



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Caracterización de las peptidoglucano hidrolasas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

ALINE VALENZUELA ROSAS

México, D.F.

2012





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:** MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

VOCAL: **Profesor:** SANDRA PAOLA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

SECRETARIO: **Profesor:** ISRAEL GARCÍA CANO

1er. SUPLENTE: **Profesor:** MARÍA DEL CONSUELO PLATA RAMOS

2° SUPLENTE: **Profesor:** AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ
SARAVIA

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO 312 DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E DE LA FACULTADA DE QUÍMICA UNAM.

ISRAEL GARCÍA CANO
ASESOR DEL TEMA

AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ SARAVIA
SUPERVISOR TÉCNICO

ALINE VALENZUELA ROSAS
SUSTENTANTE

Agradecimientos

A mi Dios **Jehová** por las fuerzas y valor que me proporcionaste inmerecidamente, por tu presencia espiritual y de todas tus hermosas cualidades que me motiva día a día a esforzarme por ser de tu agrado, toda la alabanza y gloria sean para ti.

A mi madre **María Antonieta** por todo el amor y apoyo incondicional tanto en los buenos tiempos como en las situaciones duras, gracias por las energías, los recursos, la disposición y el tiempo que me destinaste; por demostrarme que todo es posible con esfuerzo y determinación siempre teniendo fija la vista en el objetivo, tu ejemplo de generosidad y valor siempre será mi mayor motivación te amo.

A mi padre **Carlos Valenzuela** del cual obtuve mucho apoyo y orgullo, confiaste continuamente en mí y la entereza que me enseñaste con tu ejemplo fueron el mejor legado que me diste y por eso te lo agradeceré siempre.

A mi padre **Rodolfo Pérez** gracias por el interés y la paciencia por todas esas idas y venidas, por los caprichos cumplidos y por las experiencias vividas.

A mis hermanos **Oliver** e **Irving** con los cuales siempre pude contar, que me brindaron su tolerancia y comprensión que estuvieron en todo momento y lugar construyendo ilusiones, apoyando los sueños y celebrando la realización de las metas .

A mis abuelas **Rosa María**, “**Chelita**” y **Esther** que me regalaron tan buenas anécdotas, tan valiosos ejemplos especialmente a mi abue Rosa María que con su presencia y cuidados crecí segura y protegida. A mis abuelos **Ramón** y **Miguel** por estar dándole chispa a la familia y vida a las relaciones.

A mis tíos Rosalba, Eduardo, , Ilda, Gloria, Jorge, Alfredo, Rodolfo, Rosa María, Esther, Oscar, Araceli y Marina Vega, Karla Quiroz y Mercedes Becerril, gracias por los afectos, la comprensión, el estímulo y el interés que mostraron en mí.

A mis amigos Erika, Alba, Idalí, Gloria, Fernando, Daniel, Cristian, Paola, Berenice, Liz, Tunalli, Cecilia, Omar, Edwin, Ramiro, José Juan, Oswaldo, Sandra, Rosa María, Ignacio, Jessy y Pepito que duplicaron las alegrías e hicieron más fácil y divertida mi vida.

A mis amigos y compañeros de la facultad Luis Fernando, Lupita, Patsy, Edith, Itzel, Marco Antonio, Jorge, Rodrigo, Gustavo, Eliane, Cesar, Gerardo, Estefania, Magdalena, Edgar, Patricio, David, Talia, Brenda, Cristian, Leo, Carlos, Isabel, Nidia, Nelly, Gabriela, Hugo, Juan José, con cada uno de ustedes pase buenos momentos y con su compañía hicieron más fácil mi estadía en la facultad. Gracias a los amigos ganados, a los amigos perdidos y a los amigos recuperados.

A la Dra. **Amelia Farrés** por haber confiado en mí, por el respaldo y el conocimiento brindado, le agradezco por el interés, tiempo y dirección de este trabajo.

A las Dras. **Maricarmen Quirasco**, **Amanda Gálvez** y **Carolina Peña** por sus observaciones y sugerencias por la disposición y las buenas enseñanzas. Por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la Tesis y sus atinadas correcciones.

A **Israel García** por la guía, y la paciencia, desde un principio hasta el día hoy sigues dándome ánimo para terminar este proceso. Por ser más que el asesor y amigo, por el apoyo y el esparcimiento.

A mis compañeros del laboratorio (sin estricto orden) Sergio, Liliana, Lalo, Ales, Minos, Laura, Mary, Isaac, Katy, Mariana, Bety, Gaby y todos lo que me ayudaron de alguna u otra forma en mi proyecto y que fueron una gran alegría en mi vida.

A **Xim** que más que ser mi compañera es mi amiga, me apoyaste en todo momento, fuiste cómplice de travesuras y rebeldías en las muchas horas de trabajo y estuviste en situaciones muy felices y también difíciles gracias hermana por los detalles y las metas compartidas.

A la **facultad de Química** por haberme dotado de todos los conocimientos y de la formación profesional.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, UNAM, por su apoyo generoso y desinteresado durante mis estudios de licenciatura -y desde luego en muchas otras ocasiones a través de sus múltiples instancias y programas.

Finalmente a **Odín** mi fiel compañero y amigo que estuvo en todo tiempo y camino que pasé para lograr esta meta, que estudió, que se desveló y que sufrió junto a mí pero que a la vez disfrutó los logros alcanzados.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Salud y alimentación.....	2
1.2 Enfermedades asociadas a alimentos	2
1.3 Tratamiento de enfermedades transmitidas por alimentos	4
1.4 Clasificación de los antibióticos.....	4
1.5 Resistencia a antibióticos.....	6
1.6 Alternativas al tratamiento de enfermedades infecciosas	7
1.7 Enzibióticos	8
II. ANTECEDENTES.....	11
2.1 Bacterias ácido lácticas.....	11
2.2 Compuestos sintetizados por BAL	11
2.3 <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	15
2.4 Proteína de 110 kDa	15
2.5 Proteína 99 kDa	16
III. HIPÓTESIS.....	20
IV.OBJETIVOS.....	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivos particulares.....	20
V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	21
5.1.1 Cepas	22
5.1.2 Medio MRS modificado.....	22
5.1.3 Crecimiento y obtención de células de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.....	23
5.1.4 Purificación parcial.....	23

5.1.5 Cuantificación de proteína	24
5.1.6 Determinación del perfil electroforético y de actividad lítica por zimogramas	24
5.1.7 Determinación actividad lítica por difusión en agar.....	25
5.1.8 Purificación por cromatografía	26
5.1.9 Preparación muestra.....	26
5.1.10 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	26
5.1.11 Cromatografía de afinidad	27
5.1.12 Identificación de la proteína purificada.....	27
5.2 SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL.....	28
5.2.1 Estabilidad térmica.....	29
5.2.2 Estabilidad al pH.....	29
5.2.3 Efecto de Inhibidores	30
5.2.4 Efecto de iones metálicos	30
5.2.5 Actividad de endopeptidasa.....	31
5.2.6 Actividad de muramidasa.....	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1 PRIMERA PARTE EXPERIMENTAL	33
6.1.1 Determinación de la concentración de proteína.....	33
6.1.2 Determinación del perfil proteico y de actividad lítica en gel de la fracción con actividad de peptidoglucano hidrolasa	33
6.2 PURIFICACIÓN	34
6.2.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica	34
6.2.2 Columnas Fenil Sefarosa.....	37
6.2.3 Columna Octil Sefarosa	38
6.2.4 Columna Butil Sefarosa	40

6.2.5 Cromatografía de afinidad	42
6.3 SEGUNDA PARTE EXPERIMENTAL.....	48
6.3.1 Actividad y estabilidad térmica.....	48
6.3.2 Actividad y estabilidad frente a diferentes pH	50
6.3.3 Efecto de Inhibidores	52
6.3.4 Activadores y efecto de iones metálicos	53
6.3.5 Especificidad por sustrato.....	55
VII CONCLUSIONES.....	57
VIII. REFERENCIAS.....	58

RESUMEN

La dificultad para el control de enfermedades transmitidas por alimentos y el incremento en la resistencia bacteriana a los antibióticos han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y tratamiento de este tipo de enfermedades. El empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) para prevenir la contaminación de alimentos con bacterias patógenas se ha usado por muchos años. El mejor conocimiento de la amplia gama de sustancias con actividad antibacteriana que producen lleva a usarlas en nuevas aplicaciones. Un ejemplo lo constituyen las enzimas peptidoglucano hidrolasas (PGH), que hidrolizan el peptidoglucano de la pared celular bacteriana causando la lisis celular. En la BAL *P. acidilactici* ATCC 8042 se han reportado dos proteínas con actividad de PGH, de 110 y 99 kDa. Sus propiedades bioquímicas se desconocen, por lo que es necesario purificarlas. La proteína de 110 kDa presenta una región conservada similar a un transportador de tipo ABC, que tiene un carácter hidrofóbico; en tanto en la proteína de 99 kDa se reconocen secuencias con función de amidasa, glucoamidasa y una región rica en L-asparagina que le confiere un carácter hidrofílico.

En el presente trabajo se trató de aprovechar estas diferencias para separar a estas dos proteínas por medio de técnicas cromatográficas. A partir de un sistema de concentración por ultrafiltración se obtuvo una fracción semipura. Al pasarla por las columnas hidrofóbicas, se encontró que las enzimas sufren degradación al interaccionar con los diferentes ligandos empleados, pero determinadas regiones conservan actividad lítica. Se realizó una caracterización bioquímica preliminar empleando técnicas zimográficas para detectar diferencias de comportamiento entre las dos proteínas. La máxima actividad lítica ocurrió a 37°C y a un pH de 4, el compuesto que inhibió la actividad lítica de la fracción proteica fue EDTA y ésta no se ve afectada drásticamente por los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} . No se logró detectar alguna diferencia entre las dos bandas. La fracción semipura presentó actividad de muramidasa y endopeptidasa.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Salud y alimentación

La alimentación es una actividad básica del hombre, la cual está estrechamente vinculada con el estado global de salud de los individuos. Por medio de los alimentos se obtienen todos los nutrientes esenciales que aportan tanto elementos estructurales como energía al cuerpo, necesarios para el óptimo desarrollo y mantenimiento celular. La preocupación entre la relación alimentación y salud es cada vez mayor entre los consumidores, no sólo por el creciente consumo de alimentos poco nutritivos, sino por la falta de inocuidad en los alimentos que se consumen. Un problema grave extendido a nivel mundial es la incidencia de enfermedades debidas al consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos (Herrera-Monteache *et al.*, 1999).

1.2 Enfermedades asociadas a alimentos

Las enfermedades asociadas al consumo de los alimentos contaminados, se han denominado Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) y se definen como cualquier síndrome originado por la ingestión de productos alimenticios que contengan agentes patógenos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor, a escala individual o como grupo poblacional. Tales padecimientos no sólo ocasionan daño a la salud, sino emocional y económico (gastos médicos) (Bravo, 2004). Los agentes responsables de dichas enfermedades son bacterias, virus, hongos, parásitos, toxinas, sustancias químicas, metales y sustancias que pueden provenir de herbicidas o fertilizantes. Se han descrito más de 250 enfermedades diferentes transmitidas por alimentos y los síntomas varían dependiendo del agente causal y de la dosis en la que esta se presente (Rosas y Acosta, 2001). Estas enfermedades se han clasificado como infecciones, intoxicaciones y toxiinfecciones (Bravo, 2004).

Las infecciones alimentarias se producen por la ingestión de alimentos que tienen cuentas elevadas de microorganismos patógenos, tales como bacterias, virus, hongos, protozoarios y helmintos que pueden desarrollarse en el intestino con la consecuente alteración de su funcionamiento. La tabla 1 muestra algunos ejemplos de microorganismos causantes de enfermedades asociadas a alimentos.

Tabla 1. Ejemplos de diferentes patógenos que causan ETA's (Tomado y adaptado de Mead, 1999)

Tipo de patógeno	Bacterias	Parásitos	Virus
Ejemplos	<p><i>Campylobacter</i> spp.</p> <p><i>Salmonella</i> spp.</p> <p><i>Staphylococcus</i> spp.</p> <p><i>Clostridium perfringens</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Shigella</i> spp.</p> <p><i>Listeria monocytogenes</i></p> <p><i>Yersinia enterocolitica</i></p> <p><i>Vibrio</i> spp.</p>	<p><i>Cryptosporidium parvum</i></p> <p><i>Cyclospora cayetanensis</i></p> <p><i>Giardia lamblia</i></p> <p><i>Toxoplasma gondii</i></p> <p><i>Trichinella spiralis</i></p>	<p>Virus parecidos al Norwalk</p> <p>Rotavirus</p> <p>Astrovirus</p> <p>Virus hepatitis A</p>

Las intoxicaciones alimentarias se producen por la ingestión de toxinas que se encuentran en tejidos de plantas o animales o que derivan de la actividad metabólica de microorganismos presentes en el alimento. La toxiinfección alimentaria ocurre como resultado del consumo de un alimento con niveles elevados de microorganismos que, después de ser ingeridos, producen toxinas causantes de la enfermedad (Bravo, 2004).

Los agentes más frecuentes de ETA's son de origen bacteriano (OMS, 1995) ya que se pueden propagar rápidamente y, en la mayor parte de los casos, causan enfermedades diarreicas que pueden ir desde leves a severas con complicaciones graves, como son la colitis hemorrágica, infecciones de la sangre, meningitis, insuficiencia renal, entre otras (www.fda.gov). Las especies bacterianas que mayor incidencia presentan son *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC) (Romero y Herrera, 2002)

1.3 Tratamiento de enfermedades transmitidas por alimentos

El proceso generalmente empleado en el tratamiento de estas enfermedades infecciosas es el uso de antibióticos, los cuales son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos que en concentraciones bajas inhiben el crecimiento de bacterias y de hongos (Jawetz, 1989).

1.4 Clasificación de los antibióticos

La clasificación más usada de los antibióticos es la que se basa en el mecanismo de acción, es decir, se ordenan en función del daño que causen a una estructura celular vital o por la inhibición de una función esencial (figura 1 y tabla 2).

Se clasifican en 4 principales grupos:

- 1) Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular
- 2) Antibióticos que alteran permeabilidad de la membrana celular
- 3) Antibióticos que interfieren en la síntesis de proteínas
- 4) Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos

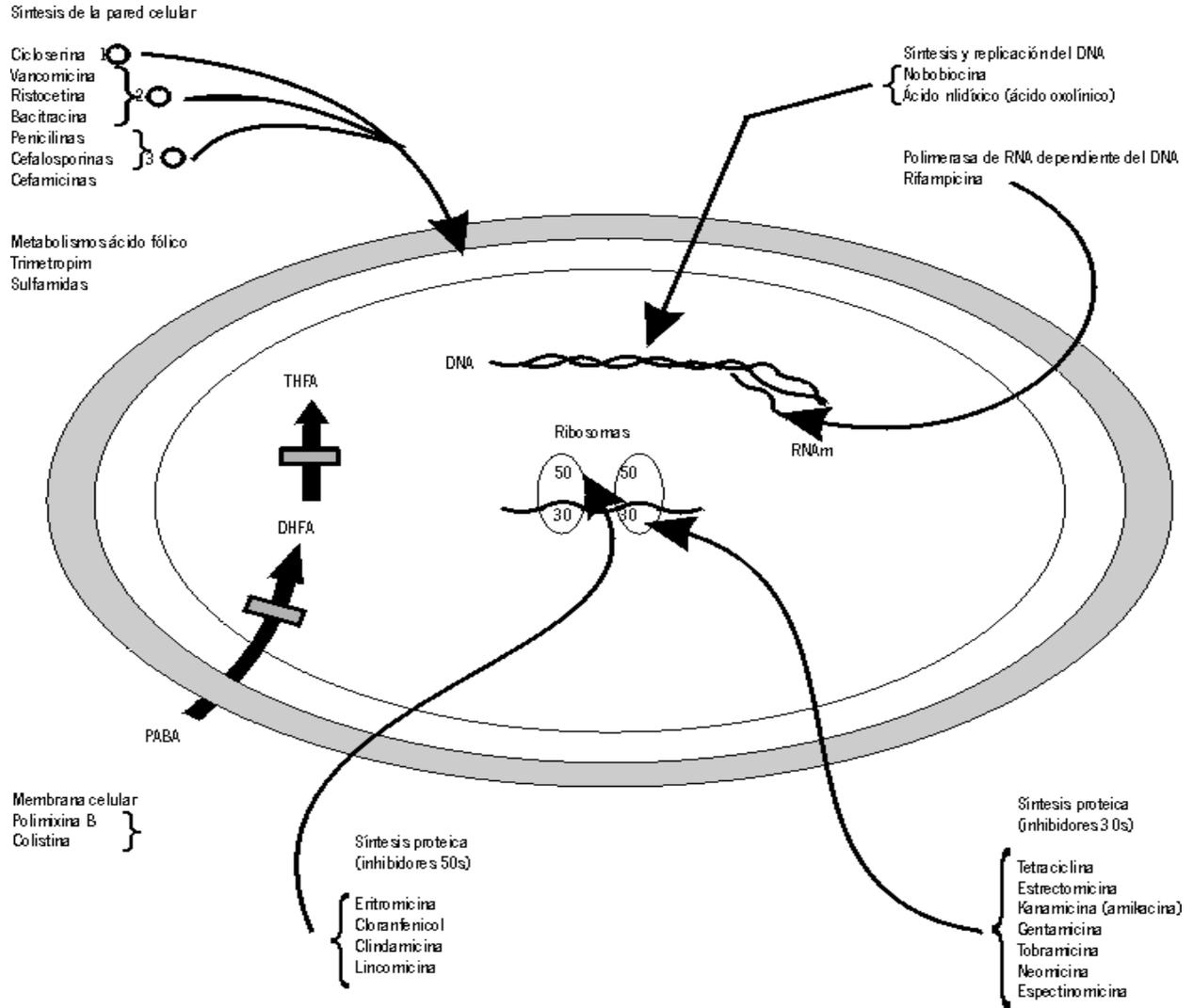


Figura 1. Clasificación de los antibióticos en función del mecanismo de acción. (Tomado de Jackson *et al.*, 1998)

Tabla 2. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción sobre la estructura bacteriana (Tomado de Greenwood, 1992).

Mecanismo de acción	Antibiótico
Inhibición de síntesis de pared celular	Penicilinas Cefalosporinas Vancomicina Tercoplanina Bacitracina
Lesión en la permeabilidad de la membrana celular	Polimixinas Colistinas Nistatina Anfotericin B
Inhibición de la síntesis proteica	Cloranfenicol Tetraciclina Aminoglicosidos Lincomicinas Eritromicina
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas Sulfonamidas Rifampicina Trimetropin

1.5 Resistencia a antibióticos

El uso de estos agentes antimicrobianos ha sido un suceso importante ya que se han podido controlar las enfermedades infecciosas con una mayor eficacia. En la actualidad se calcula que aproximadamente el 37% de personas que presenta una infección reciben tratamiento con algún antibiótico (Serna *et al.*, 2011) por lo que en las últimas décadas se han desarrollado numerosos compuestos de esta índole. Sin embargo el uso indiscriminado de éstos es la causa más importante del desarrollo de resistencia bacteriana.

Existe una clara correlación entre el uso de antibióticos y la prevalencia de cepas resistentes (Budnitz, 2008). Un ejemplo de esto es el caso de *S. aureus* resistente a meticilina (figura 2) el cual ha tenido un aumento considerable de las cepas resistentes en los últimos años.

El problema de resistencia bacteriana crea una necesidad cada vez mayor de nuevos fármacos, que a su vez perderán eficacia por el desarrollo de cepas resistentes. En consecuencia, se encarecerán los tratamientos médicos, aumentará la incidencia de enfermedades infecciosas, con el consecuente incremento en la estancia de pacientes en los hospitales (Wyatt *et al.*, 1990).

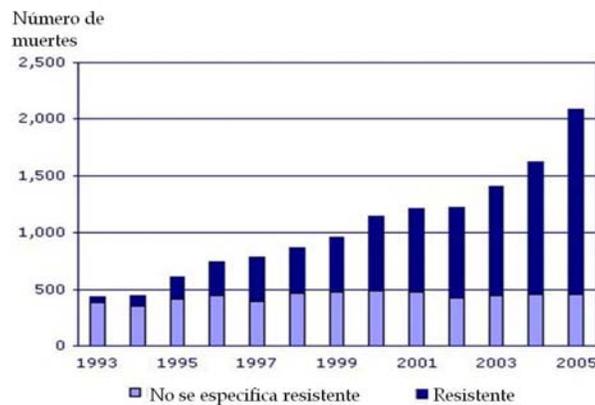


Figura 2. Incidencia de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (Tomado de National Office of Statistic England at Wales. 2005).

1.6 Alternativas al tratamiento de enfermedades infecciosas

Dada la dificultad para el control y vigilancia de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias resistentes a antibióticos, ha surgido la necesidad de buscar y emplear nuevas alternativas para la prevención y tratamiento de este tipo de enfermedades.

1.7 Enzibióticos

Recientemente se han demostrado que ciertas proteínas de bacteriófagos tienen actividad contra la pared celular bacteriana. Estas enzimas, llamadas endolisinas (también conocidas como enzibióticos), se han utilizado para el tratamiento y prevención de infecciones principalmente por bacterias Gram positivas. Los fagos producen estas endolisinas en la etapa final de ciclo viral tras la infección a la bacteria. Una vez traslocadas a la pared celular, por lo general mediante proteínas de membrana (holinas), estas enzimas se unen al peptidoglucano y rompen los enlaces requeridos para su estabilidad, producen la lisis de la bacteria y en consecuencia la liberación de los fagos formados dentro de la célula (figura 3).

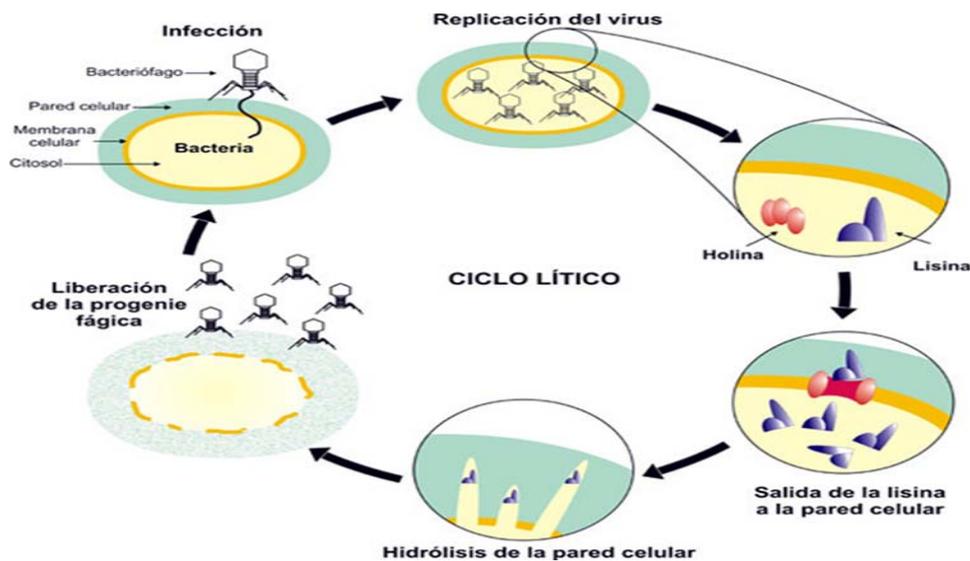


Figura 3. Esquema de ciclo lítico de los bacteriófagos (Tomado de www.madrimasd.org).

La actividad lítica de estas endolisinas está en función de la especificidad en el sitio de corte del peptidoglucano (figura 4). Estudios recientes sobre cristalografía y mecanismos moleculares han demostrado que estas enzimas cuentan con dos dominios funcionales, uno de unión o anclaje a la pared celular y otro módulo catalítico, que rompe los enlaces del peptidoglucano. Además, se ha obtenido una idea sobre la organización molecular y el mecanismo de reconocimiento de estas enzimas fágicas en la pared celular.

Tal es el caso de la lisina PlyB, la cual tienen actividad de muramidasa y muestra potente actividad lítica contra *Bacillus anthracis* ATCC 4342, cepa productora de esporas de ántrax (Porter *et al.*, 2007). No hay estudios que indiquen que las endolisinas ocasionen resistencia, ya que entre fagos y bacterias el dominio de unión ha evolucionado a una molécula única que permite la interacción entre las enzimas líticas y la pared celular, por lo que podrían ser una alternativa potencialmente segura para contrarrestar el problema de resistencia a antibióticos (Fischetti, 2005).

Se han purificado a la fecha varias endolisinas fágicas y se han evaluado como agentes antiifecciosos. En 2006 la FDA aprobó una mezcla en spray de seis fagos purificados que podrían ser utilizados como aditivo alimentario en cárnicos, específicos para matar a *Listeria monocytogenes*. Estos enzibióticos tienen un amplio rango de aplicación desde los tratamientos médicos, agricultura y biotecnología (Hermoso *et al.*, 2007).

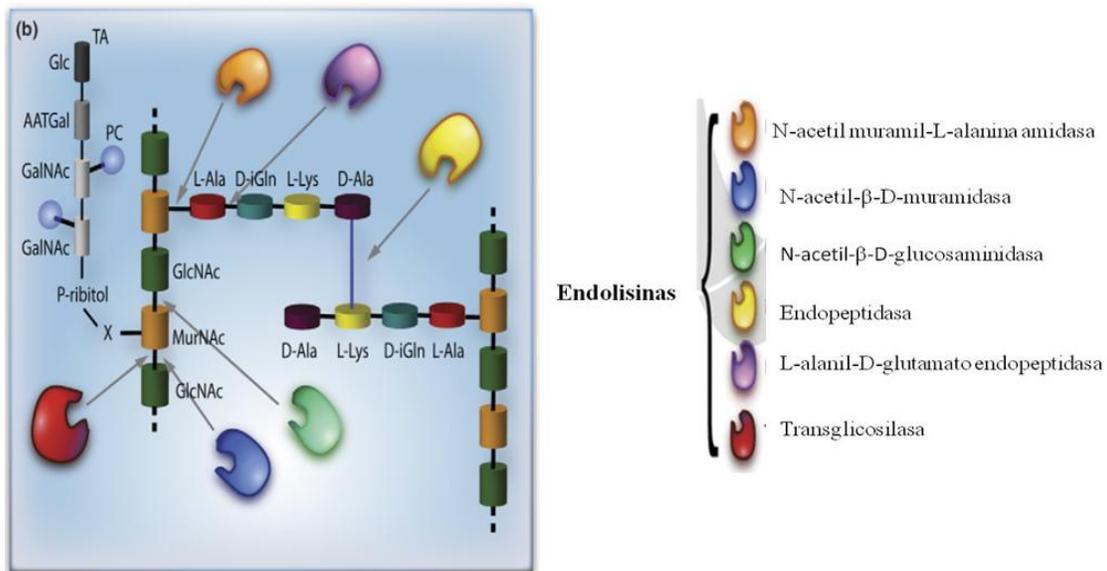


Figura 4. Estructura de peptidoglucano en *Streptococcus pneumoniae* y sitios de corte de las endolisinas. Peptidoglucano formado por cadena de alternadas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetil-murámico (MurNAc). Ácidos Teicoicos (TA), Fosforilcolina (PC). Los diferentes enlaces hidrolizados por las endolisinas se indican con flechas. (Tomado y modificado de Hermoso *et al.*, 2007).

La capacidad de las bacterias ácido lácticas para producir sustancias antibacterianas, aunado al hecho de que se han designado como bacterias seguras o GRAS- Generally Recognized as Safe (Barbosa-Canovas *et al.*, 1998) ha llevado a que en el presente trabajo se proponga el uso de un metabolito primario la BAL *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como medida preventiva de contaminación en alimentos. Esta cepa tiene gran importancia económica ya que, de forma natural o añadida intencionalmente, desempeña un papel importante en la fermentación y maduración de alimentos como los embutidos y quesos. Este metabolito es una enzima con actividad antibacteriana y tiene un potencial de aplicación en empaque, soluciones desinfectantes, aditivos y conservadores.

II. ANTECEDENTES

2.1 Bacterias ácido lácticas

Una alternativa empleada para prevenir la contaminación de alimentos por bacterias patógenas es el empleo de bacterias ácido lácticas durante su procesamiento. Las bacterias ácido lácticas (BAL) se utilizan como cultivos iniciadores y para la bioconservación de los alimentos. Tienen gran importancia económica ya que desempeñan un papel importante en la fermentación de una gran variedad de alimentos. Las actividades metabólicas de las BAL no sólo contribuyen al desarrollo de características organolépticas deseables sino también permiten conservar la inocuidad de la materia prima y aumentan la vida de anaquel de los productos en los que se emplean (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998).

2.2 Compuestos sintetizados por BAL

- a) Ácidos orgánicos. El resultado de la fermentación de las hexosas por la vía heterofermentativa es una gama de moléculas orgánicas, que tienen actividad antibacteriana, y las más comunes son el ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico (figura 5). Se ha observado que ciertos ácidos débiles tienen mayor actividad antibacteriana a bajo pH que a un pH neutro. Entre el ácido acético y propiónico, el primero es el inhibidor más fuerte y tiene un amplio espectro de actividad inhibitoria, pues actúa sobre levaduras, hongos y bacterias, mientras que el ácido propiónico ejerce un fuerte efecto sobre levaduras y hongos. Esta fuerte actividad antibacteriana de estos dos ácidos puede explicarse en parte por su alto pK_a comparado con el ácido láctico (Salminen *et al.*, 2004).

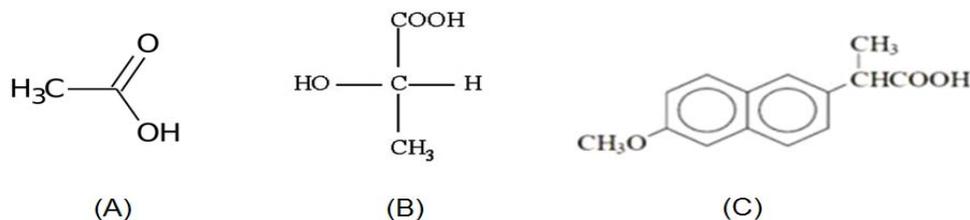


Figura 5. Ácidos orgánicos. (A), Ácido acético. (B), Ácido láctico. (C), Ácido propiónico.

- b) Bacteriocinas. Son sustancias pequeñas (no mayores a 30 kDa), de naturaleza peptídica, lineales o circulares, que se pueden presentar en una amplia gama de secuencias y con mecanismos de acción diferentes.

Las bacteriocinas pueden ser reconocidas como antibióticos y algunas de sus características principales son: (a) se sintetizan en el ribosoma, (b) la célula productora es inmune a éstas y (c) tienen un reducido espectro bactericida, generalmente es posible que maten bacterias relativamente cercanas a la cepa productora. Pueden usarse como “drogas blanco” hacia patógenos específicos sin interferir con la microbiota benéfica (Salminen *et al.*, 2004).

Además pueden limitar el uso de antibióticos en cierto grado y retrasar así la evolución de la resistencia a antibióticos (Nagel, 2007). Las bacteriocinas pueden clasificarse en tres grupos según Cotter *et al.*, (2005) (tabla 3).

Tabla 3. Clase de bacteriocinas producidas por BAL (Cotter *et al.*, 2005)

Clasificación	Descripción	Ejemplos
Clase I. bacteriocinas que contienen lantionina/lantibióticos	Incluyen lantibióticos de uno o dos péptidos; más de 11 subclases pueden ser incluidas	Nisina
Clase II. Bacteriocinas que no contienen lantionina	Es una clase heterogénea de pequeños péptidos; incluye los tipos pediocina, de dos péptidos, cíclicas y no pediocinas de péptidos lineales	Pediocina PA1, pediocina AcH/PA-1, enterocina
Bacteriolisinas. Proteínas líticas no bacteriocinas	Proteínas termolábiles y de peso molecular alto	Enterolisina A

- c) **Proteasas.** Las bacterias ácido lácticas son conocidas por poseer una gran variedad de enzimas proteolíticas, capaces de utilizar las proteínas como una fuente de nitrógeno para garantizar su crecimiento durante la fermentación.

La proteólisis es uno de los fenómenos más importantes que contribuyen al sabor y textura de productos cárnicos madurados y de productos lácteos, en el caso de estos últimos la degradación de proteínas lácteas genera péptidos y aminoácidos precursores de compuestos de sabor y que también pueden ser péptidos antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos están constituidos por cadenas cortas de aminoácidos con características hidrofóbicas y carga positiva, lo que les permite alterar la bicapa lipídica de los microorganismos, causando una modificación similar a la producida por las proteínas de canal, lo cual conlleva a la muerte de la célula debido a la pérdida de iones y sustancias metabólicas (Villaruel *et al.*, 2004). Se han descrito péptidos originados a partir de la hidrólisis de proteínas u oligopéptidos del lactosuero, como la kappacina, fragmento del glicomacropéptido, caracterizado por poseer un residuo fosforilado de serina (Ser) y por acumularse sobre la membrana celular formando un poro aniónico, lo que lo hace un potente péptido antibacterial contra bacterias Gram-positivas (*Streptococcus mutans*) y Gram-negativas (*Pseudomonas gingivalis* y *E. coli*) (Rizello *et al.*, 2005).

- d) Peptidoglucano hidrolasas (PGH) son otro tipo de enzimas líticas algunas de ellas son producidas por BAL, llamadas también autolisinas las cuales hidrolizan los enlaces glucosídicos o peptídicos del peptidoglucano de la pared celular de bacterias causando la lisis celular. Dependiendo del tipo de enlace del peptidoglucano que hidrolicen, las PGH se pueden clasificar en: *N*-acetilmuramidasa, (muramidasa), *N*-acetilglucoamidasa (glucoamidasa), *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa (amidasa) y endopeptidasas (figura 6). Se ha reportado que algunas bacterias poseen autolisinas con más de un tipo de actividad o diferentes autolisinas con la misma actividad (Østlie *et al.*, 2007).

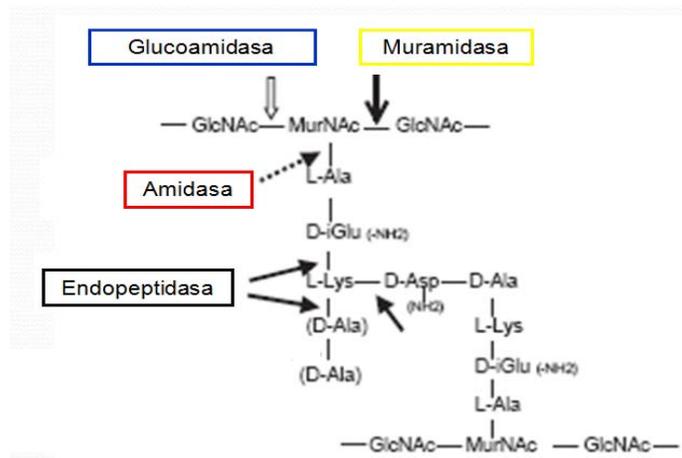


Figura 6. Clasificación de PGHs dependiendo del enlace que hidrolizan en la pared celular (Tomado y modificado de Lortal *et al.*, 2005)

Un ejemplo de actividad de PGH se presenta en *Lactobacillus pentosus*. En la fracción extracelular la actividad fue detectada en la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo (16 h), que mostraron actividad en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a los 31, 58 y 112, otra fracción, la fracción citosólica presentó actividad a los 31, 43, 58, 77, 95 y 112 kDa, concluyendo probablemente que este tipo de enzimas se encuentran adheridas a membrana y posiblemente tienen diferentes actividades que le confirieren mayor capacidad lítica (Cibik y Chapot-Chartier, 2004).

Otro ejemplo de PGH es la lisostafina, enzima estafilocócica que tiene actividad de endopeptidasa, secretada por *Staphylococcus simulans* y que tiene una alta especificidad sobre la pared celular de *S. aureus*, ya que rompe el enlace de pentaglicina característico del peptidoglucano en este microorganismo (Fedorov *et al.*, 2003). Actualmente la lisostafina es una enzima que es comercializada y empleada en el sector de análisis microbiológico. Se ha logrado producir estas enzimas en algunas cepas del género *Lactobacillus*, lo que tiene un efecto antimicrobiano sinérgico, muy útil en la bioconservación de productos alimenticios (Turner *et al.*, 2007). También se ha realizado estudios en la producción de esta enzima en vacas para evitar infecciones intramamarias (Wall *et al.*, 2005),

2.3 *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

P. acidilactici ATCC 8042 es una BAL Gram positiva, de la familia *Lactobacillaceae*, tiene forma de coco y se agrupa en pares o tétradas siendo no patogénica. Es homofermentativa usada en la preparación de cultivos iniciadores, se sabe que produce un efecto de bioconservación en salamis (Llorente *et al.*, 1998). En esta cepa se han reportado enzimas con actividad de peptidoglucano hidrolasa (PGH). Esta actividad se ha encontrado en diferente localización celular: se reportó actividad intracelular a los 45, 110 y 116 kDa, la cual fue relacionada con la autólisis del microorganismo, pues las cepas analizadas presentaron un alto grado de autólisis después de 48 h de incubación a 37°C (Mora *et al.*, 2003). Llorente y cols. reportaron actividad extracelular ya que detectan una banda muy tenue a los 116 kDa en zimogramas utilizando *M. lysodeikticus* y *S. aureus* (Llorente *et al.*, 2008).

En un trabajo más reciente se reportó actividad lítica adherida a membrana donde la mayor actividad fue detectada a las 8 h de crecimiento del microorganismo y con un amplio espectro antimicrobiano contra diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas (Velasco-Pérez, 2010). Tras diversos intentos de identificación, se encontraron dos proteínas con actividad lítica en un peso molecular aproximado de 99 y 110 kDa, con un total de aminoácidos de 927 y 1065 respectivamente (García-Cano *et al.*, 2011).

2.4 Proteína de 110 kDa

La secuencia de la proteína de 110 kDa (figura 7) corresponde a una proteína putativa del mismo peso molecular presente en el genoma de *P. acidilactici* 7_4, con función desconocida y que contiene una región conservada de transportador tipo ABC (García-Cano *et al.*, 2011).

1 MVRKEWKFIR NNKLILISVL AIIFIPFLYS IFFLKSVWDP YGDTKNLPVA VVNLDPVKY QGQRLAVGDE MVDNLKHHHQ
81 LGWHFVSAKK AKEGMDKKY YTVVTIPKDF SANAATVTDK NPKKMQLKYS TNASLNYIGK VISDVGTEKL NSEVREQVTK
161 SYATAMFDQV KTAGKGFKA SDGAKKLDG AVQLNDGTKT YTAGVSQLHD GIATMAVSVK PLQAGVAQLA DGSSQLTNGL
241 DQLNGKTGAL SSGVSQLANG SGQVTTGAVA LSKGLNELQQ KSGALVTGVS QLNNGALQLK VKVPQYVNGV YQLNDGIQEL
321 NAKTGQLVGG IKQLSSGAGA LSAGVKQYTD GVSAGAGQLQ GGVAKLANDT KMPSSINAL HNGIADIACS SKQLADANGK
401 ISTGLGQVAD QVSANDISKQ AAALKQOMAS IQTQLVALNK ATAGQTNGGN AAQSINNQLS EIKSEVGSLS NSSKTTTSTS
481 GGVSQATINS KIDGAGLSAE DAAKAKSALA GVANGSQNKT TSQTVDTNKI ASIQQKITDV QGQVTKLNDL ANKQAEINKQ
561 VTSLTASFQK LAAGANELTG NSDDMKQLAA TLKKLAAGSQ EVTTNLQALS SGSNTVAGKV GEFAGSASEL TDGVAQLDSG
641 AKSLASQTNK NSKDVKKLVS GSQELSSSLA MLDKQTPTLQ SKIGQLAAGS NQISAGTGAL AGGINQLSNG ISAASSQMPT
721 LVSGVSLLAN GGNQLAAGSS QVTGGLNTLN GQVPALVSGV AQLDNGGHQL NTGIQTLNSS TGTILINGVNQ LNTGAAELDA
801 NSGALLDATK QISDNGELS SKLADGAKQV NSVPLTDKTA NMFAAPTCLK HTNYSYVPHY GHALAPYVLS **LALYVGAIVF**
881 **NFAYPIRKVS ERGGTPTQWF LSKVSVGTVV ALGMALVETT IMMIAGIHVD HVGQFYMTAI MISLASMYIV MFLSMAFDNP**
961 **GRFVAMILLM LQLGGSGGTF PMEVTNHFFYN VIHFFLPLTY SILSFRQAIT SGLGDGTFFQ AMGALLLFAV IALALLWFSM**
1041 **NQLQKHLEN KSQDDNQLQ QEVER**

Figura 7. Secuencia de la enzima de 110 kDa presente en el genoma de *P. acidilactici* 7_4. Función desconocida con región conservada a un transportador ABC (línea roja) y región de alta hidrofobicidad (secuencias en negritas).

2.5 Proteína 99 kDa

Para la proteína de 99 kDa se reconocen regiones con función de amidasa, glucoamidasa y además regiones muy conservadas de unión a carbohidratos y una región de unión a Zn²⁺ (figura 8).

```

1 MFKSGKKWAF ASIATASLGL VALNTNAEKA HADSDAQANT NSASQLDQQT KTAPVNEKQV TLAKPATVKA SSAAVTAQSA
81 APAPSAAQSA AKVNADSTAK ADQHSAAKV GTKATTSSAV KPAKEAASAN AVKAAPASSA AKKVSTSVAS SAAPSSAASK
161 TVTSAAVKDS AAKEAVSSAA NVKSSSAAK TSVNSSAVSE AAKKDAKAEK TAEKKTDNSS KDYDNTYR LADNEGSDQK
241 TNNKIIVAHA VGQYSSARDV AIYEKREWDS SETYVQYIVG DGGRVYAVGE EGYVAVGAGK WANENAPVQV ELAQYSDSQ
321 FKKDYQTYVN LLRDSAKKWN IPTTLDSEY TGIKSHVWVT EHVWGNHVDP YGYLGTHGIT KEQFAHDLAY GFDNDAANDN
401 QNNNQNDNHQ NDNQNNQNNN HQNDSSNNHG NQNNQSYHVG DKVTIKNSAS HWATGQSIYN GVKGHTYKII QTNGHKLLLD
481 QVISWINDGD VYKAGSNSGS SNNHNNHHTT NNADIKVGTV VTINNNASHW ATGQSIYSGV KGKSYKVIQT NGNRLLLDKV
561 ISWINKGDVH VPGSNNNNN SGNQNHNGN NHNNNGNTES IHVGSKVTIN NNAKRWATGQ NIYSGVKGKT YTVIQMNGSR
641 LLLDKVISWI NKGDVHLPGS NGSQNNNNN NNHANNDGT IRVGTNVTIK PSAKRWATGQ NIYGVKGKT YKVIQMNGNR
721 LLLDKVISWI NKGDVYVPGS SNNNNSNSN NHNNNGSNYH FTNQNWTAQ TNFVNSIASD VMNVCQNNHL YASVAMAQAV
801 VESAYGASTL AQEAHNLFGI KADSTWHGAT YTKNTQEVIN GRVVTISAAF RKYDSFKDSI ADYAKKLESR PQYANAFSNH
881 AHNYVESVKA IKAGGYATAP TYVSSIVNCI NNYGFYKLDG LNSAISL

```

Figura 8. Secuencia de la enzima de 99 kDa presente en el genoma de *P. acidilactici* 7_4 con función de N-acetilmuramudasa (línea azul) y N-acetilglucosaminidasa (línea roja) con una región rica en L-asparagina (líneas punteadas).

Las dos secuencias mostraron diferencias en su carácter hidrofóbico. Por medio de un análisis con el programa ProtScale, utilizando una escala de hidrofobicidad (Kyte-Doolittle) (Gasteiger, 2005), con la que se indica que las regiones con valores por encima de 0 (línea roja) son regiones hidrofóbicas y las regiones por debajo de este valor son regiones con carácter hidrofílico. La gráfica de la proteína de 110 kDa (figura 9) presenta una zona de hidrofobicidad situada en el extremo carboxilo terminal, donde se encuentra la región del transportador tipo ABC. A diferencia de la gráfica de la proteína de 99 kDa (figura 10) que tiene un carácter hidrofílico posiblemente porque la secuencia presenta un número elevado de aminoácidos L-asparagina (aminoácido polar sin carga) que le confiere mayor polaridad a la proteína.

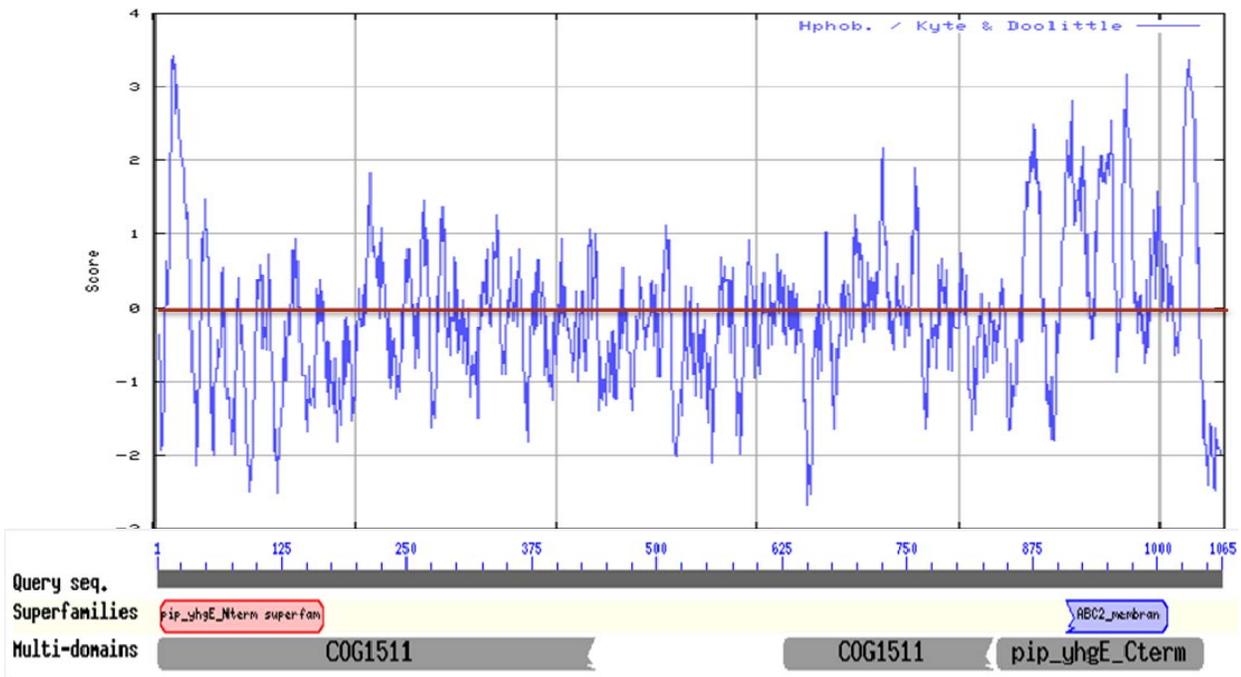


Figura 9. Carácter hidrofóbico de la proteína de 110 kDa situado en el extremo carboxilo de la molécula.

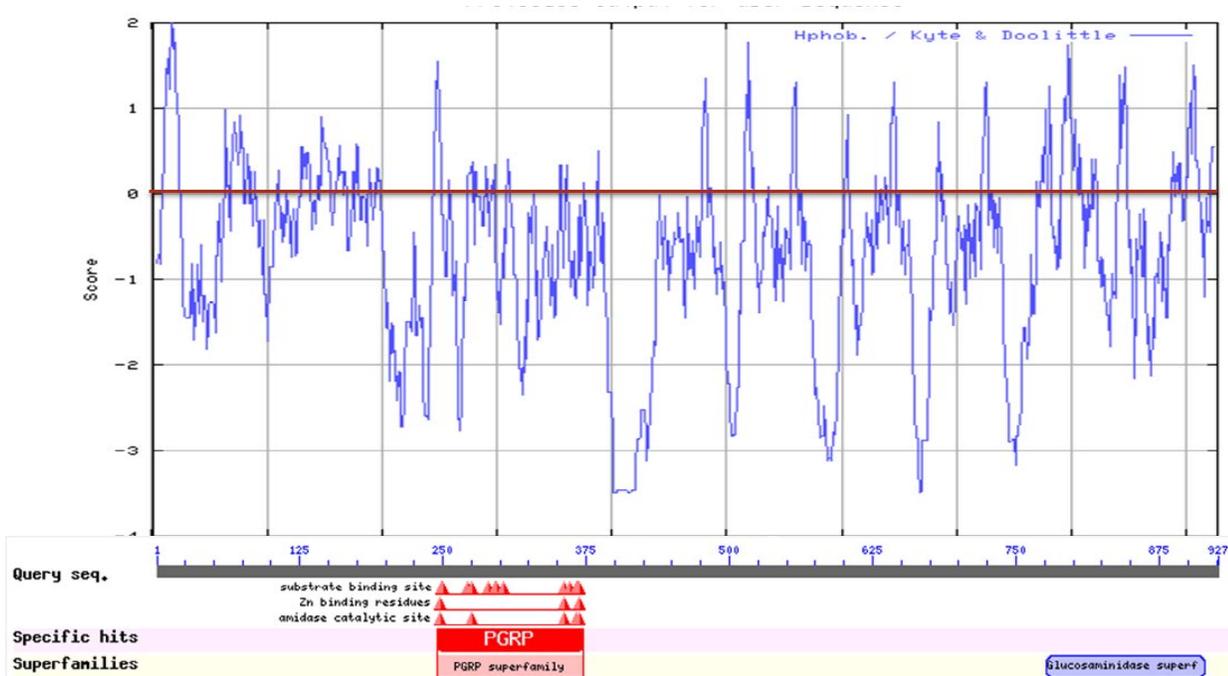


Figura 10. Carácter hidrofílico de la proteína de 99 kDa.

Se conocen los puntos isoeléctricos teóricos de ambas proteínas, que son de 9.18 para la enzima de 110 kDa y 9.27 para la de 99 kDa, lo cual dificultaría la purificación por cromatografías de intercambio iónico y exclusión molecular, ya que los pesos moleculares y puntos isoeléctricos son valores muy cercanos.

De acuerdo a lo descrito anteriormente es importante el estudio y caracterización de este tipo de enzimas para valorar su potencial de aplicación como bioconservadores en el sector alimenticio, en este análisis es importante la purificación, considerando que teóricamente existen diferencias en la naturaleza hidrofóbica-hidrofílica de estas dos enzimas, en este trabajo se expondrán los resultados de la purificación por medio de técnicas cromatográficas: cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de afinidad y posteriormente se presentaran los resultados de la determinación de las condiciones óptimas de actividad de cada una de las enzimas en función de temperatura, pH, iones metálicos, inhibidores y especificidad por sustratos.

III. HIPÓTESIS

Entre las diferencias que existen entre las dos proteínas con actividad de PGH producidas por *P. acidilactici* ATCC 8042 están el sitio de unión a carbohidratos en la de 99 kDa y la presencia de la región hidrofóbica en la de 110 kDa. Por lo tanto, será posible implementar un proceso de separación aprovechando estas características para posteriormente determinar sus características bioquímicas.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Purificación de las dos enzimas PGH de *P. acidilactici* por medio de técnicas cromatográficas para su posterior caracterización.

4.2 Objetivos particulares

Establecer las mejores condiciones de purificación para las dos enzimas activas.

Determinar cuál es la columna cromatográfica más eficiente para realizar la separación de las dos proteínas.

Caracterizar las dos enzimas con actividad de peptidoglucano hidrolasa de *P. acidilactici* en función de pH, temperatura, inhibidores, iones metálicos y afinidad por sustrato.

V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 PRIMER FASE EXPERIMENTAL

•Obtención de la fracción parcialmente pura con actividad
lítica de PGH

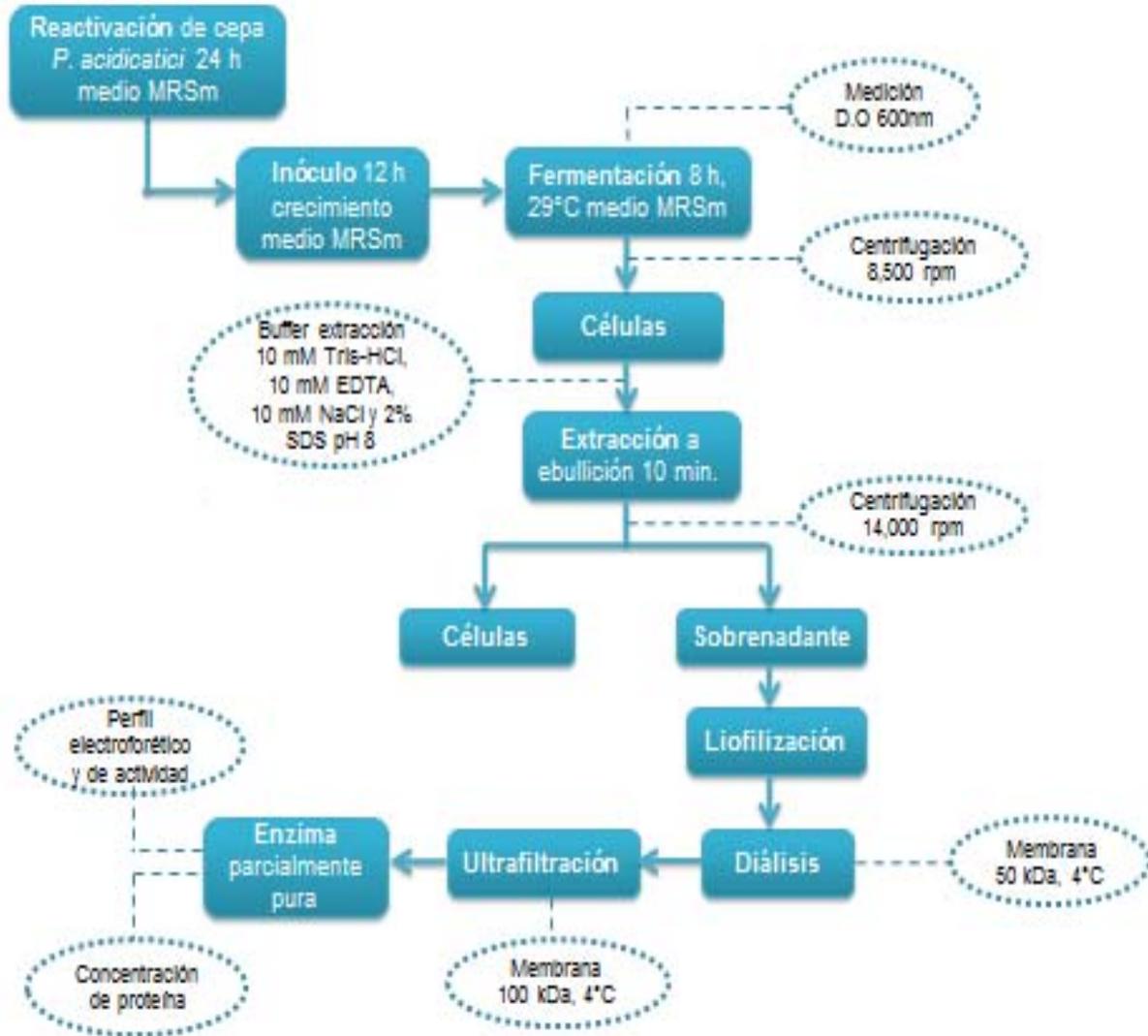


Figura 11. Diagrama de trabajo de la fase experimental 1A. Obtención y purificación parcial de PGH de *P. acidilactici* ATCC 8042 propuesto por Velasco-Pérez (2010).

5.1.1 Cepas

P. acidilactici ATCC 8042 fue obtenida del cepario del CINVESTAV, México. Las células se almacenaron a -20°C en viales de 1.5 mL con esferas de vidrio y en caldo MRS (DeMan Rugosa and Sharp, Oxoid) con glicerol (80-20 %, v/v). Las células de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 fueron obtenidas de Sigma-Aldrich, USA. *S. aureus* ATCC 6538 fue obtenido del cepario de Posgrado de la FESC-UNAM. Se conservó en caldo BHI (Brain Heart Infusion, DIFCO) y glicerol (80-20 %, v/v) en viales de 1.5 mL con cuentas de plástico a -20°C.

5.1.2 Medio MRS modificado

Se pesaron y disolvieron en agua destilada los ingredientes del medio MRS modificado (tabla 4) con excepción del ácido ascórbico y la sacarosa, mismos que fueron preparados y esterilizados por separado en autoclave a 121°C/15 lbs/15 min (Yamato SM 300). Posteriormente se mezclaron todos los componentes estériles y se colocaron en un matraz Fernbach con capacidad de 2.8 L (Llorente, 1998).

Tabla 4. Formulación del medio MRS modificado.

Ingrediente	g/L	Proveedor
Extracto de carne	10.0	Oxoid
Peptona proteasa	10.0	BDifco
Extracto de levadura	5.0	Oxoid
Acetato de sodio	5.0	Mallinckrodt
Fosfato de potasio dibásico	2.0	Baker
Citrato Amonio	2.0	Merck
Sulfato de manganeso	0.25	Baker
Sulfato de magnesio	0.1	Baker
Tween 80	1.0	Sigma
Ácido ascórbico	1.5	Merck
Sacarosa	10.0	Baker

5.1.3 Crecimiento y obtención de células de *P. acidilactici* ATCC 8042

P. acidilactici se cultivó en caldo MRS modificado (MRSm) (Llorente, 1998). Se realizó un pre-inóculo partiendo de la cepa conservada a -20°C, y se adicionaron 2-3 cuentas de plástico a un tubo con 10 mL de caldo MRSm. El pre-inóculo se incubó, sin agitación, a 29°C durante 24 h (Precision Gravity Convection Incubator Modelo 4). Posteriormente se realizó una resiembra, adicionando 2% del pre-inóculo a un tubo de 10 mL con medio MRSm, el cual se incubó por 12 h bajo las mismas condiciones anteriores. A un matraz Fernbach con 1 L de medio MRSm se adicionó el inóculo de 12 h y se incubó a 29°C, por 8 h, sin agitación. Transcurrido este tiempo se midió la densidad óptica a una absorbancia de 600 nm (PERKIN-ELMER lambda 3A UV/VIS Spectrophotometer).

Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 8,500 rpm durante 20 min a 4°C (Beckman J2-MC centrifuge). El paquete celular se resuspendió con un buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 (buffer de trabajo) y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 20 min a 4°C.

El paquete celular se resuspendió en 200 mL de un amortiguador que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM y 2% SDS (buffer de extracción), se agitó vigorosamente y se colocó en baño de agua a ebullición durante 10 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 10°C. El sobrenadante se congeló a -4°C y se sometió a liofilización (Labconco, Freezone 4.5) (Velasco-Pérez, 2010).

5.1.4 Purificación parcial

La muestra liofilizada se resuspendió en 15-20 mL de buffer de trabajo y se dializó contra agua destilada con una membrana con tamaño de corte de 50 kDa (SpectraPor 7), en agitación constante a 4°C toda la noche, esto con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de SDS posible. Posteriormente se ultrafiltró hasta un volumen de 2 mL con una membrana de tamaño de corte de 100 kDa (Millipore). Finalmente la muestra se distribuyó en alícuotas de 0.5 mL y se almacenó a -20°C para su posterior uso (Velasco Pérez, 2010). A la fracción parcialmente pura se le determinó la concentración proteína, el perfil electroforético y la actividad de PGH.

5.1.5 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína de las muestras obtenidas, se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (Epoch, Biotek). Se realizó una dilución previa de la muestra 1:100 y se colocaron 160 μL de la dilución de cada muestra, en un pozo de una microplaca. Posteriormente se adicionaron 40 μL del reactivo de Bradford concentrado y se homogenizó la muestra. Se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Las mediciones se realizaron por triplicado y se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA).

5.1.6 Determinación del perfil electroforético y de actividad lítica por zimogramas

El peso molecular de la PGH se determinó por medio de SDS-PAGE, que es ampliamente usado para resolver y caracterizar componentes proteicos (Lacks *et al.*, 1980). Se prepararon geles SDS al 10% de poliacrilamida co-polimerizada con los reactivos necesarios para la elaboración del gel, Bis-acrilamida 30%, Tris- HCl_2 M, pH 8.8, SDS 10%, H_2O , TEMED y APS 10% (Bio-Rad).

Se tomó una alícuota de 30 μL de la muestra y se adicionaron 10 μL de buffer de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, 2% SDS, 2.5% glicerol, 0.5% β -mercaptoetanol y 0.5% de azul de bromofenol).

La muestra se trató a ebullición durante 5 min y posteriormente se sometió a electroforesis en gel (Bio-Rad, Power-Pac 300) a 120 V durante 2 h. Después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada en agitación suave durante 15 min, se tiñó con azul de Coomassie (0.1% azul de Coomassie R-250, 45% metanol, 10% ácido acético glacial y 45% de agua) durante toda la noche en agitación suave y finalmente el gel se destiñó con solución desteñidora (10% de metanol, 10% ácido acético glacial y 80% agua). El peso molecular de las bandas de proteína se determinó por la comparación con marcadores de alto peso molecular (Bio-Rad, catálogo 161-0303).

Para la elaboración del zimograma, se prepararon geles con SDS y 10% de poli(acrilamida co-polimerizada, con 0.2% de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* como sustrato (Leclerc *et al.*, 1989). Una vez realizada la electroforesis, como ya se describió anteriormente, el gel se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada en agitación suave durante 15 min, se adicionaron 100 mL de buffer de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 con Tritón X-100 1% v/v) y se incubó a 37°C durante 12 h en agitación suave. Finalmente el gel se tiñó con 0.01% de KOH y 0.1% de azul de metileno durante 30 min y se destiñó con agua destilada. El peso molecular de las bandas de actividad lítica fue determinado por la comparación con marcadores de alto peso molecular (Bio-Rad, catálogo 161-0303).

5.1.7 Determinación actividad lítica por difusión en agar

Para determinar el efecto antibacteriano *in vitro* se realizaron pruebas de difusión en agar con la muestra sometida a diferentes condiciones (temperatura, pH, inhibidores e iones metálicos). En estas pruebas se utilizó como microorganismo indicador *S. aureus*. En la caja petri se colocaron 20 mL de agar BHI al 1% estéril, se dejó solidificar a 4°C durante 15 min y a la caja se adicionó 10 mL de agar al 0.8% con 1×10^7 de células de *S. aureus*. Con un penicilindro se hicieron pozos sobre la doble capa de agar, a los cuales se les adicionaron 100 µg de proteína de cada muestra, por último las cajas se incubaron a 37°C por 12 h.

En todos los casos el control positivo de la prueba fue la enzima en el buffer de trabajo (pH 8.0) a la misma concentración de las muestras tratadas. Se evaluó el diámetro del halo de inhibición del microorganismo prueba y se correlacionó con la concentración de proteína colocada en cada pozo (actividad en mm de inhibición/mg de proteína).

5.1.8 Purificación por cromatografía

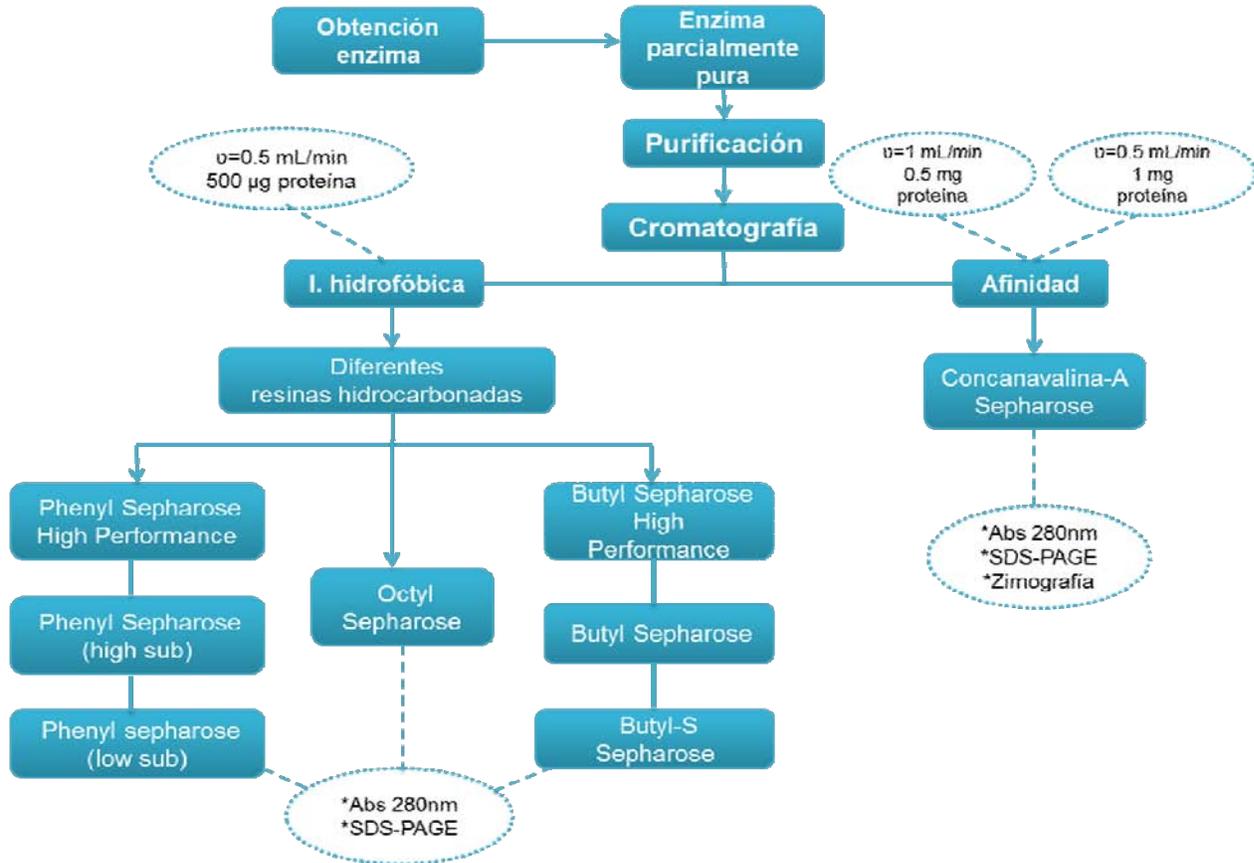


Figura 12. Diagrama de trabajo de la fase experimental 1B. Purificación de PGH de *P. acidilactici* ATCC 8042 por cromatografía.

5.1.9 Preparación muestra

La muestra obtenida del punto 5.1.4 se descongeló en baño de hielo y se filtró con una membrana de tamaño de corte de 0.20 µm Millex® (Millipore).

5.1.10 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Se utilizó un kit de selección GE Healthcare para realizar el ensayo a escala. Cada una de las columnas empleadas de volumen interno 5 mL, se equilibró con 10 volúmenes del buffer que contenía 50 mM Na₂SO₄, pH 7.0 a temperatura ambiente, se pasaron 5 volúmenes de buffer eluyente 50 mM Na₂SO₄ y 500 mM de NaCl pH 7.0, posteriormente una muestra de 500 µL, con una concentración de proteína 1 mg/mL, se eluyó con el mismo buffer y finalmente con agua destilada.

Las condiciones de la corrida fueron: flujo de 0.5 mL/min, a temperatura ambiente; las fracciones se recolectaron cada minuto, con dichas fracciones se realizaron lecturas a una absorbancia de 280 nm y se graficó con respecto al número de fracciones. Se determinó el perfil proteico por medio de SDS-PAGE.

5.1.11 Cromatografía de afinidad

Se utilizó una columna empacada manualmente con la resina Concanavalin-A Sepharose (Sigma- Aldrich catálogo 099K1263) de 20 mL de volumen interno. Se lavó 2 veces con 5 volúmenes de buffer eluyente (10 mM K_2HPO_4 , pH 6.5) seguido de esto se cargó la proteína. El volumen de muestra empleada en la primera corrida cromatográfica fue de 500 μ L, con una concentración de proteína de 1 mg/mL y, la columna se eluyó con un flujo de 1 mL/min, a temperatura ambiente.

Para la optimización de las condiciones en la segunda corrida cromatográfica se utilizó un volumen de muestra de 1 mL con una concentración de proteína de 1 mg/mL y la columna se eluyó con un flujo de 0.5 mL/min, a temperatura ambiente.

De ambas corridas se colectaron fracciones de 0.5 mL (cada minuto) y con dichas fracciones se realizaron lecturas de concentración de proteína a una absorbancia de 280 nm (EpochBiotek), se liofilizaron las fracciones que presentaron mayor Absorbancia para concentrarlas y finalmente se determinó el perfil electroforético y la actividad de PGH.

5.1.12 Identificación de la proteína purificada

Las bandas observadas en SDS-PAGE alrededor de los 66 y 45 kDa que presentaron actividad en zimogramas se analizaron en la Unida de Proteómica del IBT/UNAM. Las muestras fueron cortadas del gel con SDS, electro diluídas y digeridas con tripsina (1 mg/mL) de 12 a 14 h. Posteriormente los péptidos resultantes fueron analizados en un sistema LC-MS, constituido de un cromatógrafo de líquidos (Accela, Thermo-Fisher) con splitter acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher) con sistema de ionización tipo nano-electrospray.

Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI (National Center Biotechnology Information).a través de programa Matrix Science (Mascot Search Result) y Protein Prospector.

5.2 SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL

▪Caracterización bioquímica

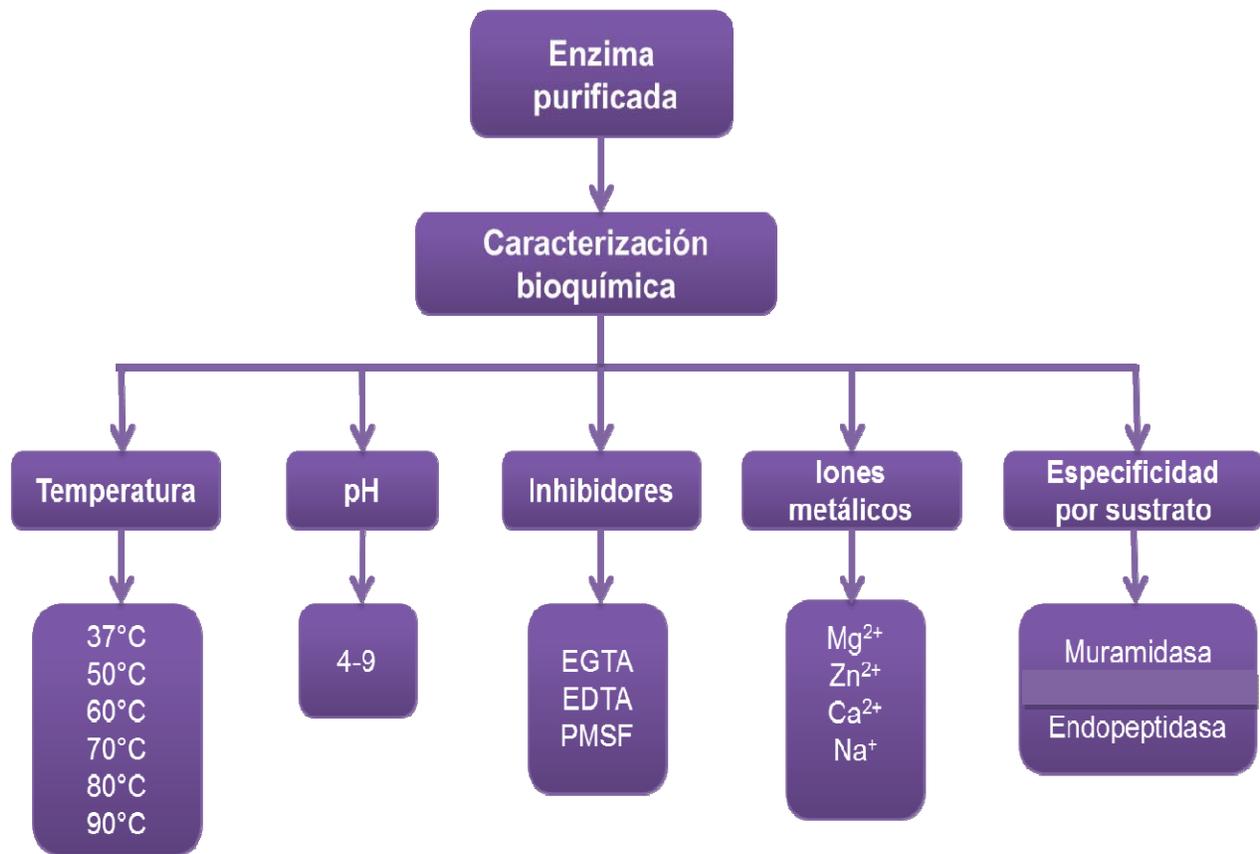


Figura13. Diagrama de trabajo de la segunda fase experimental. Caracterización bioquímica de PGH de *P. acidilactici* ATCC 8042.

5.2.1 Estabilidad térmica

De la preparación semipurificada con actividad lítica se colocaron alícuotas de 200 μ L en tubos eppendorf, los cuales se sometieron a un calentamiento en un baño de agua a diferentes temperaturas: 37, 50, 60, 70, 80 y 90°C, en tiempos de incubación 0, 15, 30, 60 y 90 min. Posteriormente se le determinó a cada tratamiento el perfil proteico por medio de SDS-PAGE, la actividad de PGH por medio de zimogramas. Adicionalmente se corroboró la actividad antimicrobiana de PGH por medio de la prueba de difusión en agar.

En esta última prueba se evaluaron las muestras expuestas durante 90 min a las diferentes temperaturas. El control positivo del ensayo fue la enzima sin ningún tratamiento térmico (4°C). Como control negativo, se adicionaron 100 μ L del buffer de trabajo en el que se encuentra la fracción proteica.

5.2.2 Estabilidad al pH

Se utilizaron alícuotas de 30 μ L en tubos eppendorf de la muestra con actividad lítica y fueron liofilizadas. Posteriormente fueron resuspendidas en 30 μ L de un buffer que contenía: buffer de acetatos 20 mM (intervalo de pH valido 4.8-5.2), CHES 20 mM (8.6-10), HEPES 20 mM (7.0-8.0), MES 20 mM (6.0) y Tris-HCl 20 mM (8.0-9.0) ajustado a diferentes pH, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, con las que se realizó el perfil electroforético.

Para la determinación de la actividad de PGH se realizó un zimograma. En cada pozo, se cargaron 30 μ L de la muestra proteica, después de la electroforesis cada carril fue cortado y lavado dos veces con 50 mL de agua desionizada durante 15 min, seguido de la adición de 50 mL del buffer de renaturalización ajustado a los diferentes pH de tratamiento. La renaturalización se realizó en agitación suave en un periodo de 12 h a 37°C, trascurrido este tiempo se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada y se tiñó el gel como se describió anteriormente.

Se evaluó la actividad antimicrobiana con la prueba de difusión en agar. Se colocaron 100 μ L de la muestra que previamente fue liofilizada y resuspendida en el buffer de trabajo ajustado a diferentes pH. El control positivo del ensayo fue la enzima sin ningún tratamiento, liofilizada y resuspendida en el buffer de trabajo.

Como control negativo, se adicionaron 100 μL de cada buffer de trabajo ajustado a los diferentes valores de pH.

5.2.3 Efecto de Inhibidores

Para la determinación de la actividad de PGH con diferentes agentes quelantes se realizó un zimograma en el cual se cargaron 30 μL de la muestra. Después de la electroforesis, cada carril fue cortado, lavado y renaturalizado con buffer de renaturalización al que previamente se le ajusto la concentración de cada inhibidor a evaluar (EDTA, EGTA y PMSF). De cada inhibidor se probaron las concentraciones 1 y 10 mM en buffer renaturalizante. Cada gel se lavó con 50 mL de agua desionizada y se tiñó en las mismas condiciones descritas anteriormente para un zimograma.

Se evaluó la actividad con la prueba de difusión en agar en el cual se adicionaron 90 μL de la muestra proteica y 10 μL de soluciones quelantes preparadas con cada inhibidor en concentración final de 1 y 10 mM, y se siguió el mismo procedimiento ya mencionada para esta técnica, se utilizó como control positivo del ensayo la enzima en el buffer de trabajo. Como control negativo, se adicionaron 100 μL de cada solución del inhibidor en la concentración más alta (10 mM).

5.2.4 Efecto de iones metálicos

Para determinar el efecto que tiene cada ion evaluado, (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y Na^+) sobre la actividad de la muestra proteica se realizaron pruebas de actividad en gel y de difusión en agar.

Se realizó un zimograma en el cual se cargaron 30 μL de la muestra, se realizó la electroforesis y cada carril fue cortado, lavado y renaturalizado con buffer de renaturalización al que previamente se le ajusto la concentración de cada ión metálico a evaluar. De cada ión se probaron las concentraciones 1 y 10 mM en buffer renaturalizante. Cada gel se lavó y tiñó como ya se describió para un zimograma.

Para la prueba de difusión en agar se tomaron alícuotas de 90 μL de la muestra y se adicionaron 10 μL de soluciones preparadas de cada ión evaluado en concentraciones finales de 1 y 10 mM. Se siguió con la metodología descrita anteriormente para esta técnica. El control positivo del ensayo fue la enzima sin la adición de ningún ión metálico. Como control negativo, se adicionaron 100 μL de cada solución preparada en su concentración más alta (10 mM).

5.2.5 Actividad de endopeptidasa

La actividad de endopeptidasa se determinó por la modificación del método de Cd-ninhidrina (Doi, *et al*, 1981). En un tubo se colocaron 50 μL de la muestra semipurificada y se adicionaron 15 μL de soluciones preparadas con los sustratos Leu-Gly-Gly y Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (Sigma-Aldrich) en concentraciones de 20 mM en HEPES pH 7.0. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 150 μL con buffer de trabajo y se incubó a 37°C por 1 h. Posteriormente se adicionaron 150 μL del reactivo de Cd-ninhidrina (0.8 g ninhidrina, 80 mL de EtOH al 99.5%, 10 mL de ácido acético y 1 g de CdCl_2) y nuevamente se incubó la mezcla a 85°C por 5 min. Después de la incubación se centrifugó cada tubo para evitar la turbidez que pudiera interferir en la medición y se determinó la liberación del grupo amino. El ensayo se realizó transfiriendo 200 μL de cada tubo a una microplaca Nunc con 96 pozos (Fischer Scientific). Se utilizó el lector de placas Epoch Biotek con el software Gen 5 1.10 y las lecturas se realizaron a 507 nm (Simitsopoulou *et al.*, 1997). El control positivo del ensayo fue la lisostafina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma-Aldrich) más el sustrato, a la misma concentración empleada de la muestra. Como control negativo se utilizaron el sustrato y el buffer de trabajo; ambos controles fueron tratados en las mismas condiciones del ensayo.

5.2.6 Actividad de muramidasa

Para determinar la actividad lítica de la enzima se siguió el protocolo establecido por Sigma-Aldrich 2001, para la determinación de la actividad de lisozima, en el que se utilizan células de *M. lysodeikticus* como microorganismo indicador (www.sigmaaldrich.com).

Con la finalidad de reducir el volumen del ensayo se utilizó un lector de placas. Para la validación del método en cada uno de los pozos de la microplaca, se adicionaron 200 μL de la suspensión celular y 50 μL de lisozima (10,000 unidades/mg), se determinó el cambio en la absorbancia ($\lambda_{595\text{nm}}$) y se graficó con respecto al tiempo.

Para determinar la actividad lítica de las fracciones se preparó un buffer de KH_2PO_4 adicionando 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) la cual ayuda a estabilizar la mezcla de reacción y se ajustó al pH 7.4. En dicho buffer se resuspendieron células liofilizadas de *M. lysodeikticus* ajustando a $A_{595\text{nm}}$ 0.6-0.7. Se colocaron 50 μL de la fracción con actividad lítica en cada uno de los pozos de la microplaca y se adicionaron 200 μL de la suspensión celular de *M. lysodeikticus* (aprox. 0.1%). El ensayo se realizó por triplicado.

La microplaca se colocó en el lector de placas y se tomaron lecturas hasta 10 min, con intervalos de lectura de 10 segundos. Como control positivo para la determinación de la actividad lítica en microplacas, se empleó lisozima. Se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima que provoca el cambio en la absorbancia $_{595\text{nm}}$ de 0.01/min.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 PRIMERA PARTE EXPERIMENTAL

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PEPTIDOGLUCANO
HIDROLASA

6.1.1 Determinación de la concentración de proteína

Se obtuvo la fracción parcialmente pura con actividad de peptidoglucano hidrolasa siguiendo la metodología propuesta por Velasco-Pérez (2010). Se cultivaron células de *P. acidilactici* ATCC 8042 y se cosecharon a las 8 h de crecimiento, tras determinar crecimiento por densidad óptica. Posteriormente se realizaron mediciones para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford. En la tabla 5 se muestra el promedio de los resultados de densidad óptica a las 8 h de crecimiento y concentración de proteína de los 20 lotes realizados.

Tabla 5. Densidad óptica, volumen y concentración de proteína obtenida a las 8 h de crecimiento de los diferentes lotes de cultivo.

Lote de cultivo	D.O _{595nm}	Volumen obtenido (mL)	Concentración de proteína (mg/mL)
Promedio	1.03±0.068	2.3±0.273	1.17±0.025

Numero de lotes=20

En virtud de que se parte de inóculos estandarizados, los resultados muestran un bajo grado de dispersión, indicado por la desviación estándar, tanto para los datos de crecimiento como de concentración de proteína.

6.1.2 Determinación del perfil proteico y de actividad lítica en gel de la fracción con actividad de peptidoglucano hidrolasa

De cada lote obtenido se realizó el perfil proteico por medio de SDS-PAGE y se determinó la actividad de peptidoglucano hidrolasa por medio de la técnica zimográfica descrita para la detección de dicha actividad por Mora (2003) y Cibik (2004). La figura 14 se presenta el perfil proteico y de actividad representativo de los lotes obtenidos.

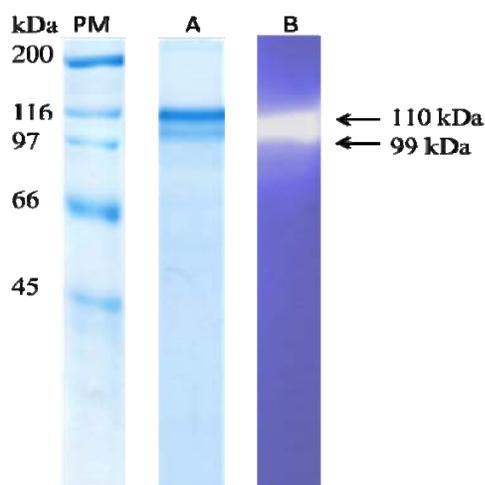


Figura 14. A) Perfil proteico, SDS-PAGE al 10%. B) Zimograma de actividad lítica sobre *M. lysodeikticus* como microorganismo indicador. PM, marcador de peso molecular (Bio-Rad, USA).

El perfil proteico mostrado en la figura 14-A es representativo de todos los lotes realizados. En éste se observan las fracciones proteicas de interés, de pesos moleculares de 110- y 99-kDa. En la figura 14-B se presentan dos bandas claras, lo que revelan la lisis del microorganismo indicador asociado a la actividad lítica de las proteínas. Después de la purificación parcial, las fracciones con actividad lítica representan aproximadamente el 94.5% de la proteína total (García- Cano *et al.*, 2011), con lo que la interferencia de otras proteínas en las determinaciones subsecuentes es mínima.

6.2 PURIFICACIÓN

Para llevar a cabo la caracterización bioquímica de cada una de las proteínas en forma independiente, se intentó su separación por medio de diversos métodos cromatográficos.

6.2.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) es una de las principales técnicas utilizadas para la separación y purificación de proteínas en procesos biotecnológicos (Fausnaugh *et al.*, 1986).

En HIC las proteínas se unen reversiblemente a ligandos hidrofóbicos que se encuentran inmovilizadas en un soporte cromatográfico y, aunque la naturaleza exacta de la interacción hidrofóbica no se entiende completamente, se ha logrado establecer que una de las propiedades más importantes que afectan el perfil de elución y el tiempo de retención es la hidrofobicidad de la proteína (Queiroz *et al.*, 2001). La HIC tiene ciertas ventajas con respecto a otro tipo de cromatografías, como lo es la unión reversible de ligando con los sitios hidrofóbicos expuestos de la proteína, niveles altos de capacidad así como de resolución y las concentraciones de sales empleadas estabilizan a la proteína en solución (Lienqueo *et al.*, 2002).

Como lo indica el análisis de la secuencia de cada enzima, existen diferencias en el perfil hidrofóbico: la proteína de 110-kDa presenta mayores grupos hidrofóbicos en su extremo carboxilo (residuos 905-1110) a diferencia de la fracción de 99-kDa que posee un carácter más polar por la presencia del aminoácido L-asparagina (13.5%), por lo que se aprovechó esta característica fisicoquímica de la muestra.

Las columnas empleadas fueron de un kit que contiene diversas columnas de HIC (GE Healthcare). En la tabla 6 se presentan las características de cada una de las columnas empleadas.

Tabla 6. Características de las columnas empleadas para la purificación de las PGHs.

Columna	Tipo de ligando hidrofóbico	Concentración del ligando ($\mu\text{mol/mL}$)	Tamaño de partícula (μm)
Fenil Sefarosa (alta sustitución)	Fenilo	40	90
Fenil Sefarosa (baja sustitución)	Fenilo	25	90
Fenil Sefarosa alto rendimiento	Fenilo	25	34
Octil Sefarosa	Octilo	5	90
Butil Sefarosa alto rendimiento	Butilo	50	34
Butil Sefarosa	Butilo	40	90
Butil-S Sefarosa	Butilo-S	10	90

Entre las columnas empleadas existen diferencias entre el tipo y fuerza hidrofóbica de los ligandos que las conforman, donde la fuerza está determinada principalmente por el tamaño de la cadena carbonada. Así, el de mayor fuerza hidrofóbica es el fenilo, seguido de octilo y por último butilo. Entre cada ligando varia la concentración empleada y el tamaño de la partícula, lo que determina la selectividad para cada columna pese a que el ligando sea el mismo.

Los resultados de cada corrida cromatográfica fueron muy similares entre aquellas columnas que contenían el mismo ligando hidrofóbico, por lo que se presentan los cromatogramas y perfiles proteicos representativos de cada uno de los ligandos.

6.2.2 Columnas Fenil Sefarosa

Las columnas que poseen como ligando al grupo fenil tienen como característica general que el grado y fuerza de sustitución es muy elevado y su selectividad es alta, son ideales para la separación de muestras en pasos finales de purificación pues con ellas se obtiene una elevada resolución de bandas cromatográficas.

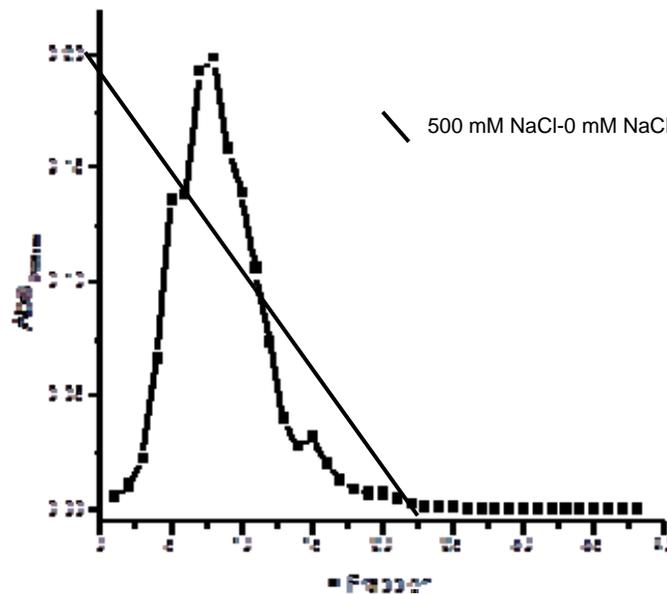


Figura 15. Cromatograma de la fracción proteica eluída en la columna Fenil Sefarosa 6 flujo rápido (baja sustitución). Buffer de elución 50 mM Na_2SO_4 v 500 mM de NaCl pH 7.0 v flujo 0.5

En el cromatograma obtenido (figura 15) se observa principalmente un pico de absorbancia máxima en la fracción número 8, el cual está traslapado con otros dos picos de menor área, correspondientes a las fracciones 5 y 15. Los picos no están lo suficientemente separados, por lo que la definición de cada uno de ellos es muy baja e indica que no hubo una buena separación de las fracciones proteicas. Sin embargo se procedió a determinar el perfil proteico (figura 16) de las fracciones que conforman los picos y así conocer el peso molecular de las proteínas presentes en las fracciones eluídas, que se presentan en la figura 16.

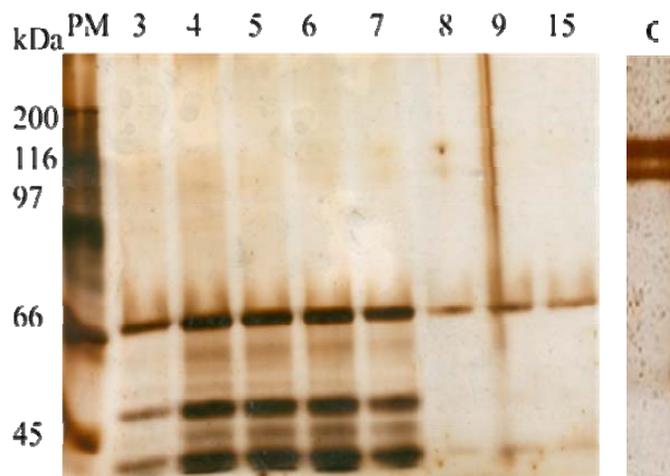


Figura 16. Perfil electroforético, tinción con plata. PM, marcador de peso molecular. C, enzima semipurificada. Carriles 3-9 y 15 número de fracción colectada en la columna Fenil Sefarosa 6 flujo rápido (baja sustitución).

En la figura 16 se observan que existen dos tipos de fracciones: los primeros carriles muestran bandas de pesos moleculares por debajo de 66-y 45-kDa y los demás sólo la banda cercana a los 66-kDa. Es posible que las bandas de bajo peso molecular se deban a degradación, ya que el ligando fenilo es muy hidrofóbico y establece interacciones hidrofóbicas fuertes con residuos de aminoácidos de cadenas alifáticas (Ala, Ile, Leu, Met, Pro y Val) y aromáticas (Phe, Trp y Tyr); de alguna forma, la interacción es tan fuerte que la parte de la proteína que no establece dicha interacción se separa de la zona de alta hidrofobicidad. Otra razón sería la copurificación de una proteasa, pero esta actividad se ha buscado en geles con gelatina como sustrato y no se ha encontrado (datos no mostrados).

6.2.3 Columna Octil Sefarosa

Esta columna tiene un carácter diferente al de las columnas con fenilo, ya que en este caso el ligando es lineal, lo que proporciona la ventaja de que no hay ningún impedimento por parte del mismo que pudiera limitar la interacción entre éste y la proteína, a diferencia de un ligando aromático. La cadena alifática es C8 por lo que presenta una elevada fuerza de interacción hidrofóbica.

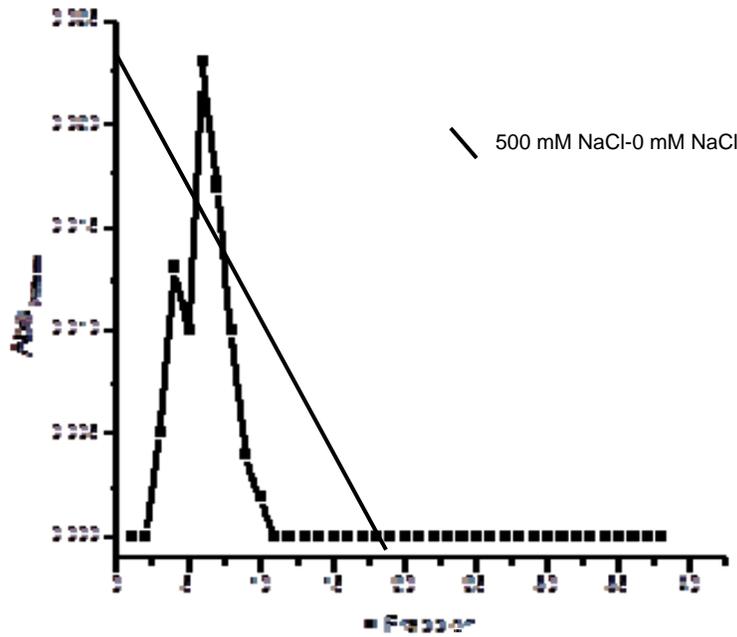


Figura 17. Cromatograma de la fracción proteica eluída en la columna Octil Sefarosa 4 Flujo rápido. Buffer de elución 50 mM Na₂SO₄ y 500 mM de NaCl pH 7.0 y flujo 0.5 mL/min.

En la figura 17 se puede observar la presencia de dos picos de absorbancia en las primeras fracciones colectadas, muy cercanos entre sí y con muy baja resolución. Esto indica que esta columna no resultó ser muy eficiente para la separación de las dos proteínas. Se realizó SDS-PAGE para conocer el perfil proteico de la muestra eluída (figura 18). Las fracciones analizadas son la que comprenden el área cromatográfica (3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9).

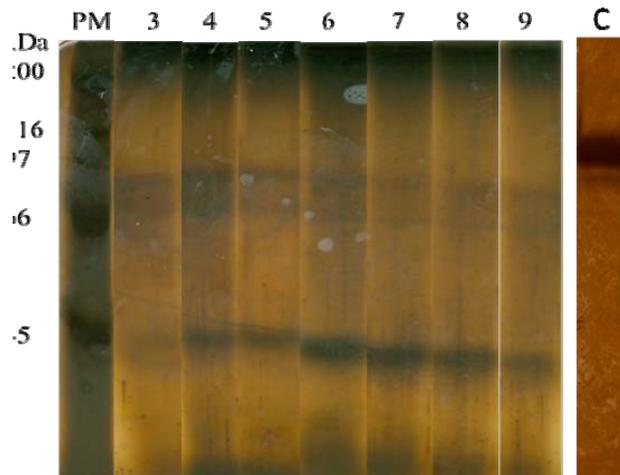


Figura 18. Perfil electroforético, tinción con plata. PM, marcador de peso molecular. C, enzima semipurificada. Carriles 3-9 número de fracción colectada en la columna Octil Sefarosa 4 Flujo rápido.

El perfil proteico de la figura 18 muestra dos bandas con peso superior a los 66-kDa y una intensa, a los 45-kDa en cada una de las fracciones colectadas, lo que indica que las proteínas de 110- y 99-kDa no fueron separadas y en cambio, probablemente se observen productos de hidrólisis de las mismas por las razones antes mencionadas. Las fracciones están teñidas con plata por tratarse de muestras no concentradas, en cuyo caso es frecuente la contaminación con queratina a los 45-kDa (G. Mendoza, comunicación personal).

6.2.4 Columna Butil Sefarosa

Las columnas que contienen el ligando Butil se caracterizan por tener la menor fuerza hidrofóbica (con respecto a fenilo y octilo) ya que su cadena alifática es C4. Son empleadas para la separación de proteínas con una naturaleza hidrofóbica media o baja y son excelentes para los pasos finales de purificación. El tamaño de la matriz le confiere una elevada resolución a gran caudal.

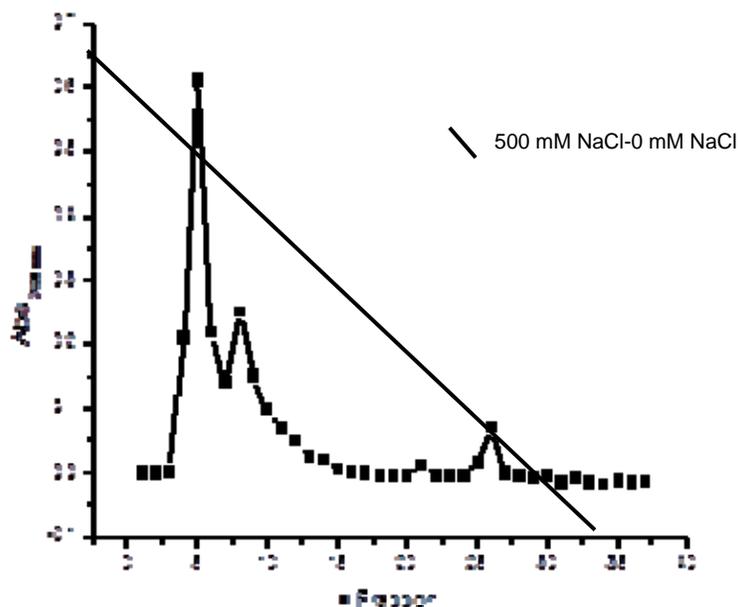


Figura 19. Cromatograma de la fracción proteica eluida en la columna Butil-S Sefarosa 6 Flujo rápido. Buffer de elución 50 mM Na_2SO_4 y 500 mM de NaCl pH 7.0 y flujo 0.5 mL/min.

Esta columna presenta otras características diferentes a otras columnas Butilo, no sólo por la baja concentración del ligando inmovilizado (10 $\mu\text{mol/mL}$) sino también en la longitud de los brazos del espaciador entre el ligando y la matriz de Sefarosa, así como el tipo de átomo conector (S-éter). Todo esto en conjunto le confiere a la columna el carácter menos hidrofóbico en relación a las otras columnas Butilo y, en general, con las columnas del kit de HIC.

En la figura 19 se presentan tres picos de absorbancia, con buena resolución, dos de ellos cercanos, que presentan la máxima absorbancia en las fracciones 5 y 8, y un tercer pico en la fracción número 26. Se espera que alguna de estas áreas corresponda a cualquiera de las dos fracciones con actividad de PGH. Probablemente la fracción con mayor carácter hidrofóbico eluyó en las últimas fracciones. Se realizó el perfil de proteínas por medio de SDS-PAGE (figura 20), donde las fracciones analizadas corresponden a las áreas cromatográficas.

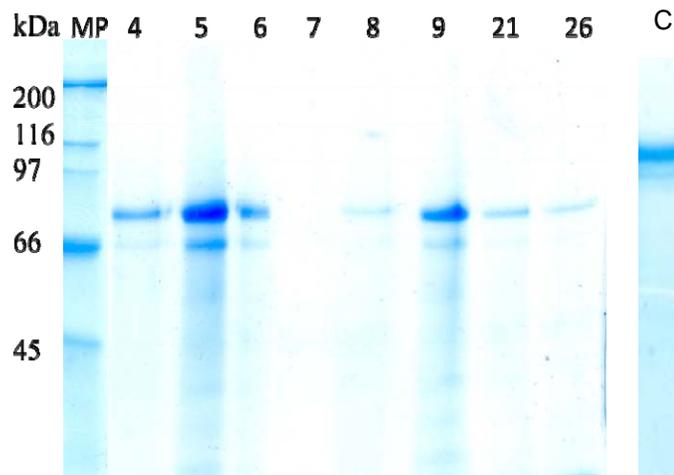


Figura 20. Perfil electroforético, tinción con azul de Coomassie. PM, marcador de peso molecular. C, enzima semipura. Carriles 4-26 número de fracción colectada en la columna Butil-S Sefarosa.

Del perfil proteico, obtenido de muestras concentradas por liofilización para garantizar su visibilidad con esta tinción (figura 20), se puede notar que el número de bandas encontradas en cada fracción es menor con respecto al perfil de las demás columnas. La intensidad de las bandas concuerda con los picos cromatográficos de área mayor.

De todas las columnas empleadas ésta fue la que presentó el menor número de bandas y el perfil mas definido de separación de proteínas, aunque las bandas encontradas no concuerdan con lo pesos moleculares de las dos fracciones proteicas, ya que son menores a 97-kDa. Puede haber ocurrido el fenómeno de hidrólisis por interacción hidrofóbica. Todas las columnas hidrofóbicas probadas dieron como resultado bandas de proteína de diferente peso molecular al esperado, probablemente por rompimiento de las cadenas debido a la interacción hidrofóbica con el soporte. Por tal motivo, se procedió a evaluar otro sistema de separación, el de cromatografía de afinidad.

6.2.5 Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una técnica de separación normalmente aplicable para purificar proteínas y utiliza la alta afinidad de las proteínas por grupos específicos. La cromatografía de afinidad es más efectiva cuando la interacción de la proteína y la molécula que se usa como atrayente son muy específicas (Stryer, 2008).

El análisis de la secuencia de las dos enzimas líticas, indica que la de 99-kDa cuenta con regiones muy conservadas y específicas de reconocimiento y unión a carbohidratos en los residuos 249, 250, 271, 275, 289, 296, 297, 303, 356, 360, 367 y 369, a diferencia de la fracción de 110-kDa (García-Cano *et. al.*, 2011), por lo que se buscó aprovechar esta diferencia empleando una columna con un ligando de naturaleza lectina: la Concanavalina-A, que es la más estudiada y empleada para la purificación de glicoproteínas, pues cuenta con la capacidad de establecer interacciones específicas reversibles con carbohidratos, particularmente D-glucosa y D-manosa. Mediante esta propiedad es posible separar proteínas con residuos de estos azúcares (Stryer, 2008).

Se tomaron 500 μ L de la muestra y se eluyeron en una columna empacada manualmente con Concanavalina-A Sefarosa, a una velocidad de flujo de 1 mL/min y las fracciones se colectaron cada minuto. Se determinó la absorbancia a 280 nm a cada una de las fracciones colectadas y las lecturas se graficaron con respecto al número de fracción (figura 21). Se obtuvo el perfil proteico de cada fracción y se evaluó la actividad de PGH.

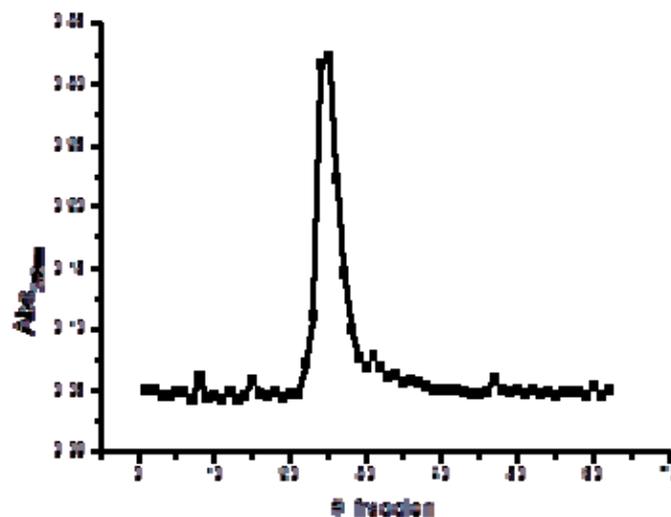


Figura 21. Cromatograma de la fracción proteica eluída en la columna Concanavalina-A. Buffer eluyente 10 mM K_2HPO_4 pH 6.5, flujo 1 mL/min.

En la figura 21 se observan un pico principal, de absorbancia máxima en la fracción 25, y otro pico de menor área en la fracción número 8. Los picos están suficientemente separados y se distinguen uno de otro. Se determinó el perfil electroforético de las fracciones que conforman a estos picos.

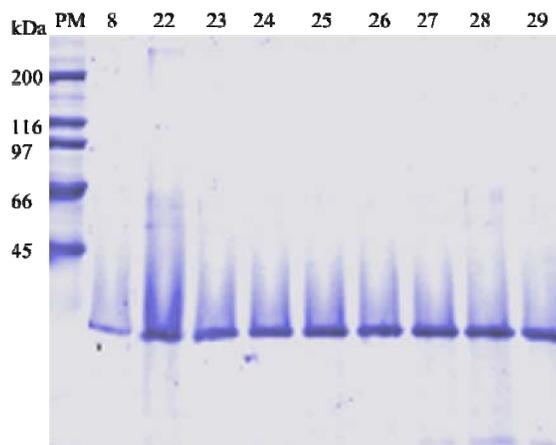


Figura 22. Perfil electroforético, tinción con azul de Coomassie. PM, marcador de peso molecular. Carriles 8, 22-29 número de la fracción colectada en la columna Concanavalina-A.

En el perfil proteico de la muestra eluída (figura 22) se observó la presencia de bandas con pesos moleculares por debajo de los pesos moleculares de la muestra parcialmente pura (110- y 99- kDa) y corresponden al mismo peso molecular, independientemente del pico del que fueron tomadas. Dichas bandas presentaron actividad de peptidoglucano hidrolasa (gel no mostrado, similar a figura 25). Para conocer la naturaleza de dichas proteínas se seleccionaron bandas representativas del SDS-PAGE (figura 23), en la zona ubicada alrededor de los 66- y 45- kDa (X_1 , X_2 y X_3), para realizar una identificación y caracterización estructural por medio de espectrometría de masas de alta resolución. Las bandas fueron analizadas en la Unidad de Proteómica del IBT/UNAM.

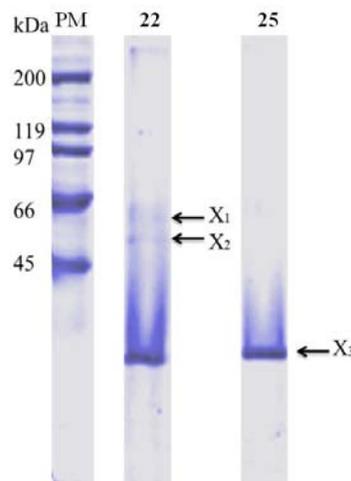


Figura 23. Bandas de las fracciones 22 y 25 seleccionadas para la identificación de la muestra eluída en la columna Concanavalina-A.

El análisis de dichas bandas por LC-MS indicó que todos los péptidos generados presentaron 100% de identidad con la secuencia de *Canavalia ensiformis* (Nagano et al., 2008) la cual es la fuente de extracción de la Concanavalina-A. La presencia de estos péptidos seguramente se debió a contaminación por el método de separación empleado; se esperaba que alguna de las bandas del perfil proteico fuera una proteína o péptido glicosilado de la muestra que interaccionó con la columna y eluyó en un determinado tiempo, pero no fue posible identificarlo.

Con la finalidad de optimizar el método se procedió a modificar las condiciones de la corrida cromatográfica, disminuyendo el caudal de elución y aumentando la cantidad de proteína; la velocidad de flujo empleada fue de 0.5 mL/min y se utilizó 1 mg de proteína. El cromatograma correspondiente se presenta en la figura 24.

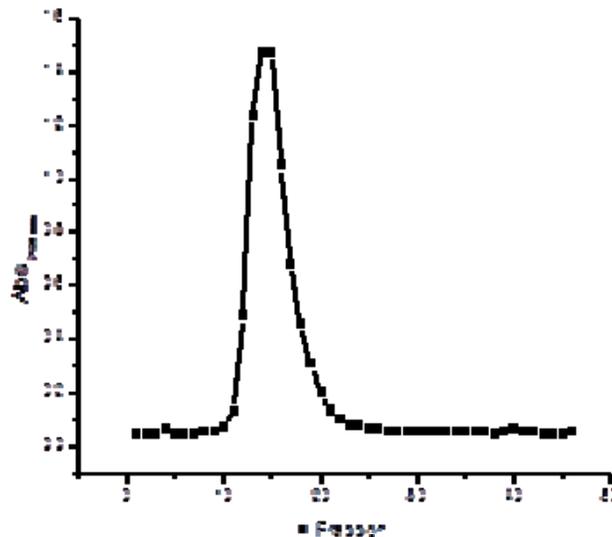


Figura 24. Cromatograma de la fracción proteica eluída en la columna Concanavalina-A. Buffer eluyente 10 mM K_2HPO_4 , pH 6.5, flujo 0.5 mL/min.

La figura 24 muestra un pico de absorbancia comprendido entre las fracciones 11-20, cuyo comportamiento es similar al que se obtuvo con la primera corrida. Se observa un solo ensanchamiento de banda, esto nos pudiera indicar que la proteína no se separó eficazmente y que los picos correspondientes a cada fracción están traslapados. Se realizó el perfil proteico y el gel de actividad de las fracciones que comprenden el pico cromatográfico (figura 25).

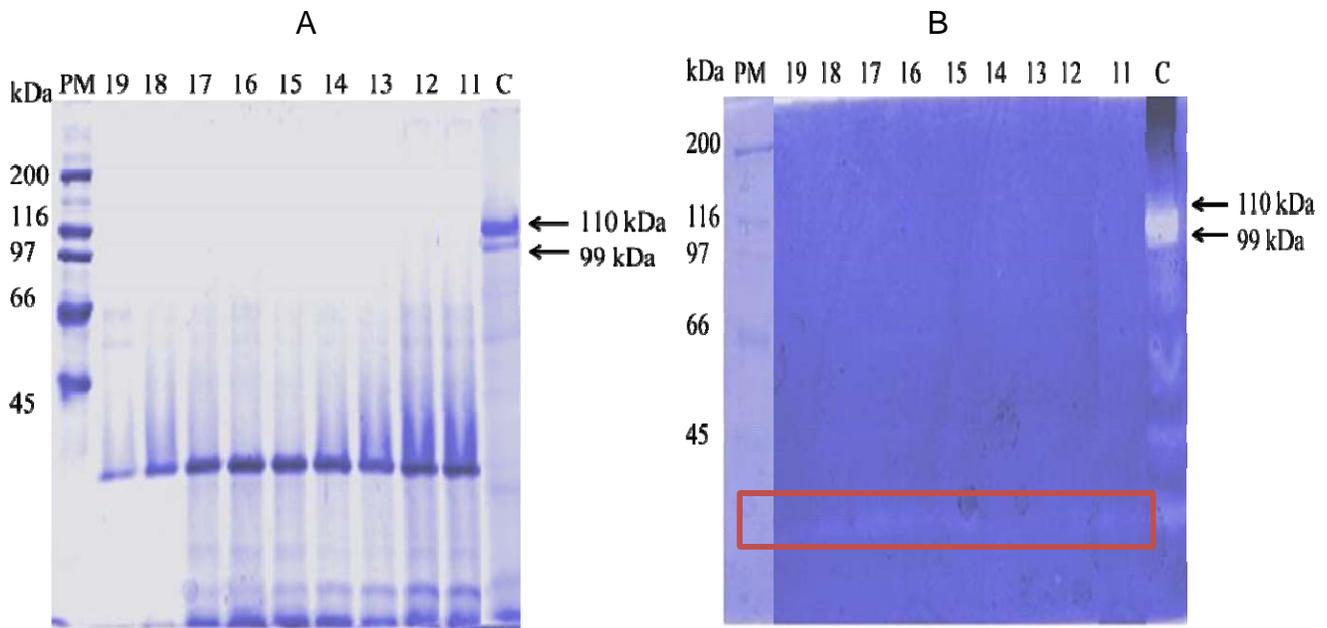


Figura 25. A) Perfil proteico, tinción con azul de Coomassie. B) Gel de actividad con *M. lysodeikticus* como microorganismo indicador. PM, marcador de peso molecular. C, PGH parcialmente pura, Carriles 11-19 número de fracción colectada en la columna Concanavalina-A.

En la figura 25-A se observan numerosas bandas de pesos moleculares menores a 45-kDa muy similares a las obtenidas en el ensayo anterior. Como ya había ocurrido antes, en la figura 25-B se observa que las fracciones por debajo de los 45-kDa presentan actividad lítica (recuadro rojo). Esto sugiere degradación de la proteína con actividad lítica. Para confirmar esto, nuevamente se seleccionaron bandas del SDS-PAGE que presentaron actividad alrededor de los 66- y 45-kDa, (P_1 , P_2 , P_3 y P_4) las bandas analizadas para la identificación corresponden a las fracciones 11 y 19 (figura 26).

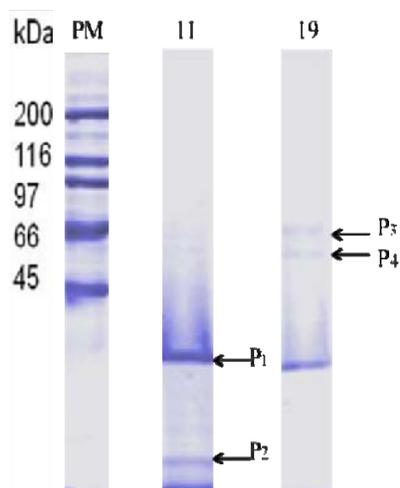


Figura 26. Bandas de las fracciones 11 y 19 seleccionadas para la identificación de la muestra eluída en la columna Concanavalina-A.

Las bandas fueron analizadas en la Unidad de Proteómica del IBT/UNAM por medio de espectrometría de masas de alta resolución y los péptidos generados de la digestión con tripsina se presentan en la tabla 7, así como el porcentaje de identidad con respecto a las proteínas líticas de 99- y 110-kDa.

Tabla 7. Péptidos analizados por espectrometría de masas de las fracciones obtenidas en la columna Concanavalina-A.

Péptidos generados	% identidad 110-kDa	% identidad 99-kDa
SYS SNATGNEAAK		57
YQLSSSY LNGDYSAANQ ER	36	46
GQVLAAPG SIQTHK		

Se puede apreciar que dos péptidos mostraron un porcentaje de identidad del 57% y 46% con la proteína de peso molecular de 99-kDa que se encuentra en *P. acidilactici* 7_4., mientras que se encontró un péptido con 36% de identidad con la proteína de 110-kDa presente en el genoma de *P. acidilactici* 7_4.

Estos resultados indican que la proteína sufre degradación al interactuar con el ligando de la columna de Concanavalina-A y que los péptidos encontrados mantienen el sitio activo de la enzima y conservan actividad.

Los resultados de las técnicas cromatográficas en conjunto (HIC y afinidad) indican que la fracción proteica con actividad de peptidoglucano hidrolasa no se logró separar satisfactoriamente ya que por las interacciones que presenta con los diferentes ligandos de cada columna cromatográfica sufre degradación, aunque algunos fragmentos conservan actividad lítica. Una alternativa para lograr la separación de ambas proteínas es la clonación y expresión por separado de cada una de las enzimas.

6.3 SEGUNDA PARTE EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Dado que no se logró separar a las proteínas con actividad lítica las determinaciones siguientes se realizaron con la preparación enzimática parcialmente pura, en la que estaban presentes ambas enzimas. Se realizaron ensayos en zimogramas para tratar de detectar el efecto de cada parámetro sobre cada una de las dos proteínas líticas, y el efecto fue evaluado también sobre la actividad lítica antimicrobiana global, determinada por la técnica de difusión en agar.

6.3.1 Actividad y estabilidad térmica

La temperatura afecta la estructura tridimensional nativa de las proteínas y se pierden sus propiedades específicas, como la actividad enzimática (Mathews, 2007).

Para determinar su efecto sobre las enzimas líticas, se incubó a la preparación semipura a diferentes temperaturas (37, 50, 60, 70, 80 y 90°C) por un período de 90 min. En la figura 27 se presenta el perfil electroforético (A) y de actividad (B) de las fracciones tratadas.

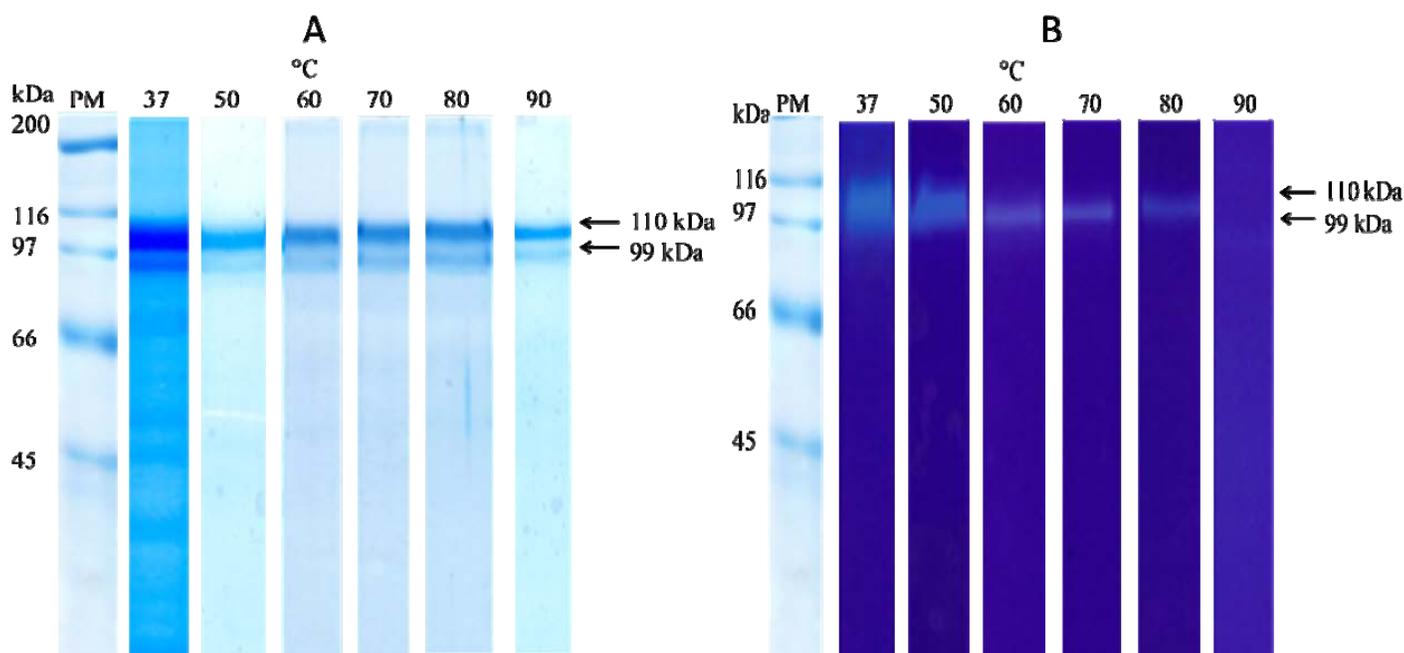


Figura 27. A) Perfil proteico de la fracción obtenida con actividad de PGH sometida a diferentes temperaturas. B) Gel de actividad con *M. lysodeikticus* como microorganismo indicador para cada temperatura aplicada, tiempo de incubación=90 min, en cada carril se cargaron 30 μ g de proteína.

En la figura 27-A se observa que las fracciones con actividad lítica que fueron sometidas a temperaturas elevadas (90°C) por 90 min no presentan degradación, porque no hay presencia de otras bandas por debajo de los peso moleculares de las fracciones en estudio.

En cuanto a la actividad (figura 27-B) la preparación presenta un máximo de actividad a 37°C, y es posible notar la disminución de la actividad lítica conforme aumenta la temperatura, sobre todo en el caso de la banda de 110-kDa. A 90°C no se observa actividad de ninguna de las dos bandas. Los resultados de la evaluación de la actividad lítica de la preparación que contiene las dos enzimas corroboran este comportamiento (figura 28), aunque aquí se puede ver que las enzimas tratadas a 90°C retienen un 50% de la actividad lítica inicial.

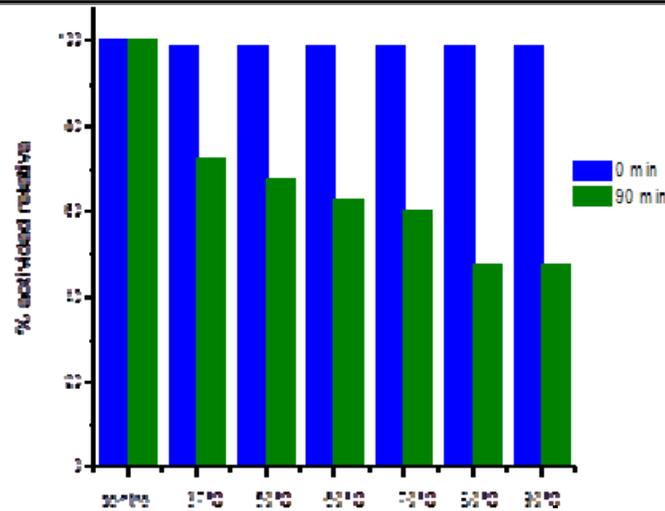


Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la actividad lítica. Control: enzima mantenida a 4°C

6.3.2 Actividad y estabilidad frente a diferentes pH

Los cambios de pH son importantes en el comportamiento particular de las proteínas, pues un pequeño cambio modifica significativamente las cargas de los residuos de aminoácidos que conforman una molécula y como consecuencia, se modificará la actividad y el comportamiento en el entorno (Mathews, 2007). Se evaluó el efecto de este factor en un intervalo de pH 4-9. Se muestran los gels de SDS y zimogramas (figura 29) para conocer el comportamiento de cada fracción.

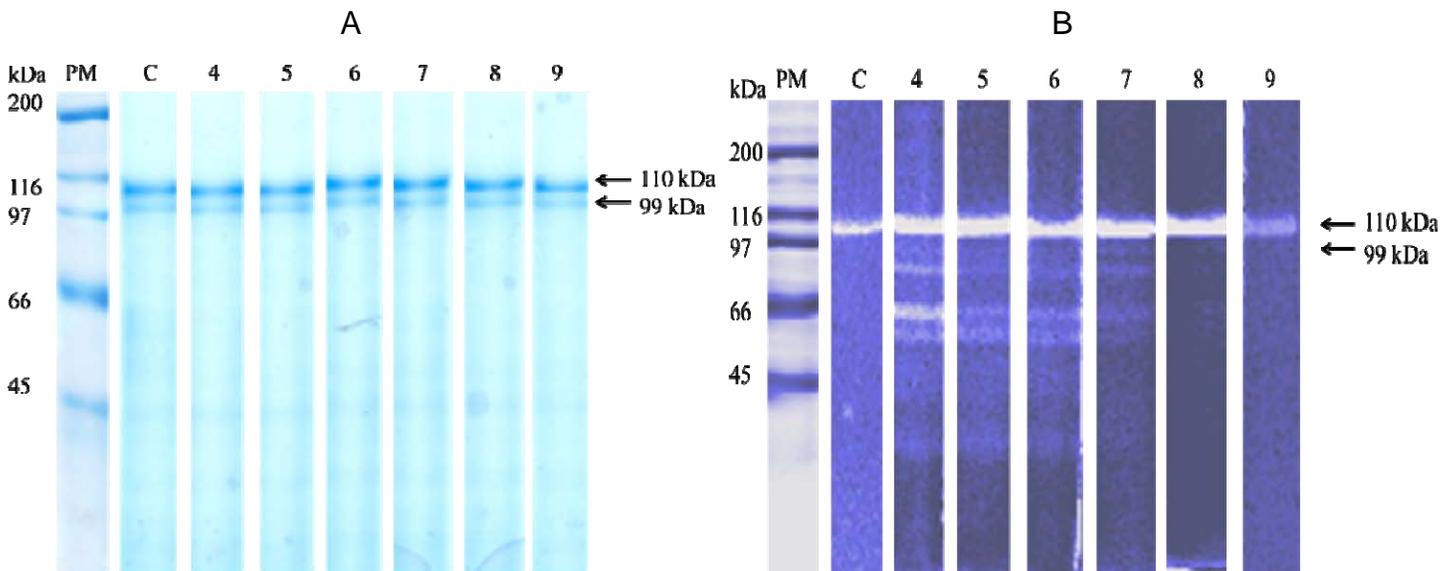


Figura 29. A) perfil proteico de la fracción semipura con actividad de PGH ajustado a diferentes pH. B) Gel de actividad con *M. lysodeikticus* como microorganismo indicador para cada pH probado. PM marcador de peso molecular. Carril C, control pH de trabajo (pH 8), carriles 4-9, pH correspondiente. En cada carril se cargaron 30 µg de proteína.

En la figura 29-A se observa que la proteína no se degrada a pH ácidos ni básicos y se puede notar que esta fracción es muy estable en el intervalo al que se trabajó (4-9). En cuanto a la actividad (figura 29-B), se aprecian las dos bandas con actividad y sólo disminuye claramente a pH 9. Se observa una tendencia a la aparición de bandas de menor peso molecular con actividad lítica más fuerte mientras más ácido es el pH. En el carril que corresponden a pH 4 se encuentra la más alta. Los valores de la actividad lítica antimicrobiana muestran una tendencia lineal al descenso de la misma a partir de pH 4.

Las enzimas provenientes de bacterias ácido lácticas pueden resistir este tipo de pH extremos y mantenerse activas, puesto que al ser el ácido láctico producto principal de su metabolismo, es frecuente la acidificación de los medios de cultivo. Sin embargo, las interacciones con los iones pueden contribuir a la degradación de las proteínas, lo que podría explicar la presencia de las bandas de bajo peso molecular.

Otra posibilidad es que en la preparación semipura se encuentre una proteasa que se active a ese pH y que esté degradando a las enzimas con actividad de PGH. En virtud de que no se ha detectado actividad proteolítica en estas fracciones, a pesar de haberse buscado (no mostrado), otra explicación podría ser la autólisis. De hecho, Mora (2003), reporta patrones similares de degradación.

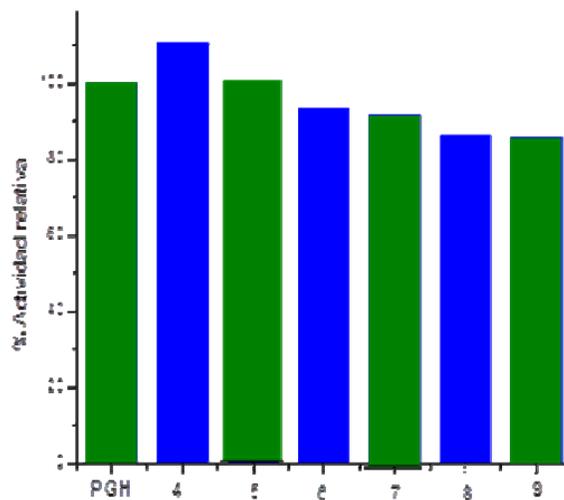


Figura 30. Efecto del pH sobre la actividad lítica

En la figura 30 se observa que la mayor actividad (110%) es a valores de pH 4 y que a valores de pH alcalinos la actividad no se ve afectada considerablemente con respecto al control ya que se mantiene el 80% de actividad, lo que es congruente con los resultados de los ensayos anteriores.

6.3.3 Efecto de inhibidores

La fracción enzimática con peso molecular de 99-kDa tiene una región conservada de unión a un ion divalente (Zn^{2+}) que puede ser usado como cofactor para la actividad, por lo que se evaluaron diferentes inhibidores (quelantes) de este tipo de cofactores para conocer el comportamiento de la fracción extraída y si este ión está ubicado en el sitio catalítico (figura 31). Los compuestos químicos empleados fueron EDTA, EGTA y PMSF en concentraciones 1 y 10 mM.

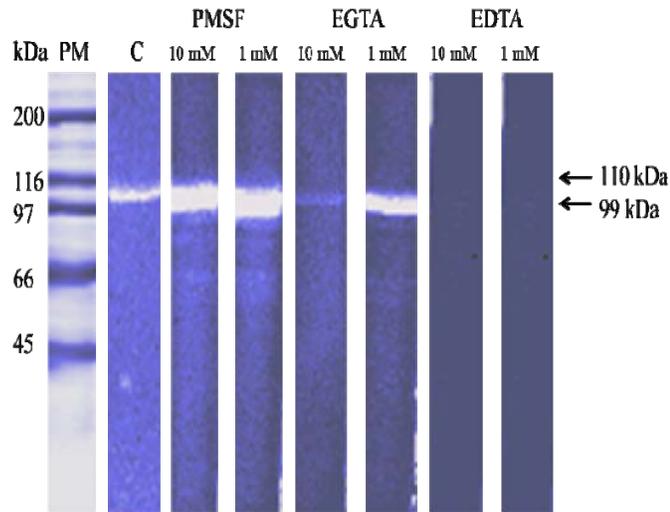


Figura 31. Gel de actividad con *M. lysodeikticus* como microorganismo indicador para cada inhibidor probado. Carril PM: marcador de peso molecular. Carril C, PGH sin ningún inhibidor; carril 3 y 4, PMSF a 1 y 10 mM; carril 5 y 6, EGTA a 1 y 10 mM; carril 7 y 8, EDTA 1 y 10 mM, respectivamente. En cada carril se cargaron 30 μ g de proteína.

En la figura 31 se observa que la mayor inactivación de la actividad lítica en la muestra proteica fue con 1 y 10 mM de EDTA, agente que coordina cationes metálicos divalentes, como lo es el Zn^{2+} . El EGTA también disminuyó la actividad de las enzimas; aunque éste tiene mayor afinidad por Ca^{2+} , formó el complejo de coordinación con el Zn^{2+} ya que es un ión divalente y tiene la capacidad de aceptar pares de electrones procedentes del EGTA.

El inhibidor PMSF no tuvo ningún efecto sobre la actividad de las enzimas, lo que indica que el mecanismo catalítico no es similar al de serin-proteasas. El mismo patrón de inhibición se aprecia cuando se evaluó la actividad lítica antimicrobiana por difusión en agar (figura 32). Se aprecia que el PMSF casi no tiene efecto, el EGTA reduce la actividad relativa en un 50% y el EDTA inhibe totalmente.

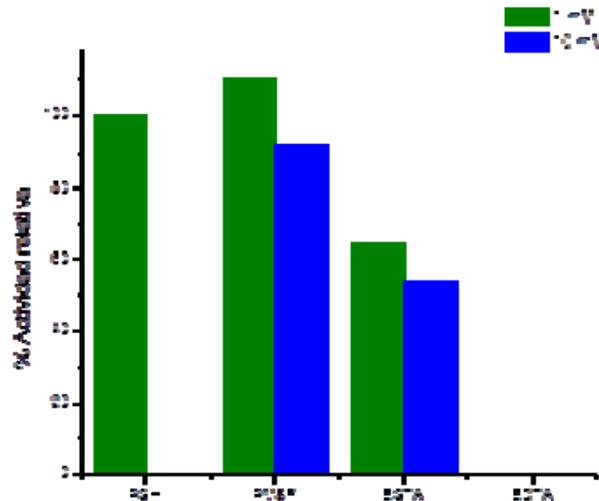


Figura 32. Efecto de diferentes quelantes sobre la actividad lítica, expresada en términos relativos

6.3.4 Activadores y efecto de iones metálicos

Muchas enzimas contienen iones metálicos que generalmente están unidos por medio de enlaces covalentes coordinados, estos iones le confieren a dichas enzimas propiedades que no tendría si estuvieran ausentes, las funciones de los iones son diversas algunos determinan su estabilidad y otros actúan como catalizadores de reacciones de hidrolisis (Mathews, 2007).

Se ha reportado que las proteínas dependientes de algún metal pueden ser activadas por diferentes iones monovalentes o divalentes y que éstos determinan la eficacia catalítica (Simitsopoulou, *et al.*, 1997). En la enzima de 99-kDa se encontró una región conservada de unión a Zn^{2+} en la posición 248, 356 y 369, por lo que se evaluó el efecto de diferentes iones metálicos, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} y Na^+ en concentraciones de 1 y 10 mM por zimogramas (figura 33) y por determinación de actividad lítica por difusión en agar (figura 34).

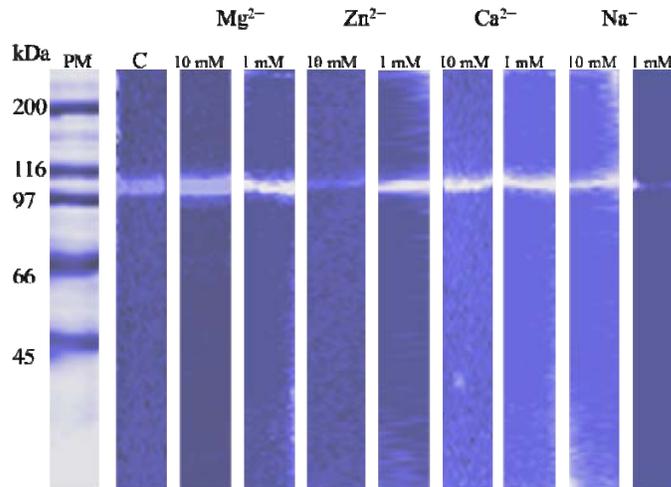


Figura 33. Gel de actividad con *M. lysodeikticus* como microorganismo indicador para cada ión metálico probado. Carril PM, marcador de peso molecular. Carril C, PGH sin ningún ión, carril 3 y 4, Mg^{2+} a 1 y 10 mM; carril 5 y 6, Zn^{2+} a 1 y 10 mM; carril 7 y 8, Ca^{2+} 1 y 10 mM, carril 9 y 10, Na^{+} a 1 y 10 mM, respectivamente. En cada carril se cargaron 30 μg de proteína.

En la figura 33 se puede observar que la actividad lítica de la fracción proteica es favorecida con el ión metálico Mg^{2+} a una concentración de 10 mM ya que la banda clara que indica la lisis de microorganismo es más intensa que para los otros iones probados. La actividad no se muestra afectada para el ion Ca^{2+} y para el ión Mg^{2+} en concentración 1 mM, sin embargo la actividad disminuye al utilizar el ión Na^{+} , esto probablemente se debe a que este ión es monovalente y en el sitio activo se requiere del aporte de las dos cargas positivas para formar el compuesto de coordinación, por la falta de la segunda carga el ión solo estuvo unido temporalmente al sitio catalítico.

En el caso de Zn^{2+} se ve afectada la actividad al emplear la concentración más alta pese a eso no se le puede asociar a la disminución de la actividad de la fracción proteica ya que este ión influye en la hidratación del gel y esto afecta la retención del colorante en el gel, por lo que se descarta el efecto que pueda tener sobre la muestra, con respecto a la concentración 1 mM la actividad no se observa drásticamente afectada.

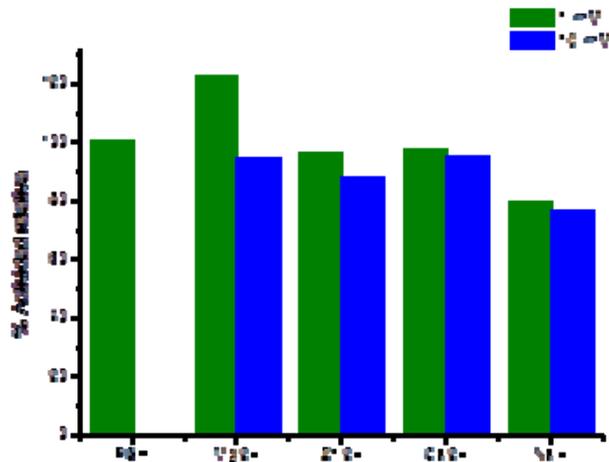


Figura 34. Efecto de diferentes iones metálicos sobre la actividad lítica de la muestra proteica.

Los resultados de gel de actividad son acordes con los mostrados en la figura 34, donde se observa el efecto positivo que tiene el ión Mg^{2+} en concentración de 10 mM con respecto a la muestra PGH sin ningún ión; el comportamiento de la muestra proteica no se ve drásticamente afectado con los iones Ca^{2+} y Zn^{2+} y con el ión Na^{+} se observa la disminución en la actividad la cual ya se había observado en el zimograma.

6.3.5 Especificidad por sustrato

Las peptidoglucano hidrolasas son enzimas hidrolíticas muy específicas ya que dependiendo del tipo de enlaces que hidrolicen en la pared celular determina el grado de lisis en las bacterias. García-Cano y cols., reportaron que la proteína de 99-kDa tiene regiones muy conservadas con función de muramidasa (amino terminal) y amidasa (carboxilo terminal) y por lo que se trató de confirmar estas actividades utilizando diferentes sustratos que se conocen para este tipo de actividades (tabla 8).

TABLA 8. Evaluación de la actividad de la fracción semipura de PGH a diferentes sustratos.

Actividad	Sustrato	U/mg prot.	Referencia
Endopeptidasa	Pentaglicina [Gly] ₅	Lisostafina 414.6 PGH 345.3	(Simitsopoulou, <i>et al.</i> , 1997)
	Tripeptido [Leu-Gly-Gly]	Lisostafina 162 PGH 102.4	
Muramidasa	<i>M. lysodeikticus</i>	Lisozima 200 PGH 95	(Sigma-Aldrich, 2001)

+ = presenta actividad (positivo)

- =no presenta actividad (negativo)

El tipo de actividad que presentó la fracción obtenida es de endopeptidasa, ya que hidroliza el enlace peptídico entre los aminoácidos, liberando el grupo amino y por la técnica de Cd-ninhidrina (Simitsopoulou *et al.*, 1997) se observó este efecto tanto para el tripéptido como para el pentapéptido, siendo éste el que presentó mayor hidrólisis por la mayor cantidad de enlaces péptidicos.

Otro tipo de actividad evaluada fue la de muramidasa, la cual hidroliza el enlace glucosídico que está entre el N-acetil ácido murámico y la N-acetil glucosamina de la pared celular de las bacterias. La PGH parcialmente pura presentó actividad de muramidasa.

VII Conclusiones

En el proceso de purificación de la preparación con actividad de peptidoglucano hidrolasa obtenida de *P. acidilactici* ATCC 8042 no se logró la separación eficiente de las bandas obtenidas en el perfil proteico. La cromatografía de interacción hidrofóbica no logró realizar dicha separación ya que la fracción presentó degradación en todos los casos. La cromatografía de afinidad no logró separar las dos fracciones y la muestra presentó degradación al interaccionar con la lectina. Los resultados del análisis identificación y caracterización estructural mostraron que estos productos de degradación conservaban la capacidad catalítica.

La preparación parcialmente pura con actividad de peptidoglucano hidrolasa obtenida de *P. acidilactici* ATCC 8042 presenta máxima actividad y estabilidad a la temperatura después de haber sido almacenada 90 min a 37°C. La actividad lítica disminuye al aumentar la temperatura.

A pH de 4 se observó la mayor actividad, y en un intervalo de pH de 6-9 se mantuvo más del 80% la actividad lítica con respecto al control.

El agente quelante que inactivó la actividad lítica fue el EDTA en concentraciones de 1 y 10 mM, seguido de EGTA, aunque en menor proporción. El inhibidor PMSF no tuvo ningún efecto sobre la actividad, lo que sugiere que el mecanismo de acción no corresponde al de serin proteasas.

El ión que tuvo un efecto positivo sobre la actividad de la preparación proteica fue Mg^{2+} en concentración 10 mM, el compuesto que la inactivó fue Na^+ , con relación a los demás iones evaluados la actividad no se vio afectada drásticamente.

La fracción semipura presentó actividad de muramidasa y endopeptidasa.

VIII. REFERENCIAS

- Barbosa-Cánovas V. G., Pothakamury R. U. and Palou E. (1998). Conservación no térmica de alimentos. Editorial Acribia. México, pp. 217-226, 228-230, 234-236.
- Bravo, F. (2004). El manejo higiénico de los alimentos: guía para la obtención de distintivo H. Editorial Limusa Noriega, México. pp. 13.
- Budnitz, D. S. (2008). Emergency department visits for antibiotic-associated adverse events. *Clin. Infect. Dis.* 47:735-743.
- Cibik, R. and Chapot-Chartier, M. P. (2004). Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 459-463.
- Cotter, P., Hill, C. and Ross R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Microbiol. Rev* 3:777-788
- Doi, E., Shibata, D. and Matoba, T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* 118:173–184.
- Fausnaugh, J. L. and Regnier, F. E. (1986). Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography. *J. Chrom.* 359: 131-146.
- Fedorov, T. V., Surovtsev, V. I., Pletnev, V. Z., Borozdina, M. A. and Gusev V. V. (2003). Purification and some properties of Lysostaphin, a glycylglycine endopeptidase from the culture liquid of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Biochem.* 68: 61-65.
- Fischetti, V. A. (2005). Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trend Microbiol.* 13: 491–496.
- García-Cano, I., Velasco-Pérez, L., Rodríguez-Sanoja, Sánchez, S., Mendoza-Hernández, G. and Farrés, A. (2011). Detection and localization of two lytic enzymes in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *J. Appl. Microbiol.* 111:607-615.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, (In) John M. Walker (ed). The proteomics protocols handbook, Humana press. pp. 571-607.
- Greenwood, D., Lambert, H. and O'grady, P. (1992). Antibiotic: modes of action. Antibiotic and chemotherapy. 6 ed. Churchill Livingstone Editorial. Londres. pp. 291-302.
- Hermoso, J. A., García J. and García P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Microbiol.* 10:461–472.
- Hermoso, J. (2007) Las enzimas líticas de los bacteriófagos (enzibioticos): nuevas terapias contra las infecciones bacterias. Tomado de <http://www.madrimasd.org/> (consultado 15 junio 2011).
- Herrera-Monteache, A., Conchello, P., Hernández, M. y Sastre, A. (1999). La cadena alimentaria como riesgo para la Salud Pública. Contaminación y alteración alimentaria. Tratado de Nutrición. Madrid. pp. 504-541.
- Jackson, L., Machado, L. y Hamilton, M. (1998). Principios generales de la terapia antimicrobiana. *Act. Med.* 8:13-27
- Jawetz, E. (1989). Quimioterapia antimicrobiana. Manual de microbiología médica. 9ed. Editorial El Manual Moderno, México, DF. pp. 110-53.
- Lacks, S. A. and Springhorn, S. S. (1980). Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 10:7467-7473.
- Leclerc, D. and Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrilamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* 35:749-753.
- Lienqueo, M. E., Mahn, A. and Asenjo J. A. (2002). Mathematical Correlations for Predicting Protein Retention Time in Hydrophobic Interaction Chromatography. *J. Chrom. A.* 978:71-79

- Lortal, S., and Chapot- Chartier, M. (2005). Role mechanisms and control of lactic acid bacterialysis in cheese. *J. Internat. Dairy*. 15:857-871.
- Llorente, B. A. (1998). Evaluación de la producción de bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 bajo diferentes condiciones cultivo. Tesis de Maestría en Microbiología. (FESC. UNAM.). pp. 33, 89.
- Llorente, B. A., Pérez-Munguía S. and Farrés A. (2008). Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATTC 8042. *Can. J. Microbiol.* 54: 694-699.
- Mathews, C., Ahern, K. y Van Holde, K. (2007). Bioquímica. Editorial Pearson. España. pp. 152,153, 202-208, 437-439.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V. (1999). Food- related illness and death in the Unites States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607-625
- Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M., Senini, L. and Manachni, P. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 94:561-570.
- Nagano, C.S., Calvete, J.J., Baretino, D., Pérez, A., Cavada, B.S. and Sanz L. (2008). Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. *Biochem. J.* 15:417-28.
- Nagel, R. (2007). La resistencia de las bacterias a los antibióticos. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. CONICET. Tomado de <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/15regulacion.htmtecnologia/2007/07/24/28327.php> (consultado 11 de junio de 2010).
- Office for National Statistics (2005) 'Deaths involving MRSA: England and Wales, 1993-2003.' Health Statistics Quarterly, spring 2005, No 25. London: ONS.
- Organización Mundial de la Salud / Organización Panamericana de la Salud. (1995). Enfermedades Diarreicas. Prevención y Tratamiento. Washington (DC): OMS/OPS

Porter, C., Schuch, R., Pelzek, A. Buckle, A., McGowan, S., Wilce, M., Rossjohn, J., Russell, R., Nelson, D., Fischetti, V. and Whisstock, J. (2007). The 1.6 Å Crystal Structure of the Catalytic Domain of PlyB, a Bacteriophage Lysin Active Against *Bacillus anthracis*. *J. Mol. Biol.* 366: 540–550.

Østlie, H. M., Vegarud, G. and Langsrud, T. (2007). Autolysis of propionibacteria: detection of autolytic enzymes by renaturing SDS-PAGE and additional buffer studies. *Int. J. Food Microbiol.* 117:167-174.

Queiroz, J.A., Tomaz, C. T. and Cabral, J.M.S. (2001). Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Biotechnol.* 87:143-159.

Rizzello, C, Losito, I, Bobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. and Zamboni, P. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of italian cheese varieties. *J. Dairy. Sci.* 88:2348-60.

Rosas, G. A. y Acosta, V. M. (2001). Manual de manejo higiénico de los alimentos. México, D.F. Secretaría de Salud. pp. 8,11 y 25.

Salminen, S., Von Wright, A. and Ouwehand, A. (2004). Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3rd. edition. Marcel Dekker. U.S.A. pp. 5-24, 375-387.

Serna, C., Ribes, M., Real, E., Galván, J. and Gascó L. (2011). Alta exposición a antibióticos en la población y sus diferencias por género y edad. *Aten. Prim.* 43:236-44.

Sigma- Aldrich technical bulletin, 2001. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-lysozyme.html>

Simitsopoulou, M., Vafopoulou, A., Choli-Papadopoulou, P. and Alichanidis, E. (1997). Purification and partial characterization of a tripeptidase from *Pediococcus pentosaceus* K9.2. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4872-4876.

Stryer, L., Berg, J. y Tymoczko, J. (2008). Bioquímica. 6ª. ed. Editorial Reverté, España. pp. 69, 70 y 884.

Turner, M. S., Waldherr, F., Loessner, M. J. and Giffard, P. M. (2007). Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 30:58-67.

Velasco-Pérez, L. Y. (2010). Caracterización y espectro antibacteriano de la peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Villarruel, R., Huizar, R., Corrales, M., Sánchez, T. e Islas, A. (2004). Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune. *Invest. Salud.* 6: 170-179.

Vital sings: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S sites 1996-2010 june 10 2011/ 60:749-755. Tomado de <http://www.fda.gov/> (consultado 1 agosto 2011).

Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bannerman, D. D., Pursel, V. G., Wells, K. D., Talbot, N. and Hawk H. W. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol.* 23:445-451.

Wyatt, T.D., Passmore, C. M., Morrow, N. C. and Reilly, R. M. (1990). Antibiotic prescribing: the need for a policy in general practice. *J.Br. Med.* 300:441-444.