en la *Tabla 3*.

Todas las proteasas deben superar tres obstáculos para hidrolizar un enlace peptídico:

- a) Los enlaces amida son muy estables debido a la donación de electrones por parte del nitrógeno de la amida al carbonilo. Las proteasas activan normalmente al enlace amida mediante la interacción del oxígeno del carbonilo con un ácido.
- b) Las moléculas de agua son nucleófilos pobres. Las proteasas activan las moléculas de agua utilizando normalmente una base.
- c) Las aminas son malos grupos salientes. Las proteasas protonan la amina antes de su liberación (Hedstrom, 2002).

i. Serin proteasas:

Son caracterizadas por hidrolizar enlaces peptídicos y ésteres y por poseer una triada catalítica compuesta por serina, ácido aspártico e histidina. El residuo de serina actúa como nucleófilo y se une al intermediario sustrato-enzima, el ácido aspártico actúa como electrófilo y la histidina como la base. Son numerosas entre virus, bacterias y eucariontes, entendiéndose que son vitales para los organismos, las tres más estudiadas son la quimotripsina, la tripsina y la elastasa. Las serin proteasas son activas a un pH de 7 a 11, tienen gran intervalo de especificidad de sustratos incluyendo actividad amidasa y esterolítica, su punto isoeléctrico va de 4 a 6 y el subgrupo más grande de serin proteasas está constituido por las serin alcalin proteasas (Donlon, 2007; Rao *et al.*, 1998).

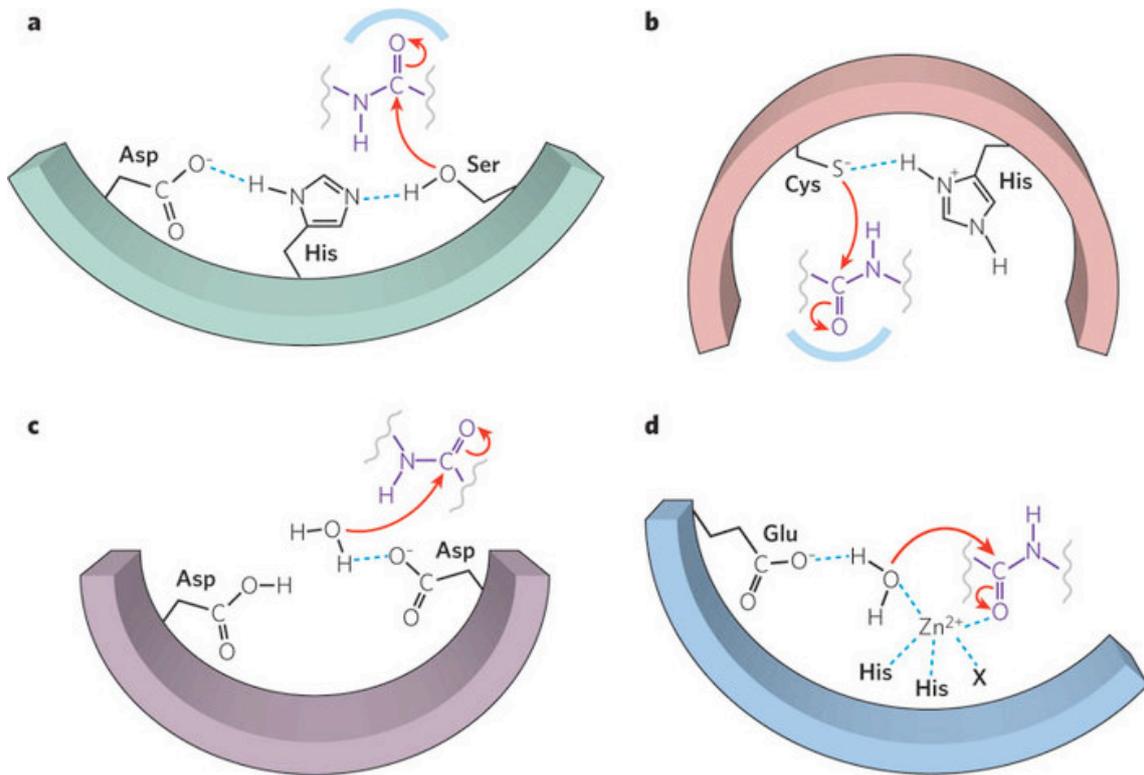


Figura 6. Mecanismo de reacción de los cuatro grupo de proteasas: a) Serin proteasa; b) Cisteín proteasa; c) Aspartil proteasa; d) Metaloproteasa (Tomado de Erez *et al.*, 2009).

La reacción de hidrólisis general llevada a cabo por estas enzimas involucra dos pasos: en el primero se forma un intermediario enzima-péptido que se encuentra covalentemente unido, éste es causado por el ataque nucleofílico de la serina del sitio activo de la enzima hacia el carbonilo del enlace peptídico del sustrato; el segundo es un ataque nucleofílico por parte del agua directamente al intermediario provocando la hidrólisis del péptido. La nucleofilidad de la serina es dependiente de una triada catalítica de residuos de ácido aspártico, histidina y serina (Figura 6a) (Page y Di Cera, 2008).

ii. Aspartil proteasas:

Se encuentran presentes en animales, plantas, hongos y virus. También llamadas proteasas ácidas, dependen de dos residuos de ácido aspártico para tener actividad catalítica. Las proteasas ácidas consisten en 320-360 residuos de aminoácidos con masas moleculares de 32 a 36 kDa. Se han agrupado en 3 familias: pepsina, retropepsina y enzimas de pararetrovirus. La mayoría muestra actividad máxima a pH de 3 a 4 y tienen puntos isoeléctricos de 3 a

4.5. Las proteasas ácidas provenientes de microorganismos exhiben especificidad hacia residuos de aminoácidos aromáticos o de alta masa molecular en ambos lados del enlace peptídico. Éstas se dividen en dos grupos, aquellas enzimas similares a pepsina que son producidas por *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Neurospora*, y enzimas similares a renina producidas por *Endothia* y *Mucor* (Claverie-Martín y Vega-Hernández, 2007; Rao *et al.*, 1998).

El sitio activo de las aspartil proteasas está compuesto por un par de residuos de ácido aspártico, éstos actúan conjuntamente para permitirle a una molécula de agua el ataque al enlace peptídico. Uno de los residuos de ácido aspártico en su forma desprotonada activa a la molécula de agua para su desprotonación mientras que el otro residuo de ácido aspártico en su forma protonada permite que el carboxilo sea atacado (*Figura 6c*) (Polgár, 1987).

iii. Cisteína proteasas:

Se encuentran en procariontes y eucariontes; industrialmente se conocen la papaína, bromelina, ficaína, catepsina animal y la caspasa. En los años recientes han ganado mucho interés por parte de la industria farmacéutica debido a su uso en el tratamiento para osteoporosis, artritis, arteriosclerosis, cáncer y enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Se han reconocido 20 familias dependientes de una pareja catalítica de cisteína e histidina, lo que cambia entre las familias es el orden de los residuos (Cys-His ó His-Cys).

Las cisteína proteasas (E.C.3.4.22) son proteínas con una masa molecular alrededor de 21-30 kDa que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos, amida, éster y tio-éster. Se encuentran activas sólo en presencia de agentes reductores como ácido cianhídrico o cisteína. Basándose en el tipo de aminoácido que forma el enlace peptídico se dividen en cuatro grupos: i) semejante a papaína ii) semejante a tripsina: con preferencia en el residuo de arginina iii) específica para ácido glutámico iv) otras. La papaína es la cisteína proteasa más conocida, tiene pH óptimo de actividad proteolítica cercano a la neutralidad aún cuando algunas de ellas tienen su máxima actividad a pH ácido. Son susceptibles a compuestos sulfhidrilo pero resistentes a agentes

metalo-quelantes. Ejemplos de cisteína proteasas de origen microbiano son Clostripain y Streptopain provenientes de *Clostridium histolyticum* y *Streptococcus* spp. respectivamente (Grzonka *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 1998).

En el sitio activo de la proteasa existe una díada catalítica compuesta por cisteína e histidina. El residuo de cisteína es activado por el residuo de histidina mediante la desprotonación del grupo tiol. Éste actúa como nucleófilo atacando al carbonilo del enlace peptídico del sustrato y liberando el grupo amino. Una molécula de agua ataca al carbonilo formando un segundo intermediario tioéster que por un reacomodo libera al péptido y a la enzima (*Figura 6b*) (Berg *et al.*, 2002).

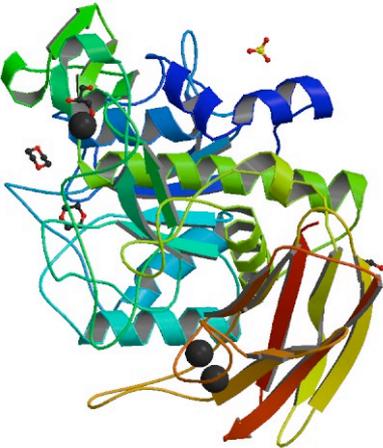
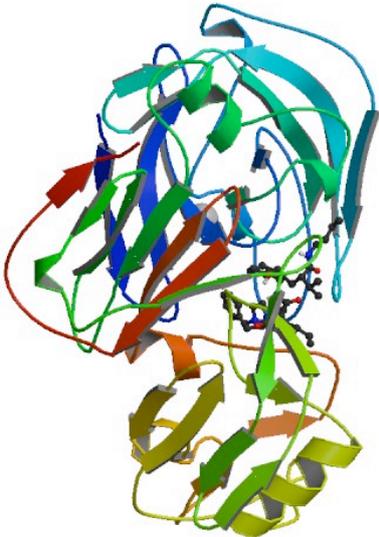
iv. Metaloproteasas:

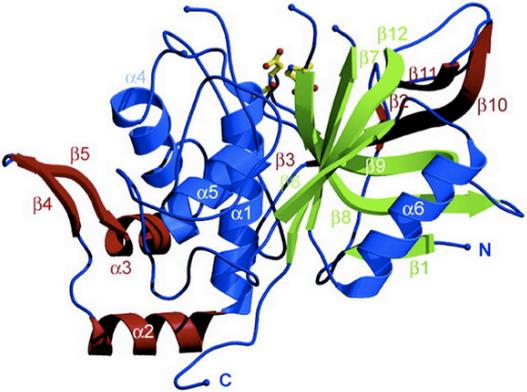
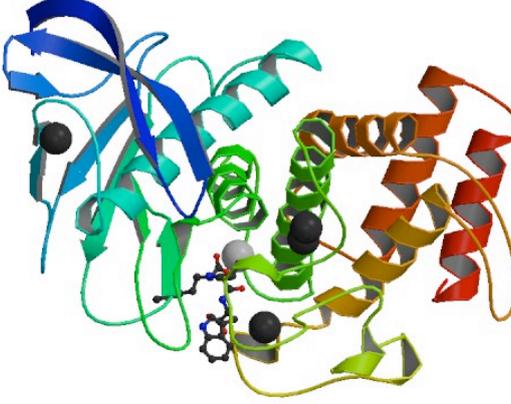
Representan una clase extensa de hidrolasas que provocan la ruptura de enlaces peptídicos mediante la acción de una molécula de agua activada por iones metálicos divalentes que están acomplejados con tres residuos aminoácidos que pueden ser His, Asp, Glu o Lys. La mayoría posee como ión metálico al Zn^{2+} pero muchas otras tienen iones de manganeso, cobalto, níquel o cobre. Tienen actividad máxima a pH cercano a 7 (Adler-Nissen, 1993), incluyen enzimas de una gran variedad de orígenes como las colagenasas, toxinas hemorrágicas de venenos de serpientes y termolisinas de bacterias. Están divididas en cuatro grupos: i) Neutras ii) Alcalinas iii) *Myxobacter* I iv) *Myxobacter* II. El primer grupo exhibe especificidad por aminoácidos hidrofóbicos y las alcalinas son específicas para varios aminoácidos. El grupo de *Myxobacter* I es específico para residuos de aminoácido pequeños en ambos lados del enlace peptídico mientras que *Myxobacter* II es específico para residuos de lisina de la parte amino del enlace peptídico. Todas las metaloproteasas son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA pero no es específico para compuestos con sulfhidrilos ni DFP (fluorofosfato de diisopropilo) y son activadas por el ión divalente Ca^{2+} (Mansfeld, 2007; Rao *et al.*, 1998).

El sitio activo de las metaloproteasas implica la pentacoordinación de un ión metálico, que en general es Zn^{2+} , con tres residuos de aminoácidos y una

molécula de agua. El ión metálico en el sitio activo se coordina con la molécula de agua que atacará al carbonilo del sustrato. Con ayuda de una base en el sitio activo, esta coordinación permite la salida de un protón de la molécula de agua generando así un ión hidróxido que formará el complejo enzima-sustrato (*Figura 6d*) (Pelmenschikov *et al.*, 2002).

Tabla 3. Estructura 3D de algunas proteasas (Tomado de Protein Data Bank).

Proteasa	Estructura cristalina	Características
<p>Serin proteasa</p> <p>(Estructura cristalina de una serin proteasa alcalina estable a la oxidación, <i>KP-43</i>)</p>		<p>Poseen una triada catalítica: Ser, Asp-His</p> <p>pH óptimo de actividad proteolítica: 7-11</p> <p>Inhibición por PMSF y DFP</p>
<p>Aspartil proteasa</p> <p>(Estructura de una aspartil proteasa extracelular de <i>C. albicans</i> acomplejada con un inhibidor: implicaciones para el diseño de agentes antifúngicos)</p>		<p>Dependientes de residuos de ácido aspártico</p> <p>Sitio activo: Asp-(Ser/Thr)-Gly</p> <p>pH óptimo de actividad proteolítica: 3-4</p> <p>Inhibición por pepstatina</p>

<p>Cisteína proteasa</p> <p>(<i>IdeS</i> de <i>Streptococcus pyogenes</i> expresada en <i>E. coli</i>)</p>		<p>Poseen una díada catalítica: Cys-His ó His-Cys</p> <p>pH óptimo de actividad proteolítica: neutro</p> <p>Inhibición por agentes sulfhidrilo</p>
<p>Metaloproteasa</p> <p>(Unión de inhibidores dipéptidos <i>n</i>-carboximetil a la termolisina, determinación por cristalografía de rayos X)</p>		<p>Requieren de un ión metálico divalente</p> <p>Son inhibidas por agentes quelantes</p>

1.9 El sistema proteolítico en bacterias ácido lácticas

El sistema proteolítico de las BAL involucrado en la utilización de caseína provee a las células con aminoácidos esenciales durante el crecimiento en el medio lácteo. Es de importancia en el uso industrial debido a su contribución en el desarrollo de propiedades organolépticas de productos lácteos fermentados (Savijoki *et al.*, 2004).

Lactococcus lactis es la primera bacteria ácido láctica y la segunda bacteria gram-positiva más extensamente estudiada en lo que se refiere a su genética, fisiología y biología molecular. Debido a lo anterior, y a que es utilizado principalmente en productos lácteos, existe ya un modelo definido sobre la

proteólisis, peptidólisis y transporte de péptidos provenientes de la caseína en este microorganismo. En el ámbito del procesamiento de nutrientes, la proteólisis celular juega un papel crítico en la calidad del control de polipéptidos y en muchos circuitos regulatorios, manteniendo los niveles basales de proteínas regulatorias bajos y eliminándolas cuando ya no son necesarias (Savijoki *et al.*, 2004).

Durante el proceso de fermentación en lácteos las bacterias necesitan una fuente de aminoácidos o péptidos, los cuales son proporcionados por la hidrólisis de la caseína por medio del sistema proteolítico de las BAL. La caseína es la proteína más abundante en la leche y es también la fuente principal de aminoácidos (Hagen *et al.*, 1996). La utilización de la caseína por parte de las BAL empieza con una proteinasa de la pared celular (CEP: la mayoría de las BAL sólo tienen una) que degrada a la proteína en oligopéptidos, éstos son transportados al interior de la célula mediante un sistema específico de transporte de péptidos llamado sistema Opp (Doeven *et al.*, 2005) para posteriormente ser degradados mediante la acción concertada de peptidasas intracelulares en péptidos más pequeños y aminoácidos (Figura 7) (Kunji *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 1999).

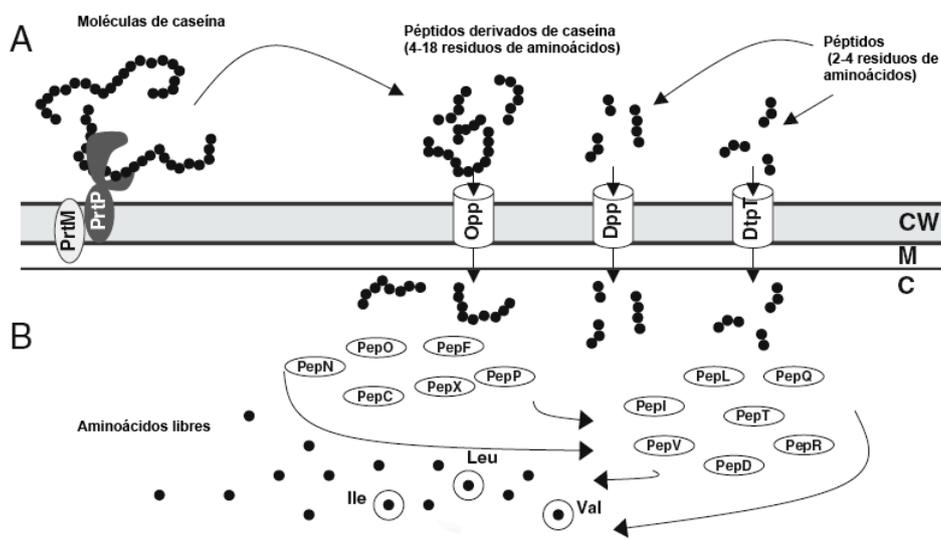


Figura 7. Presentación simplificada de la función y regulación del sistema proteolítico de *Lactococcus* durante la degradación de caseína. A) Espacio extracelular; B) Espacio intracelular; CW. Pared celular, M. membrana celular, C. Citoplasma (Tomado de Savijoki *et al.*, 2004).

El sistema proteolítico de las BAL suele ser bastante complejo, por lo general comprende tres componentes principales (Mengjin, 2010).

- i) Proteinasas: se unen a la pared celular e inician la degradación de caseína extracelular en oligopéptidos.
- ii) Péptidos transportadores: llevan otros péptidos a través de la membrana citoplásmica.
- iii) Peptidasas intracelulares: degradan péptidos en péptidos más pequeños y aminoácidos, éstos últimos a su vez son degradados a compuestos que otorgan sabor y olor como aldehídos, alcoholes y ésteres.

Las proteínas que conforman el sistema Opp, que pertenecen a la altamente conservada superfamilia de transportadores ABC, median la admisión de péptidos derivados de la caseína. Este sistema transporta péptidos de aproximadamente 18 residuos (Higgins, 1992). Estas rutas son de importancia industrial porque además de permitir el crecimiento, los péptidos, aminoácidos y sus derivados generan textura y propiedades organolépticas deseadas en productos lácteos fermentados. Los aminoácidos producto de la proteólisis son precursores de compuestos organolépticos específicos como alcoholes, aldehídos, ácidos, ésteres y compuestos sulfúricos (Smit *et al.*, 2005). La actividad de los sistemas proteolíticos de las BAL produce peptidasas citoplásmicas que son liberadas en el cuajo llevando a la formación de sabor y olor (Crow *et al.*, 1995).

La degradación de proteínas que se presenta durante la fermentación de productos cárnicos es llevada a cabo por la actividad de microorganismos y por proteasas endógenas. Estas proteasas son activadas por la disminución de pH, la producción de ácidos orgánicos por parte de las BAL no puede ser excluida del panorama global (Fadda *et al.*, 2010). Durante los primeros días de fermentación de los productos cárnicos, las proteasas endógenas son las causantes de la hidrólisis de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares en péptidos pequeños (Díaz *et al.*, 1997) que posteriormente serán hidrolizados a su vez en etapas posteriores de la fermentación por enzimas microbianas (Hughes *et al.*, 2002).

II. ANTECEDENTES

La proteólisis por parte de las BAL tiene un rol muy importante durante la generación de péptidos y aminoácidos para el crecimiento bacteriano y en la formación de metabolitos que contribuyen al sabor y olor de productos fermentados. *Lactococcus lactis* es la BAL más estudiada respecto a su genética, fisiología y biología molecular, por lo que su sistema proteolítico está elucidado por completo (*Figura 7*) (Savijoki *et al.*, 2006).

El género *Lactobacillus* era el más utilizado como cultivo iniciador en productos cárnicos fermentados, pero se observó que no soporta procesos como la liofilización, altas temperaturas como las utilizadas en el proceso de elaboración de salchichas, ni bajos pHs que se usan para inhibir el crecimiento y formación de *Staphylococcus aureus*. El género *Pediococcus* comenzó a utilizarse como cultivo iniciador alternativo debido a la mejor tolerancia que tiene a las condiciones antes mencionadas (Bacus y Brown, 1981).

Los pediococos son bacterias gram-positivas y son las únicas BAL que se pueden dividir alternativamente en dos direcciones perpendiculares formando así tétradas. Son invariablemente esféricas, cuyo diámetro va de 1.0 a 2.0 μm , producen ácido láctico más no CO_2 a partir de la glucosa, haciéndola homofermentativa. Son no mótils, no esporuladas, anaerobias facultativas, crecen mejor en medios ricos en nutrientes, la mayoría necesitan un rango de aminoácidos que incluyen a 15 de los aminoácidos esenciales y necesitan una fuente compleja de nitrógeno para crecer (Simpson y Taguchi, 1995).

Las especies más utilizadas comercialmente son *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*. Éstas participan en la fermentación de vegetales y carnes, en ensilados y en la producción de quesos; además han sido utilizados como probióticos o promotores de crecimiento biológico en alimentación animal (Mc Kay y Baldwin, 1990). Específicamente en la fermentación de productos cárnicos o lácteos, la actividad proteolítica que tienen estas bacterias resulta fundamental para garantizar el crecimiento en estos sustratos.

Con la intención de conocer qué proteasas se pueden encontrar dentro del genoma de *P. acidilactici*, se realizó una búsqueda *in-silico* en la base de datos del NCBI. Se encontraron proteasas putativas mayores a 70 kDa, de las cuales se obtuvo su secuencia en aminoácidos. A partir de ésta se calculó la masa molecular de cada proteasa, se planteó su localización en la célula y su posible función dentro de ésta.

Tabla 4. Análisis *in-silico* de proteasas con una masa molecular mayor a 70 kDa reportadas en el genoma de *P. acidilactici*.

Base de Datos NCBI. Proteínas en <i>Pediococcus acidilactici</i>			
MM (kDa)	Localización	Tipo	Clave NCBI
75.65	Membrana plasmática	Proteasa de division celular FtsH	ZP_06196431
75.92	Citoplasma	Subunidad de union a ATP de proteasas Clp y chaperonas DnaK/DnaJ	ZP_12706116
77.98	Citoplasma	Proteasa Clp dependiente de ATP	ZP_06197465
81.67	Membrana plasmática	Pediocina PA-1	P36497
81.76	Citoplasma	Proteasa Clp dependiente de ATP	ZP_07368408
91.61	Citoplasma	Proteasa Clp dependiente de ATP	ZP_07367769
97.25	Citoplasma	Subunidad de unión a ATP de proteasas Clp y chaperonas DnaK/DnaJ	ZP_12706621
370.7	Pared celular	Serin protease tipo subtilisina	ZP_12705585

Los resultados de la *Tabla 4* muestran la diversidad de proteasas con las que cuenta *P. acidilactici* probablemente para poder actuar sobre diferentes sustratos naturales. Esto lleva a pensar que el sistema proteolítico de *P. acidilactici* es muy complejo y que además faltan muchas proteasas por descubrir y caracterizar. Paradójicamente, aún cuando la bacteria es utilizada ampliamente en la industria alimenticia, existen muy pocas proteasas estudiadas ya que la mayoría no se han demostrado ni caracterizado bioquímicamente por lo que su sistema proteolítico aún no es muy claro.

Debido a esto el grupo de trabajo ha estudiado el sistema proteolítico de esta bacteria. Se localizó actividad proteolítica extracelular durante la fase logarítmica de crecimiento y se encontró una banda con una masa molecular

aproximada a 200 kDa y otra a 107 kDa (Llorente, 2008). La primera fue purificada y caracterizada por Granados-Pérez (2009) (*Figura 8*) quien mostró que se trata de una metaloproteasa con temperatura y pH óptimo de actividad proteolítica de 37 °C y 7.6 respectivamente. Además de estas dos proteasas extracelulares se encontró una proteasa de alrededor de 80 kDa adherida a membrana.

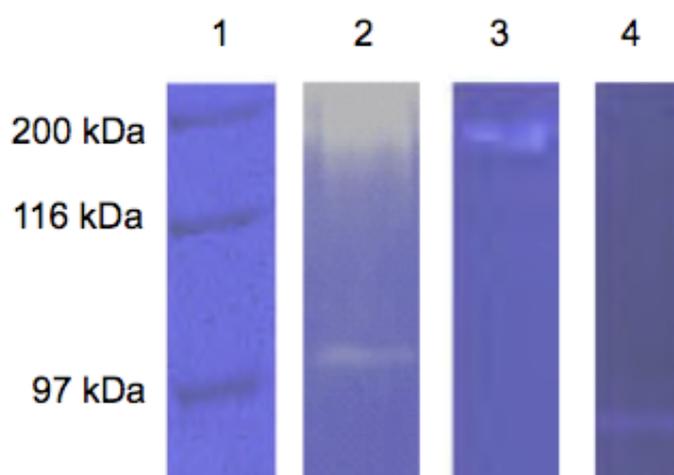


Figura 8. Actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 1% de Llorente (2008) y Granados-Pérez (2009). Carril 1, marcador de alta masa molecular (Bio-rad); carril 2, proteasa de 200 kDa y 107 kDa (Llorente, 2008); carril 3, proteasa 200 kDa purificada (Granados-Pérez, 2009); carril 4, proteasa 80 kDa (Granados-Pérez, 2009).

Casales-Cabrera en el 2012 reportó actividad proteolítica en la fracción citoplásmica a 97 kDa (*Figura 9*). Esta última hidroliza colágeno y caseína y sus condiciones óptimas de proteólisis son a pHs alcalinos y a temperaturas que van de 37 a 60 °C; se puede clasificar como una serin proteasa debido a que fue inhibida por 1 mM de PMSF. También encontró actividad proteolítica en bandas aproximadamente a 116 y 66 kDa en proteínas adheridas a membrana (*Figura 5*), obtenidas a partir de un tratamiento con Tritón X-100 sobre las células bacterianas.

A la par de la realización de este proyecto, Contreras-Cruz (2013) realizó otros experimentos en el 2012 con la finalidad de encontrar el efecto del medio de cultivo en la producción de proteasas. Encontró actividad proteolítica en medio TSB (Caldo Soya Tripticaseína) por parte de una proteína alrededor de los 120 kDa en células enteras.

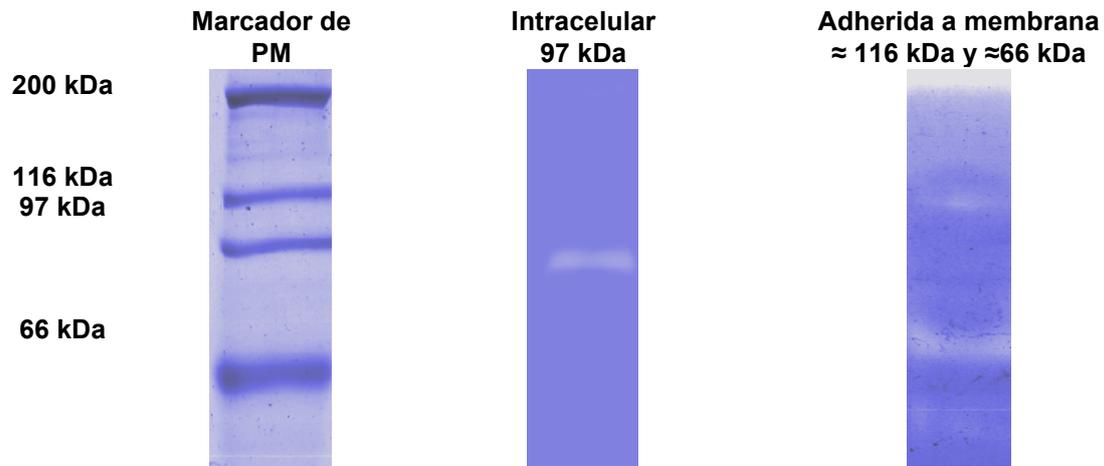


Figura 9. Zimograma de gelatina 1% de Casales-Cabrera (2012)

Lo reportado anteriormente en el grupo de trabajo indica que es posible localizar al menos 7 bandas con actividad proteolítica de diferentes masas moleculares en varias fracciones celulares. El análisis *in-silico* muestra también que existen mínimo 8 proteasas con diferentes funciones dentro del genoma de *P. acidilactici* por arriba de 70 kDa exhibiéndose así un repertorio bastante amplio.

El presente proyecto tiene como objetivo avanzar en el conocimiento del sistema proteolítico de esta bacteria, para ello se seleccionará una de las proteasas en función de su facilidad de obtención y reproducibilidad así como de la novedad que puede representar. Se iniciará con la búsqueda de las condiciones experimentales que favorezcan la producción de proteasas de interés. Posteriormente se seleccionará un modelo de estudio y después se determinarán las condiciones y metodología que permitan caracterizarla bioquímicamente en función de pH, temperatura, activadores e inhibidores o agentes quelantes con el fin de conocer más del sistema proteolítico de esta *Pediococcus acidilactici*.

iii. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Detectar y caracterizar una proteína intracelular con actividad proteolítica producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC8042.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar las condiciones y metodología que permitan obtener bandas con actividad proteolítica de manera reproducible en *Pediococcus acidilactici*.
- Evaluar la probable correspondencia a las proteasas reportadas en el genoma del microorganismo.
- Seleccionar un modelo de estudio.
- Caracterizar la enzima proteolítica seleccionada en función de pH, temperatura, iones e inhibidores y agentes quelantes.
- Determinar la actividad proteolítica sobre diferentes sustratos.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Primera fase experimental. Localización de la actividad proteolítica.

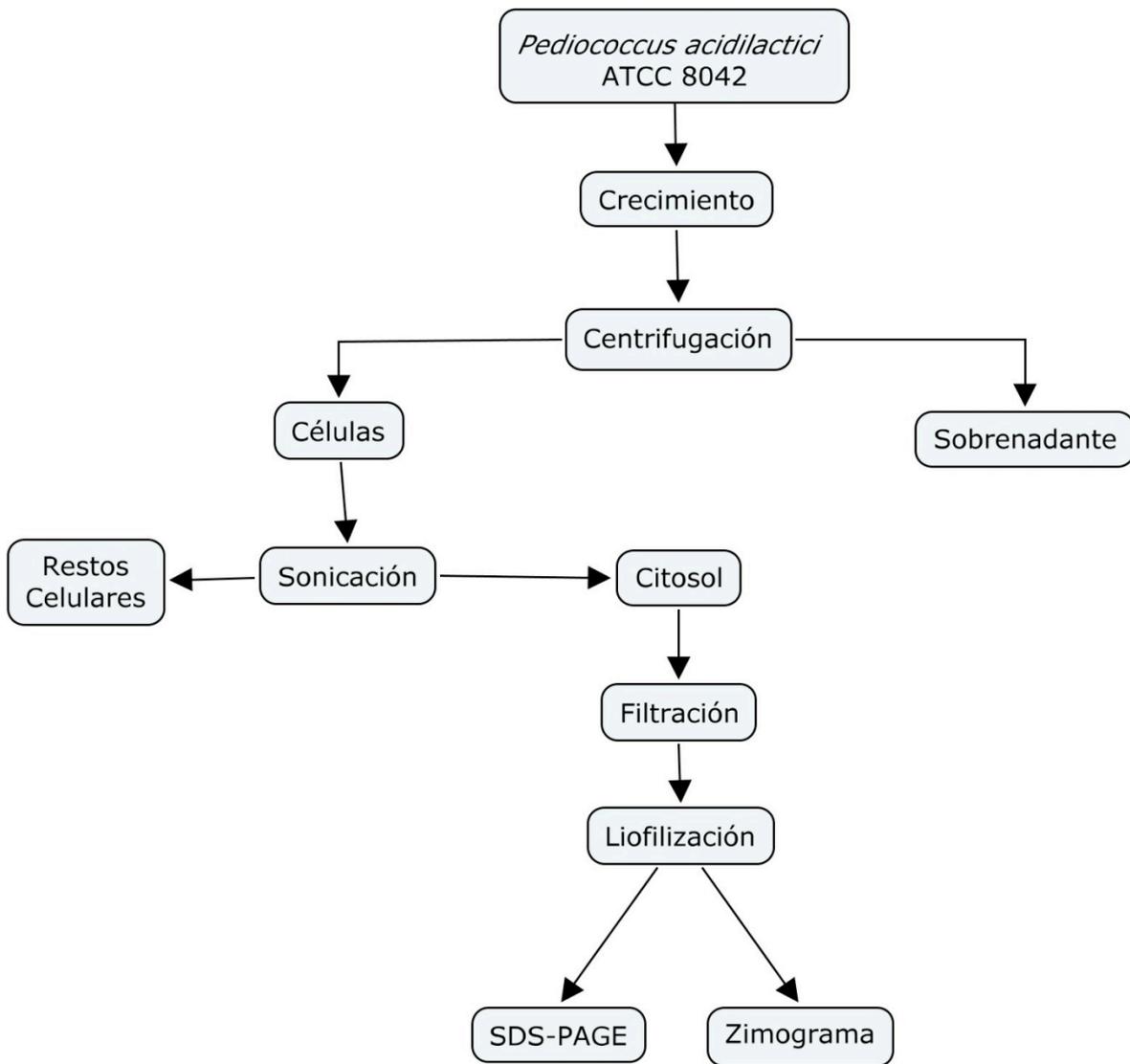


Figura 10. Diagrama de trabajo de la primera fase experimental. Localización de la actividad proteolítica de *P. acidilactici* ATCC 8042.

4.1.1 Material biológico

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 (CINVESTAV, México. -20 °C). El almacenamiento se realizó en viales con caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) modificado con esferas de vidrio perforadas (De Man, Rogosa y Sharpe, Oxoid) con glicerol (80-20% v/v).

4.1.2 Medio de cultivo y condiciones de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042:

4.1.2.1 Medio MRS modificado: Man, Rogosa y Sharpe

MRS_{modificado} Fórmula por litro de agua purificada (g/L)	
Peptona de proteasa	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Sacarosa	10
Tween 80	1 mL/L
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.25
Fosfato de potasio dibásico	2
Ácido Ascórbico	1.5

Tabla 5. Medio MRS modificado (Llorente, 1998)

Para preparar el medio de cultivo se pesaron todos los ingredientes de la *Tabla 5* excepto el ácido ascórbico y la sacarosa. Éstos se prepararon cada uno en un matraz Erlenmeyer diferente y fueron esterilizados por separado. Este proceso se llevó a cabo en autoclave a 121 °C/10 lbs/15 min (Yamato SM 300). Después se mezcló todo a temperatura ambiente y se distribuyó en matraces Erlenmeyer estériles de 500 mL.

Se realizó un pre-inóculo partiendo de la cepa, se adicionaron 3 esferas mantenidas en congelación a 20 mL de medio MRS modificado y se cultivó en agitación recíproca a 120 rpm por 24 h a 29 °C (New Bruswick Scientific Edison). De este matraz se tomaron 200 µL que se inocularon en 20 mL de

medio incubado bajo las mismas condiciones por 12 h. De aquí se tomó 1 mL que se adicionó a matraces Erlenmeyer de 500 mL, éstos contenían 100 mL de medio cada uno; se incubaron bajo las mismas condiciones durante 12 h.

4.1.2.2 Medio TSB: Tryptic Soy Broth

Tabla 6. Medio TSB (Manual Difco™ & BBL™, 2da edición)

TSB: Fórmula por litro de agua purificada (g/L)	
Bacto Tryptone (digerido pancreático de caseína)	17.0
Bacto Soytone (digerido pancreático de harina de soya)	13.0
Glucosa (dextrosa)	2.5
Cloruro sódico	5.0
Fosfato potásico dibásico	2.5

Se pesó la cantidad necesaria de medio indicado en la *Tabla 6* ajustándola a los litros deseados. Se colocaron 100 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 500 mL y se esterilizaron. Se realizó un pre-inóculo partiendo de la cepa adicionando 3 esferas a 20 mL de medio TSB en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Éste se incubó sin agitación por 24 h a 29 °C (Estufa estática 29 °C, Precision Gravity), posteriormente se le adicionó 1 mL de este pre-inóculo a 10 matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio TSB bajo las mismas condiciones durante 16 h.

4.1.3 Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 y obtención de células

Se realizó una cinética de crecimiento en medio MRS modificado y en TSB con las condiciones de fermentación antes descritas, se tomaron alícuotas a las 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 24 h de fermentación midiendo la densidad óptica a 600 nm (Espectrofotómetro Thermoscientific Biomate3) y el pH (Hanna Instruments HI 4211) a cada tiempo.

Posteriormente se centrifugó a 8,500 rpm por 25 min a 4 °C (JA10, Beckman J2-MC) para separar las células del medio de cultivo obteniendo así dos

fracciones. El paquete celular se lavó con amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 7.6 (Amortiguador de trabajo) centrifugando a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C (JA14, Beckman J2-MC) tres veces consecutivas y se ajustó la densidad óptica a 2.5 con el amortiguador de trabajo.

4.1.4 Localización de la enzima con actividad proteolítica en P. acidilactici

ATCC 8042

4.1.4.1 Solubilización de la proteasa adherida a membrana por medio de detergentes y diferentes pHs

Las células obtenidas fueron tratadas utilizando un intervalo amplio de pH y varios detergentes para observar cuáles lograban solubilizar de manera más eficiente la proteasa que se encontraba alrededor de 66 kDa. El que dio mejores resultados fue el Tritón X-100 por lo que se procedió a utilizar diferentes concentraciones de éste.

Para determinar el pH que tuviera una mejor extracción de proteínas, se preparó una solución de amortiguador con las siguientes sales: Acetato de sodio (pH 4-5), MES (pH 5.5–6.7), HEPES (pH 6.8-8.2), TRIS (pH 7.5-9.0) y CHES (pH 8.3-10.3) en una concentración 20 mM para poder mantener un intervalo de pH de 4 a 10. Se trataron las células con cada pH, se solubilizaron con agitación por 15 min y se centrifugaron a 14,000 rpm por 20 min a 4 °C.

La extracción mediante el uso de detergentes consistió en solubilizar las células con 20 mL de detergente y agitar durante 15 min, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4 °C y se realizó un zimograma de gelatina al 1%. Se observaron bandas de actividad proteolítica intensa en el tratamiento con Tritón X-100 2% por lo que posteriormente se decidió utilizar Tritón X-100 3%, 2%, 1% y 0.5% centrifugando a 18,000 rpm por 90 min a 4 °C.

4.1.4.2 Localización de la proteasa intracelular de P. acidilactici

La fermentación realizada en medio TSB se detuvo a las 16 h de crecimiento, se obtuvo el valor de densidad óptica y el de pH y se procedió a centrifugar la

muestra a 8,500 rpm durante 25 min a 4 °C. Se obtuvieron dos fracciones, el sobrenadante y el paquete celular.

El paquete celular se lavó tres veces con amortiguador de trabajo mediante centrifugación a 12,000 rpm por 25 min a 4 °C. Se ajustó la densidad óptica a 5 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 una temperatura de 4 °C (Ultrasonicador Fisher Scientific modelo 550) (Cibik y Chapot-Chartier, 2004). Se centrifugó a 17,000 rpm por 30 min a 4 °C obteniendo así dos fracciones, el citoplasma y los restos celulares (Cell Debris). Una vez obtenida la fracción citoplásmica ésta se ultrafiltró con una membrana de 30 kDa, se lavó tres veces con amortiguador de trabajo y se liofilizó y resuspendió en amortiguador de trabajo. Se realizaron pruebas de actividad proteolítica por espectrofotometría y zimografía.

4.1.5 Cuantificación de proteína

De las muestras obtenidas se determinó la concentración de proteína a través del método de Bradford (Bradford, 1976; Bio-Rad Protein Assay) a una longitud de onda de 595 nm (Espectrofotómetro Biotek Epoch) utilizando una microplaca. Se colocaron 160 µL de muestra y 40 µL de reactivo de Bradford, se homogeneizó y se esperó 5 min a que la reacción se llevara a cabo, posteriormente se procedió a leer en el espectrofotómetro, calculando la concentración de µg de proteína/mL con base a una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) (Bio-Rad Protein Assay). La cuantificación se realizó por triplicado utilizando un blanco con amortiguador de trabajo.

El método de Bradford se basa en la interacción entre el colorante hidrofóbico azul brillante de Coomassie G-250 y los residuos aromáticos y básicos de las proteínas. El máximo de absorción pasa de 465 a 595 nm, que es percibido con un cambio de color rojo a azul. Este método es utilizado comúnmente por su facilidad y rapidez. La desventaja más notoria es la interferencia de restos de detergente y algunos líquidos orgánicos como el metanol.

4.1.6 Determinación del perfil electroforético y de la actividad proteolítica por zimogramas

Uno de los métodos más utilizados para la detección de compuestos proteínicos con actividad proteolítica en un sustrato es el de zimografía, el cual ayuda a revelar una masa molecular aproximada de la enzima estudiada. El sustrato utilizado en este caso fue gelatina, ampliamente utilizado por una gran variedad de proteasas. La gelatina es incorporada a la matriz de poliacrilamida, que tiene una estructura compacta y un tamaño de poro pequeño, limitando así la difusión lateral de la proteasa y permitiendo así mayor resolución.

Paralelamente se realizaron SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) para conocer el perfil electroforético del compuesto proteínico y así determinar la masa molecular bajo condiciones desnaturizantes no reductoras (Heusen y Dowdle, 1980).

Se prepararon geles SDS al 10% de poliacrilamida co-polimerizada (Bis-acrilamida 30%, 2 M Tris-HCl pH 8.8, SDS 10%, H₂O, TEMED y APS 10%) y zimogramas de gelatina (10% poliacrilamida co-polimerizada con 1% gelatina) (Manual Bio-rad).

De las fracciones resultantes se tomaron 30 μ L, a los cuales se les adicionó 5 μ L de amortiguador de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 2.5% glicerol, 0.5% de azul de bromofenol y sólo si se requerían condiciones desnaturizantes 0.5% β -mercaptoetanol). La masa molecular se comparó con un marcador de alta masa molecular (Bio-rad, 161-0303 SDS-PAGE Standards, High, 200 μ l).

Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis de proteínas (Bio-rad Mini-protean3) con las muestras ya cargadas en los pozos; se sometieron a electroforesis en gel (Bio-Rad, Power-Pac 300) a 120 V durante aproximadamente 2 h. Terminada la electroforesis se trataron los SDS-PAGE y zimogramas de diferente manera:

- Tratamiento SDS:

Se lavó el gel con agua desionizada, se tiñó con azul de Coomassie (0.1% azul de Coomassie R-250, 45% metanol, 10% ácido acético glacial y 45% de agua) durante 12 h y posteriormente se destiñó con una solución (10% metanol, 10% ácido acético glacial y 80% de agua desionizada). La masa molecular de las proteínas que se observaron en los geles se determinó por comparación con el marcador de alta masa molecular (Casales-Cabrera, 2012).

- Tratamiento para zimograma de gelatina:

Se separó la porción del zimograma que contenía el marcador de masa molecular y se trató como un SDS-PAGE. El resto del gel se lavó dos veces durante 15 min con agua desionizada en agitación suave, posteriormente se incubó con Tritón 2.5% por 30 min y luego con amortiguador de renaturalización (50 mM Tris-HCl pH 7.6, CaCl₂ 5 mM, NaCl 200 mM) durante 20 h a 37 °C a 60 rpm. Se tiñó con azul de Coomassie y destiñó con la misma solución utilizada en los SDS-PAGE. Las proteínas con actividad proteolítica se identificaron como una banda clara o translúcida en contra de un fondo azul (Casales-Cabrera, 2012).

4.2 Segunda fase experimental: Actividad proteolítica sobre diferentes sustratos y caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de interés

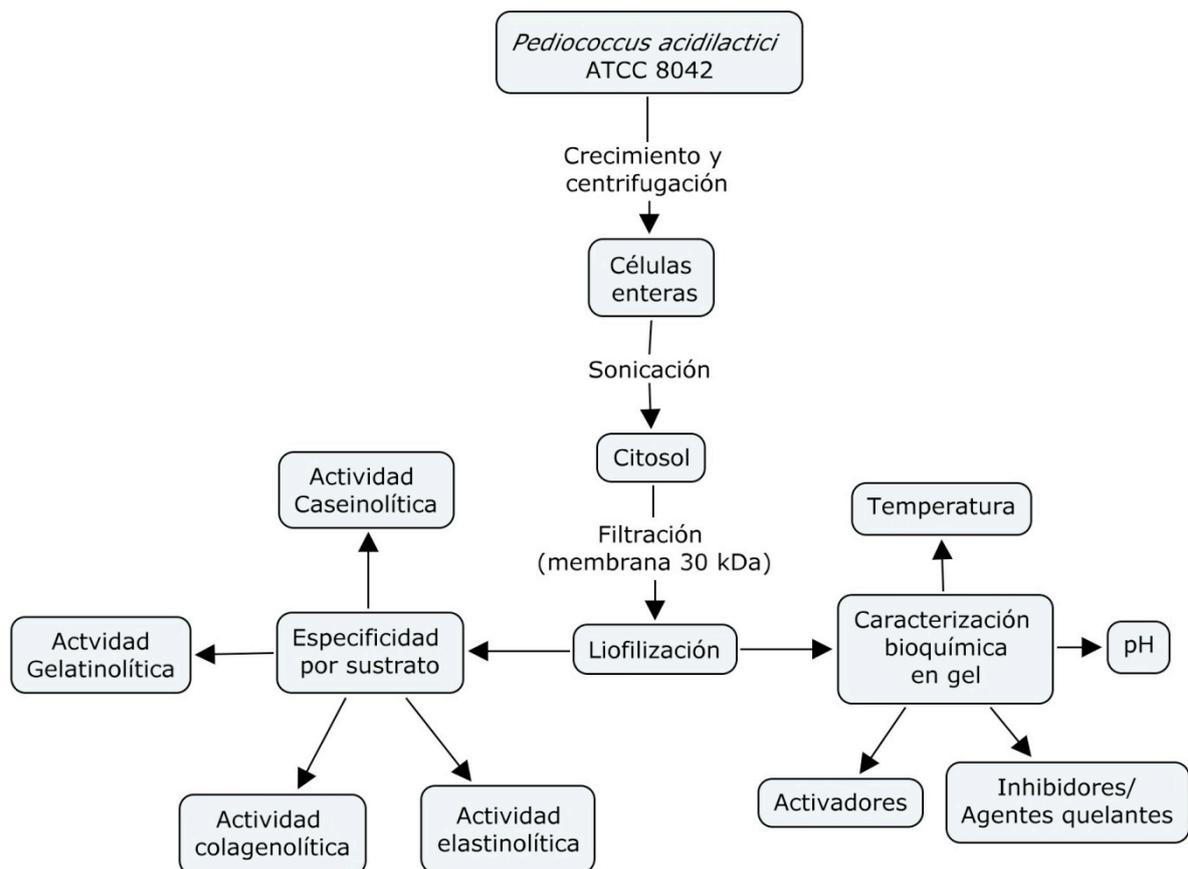


Figura 11. Diagrama de trabajo de la segunda fase experimental. Actividad proteolítica sobre diferentes sustratos y caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de la proteasa de 120 kDa.

4.2.1 Especificidad por sustrato: actividad espectrofotométrica

4.2.1.1 Actividad caseinolítica:

Con base al método de Kunitz (1947) se utilizó como sustrato una solución de caseína (*Hammersten*) al 1% que se disolvió con amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 (PBS). Ésta se calentó durante 15 min en agua a ebullición. El volumen total de reacción fue de 1 mL. Se prosiguió de la siguiente manera para la determinación de actividad proteolítica:

En tubos de 1.5 mL se colocaron las soluciones siguientes: un blanco, la muestra de solución enzimática por triplicado y un testigo.

- Blanco: 100 μ L de sustrato y 800 μ L de PBS
- Muestras: 100 μ L de sustrato, 100 μ L de solución enzimática y 700 μ L de PBS
- Testigo: 100 μ L de sustrato, 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 1.5 M y 700 μ L de PBS

Los tubos se colocaron en un baño seco (Thermomixer Eppendorf) a una temperatura de 35 °C durante 30 min a 300 rpm. Para detener la reacción se agregaron 100 μ L de TCA 1.5 M y se dejó actuar durante 30 min a 48 °C (al testigo se le adicionaron 100 μ L de la solución enzimática). Al término de la reacción se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente a 14,000 rpm por 15 min, posteriormente se midió la absorbancia del sobrenadante a 275 nm en el espectrofotómetro en una celda de cuarzo ajustando el equipo con el blanco. Este sobrenadante contenía los productos de la hidrólisis enzimática como péptidos pequeños y aminoácidos libres. Al valor final de la absorbancia se le restó el valor del testigo y se reportó la actividad caseinolítica específica (CU) como los μ mol de tirosina liberada, por min por mg de proteína total en la reacción.

4.2.1.2 *Actividad gelatinolítica:*

Se utilizó como sustrato gelatina succinilada, se determinaron aminas primarias producto de la hidrólisis del sustrato por actividad proteolítica. Para la preparación de la gelatina succinilada se utilizó anhídrido succínico, el cual bloquea los grupos aminos libres de la proteína. Al tratarse la gelatina con la solución enzimática ocurre la hidrólisis de los enlaces peptídicos exponiendo las aminas primarias. Éstas que son detectadas por el reactivo TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzen sulfónico - Sigma Aldrich) dando lugar a un producto colorido que puede ser detectado a una longitud de onda de 450 nm, que es proporcional a la actividad gelatinolítica (Baragi *et al.*, 2000).

La reacción se llevó a cabo en una microplaca, se tomaron 150 μ L de la gelatina succinilada para tener una concentración de 20 μ g de proteína y se colocaron en un pozo, a éste se le adicionaron 50 μ L de solución enzimática. Se incubó la reacción durante 20 min a 37 °C en una estufa y se detuvo la reacción agregando TNBS al 0.03% durante 20 min a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 450 nm con el espectrofotómetro Biotek Epoch y se reportó como la absorbancia a 450 nm por min por mg de proteína.

4.2.1.3 *Actividad elastinolítica:*

Se utilizó como sustrato Elastin-Congo Red (Elastin Products) a una concentración de 5 mg/mL resuspendido en un amortiguador de fosfato 100 mM pH 7.5 (PBS). Se trabajó en tubos de 1.5 mL con un volumen de reacción de 1 mL utilizando 50 μ L de muestra enzimática. Se hicieron reaccionar durante 60 min a 37 °C y 600 rpm. Se detuvo la reacción a 4 °C en hielo por 10 min y se centrifugó posteriormente a 14,000 rpm durante 10 min. Se leyó la absorbancia en el sobrenadante a 495 nm. Se reportó la actividad específica como el cambio en la absorbancia a 495 nm en 0.01 unidades por mg de proteína (U/mg proteína) (Kessler *et al.*, 1997). El blanco utilizado contenía la elastina resuspendida en PBS y el control positivo utilizó como muestra enzimática Pronasa 10 mg/mL.

4.2.1.4 *Actividad colagenolítica:*

Se utilizó como sustrato colágeno Hide Powder Azure (Sigma) en una concentración de 5 mg/mL. Se utilizó la misma metodología que para la actividad elastinolítica, pero como control se utilizó tripsina (10 µg/mL). El Hide Powder Azure es un sustrato insoluble con alto contenido de colágeno que se encuentra unido covalentemente a un cromóforo (Remazol azul brillante). Su alto contenido de hidroxiprolina le permite tener sitios de reacción con el colorante. De esta manera al ocurrir la proteólisis, los péptidos provenientes de la proteína se solubilizan junto con el cromóforo y así puede ser medida la actividad proteolítica (Rinderknecht *et al.*, 1968).

4.2.2 *Caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de interés*

La fracción con actividad proteolítica se filtró con una membrana de 0.45 µm en condiciones estériles. Se evaluó la actividad proteolítica de la proteasa con base a cuatro parámetros: temperatura óptima, pH, iones activadores monovalentes y divalentes y por último inhibidores y agentes quelantes.

4.2.2.1 *Temperatura óptima de actividad proteolítica*

La muestra con actividad proteolítica se sometió a las siguientes temperaturas: temperatura ambiente (20 °C), 37, 50, 60, 70, 80 y 90 °C durante 30 y 60 min en un baño seco. Posteriormente se adicionaron 5 µL de amortiguador de carga en condiciones desnaturizantes no reductoras. Se cargaron las muestras en un zimograma de gelatina al 1%, se corrió a 120 V por 2 h y se trató como un zimograma de gelatina.

4.2.2.2 *pH óptimo de actividad proteolítica*

Se realizó un zimograma de gelatina al 1% en el cual se cargaron 30 μ L de la muestra citoplásmica. El zimograma se corrió en condiciones desnaturizantes no reductoras a 120 V por 2 h. Posteriormente, se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada en agitación durante 15 min y como segundo lavado se utilizó una solución de Tritón X-100 al 2.5% durante 30 min.

Se preparó una solución de renaturalización modificada que contenía Tris-HCl 20 mM, ácido acético (pH 3.8-5.8), CHES (pH 8.3-10.3), HEPES (pH 6.8-8.2) y ácido succínico (pH 7.4-7.5) a una concentración final de 20 mM. Esta solución se ajustó por separado a los siguientes pHs: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Partiendo del zimograma completo se separó cada carril, los carriles fueron sumergidos en 50 mL de amortiguador de renaturalización modificado para cada pH e incubados a 37 °C por 20 h a 60 rpm.

Este procedimiento se utilizó para los siguientes dos apartados cambiando solamente la solución de renaturalización.

4.2.2.3 *Efecto de activadores*

La solución de renaturalización utilizada en este caso fue Tris-HCl la cual se ajustó a un pH 8 que se mantuvo durante el experimento. A ésta se agregaron cationes monovalentes y divalentes. Como cationes divalentes se utilizaron Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} en concentraciones de 1 y 10 mM y como cationes monovalentes se utilizaron Na^+ , K^+ y Li^+ en concentraciones de 2 y 200 mM.

4.2.2.4 *Efecto de inhibidores y agentes quelantes*

Para medir el efecto de agentes quelantes e inhibidores en la actividad proteolítica se utilizaron: EDTA, EGTA y 1,10 orto-fenantrolina como agentes quelantes y PMSF como inhibidor a concentraciones de 1 y 10 mM. Los cuales

se agregaron a la solución de renaturalización utilizada para el tratamiento de zimogramas de gelatina descrito en el apartado 4.1.6.

4.2.2.5 Análisis de bandas de actividad proteolítica

Se analizaron las bandas de actividad proteolítica obtenidas en los zimogramas de gelatina al 1% utilizando el software Image Lab de Bio-Rad por medio del volumen de la banda y la intensidad relativa de ésta tomando como referencia la muestra a temperatura ambiente que se trató con la solución renaturalizante utilizada para el tratamiento de zimogramas de gelatina descrito en el apartado 4.1.6.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Primera fase experimental: selección de la proteasa a estudiar

5.1.1 Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042

Se determinó el tipo de comportamiento que sigue la BAL en un medio de cultivo MRS modificado y TSB. La fase de latencia se presentó de las 0 a las 6 h, la fase logarítmica de las 6 a las 14 h, y la fase estacionaria a partir de las 14 h. Las curvas de crecimiento se presentan en las Figuras 12 y 13.

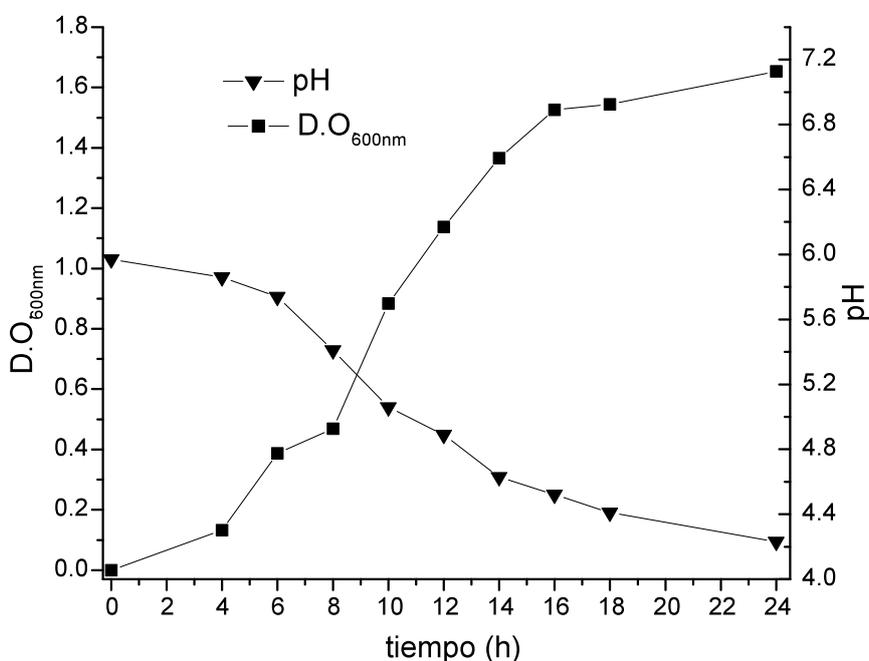


Figura 12. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC8042 en medio MRS_{modificado}. Se monitoreó la D.O._{600nm} y el pH.

Se puede observar en la curva de crecimiento microbiano con MRS modificado cómo la densidad óptica aumenta hasta por arriba de 1.6. Con medio TSB ésta apenas llega a valores de 0.6. La diferencia en el crecimiento microbiano entre estos dos medios de cultivo radica esencialmente en las diferentes cantidades de fuente de carbono y de nitrógeno que posee cada uno. El medio MRS provee fuentes fácilmente metabolizables que provocan un rápido crecimiento de la bacteria. Por lo tanto el medio TSB, que contiene menor cantidad de

fuentes de carbono y de nitrógeno, al tener menor crecimiento microbiano, generará también menor cantidad de ácidos orgánicos durante la fermentación. Esto a su vez provocará que el pH del medio no descienda demasiado por lo que en la curva de crecimiento de TSB se observa que el pH se mantiene por arriba de 6. En cambio, la curva de MRS modificado muestra una disminución a valores ácidos por arriba de 4.

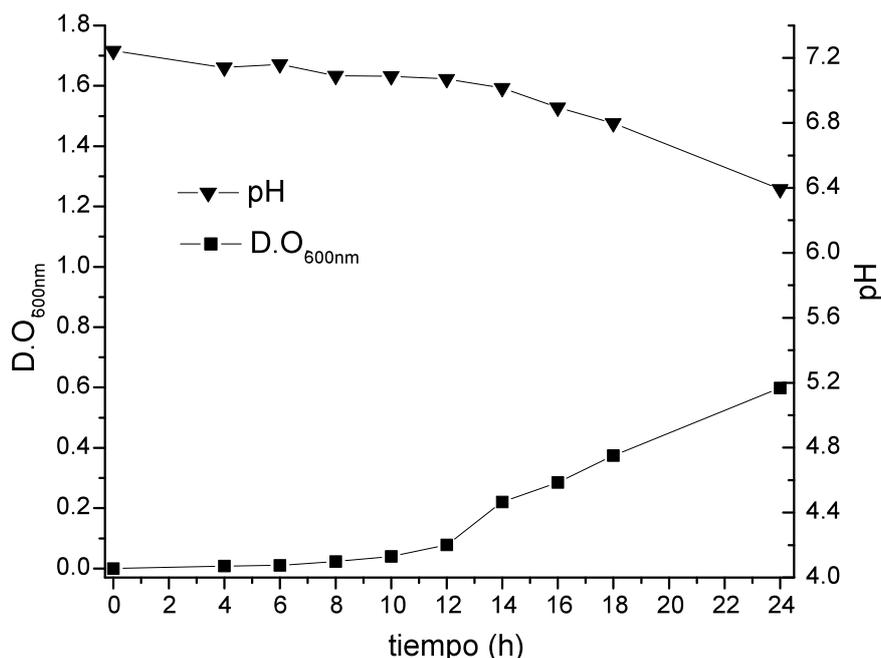


Figura 13. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC8042 en medio TSB. Se monitoreó la D.O._{600nm} y el pH.

5.1.2 Perfil electroforético y actividad proteolítica por zimogramas

5.1.2.1 Uso de Tritón X-100 y diferentes pHs para la solubilización de proteínas de membrana

Las proteínas de membrana pueden ser clasificadas en dos: las integrales y las periféricas. Las primeras tienen uno o más segmentos embebidos en la bicapa lipídica por medio de cadenas hidrofóbicas. Estas cadenas interactúan con los grupos lipofílicos de los fosfolípidos de la membrana, anclando la proteína a la membrana y extendiéndose a lo largo de ésta (Lodish, *et al.*, 2000).

Las proteínas periféricas no interactúan con el núcleo hidrofóbico de la membrana. Pueden unirse indirectamente, mediante interacciones con las proteínas integrales de membrana, o directamente, por interacciones con las cabezas polares de los fosfolípidos. Uno de los grupos que conforman estas proteínas son las enzimas hidrosolubles asociadas a las cabezas polares de los fosfolípidos. Por ejemplo, las fosfolipasas, que tienen un rol muy importante en la degradación de membranas dañadas o viejas (Lodish *et al.*, 2000). Es por todo esto que se consideró relevante buscar enzimas proteolíticas entre las proteínas de membrana, debido a que son importantes en varios mecanismos celulares.

Granados-Pérez (2009) extrajo proteínas adheridas a membrana con Tritón X-100 y obtuvo una banda de actividad proteolítica aproximadamente a 80 kDa; Casales-Cabrera (2012) también extrajo proteínas adheridas a membrana aproximadamente a 116 kDa y 60 kDa. Debido a esto se procedió a tratar de reproducir este resultado. Después de la obtención del paquete celular se hizo un gel de actividad de gelatina como sustrato. Se usó material proveniente de una fermentación de 12 h en medio MRS modificado.

Se realizaron técnicas de extracción de proteínas de membrana utilizando un intervalo amplio de pH y diferentes concentraciones de Tritón X-100, a partir de estas técnicas se obtuvo una gran variedad de proteasas de diferentes masas moleculares. El tratamiento con diferentes pHs permitió extraer 3 diferentes proteasas, una de 200 y otra de 116 kDa, las cuales estuvieron presentes en todo el intervalo. También se encontró una proteasa de 97 kDa que se presentó sólo a pH 6 y 7. La extracción con Tritón X-100 se realizó repetidas veces. Se obtuvieron 6 diferentes proteasas para cuatro concentraciones diferentes (3%, 2%, 1% y 0.5%).

Tabla 7. Análisis de proteasas adheridas a membrana obtenidas a partir de Tritón X-100

Concentración	Masas moleculares de diferentes proteasas
Tritón X-100 al 3%	>200 kDa, ≈116 kDa, ≈ 50 kDa, <45 kDa ≈ 25 kDa
Tritón X-100 al 2%	>200 kDa, ≈116 kDa, ≈97 kDa, ≈66 kDa
Tritón X-100 al 1%	<200 kDa, ≈66 kDa
Tritón X-100 al 0.5%	<200 kDa, 116 kDa, 97 kDa

*Masas moleculares marcadas en negritas son los obtenidos durante la fermentación de 8 h

Los detergentes imitan la membrana celular formando agregados estables llamados micelas. Las micelas están caracterizadas por una concentración crítica micelar (CMC), por debajo de este valor las moléculas individuales de detergente predominan en la solución. La CMC varía mucho entre diferentes clases de detergentes y puede ser influenciada por la temperatura, pH y sales (Ohlendieck, 1996).

El Tritón X-100 es un detergente no iónico no desnaturizante que permite la investigación de la estructura de proteínas de membrana; se une fuertemente a las proteínas, tiene una masa molecular micelar de aproximadamente 150 moléculas de detergente. Éste es considerado alto debido a que las micelas que forma tienden a tener una proporción mayor de moléculas de detergente que de proteína. El Tritón X-100 se caracteriza por tener una masa molecular de 90-95 kDa, una cabeza polar muy voluminosa y un valor de CMC de 0.3 mM, que es considerado pequeño. Por su gran tamaño limita la difusión y migración y por su valor bajo de CMC, el Tritón X-100 no puede ser removido por diálisis o ultrafiltración (Furth *et al.*, 1984).

Ya que el experimento para la extracción de proteínas adheridas a membrana se repitió un gran número de veces sin obtener resultados reproducibles, se puede suponer que la solubilización de proteínas de membrana a partir de Tritón X-100 es muy complicada debido a la difícil remoción de éste (Schnaitman, 1971).

Sin embargo, se encontraron varias proteínas con actividad proteolítica intensa descritas ya en la *Tabla 7*. Al compararse estos resultados con el análisis *in-silico* de proteasas dentro del genoma de *P. acidilactici* (*Tabla 6*) se encontró que algunos de las masas moleculares que se presentaron no están registradas en la literatura. De esta manera se puede observar que el sistema proteolítico de esta BAL es en verdad bastante complejo y que falta aún por hacer mucha investigación.

5.1.2.2 *El medio de cultivo en la fermentación llevada a cabo por P. acidilactici*

El medio MRS modificado es un medio de cultivo que favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas al proveer una excelente fuente de carbono y de nitrógeno. Por otro lado, el medio TSB (Caldo Soya Trypticaseína) contiene niveles menores de estas fuentes, lo que hace que la bacteria crezca más lentamente y provoca a su vez un estrés nutricional que activa proteasas para la mejor utilización de los nutrientes presentes en el medio (Stockwell *et al.*, 2005).

Los microorganismos son capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de nitrógeno presentes en un medio, si esta fuente es fácilmente metabolizable, la síntesis de enzimas relacionadas con el metabolismo primario y secundario de este microorganismo se reprimen hasta que el sustrato principal se acaba. Numerosas vías del metabolismo secundario son afectadas negativamente por fuentes nutrimentales que favorecen el crecimiento microbiano, como las sales de amonio. Además, concentraciones muy altas de nitrógeno afectan la síntesis de enzimas como las proteasas (Sánchez y Demain, 2002).

La síntesis de una proteasa es incrementada por niveles insuficientes de nitrógeno o carbono en el medio de cultivo. Esto se debe a que el microorganismo busca la degradación de otras fuentes de nitrógeno como alternativa, incrementando así su actividad aún cuando la biomasa se ve reducida. La síntesis, además, es reprimida por altos niveles de producto final como aminoácidos o NH_4^+ y por fuentes de carbono fácilmente metabolizables (Geissler y Horwath, 2008).

Comparando los medios de cultivo utilizados, el medio MRS modificado contiene como fuentes de nitrógeno orgánico: peptona de proteasa, extracto de carne y extracto de levadura. Como fuente de carbono contiene hasta 8 veces más glucosa (en forma de sacarosa) que el medio TSB (en forma de glucosa) en donde la fuente de nitrógeno orgánico se encuentra en menor proporción con digeridos pancreáticos de caseína y de harina de soya. Por lo tanto, podría suponerse que se tendrá una síntesis de proteasas diferente en el medio TSB

que mantiene a la célula con una limitante de fuente de nitrógeno y de carbono a comparación del medio MRS modificado.



Figura 14. Actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 1%. Carril 1, marcador de alta masa molecular (Bio-rad); carril 2, célula entera medio TSB (Contreras-Cruz, 2012).

Se puede observar la actividad proteolítica encontrada en células enteras en medio TSB a 16 h presentada aproximadamente a 120 kDa (*Figura 14*). Debido a este resultado se procedió a cambiar de medio de cultivo.

5.1.2.3 Perfil electroforético y actividad proteolítica de fermentación en medio de cultivo TSB a 16 h por zimogramas

En las *Figuras 15* (A y B) se pueden observar bandas de actividad proteolítica a diferente masa molecular. La fracción intracelular, es decir el citoplasma, presenta una sola banda a 120 kDa cuando el único tratamiento realizado fue el de ultrafiltración por una membrana de 30 kDa. Si posteriormente se liofiliza el ultrafiltrado se observan otras 3 bandas, una por debajo de 120 kDa y otras dos por arriba.

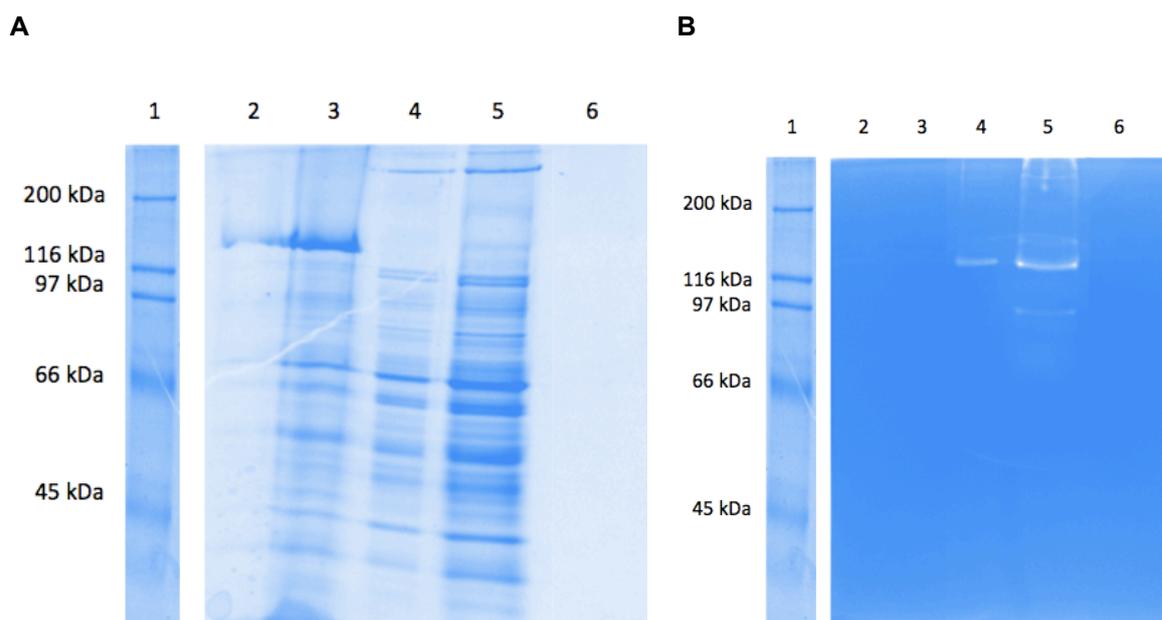


Figura 15. **A.** Perfil de proteínas de las diferentes fracciones de la célula bacteriana. SDS-PAGE 10%. **B.** Actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 1%. Carril 1, marcador de alta masa molecular (Bio-rad); carril 2, célula entera; carril 3, restos celulares; carril 4, citoplasma ultrafiltrado; carril 5, citoplasma ultrafiltrado liofilizado; carril 6, sobrenadante.

Tabla 8. Establecimiento de las condiciones de producción de proteasas

Condiciones	1	2	3	4
Medio	MRS	MRS	MRS	TSB
Tiempo de fermentación	12 h	12 h	8 h	16 h
Proceso	Intervalo de pH de 2 a 10	Tritón X-100 al 3%, 2%, 1% y 0.5%	Tritón X-100 al 3%, 2%, 1% y 0.5%	Sonicación, ultrafiltración y liofilización de la fracción citosólica
Masa molecular de las proteasas	200, 116 y 97 kDa	200, 120, 116, 98, 97, 90 y 66 kDa	200, 45 y 25 kDa	120 kDa
Reproducibilidad	✗	✗	✗	✓

Se puede observar a partir de la *Tabla 8* que la producción de proteasas en *Pediococcus acidilactici* ATCC8042 es muy sensible a factores externos. Se observa que la única proteasa que se pudo reproducir fue la de 120 kDa encontrada dentro del citoplasma de la célula bacteriana, realizando la fermentación en medio TSB con un tiempo de fermentación de 16 h. La experimentación se realizó siguiendo este procedimiento debido a que este último se consideró como el modelo de estudio seleccionado después de varias pruebas.

5.2 Segunda fase experimental: Actividad proteolítica sobre diferentes sustratos y caracterización bioquímica de la actividad proteolítica de interés

Para poder clasificar la proteasa de interés es necesario realizar experimentos en los que se observe la respuesta de su actividad proteolítica con respecto a inhibidores o agentes quelantes, activadores, pH y temperatura, así como su especificidad por sustrato.

5.2.1 Determinación de la actividad proteolítica sobre diferentes sustratos

Una vez determinada la actividad proteolítica se decidió trabajar con el citoplasma ultrafiltrado y ultrafiltrado liofilizado debido a la banda tan definida observada a 120 kDa. Se procedió a determinar la especificidad por sustrato de esta proteasa. La evaluación fue cuantitativa por técnicas espectrofotométricas utilizando como sustratos caseína, elastina, colágeno y gelatina.

La caseína es una heteroproteína encontrada en la leche y sus derivados, su porcentaje cambia dependiendo de la especie que produce la leche y está conformada principalmente por 4 tipos de caseína: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína. Todas éstas tienen la particularidad de precipitar cuando el pH del medio se encuentra por debajo de 4.6, las caseínas en la leche existen como partículas coloidales llamadas micelas (Fox y Kelly, 2004).

La elastina es la matriz proteica extracelular responsable de la flexibilidad de los tejidos, es insoluble, hidrofóbica y extensible (Debelle y Alix, 1999). Es una proteína que se encuentra en el tejido conectivo de estructuras sujetas a tensión de tracción periódica como lo son arterias, ligamentos, piel y pulmones. Esta proteína elástica provee a los tejidos de flexibilidad y deformabilidad (Sage y Gray, 1979).

El colágeno es una de las proteínas más comunes que forman los tejidos conectivos. Las fibras de colágeno están conformadas por el tropocolágeno, que a su vez está compuesto por tres cadenas helicoidales cuyos aminoácidos

principales son prolina, hidroxiprolina y glicina. Las tres cadenas polipeptídicas se enrollan formando una triple hélice unida entre sí por puentes de hidrógeno (Warriss, 2000).

La gelatina en cambio es una proteína compleja obtenida a partir de la hidrólisis parcial del colágeno. La gelatina forma geles reversibles estabilizados por puente de hidrógeno (Xiong, 2004). Se utiliza en la industria alimenticia debido a sus propiedades reológicas y su textura. Se puede obtener por hidrólisis ácida, produciendo el tipo A, o básica, produciendo el tipo B, mediante la destrucción de la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria del colágeno. Las propiedades de la gelatina, como por ejemplo poder absorber hasta 10 veces su peso en agua, derivan de la capacidad de regenerar la triple hélice del tropocolágeno y de preservar la proporción de prolina e hidroxiprolina (Aguilera y Rademacher, 2004).

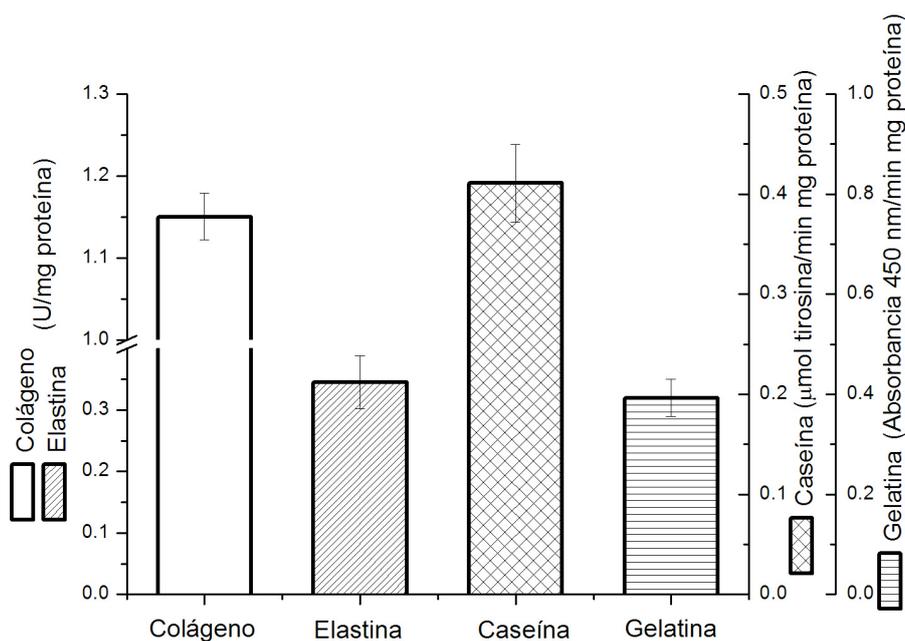


Figura 16. Determinación de actividad proteolítica sobre varios sustratos determinados mediante métodos espectrofotométricos.

Tabla 9. Determinaron de actividad proteolítica sobre varios sustratos determinados mediante métodos espectrofotométricos.

	Caseína (μmol tirosina/min * mg prot. total)	Gelatina (Absorbancia 450 nm/min* mg prot. total)	Elastina (U/mg prot. total)	Colágeno (U/mg prot. total)
Citoplasma 1	0.406	0.422	0.302	0.986
Citoplasma 2	0.375	0.405	0.345	0.986
Citoplasma 3	0.452	0.351	0.388	1.479
Citoplasma x	0.411	0.392	0.345	1.150
D.E.	0.038	0.037	0.043	0.285
Control		Tripsina 10 $\mu\text{g/mL}$	Pronasa 10 mg/mL	Tripsina 10 $\mu\text{g/mL}$
Valor Control		1.839	0.237	7.888

No se puede realizar una comparación total entre la actividad presentada por la proteasa contra los diferentes sustratos debido a que las técnicas de medición de hidrólisis fueron diferentes para cada uno. Aún así, se puede observar en la *Figura 16* que todos los sustratos fueron hidrolizados. La caseína y el colágeno presentaron alto grado de hidrólisis mientras que la elastina y la gelatina no presentaron valores tan altos. Se sabe que la elastina es resistente a la hidrólisis por parte de la mayoría de las proteasas, por lo que se observa en ésta una actividad menor (Kessler *et al.*, 1997).

En cuanto a la poca actividad presentada contra gelatina, Baragi y colaboradores demostraron que la prueba de zimografía posee una mayor sensibilidad que el ensayo utilizando gelatina succinilada. Por lo tanto, aun cuando la actividad se observa de manera clara en el zimograma de gelatina, no necesariamente presentará un valor elevado de actividad en la prueba de gelatina succinilada.

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

5.2.2.1 Determinación de temperatura óptima de actividad proteolítica

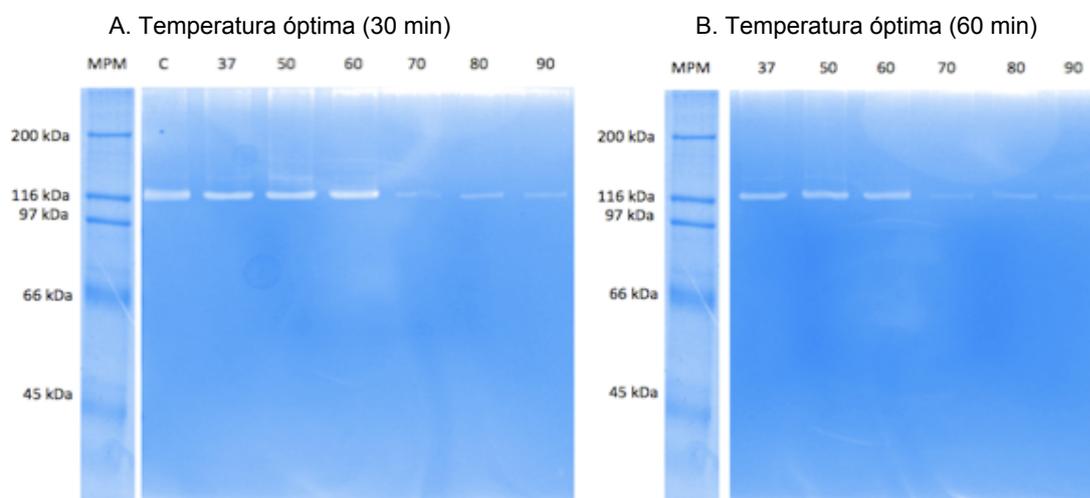


Figura 17. Determinación de la temperatura óptima de la proteasa de 120 kDa. Actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 1%. Carril MPM, marcador de masa molecular; carril C, muestra a temperatura ambiente; carril 37, 37 °C; carril 50, 50 °C; carril 60, 60 °C; carril 70, 70 °C; carril 80, 80 °C; carril 90, 90 °C.

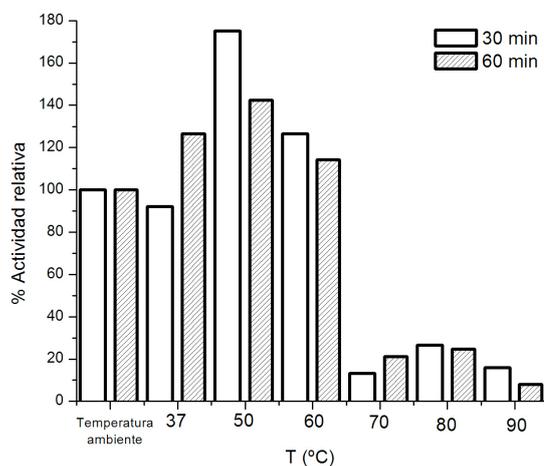


Figura 17.1. Actividades proteolíticas relativas obtenidas por análisis densitométrico de las bandas de actividad proteolítica presentes en el zimograma de gelatina al 1%.

Se evaluó la actividad proteolítica utilizando un intervalo de temperatura de 37 a 90 °C en dos tiempos, 30 y 60 min. Se puede observar en las Figura 17 (A y B) que no hubo un cambio notorio entre la incubación realizada a 30 min y a 60

min. Tampoco se observa una gran diferencia entre la muestra a temperatura ambiente y las muestras sometidas a 37, 50 y 60 °C que presentaron la actividad proteolítica máxima como se puede comprobar en la *Figura 17.1* Hay una disminución de proteólisis muy notoria por arriba de 70 °C aunque se sigue observando la actividad proteolítica hasta 90 °C.

5.2.2.2 Determinación del pH óptimo de actividad proteolítica

Se comprueba la estabilidad de la proteasa en un intervalo amplio de pH. Se puede observar en la *Figura 18.1*, la cual refleja las actividades de la *Figura 18*, que la mínima actividad de la proteasa se presenta a pH 4. A pH 3, 5 y 8 hay una ligera disminución de actividad proteolítica en comparación a la muestra tratada con la solución renaturalizante inicial, con la que se obtuvo la actividad proteolítica originalmente (solución utilizada en el apartado 5.1.2.3). La máxima proteólisis ocurrió a pH neutro mientras que los pHs 9 y 10 se mantuvieron por arriba de la referencia y el pH 6 al mismo nivel. Se puede llegar a la conclusión de que aun cuando la proteasa tiene actividad proteolítica a pHs ácidos y básicos, se observa con mayor intensidad a pHs básicos.

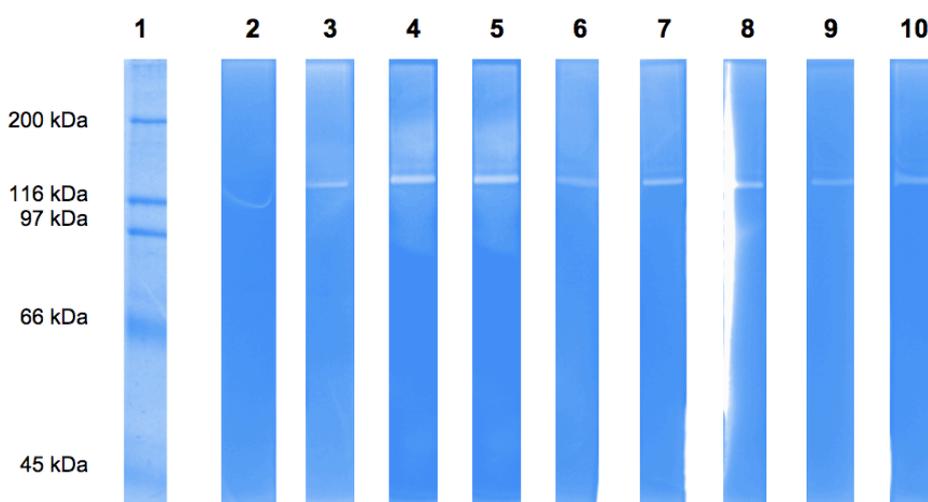


Figura 18. Determinación del pH óptimo de actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 1%. Carril 1, marcador de masa molecular; carril 2, pH 3; carril 3, pH 4; carril 4, pH 5; carril 5, pH 6; carril 6, pH 7; carril 7, pH 8; carril 8, pH 8 en solución renaturalizante original; carril 9, pH 10; carril 10, pH 8 en solución renaturalizante original.

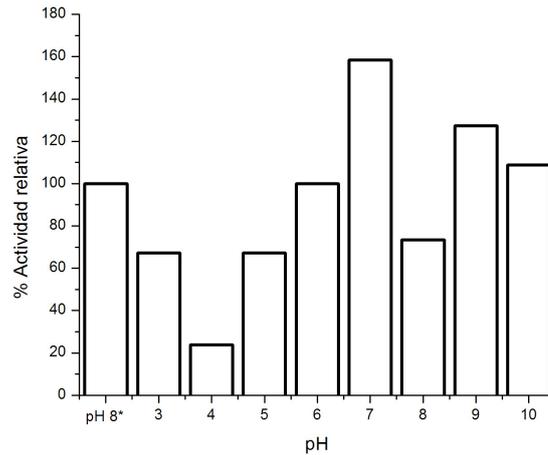


Figura 18.1. Actividades proteolíticas relativas obtenidas por análisis densitométrico de las bandas de actividad proteolítica presentes en el zimograma de gelatina al 1%. pH 8* se usó como referencia incubándose en el amortiguador de trabajo.

A partir de los resultados anteriores se puede inferir que la proteasa de interés podría ser utilizada en una gran variedad de alimentos. En productos cárnicos fermentados por ejemplo, debido a la acidez con la que se trabaja en dicho proceso. Pero también trabajaría muy bien en procesos que necesitan pHs básicos como lo es la industria de detergentes.

5.2.2.3 Efecto de activadores: cationes monovalentes y divalentes

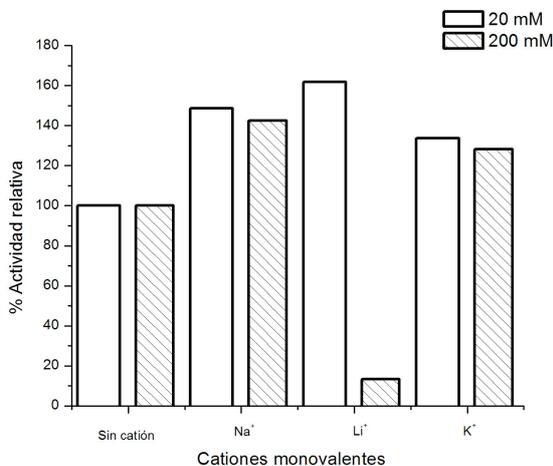


Figura 19.1. Actividades proteolíticas relativas obtenidas por análisis densitométrico de las bandas de actividad proteolítica presentes en el zimograma de gelatina al 1%.

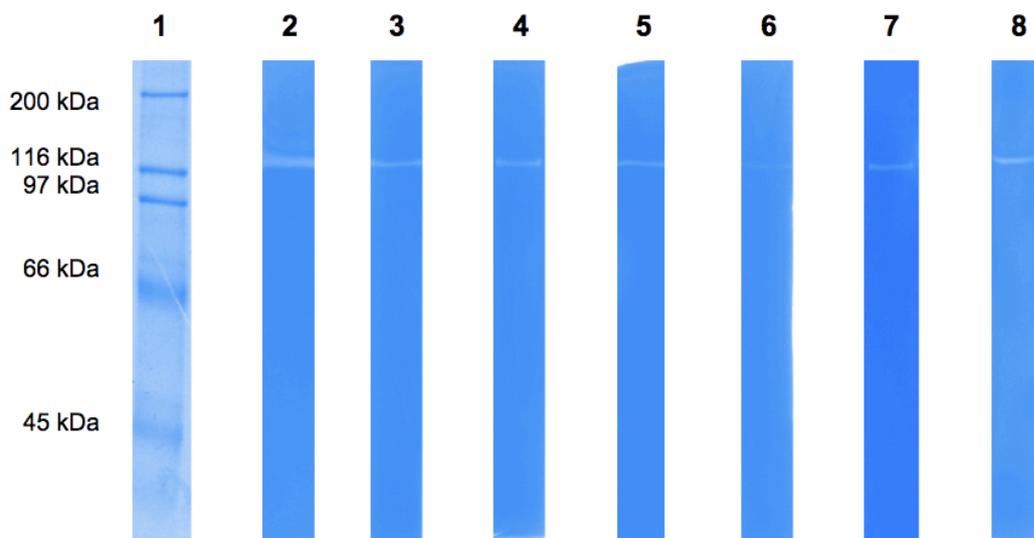


Figura 19. Efecto de cationes monovalentes sobre la actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 1%. Carril 1, marcador de masa molecular; carril 2, citoplasma sin catión; carril 3, 2 mM de NaCl; carril 4, 200 mM de NaCl; carril 5, 2 mM de LiCl; carril 6, 200 mM de LiCl; carril 7, 2 mM de KCl; carril 8, 200 mM de KCl.

Se puede notar como la activación máxima por parte de un catión monovalente se le atribuye al Li^+ 2 mM mientras que al aumentar su concentración hasta 200 mM disminuye hasta llegar a ser la mínima. Se observa como la actividad proteolítica de la muestra a la cual no se le agregó ningún catión disminuye en un 20% aproximadamente. El Na^+ aumenta la actividad en un 40% aproximadamente en sus dos concentraciones y el K^+ en un 30% aproximadamente en ambas concentraciones.

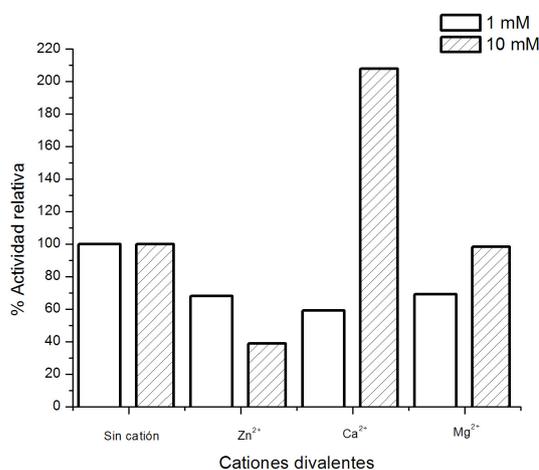


Figura 20.1. Actividades proteolíticas relativas obtenidas por análisis densitométrico de las bandas de actividad proteolítica presentes en el zimograma de gelatina al 1%.

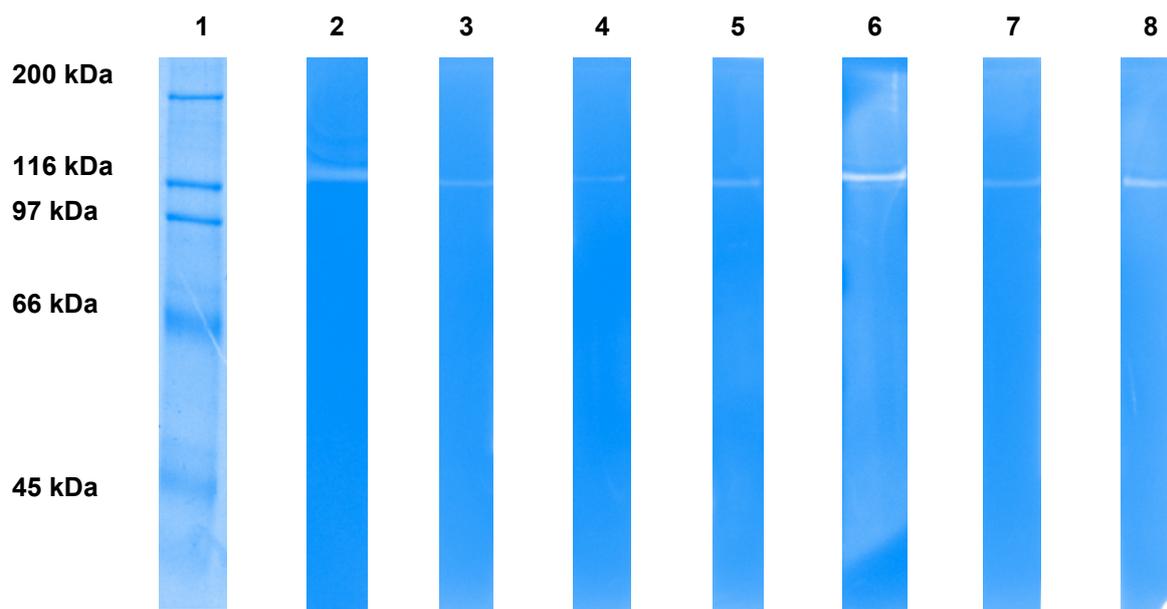


Figura 20. Efecto de cationes divalentes sobre la actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 1%. Carril 1, marcador de masa molecular; carril 2, citoplasma sin catión; carril 3, 1 mM de ZnCl_2 ; carril 4, 10 mM de ZnCl_2 , carril 5, 1 mM de CaCl_2 ; carril 6, 10 mM de CaCl_2 ; carril 7, 1 mM de MgCl_2 ; carril 8, 10 mM de MgCl_2 .

Al utilizar cationes divalentes para incrementar la actividad proteolítica es claro que el Ca^{2+} 10 mM duplica la actividad mientras que el resto de los cationes no logra alcanzar los niveles de actividad presente en la muestra a la cual no se le agregó ningún activador, con excepción del Mg^{2+} 10 mM que lo iguala.

5.2.2.4 Efecto de inhibidores y agentes quelantes

Las proteasas se pueden agrupar en dos grupos en función de su mecanismo de catálisis. Las enzimas que forman complejos covalentes entre la enzima y el sitio de hidrólisis del sustrato son las serin y cisteín proteasas, las que no forman ése complejo son las aspártico y metaloproteasas. El mecanismo de inhibición de estos dos tipos es muy diferente. Las proteasas que forman complejos covalentes tienen aminoácidos nucleofílicos muy fuertes en su sitio catalítico, consecuentemente sus inhibidores deben poseer grupos electrofílicos también fuertes que incluyan doble enlaces. Las enzimas que forman complejos no covalentes llevan a cabo una catálisis ácido-base general.

Las proteasas se clasifican de acuerdo al mecanismo de hidrólisis del enlace peptídico. Este mecanismo depende de los residuos de aminoácidos involucrados en el centro activo de la enzima. Cuatro clases de proteasas son reconocidas por la Comisión de Enzimas (EC), cada clase tiene un grupo de residuos de aminoácidos catalíticos o reactivos organizados en una configuración definida que forma el centro activo de catálisis. Las serin proteasas, el grupo más estudiado, tienen un residuo de serina en su centro activo así como residuos de ácido aspártico e histidina.

La caracterización de proteasas debe incluir el estudio del mecanismo de hidrólisis mediante el uso de inhibidores del sitio activo o con agentes quelantes. Los primeros reducen o inhiben la actividad enzimática mediante el bloqueo de los aminoácidos del sitio activo, los segundos forman complejos con los cationes involucrados en la hidrólisis del enlace peptídico (García-Carreño, 1992).

En la *Figura 21* se muestra el resultado del uso de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica de la enzima. La sustancia que pudo disminuir la actividad de la proteasa de manera más notoria fue el PMSF en concentraciones 1 y 10 mM, indicando que probablemente la enzima sea una serin proteasa.

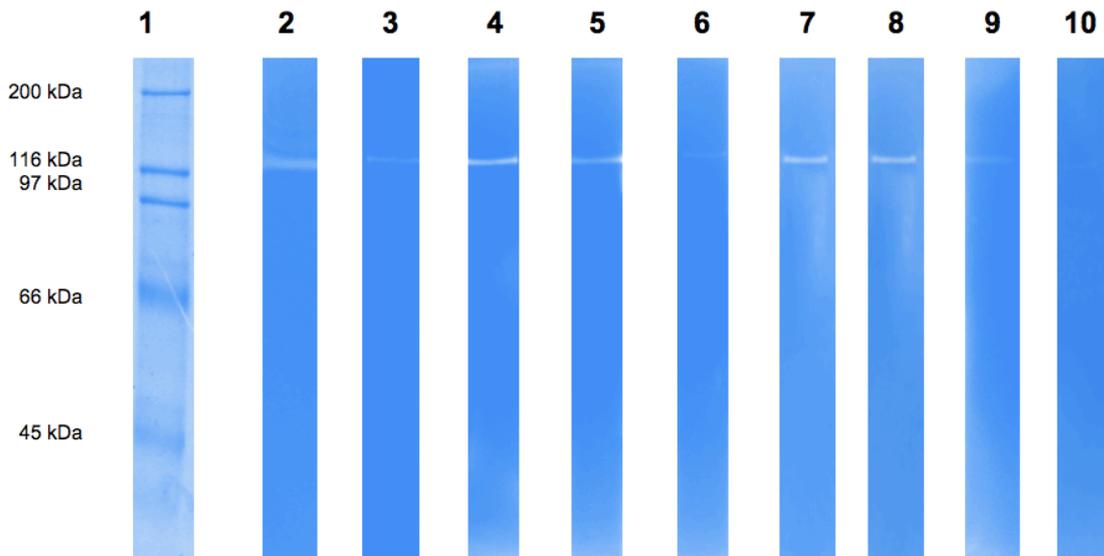


Figura 21. Efecto de inhibidores y agentes quelantes sobre la actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 1%. Carril 1, marcador de masa molecular; carril 2, citoplasma sin inhibidor/agente quelante; carril 3, 1 mM de EDTA; carril 4, 10 mM de EDTA; carril 5, 1 mM de EGTA; carril 6, 10 mM de EGTA; carril 7, 1 mM de o-fenantrolina; carril 8, 10 mM de o-fenantrolina; carril 9, 1 mM de PMSF; carril 10, 10 mM de PMSF.

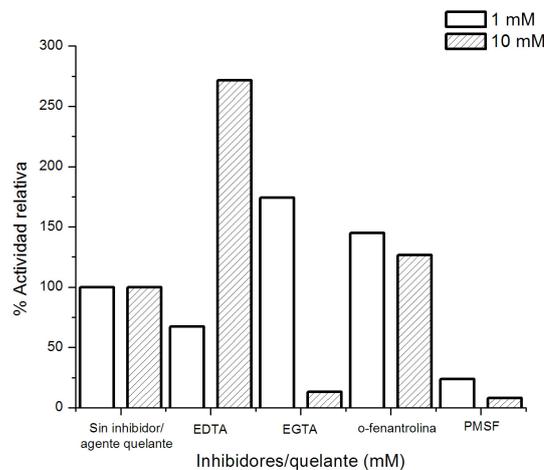


Figura 21.1 Actividades proteolíticas relativas obtenidas por análisis densitométrico de las bandas de actividad proteolítica presentes en el zimograma de gelatina al 1%.

Las gráficas correspondientes a cada uno de los zimogramas de gelatina realizados para la caracterización de la proteasa, ayudan a analizar y comparar la intensidad de las bandas de manera relativa utilizando una referencia de

actividad proteolítica. De esta manera se obtienen conclusiones más objetivas y cuantificables. Para poder ahondar en el análisis de esta proteasa, su purificación a gran escala y la obtención de su secuencia de aminoácidos sería necesaria.

Alrededor de un tercio de todas las enzimas proteolíticas son serin proteasas. El mecanismo de reacción de las serin proteasas, de una manera más detallada, es el siguiente.

Durante la fase de acilación de la reacción, el oxígeno de la serina ataca de forma nucleofílica el grupo carbonilo del péptido escindible para formar un complejo conocido como intermediario tetraédrico. La serina está posicionada en forma ideal para llevar a cabo este ataque nucleofílico, el protón liberado es captado por el anillo imidazolico de la histidina que realiza una catálisis básica general. La histidina protonada es estabilizada por el puente de hidrógeno formado con el ácido aspártico. El intermediario tetraédrico desaparece con la liberación del grupo saliente asistido por la histidina que actúa en este caso como base para dar lugar al intermediario covalente acil-enzima. La fase de desacilación consiste en el ataque de una molécula de agua a la acil-enzima formando un segundo intermediario tetraédrico que posteriormente da lugar a la liberación de la serina y del producto peptídico (Figura 22) (Hedstrom, 2002).

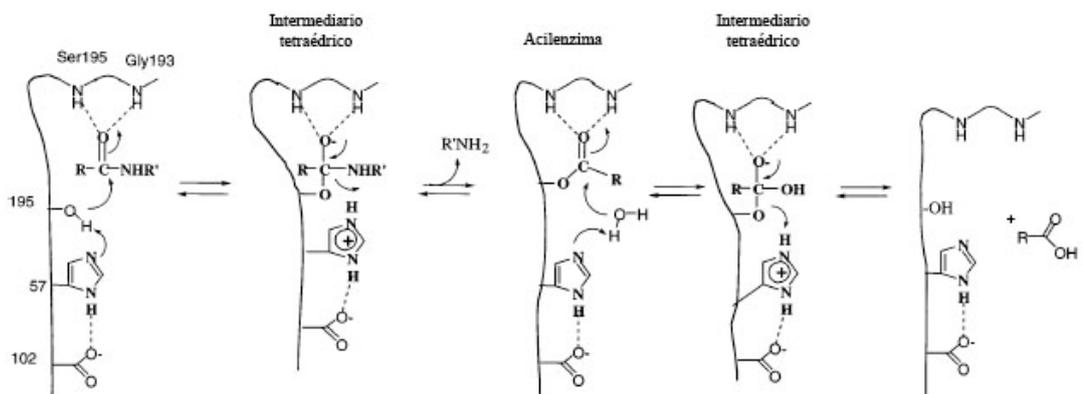


Figura 22. Mecanismo de reacción para las serin proteasas (Tomado de Hedstrom, 2002).

Sería de gran interés observar la actividad proteolítica presentada por la proteasa de 120 kDa contra una gama más amplia de sustratos para poder determinar también el tamaño de los péptidos que tuvieran mayor hidrólisis. De esta manera se lograría localizar en qué etapa del proceso del sistema proteolítico de *Pediococcus acidilactici* se encuentra y por qué comparte algunas características con la reportada anteriormente por Casales-Cabrera en 2012.

La proteasa de 120 kDa y la proteasa de 97 kDa reportada por Casales-Cabrera son ambas serinproteasas intracelulares con temperatura y pH óptimos de actividad proteolítica muy similar y que degradan principalmente los sustratos colágeno y caseína. Difieren inicialmente en las condiciones de producción y masa molecular asignada. Ambas son totalmente diferentes a la metaloproteasa extracelular de 200 kDa caracterizada por Granados-Pérez en 2009 cuya temperatura y pH óptimos son de 37 °C y 7.6 respectivamente. Tomando en cuenta las proteasas encontradas por el grupo de trabajo y el trabajo experimental realizado en este proyecto, se podría entonces comparar el sistema proteolítico de *Pediococcus acidilactici* con el de *Lactococcus lactis*.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten afirmar que el sistema proteolítico de *Pediococcus acidilactici* ATCC8042 cuenta con al menos dos proteasas citoplásmicas. La caracterizada en este proyecto tiene una masa molecular de 120 kDa, actúa en un intervalo de pH y temperatura amplio y parece ser una serin proteasa. Estas características podrían ser explotadas en procesos industriales, particularmente en los referentes a la industria cárnica puesto que presenta actividad colagenolítica.

Su capacidad de hidrólisis de caseína aunado a la actividad antibacteriana reportada en otros trabajos para esta cepa, permitiría su uso como cultivo adjunto en fermentaciones lácticas.

Los resultados obtenidos muestran que la producción de proteasas es totalmente dependiente de las condiciones de cultivo por lo que la producción y caracterización de las mismas debe tomar en cuenta estos factores.

Ni la masa molecular de esta proteasa ni la de las otras encontradas en el grupo de trabajo corresponden exactamente a las ya reportadas en el genoma de las cepas de *Pediococcus acidilactici*. Es necesaria más investigación para la comprensión del sistema proteolítico de esta especie cuyo uso en la industria cárnica ha sido plenamente establecido.

VII. REFERENCIAS

- Adams, M. R., Robert Nout, M. J. (2001). **Fermentation and Food Safety**. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA.
- Adler-Nissen, J. (1993). **Enzymes in Food Processing**. Third Edition. Academic Press.
- Aguilera, J. M., Rademacher, B. (2004). **Protein Gels**. In: Proteins in Food Processing. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England.
- Ansorena, D., Astiasarán, I. (2007). **Functional Meat Products**. Part V. Product Categories: General Considerations. In Toldrá, F. (Ed.), Handbook of Fermented Meat and Poultry. Blackwell Publishing.
- Axelsson, L. (2004). **Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology**. In: Salminen, S., Von Wright, A. (Eds.) Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Marcel Dekker, New York, 19-85.
- Bacus, J. N., Brown, W. L. (1981). **Use of Microbiology Cultures: Meat Products**. *Food Technology*. 36:74-78, 83.
- Badui, Salvador. (2006). **Química de los Alimentos**. Cuarta edición, México, Pearson Educación.
- 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(3), 267-273.
- Barros, R. R., Carvalho, M. D. G. S., Peralta, J. M., Facklam, R. R. y Teixeira, L. M. (2001). **Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pediococcus* Strains Isolated from Human Clinical Sources**. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(4): 1241.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., (2002). **Biochemistry**. 5th edition. New York: W.H. Freeman.
- **Bio-Rad Protein Assay Manual**. Bio-Rad Laboratories. USA. <http://labs.fhcrc.org/fero/Protocols/BioRad_Bradford.pdf>
- Bradford, M. M. (1976). **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding**. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Candogan, K., Wardlaw, F. B., Acton, J. C. (2009). **Effect of Starter**

- Culture on Proteolytic Changes During Processing of Fermented Beef Sausages.** *Food Chemistry* 116, 731–737.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida N. (2002). **The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey.** *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4):281–370.
 - Casaburi, A., Monaco, R. D., Cavella, S., Toldra, F., Ercolini, D., Villani, F. (2008). **Proteolytic and Lipolytic Starter Cultures and their Effect on Traditional Fermented Sausages Ripening and Sensory Traits.** *Food Microbiology*, 25, 335–347.
 - Casales-Cabrera, G.X., (2012). **Localización y Caracterización de la Actividad Proteolítica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** Tesis de licenciatura en química de alimentos. UNAM, 29-37, 56.
 - Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., Steele, J. L., (1999). **Peptidases and Amino Acid Catabolism in Lactic Acid Bacteria.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76:217–246.
 - Claverie-Martín, F., Vega-Hernández, M. C. (2007). **Aspartic Proteases Used in Cheese Making. Chapter 13 in: Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications.** Springer. 207-218.
 - Cibik, R., Chapot-Chartier, M. (2004). **Characterisation of Autolytic Enzymes in *Lactobacillus pentosus*.** *Letters in Applied Microbiology*, 38(6), 459-463.
 - Crow, V. L., Coolbear, T., Gopal, P.K., Martley, F.G., McKay, L.L., Riepe, H. (1995). **The Role of Autolysis of Lactic Acid Bacteria in The Ripening of Cheese.** *International Dairy Journal*, 5:855–875.
 - Cocconcelli, P. S. (2007). **Starter Cultures: Bacteria.** Part III, Microbiology and Starter Cultures for Meat Fermentation. In Toldrá, F. (Ed.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Blackwell Publishing.
 - Contreras-Cruz, M., (2013). **Efecto del Medio de Cultivo en la Producción de Enzimas de Interés Biotecnológico por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** Tesis de licenciatura en química de alimentos. UNAM (en escritura).
 - Danielsen, M., Simpson, P. J., O'Connor, E. B., Ross, R. P., Stanton, C. (2007). **Susceptibility of *Pediococcus spp.* to Antimicrobial Agents.** *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 384-389.

- Debelle, L., y Alix, A. J. P. (1999). **The Structures of Elastins and their Function.** *Biochimie*, 81(10), 981-994.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, G. D., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A. (1997). **Proteolysis in Dry Fermented Sausages; The Effect of Selected Exogenous Proteases.** *Meat Science*, 46, 115–128.
- Doeven, M. K., Kok, J., Poolman, B., (2005). **Specificity and Selectivity Determinants of Peptide Transport in *Lactococcus lactis* and Other Microorganisms.** *Molecular Microbiology* 57:640–649.
- Donlon, J. (2007). **Subtilisin.** In: **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications.** Springer. 197-205.
- Erez, E., Fass, D., Bibi, E. (2009). **How Intermembrane Proteases Bury Hydrolytic Reactions in the Membrane.** *Nature*, 459, 371-378.
- Fadda, S., López, C., Vignolo, G. (2010). **Role of Lactic Acid Bacteria During Meat Conditioning and Fermentation: Peptides Generated as Sensorial and Hygienic Biomarkers.** *Meat Science*, 86(1), 66-79.
- Fox, P. F., Kelly, A.L. (2004). **The Caseins.** In: **Proteins in Food Processing.** Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England.
- Furth, A. J., Bolton, H., Potter, J., Priddle, J. D. (1984). **Separating Detergent from Proteins.** *Methods in Enzymology*, 104, 318-328.
- García Garibay, M., Quintero Ramírez, R., López-Munguía Canales, A. (2000). **Biología Alimentaria.** Editorial Limusa, México. 103.
- García Carreño, F. L. (1992). **Protease Inhibition in Theory and Practice.** *Biotechnology Education*, 3, 4:145-150.
- Garriga, M., Aymerich, T. (2007). **The Microbiology of Fermentation and Ripening.** Part III, Microbiology and Starter Cultures for Meat Fermentation. In Toldrá, F. (Ed.), Handbook of fermented meat and poultry. Blackwell Publishing.
- Gonzales, T., Robert-Baudouy, J. (1996). **Bacterial Aminopeptidases: Properties and Functions.** *FEMS Microbiology Reviews* 18, 3: 19-344.
- Geisseler, D., Horwath, W. (2008). **Regulation of Extracellular Protease Activity in Soil in Response to Different Sources and Concentrations of Nitrogen and Carbon.** *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 3040–3048.
- Gottschalk, G. (1985). **Bacterial Metabolism.** *Springer Series in*

- Microbiology*. Springer-Verlag. (2nd Edition). Virginia, U.S.A. p. 216,127.
- Grandos-Pérez, E.A. (2009). **Caracterización de la Actividad Proteolítica Extracelular de *Pediococcus acidilactici* ATCC8042**. Tesis de Maestría en ciencias biológicas, CU, UNAM. pp. 95.
 - Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., Wiczak, W. (2007). **Cysteine Proteases**. In: **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. Springer. 181-194.
 - Hagen, B. F., Berdagué, L., Holck, A. L., Naes, H., Blow, H. (1996). **Bacterial Proteinase Reduces Maturation Time of Dry Fermented Sausages**. *Journal of Food Science*, 61, 1024-1029.
 - Hedstrom, L. (2002). **Serine Protease Mechanism and Specificity**. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501-4523.
 - Heusen, C., Dowdle, E. B., (1980). **Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates**. *Analytical biochemistry*, 102, 196-202.
 - Higgins, C.F. (1992) **ABC Transporters: From Microorganisms to Man**. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 67–113.
 - Holland, R., Crow, V., Curry, B. **Lactic Acid Bacteria / *Pediococcus* spp.** (2011). *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second Edition, 149-152
 - Holt J.G., Noel R., Krieg P., Sneath H.A., Stanley J.T., Williams T. (1999). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Lippincott Williams, 9th Edition, 530.
 - Hughes, M. C., Kerry, J. P., Arendt, E. K., Kenneally, P. M., Mc Sweeney, P. L. H., O'Neill, E. E. (2002). **Characterization of Proteolysis During the Ripening of Semi-dry Fermented Sausages**. *Meat Science*, 62, 205–216.
 - Jay, J.M. (2000). **Modern Food Microbiology**. Aspen Publishers, 6th Edition, Inc. Gaithersburg, Maryland.
 - Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W. R., Rosenbloom, J., Ohman, D. E. (1997). **Inhibitors and Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA**. *Journal of Biological Chemistry*, 272(15), 9884-9889.
 - Kluyver, A.J., Donker, H.J.L. (1926). **Die Einheit in Der Biochemie**. Borntraeger. 57.

- Kumar, C. G., Takagi, H. (1999). **Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint.** *Biotechnology Advances*, 17(7), 561-594.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W. N. (1996). **The Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70:187–221.
- Law, S. V., Abu Bakar, F., Mat Hashim, D., Abdul Hamid, A. (2011). **Popular Fermented Foods and Beverages in Southeast Asia.** *International Food Research Journal*, 18(2)
- Leistner, L. (2000). **Basic Aspects of Food Preservation by Hurdle Technology.** *International Journal of Food Microbiology*, 55, 181-186.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). **Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation Industry.** *Trends in Food Science and Technology*, 15, 2: 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., Farrés, A. (2008). **A Novel Extracellular Proteolytic Activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC8042.** *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 604-609.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L. (2000). **Molecular Cell Biology.** 4th edition. New York: W. H. Freeman.
- Mandal, V., Sen, S. K., Mandal, N. C. (2011). **Isolation and Characterization of Pediocin NV 5 Producing *Pediococcus acidilactici* LAB 5 from Vacuum-Packed Fermented Meat Product.** *Indian Journal of Microbiology*, 2011, 51(1):22–29.
- Mansfeld, J. (2007). **Metalloproteases. Chapter 14 in: Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications.** Springer. 221-242.
- Mäyry-Mäkinen, A., Bigret, M. (2004). **Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria.** In: Salminen S, von Wright A (Eds.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects.* Marcel Dekker, New York. 192-215.

- Mengjin, L., Jumamurat, B., Bernadet, R., Arjen, N., Roland, S. (2010). **The proteolytic System of Lactic Acid Bacteria Revisited: A Genomic Comparison.** *BMC Genomics*.
- McKay, L. L., Baldwin, K. A. (1990). **Application for Biotechnology: Present and Future Improvements in Lactic Acid Bacteria.** *FEMS Microbiology Reviews*, 87: 3-14.
- Monteagudo-Mera, A., Caro, I., Rodriguez-Aparicio, L. B., Rua, J., Ferrero, M. A., García-Armesto, M. R. (2011). **Characterization of Certain Bacterial Strains for Potential Use as Starter or Probiotic Cultures in Dairy Products.** *Journal of Food Protection*, 74(8), 1379-1386.
- Naidu, A.S. (2000). **Natural Food Antimicrobial Systems**, CRC Press, Boca Raton, Naidu, A.S. (Editor). Chapters 17, 18 & 22.
- Niven, C. F., Deibel, R. H. y Wilson, G. D. (1959). **Production of Fermented Sausages.** US Patent, 2, 907, 661.
- Norma, N. P., Hotchkiss, H. J. (1998). **Food Science.** 5th edition. Maryland, Aspen.
- Ohlendieck, Kay. (1996). **Removal of Detergent From Protein Fractions.** *Protein Purification Protocols. Methods in Molecular Biology*, 59, 305-312.
- Page, M.J., Di Cera, E. (2008). **Serin Peptidases: Classification, Structure and Function.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 1220 – 1236.
- Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, G., Dasiou, D., Ambrosiadis, I. (2006). **Determination of Bacteriocin Activity with Bioassays carried out on Solid and Liquid Substrates: Assessing the Factor Indicator Microorganism".** *Microbial Cell Factories*, 5.
- Petäjä-Kanninen, E. y Puolanne, E. (2007). **Principles of Meat Fermentation.** Part I. Meat Fermentation Worldwide: History and Principles. In Toldrá, F. (Ed.), Handbook of fermented meat and poultry. Blackwell Publishing.
- Pelmeshikov, V., Blomberg, M.R., Siegbahn, P.E. (2002). **A theoretical study of the mechanism for peptide hydrolysis by thermolysin.** *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 7(3):284-98.

- Polgár, L. (1987) **The Mechanism of Action of Aspartic Proteases involves “push-pull” catalysis.** *FEBS letters*. 219(1):1-4.
- Prado Barragán, L.A., Huerta Ochoa, S., Rodríguez Serrano, G., Saucedo Castañeda, G. (1999). **Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología.** *Colección Tópicos en Biotecnología.* UAM Iztapalapa, México, 89-100.
- Rahman, M. S. (2007). **Handbook of Food Preservation.** 2nd edition. Newyork: CRC press.
- Rao, M. B., Tanksale. A. M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. V. (1998). **Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases.** *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62(3):597.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., Barrett, A. J. (2007). **An Introduction to Peptidases and the MEROPS Database: In Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications.** Springer. 161-180.
- Rinderknecht, H., Geokas, M. C., Silverman, P., y Haverback, B. J. (1968). **A New Ultrasensitive Method for the Determination of Proteolytic Activity.** *Clinica Chimica Acta*, 21(2), 197-203.
- Sage, H., Gray, W. R. (1979). **Studies on the Evolution of Elastin-I. Phylogenetic Distribution.** *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B*, 64(4), 313-327.
- Sánchez, S., Demain. A., (2002). **Metabolic Regulation of Fermentation Processes.** *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 895–906.
- Sanz, Y., Toldrá, F. (2002). **Purification and Characterization of An Arginine Aminopeptidase from *Lactobacillus sakei*.** *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4: 1980–1987.
- Sanz, Y., Fadda, S., Aristoy, M., Vignolo, G., Oliver, G., Toldrá, F. (1999). **Hydrolysis of Muscle Myofibrillar Protein by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake*.** *International Journal of Food Microbiology*, 54: 115–125.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006). **Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71:394-406.

- Schnaitman, C. (1971). **Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100.** *Journal of Bacteriology*, 507-610.
- Simpson, W. J., Taguchi, H. (1995). **The Genus *Pediococcus* with Notes on the Genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*.** In: The Genera of Lactic Acid Bacteria; Wood, B. J. B., Holzapel, W. H., (Eds.); Chapman & Hall, London, 125–172.
- Smit, G., Smit, B. A., Engels, W.J.M. (2005). **Flavour Formation by Lactic Acid Bacteria and Biochemical Flavour Profiling of Cheese Products.** *FEMS Microbiology Reviews*, 29:591–610.
- Stockwell, V., Loper, J. (2005). **The Sigma Factor RpoS is Required for Stress Tolerance and Environmental Fitness of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5.** *Microbiology*, 151.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S., y Fadda, S. (2002). **Bacterial Starters Involved in the Quality of Fermented Meat Products.** In: Research Advances in the Quality of Meat and Meat products. Trivandrum, India. *Research Singpost*, 175–191.
- Toldrá, F. (1998). **Proteolysis and Lipolysis in Flavour Development of Dry-cured Meat Products.** *Meat Science*, 67, 711–719.
- Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S., Thepkasikul, P. (2004). **Changes in Composition and Functional Properties of roteins and their Contributions to *Nham* Characteristics.** *Meat Science*, 66: 579-588.
- Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. (2007). **Fundamentos de Bioquímica.** Ed. Médica Panamericana. 2da Edición. China. P. 431.
- Ward, O.P. (2011). **Proteases.** In: **Comprehensive Biotechnology.** 2nd Edition. Moo-Young, Murray (Ed.). Academic Press. Burlington, MA. 571-582.
- Warriss, P.D. (2000). **Meat Science: An Introductory Text.** CABI Publishing. Bristol, UK.
- Xiong, Y.L. (2004). **Muscle Proteins.** In: **Proteins in Food Processing.** Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England.
- Zeuthen, P. (2007). **A Historical Perspective of Meat Fermentation.** Part I, Meat Fermentation Worldwide: History and Principles. In: Toldrá, F. (Ed.), Handbook of fermented meat and poultry. Blackwell Publishing.

Sitios web consultados

- <http://www.imtech.res.in/raghava/pslpred/submit.html> (fecha de consulta 26 de mayo del 2012)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> (fecha de consulta 20 de enero del 2012)
- <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Gpos/> (fecha de consulta 11 de febrero del 2013)
- Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (consultado el 8 de marzo del 2013)
- <http://www.pnas.org/content/101/50/17371.full> (consultado el 8 de marzo del 2013).