



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

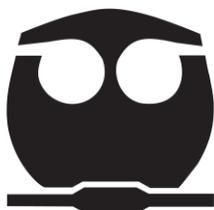
FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS: CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA
PEPTIDOGLUCANO HIDROLASA DE 99 kDa
PRODUCIDA POR *Pediococcus acidilactici* ATCC
8042**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

MANUEL ALBERTO CAMPOS GÓMEZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE **Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre**

VOCAL **Profesor: María del Carmen Wacher Rodarte**

SECRETARIO **Profesor: Amelia María Guadalupe Farrés
González Saravia**

1° SUPLENTE **Profesor: José Pedraza Chaverri**

2° SUPLENTE **Profesor: Norma Angélica Camacho de la Rosa**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Conjunto "E", Facultad de Química, Circuito de la Investigación
Científica s/n, Ciudad Universitaria, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

**DRA. AMELIA MARÍA GUADALUPE FARRÉS
GONZÁLEZ SARAVIA**

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.A. ISRAEL GARCÍA CANO

SUSTENTANTE:

MANUEL ALBERTO CAMPOS GÓMEZ

ÍNDICE

1. Introducción	5
1.1. Conservación de los alimentos.....	5
1.2. Bioconservación	8
1.3. Bacterias Ácido Lácticas.....	9
1.3.1. Metabolitos con actividad antibacteriana sintetizados por las BAL.....	10
1.3.2. Usos en alimentos de las BAL	11
1.4. Peptidoglucano hidrolasas (PGH)	12
1.4.1. Funciones de las PGH	14
1.4.2. Control de la actividad de PGH.....	15
1.4.3. Clasificación de PGH	16
1.4.4. Aplicaciones de las PGH en alimentos	16
1.4.5. Clonación y expresión de PGH	19
2. Antecedentes	26
2.1. <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	26
3. Objetivos.....	30
3.1. Objetivos particulares	30
4. Metodología	31
4.1. Clonación	31
4.1.1. Cepas y plásmidos utilizados	31
4.1.2. Extracción de ADN genómico de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	32
4.1.3. Geles de agarosa	32
4.1.4. Diseño de cebadores	33
4.1.5. Amplificación del gen 99 (Referencia de la secuencia en el NCBI: ZP_06196916.1).....	33
4.1.6. Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa	34
4.1.7. Construcción pET22-99 (Digestión y Ligación)	35
4.1.8. Transformación en <i>E. coli</i> XL1-Blue	36

4.1.9. Extracción de plásmido	37
4.1.10. Análisis de las transformantes (PCR y Digestión).....	38
4.1.11. Conservación de la cepa con la construcción (pET22-99 XL1-Blue)	39
4.1.12. Secuenciación de la construcción (pET22-99 XL1-Blue).....	39
4.2. Expresión	41
4.2.1. Selección de condiciones óptimas de inducción (pET22-99 XL1-Blue)	41
4.2.2. Localización de la mayor actividad lítica de la proteína recombinante.	42
4.2.3. Determinación del perfil electroforético y de actividad lítica por zimogramas de <i>M. lysodeikticus</i>	44
4.2.4. Western-Blot	45
5. Resultados y Discusión.....	46
5.1. Clonación	46
5.1.1. Extracción de ADN genómico de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	46
5.1.2. Amplificación del gen 99 (Referencia de la secuencia en el NCBI: ZP_06196916.1).....	46
5.1.3. Construcción pET22-99 (Digestión y Ligación).	47
5.1.4. Análisis de las transformantes (PCR y Digestión).....	49
5.1.5. Secuenciación de la construcción (pET22-99 XL1-Blue).....	50
5.2. Expresión	54
5.2.1. Selección de condiciones óptimas de inducción (pET22-99 XL1-Blue)	54
5.2.2. Localización de la mayor actividad lítica de la proteína recombinante.	59
5.2.3. Western-Blot	62
7. Conclusiones	64
8. Bibliografía	65

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Conservación de los alimentos

Los alimentos sufren el ataque destructivo de ciertos agentes que pueden afectar negativamente sus características organolépticas y sensoriales, por lo cual se hace necesario utilizar métodos de conservación que eviten este proceso de deterioro. Estos mecanismos de conservación se utilizan para mantener a los alimentos en perfectas condiciones en todas las etapas de la cadena productiva, desde el proceso de su elaboración hasta su consumo. Para entender las distintas prácticas de conservación de los alimentos es necesario conocer las causas del deterioro y su posible prevención. Entre ellas podemos distinguir, por su origen, las debidas a agentes físicos, químicos y biológicos [Silla, 2004].

- Los agentes físicos suelen actuar durante los procesos de cosecha, los tratamientos posteriores y en el almacenamiento. No suelen alterar las características nutricionales de los alimentos, pero sí sus características sensoriales. El hecho más importante es que pueden conducir a otras alteraciones del alimento.
- Los agentes químicos se manifiestan especialmente durante los procesos de almacenamiento de los alimentos y pueden afectar de forma notable el aporte nutrimental del alimento, así como las características propias del mismo.
- Los agentes que alteran de manera importante a los alimentos son de origen biológico. Pueden ser intrínsecos, como las enzimas, y extrínsecos, como parásitos o microorganismos.

Debido a la diversidad de agentes mencionada, los mecanismos utilizados para la conservación de los alimentos son muy variados, y pueden ir desde técnicas utilizadas desde hace varios años (ej. refrigeración, congelación, pasteurización, deshidratación, salado, ahumado, etc.) hasta técnicas relativamente nuevas como son el uso de radiaciones ionizantes y no ionizantes, el uso de altas presiones, las atmósferas modificadas [Bello, 2000].

Los métodos físicos para la conservación de los alimentos consisten, principalmente, en modificar la temperatura de proceso y/o de almacenamiento del alimento, así como en disminuir la actividad acuosa del alimento o el uso de radiación ionizante. El uso de bajas temperaturas en el almacenamiento (ej. refrigeración y congelación) permite que las reacciones enzimáticas y químicas que deterioran los alimentos sean más lentas, y también evita el desarrollo de microorganismos, aunque no los elimina [Aguilar, 2012]. La conservación de los alimentos utilizando temperaturas altas (ej. cocción y pasteurización) tiene como objetivo la destrucción parcial o total de los microorganismo y enzimas que contenga el alimento; sin embargo estos tratamientos modifican las propiedades sensoriales y nutrimentales de los alimentos [Cubero, 2002], razón por la que se han buscado métodos que controlen el desarrollo de microorganismos para aumentar la vida útil de los productos sin modificar las características originales del producto. Aunque se han evaluado otros métodos físicos, como las altas presiones hidrostáticas, el alto precio de los mismos ha obligado al desarrollo en otro tipo de métodos.

Uno de los más comunes es el uso de aditivos, que se definen como: "cualquier sustancia permitida que, sin tener propiedades nutritivas, se incluya en la formulación de los productos y que actúe como

estabilizante, conservador o modificador de sus características organolépticas, para favorecer ya sea su estabilidad, conservación, apariencia o aceptabilidad” [Ley General de Salud, 2013]. Desde un punto de vista normativo, cada uno de los aditivos alimentarios deberá de desempeñar alguna función o impartir un atributo útil y aceptable que justifique su uso [Fennema, 2010].

El uso de los conservadores se ha incrementado por el cambio en los procesos de producción y de distribución de los alimentos. Los alimentos son producidos y procesados en una determinada área o región y distribuidos en muchas otras, lo que provoca la necesidad de almacenarlos durante su elaboración, transporte y distribución, razón por la que el alimento pasa días o meses antes de ser consumido y la calidad de los alimentos puede verse afectada por procesos físicos, químicos, biológicos y microbiológicos, lo que hace necesario un adecuado método de conservación para mantenerlos en las condiciones óptimas de consumo [Branen *et al*, 2002]. Con la adecuada selección de conservadores, la vida media de muchos productos alimenticios se ha incrementado sustancialmente. Por ejemplo, se estima que con el uso de antioxidantes la vida media de algunos productos se incrementa hasta 200% [Barbosa-Cánovas *et al*, 1998].

El empleo de algunos agentes químicos con fines de conservación es controvertido en términos del balance de los riesgos que pueden causar en la salud y los beneficios obtenidos en cuanto al aumento de la vida comercial del alimento. Por ejemplo, ciertos aditivos, tales como el benzoato de sodio, sulfitos, sulfatos y la tartrazina, son conocidos por el hecho de causar alergias a personas sensibles [McCann *et al*, 2007]. En la búsqueda de alternativas inocuas y seguras que ayuden a aumentar

la vida de anaquel de los productos, evitando el uso de aditivos químicos, se han usado nuevos procesos como la bioconservación.

1.2. Bioconservación

Se denomina bioconservación al uso de herramientas biológicas como microorganismos y/o sus metabolitos con la finalidad de inhibir el crecimiento de microorganismo patógenos y/o responsables de la descomposición del alimento, aumentar la vida de anaquel e incluso mejorar las características sensoriales del alimento o producto [Caprice y Fitzgerald, 1999]. La bioconservación ha incrementado su popularidad por varias ventajas sobre otros métodos de conservación, entre las que destacan: los métodos naturales para la conservación de los alimentos no afectan a la salud de los consumidores, además de que tiene un menor impacto sobre las propiedades nutrimentales y sensoriales del producto en relación a otros métodos de conservación (ej. químicos o fisicoquímicos) [Gálvez *et al*, 2007]. También se puede afirmar que se reducen los costos de procesamiento mientras que la vida útil de los productos se alarga. Se resuelven problemáticas emergentes en la industria alimentaria, como el incremento de la resistencia a antibióticos en los microorganismos patógenos presentes a lo largo de la cadena alimentaria [Reis *et al*, 2012]. En contraposición con los aditivos químicos, los consumidores perciben a estas técnicas de bioconservación como algo “natural” y “benéfico para la salud”, por lo que su empleo en la conservación de los alimentos tiene gran aceptación [Rodríguez-Gómez, 2006], una de estas técnicas es el uso de bacterias ácido lácticas cuyas características más importantes se describen a continuación.

1.3. Bacterias Ácido Lácticas

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) constituyen un grupo de bacterias Grampositivas unidas por una serie de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general es que son cocos o bacilos, no esporuladas, anaerobios pero aerotolerantes, ácido tolerantes, las cuales producen ácido láctico como producto final durante la fermentación de carbohidratos y crecimiento entre 10°C y 45°C. En la fermentación se reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y da por resultado una gama de moléculas orgánicas de masa molecular pequeña, que tienen actividad antibacteriana. Las BAL tienen gran importancia económica ya que, de forma natural o añadidos intencionalmente como cultivos iniciadores, desempeñan un papel importante en la fermentación de una gran variedad de alimentos. Para fines prácticos, desde el punto de vista de la tecnología alimentaria, los siguientes géneros son considerados como las principales bacterias ácido lácticas: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* [Salminen, 2004].

Las BAL son un grupo diverso de bacterias que abarcan varios géneros y están asociados con una gran variedad de alimentos (Tabla 1). En general, las BAL son un grupo inocuo de bacterias que tienen una importancia ecológica en la conservación de los alimentos [Stiles, 1996].

Tabla 1. BAL usadas en la industria alimentaria [Leroy *et al*, 2004]

Tipo de alimento	BAL usadas
Leche y productos lácteos	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> y subsp. <i>lactis</i>

Queso Gouda y Cottage	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ; <i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Quesos Suizos	<i>Lb. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lb. helveticus</i>
Yogurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>
Kefir	<i>Lb. kefir</i> ; <i>Lb. kefiranofaciens</i>
Productos cárnicos fermentados	<i>P. acidilactici</i> ; <i>P. pentosaceus</i> ; <i>Lb. sake</i> ; <i>Lb. curvatus</i> ; <i>Lb. farciminis</i>
Productos pesqueros	<i>Lb. alimentarius</i> ; <i>C. piscícola</i>
Vino	<i>Le. oenos</i>
Productos vegetales fermentados	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lb. sake</i> ; <i>Lb. buchneri</i> ; <i>Lb. fermentum</i> ; <i>Lb. pentosus</i> ; <i>Lb. bavaricus</i> ; <i>Lb. brevis</i> ; <i>Le. mesenteroides</i>

Las BAL producen una amplia gama de sustancias con actividad antibacteriana [Turner *et al*, 2007], que pueden ser metabolitos primarios o secundarios.

1.3.1. Metabolitos con actividad antibacteriana sintetizados por las BAL

- **Ácidos orgánicos.** El resultado de la fermentación de las hexosas por la vía heterofermentativa da una gama de moléculas orgánicas, que tienen actividad antibacteriana; las más comunes son el ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico [Salminen, 2004].

- **Bacteriocinas.** Son sustancias de naturaleza peptídica, pequeñas (no mayores a 30 kDa), 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 que se sintetizan en el ribosoma, la célula productora es inmune a éstas y tienen un reducido espectro bactericida, pues generalmente actúan sobre bacterias filogenéticamente cercanas a la cepa productora [Cotter *et al*, 2005].
- **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 y lácteos madurados. 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 [Villaruel *et al*, 2004].

Además de los compuestos ya mencionados, existe un grupo de enzimas sintetizadas por las BAL, llamadas peptidoglucano hidrolasas (PGH), que se describirán más adelante.

1.3.2. Usos en alimentos de las BAL

Las bacterias lácticas gozan de gran importancia económica ya que desempeñan un papel importante en la fermentación de una gran variedad de alimentos en los que pueden encontrarse de forma natural o ser añadidas intencionalmente. Las actividades metabólicas de las BAL

no sólo contribuyen al desarrollo de características organolépticas y reológicas deseables sino que, además, permiten conservar o aumentar el valor nutritivo y la inocuidad de la materia prima [Barbosa-Cánovas *et al*, 1998]. Las bacterias lácticas y los productos de su metabolismo han sido consumidos desde tiempos remotos. Han sido usados para la fermentación de productos vegetales y derivados de la leche. Por ejemplo, los extractos celulares de algunas cepas de *Pediococcus* aislados de los quesos Cheddar y Feta poseen actividad de proteasa y de enzimas que hidrolizan péptidos (aminopeptidasas, dipeptidasas y esterases), que contribuyen potencialmente a la maduración del queso a través de la proteólisis [Simitsopoulou *et al*, 1997]. La lisis de la bacteria durante estos procesos es un paso significativo en el cual se generan productos finales de fermentación deseables o no deseables [Turner *et al*, 2004]. También han sido usadas como probióticos para mejorar la composición y la actividad normal de la microbiota del intestino [Kruszewska *et al*, 2005]. Esta capacidad de las BAL para producir sustancias antibacterianas ha sido usada a lo largo de la evolución de la industria de los alimentos para aumentar su vida de anaquel, unida al hecho de que raramente se les ha asociado a procesos patológicos, es decir, no hay un efecto nocivo por el uso de éstas en el cuerpo humano, ha contribuido a la designación de muchas de las especies del grupo como bacterias "seguras" o GRAS -Generally Recognized As Safe [Barbosa-Cánovas *et al*, 1998].

1.4 Peptidoglucano hidrolasas (PGH)

El peptidoglucano es un heteropolímero de azúcares y aminoácidos, sintetizados solamente por los procariontes. Es una malla rígida compuesta de cadenas lineales de glucano unidas por entrecruzamiento

de oligopéptidos para formar una red, la cual engloba a la célula. A su vez, el polisacárido se conforma por unidades alternadas de ácido *N*-acetilmurámico (NAM) y *N*-acetilglucosamina (NAG). Las PGH son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos o peptídicos del peptidoglucano, principal componente de la pared celular de las bacterias [Huard *et al*, 2004]. Dependiendo del tipo de enlace del peptidoglucano que hidrolicen se clasifican en: *N*-acetilmuramidasa (muramidasa), *N*-acetilglucosaminidasa (glucoamidasa), *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa (amidasa) y endopeptidasas [Lortal *et al*, 1997; Raddadi *et al*, 2005; Vollmer *et al*, 2008] (Figura 1). Estas enzimas tienen un dominio catalítico activo y un dominio que se une a la pared celular [Vollmer *et al*, 2008].

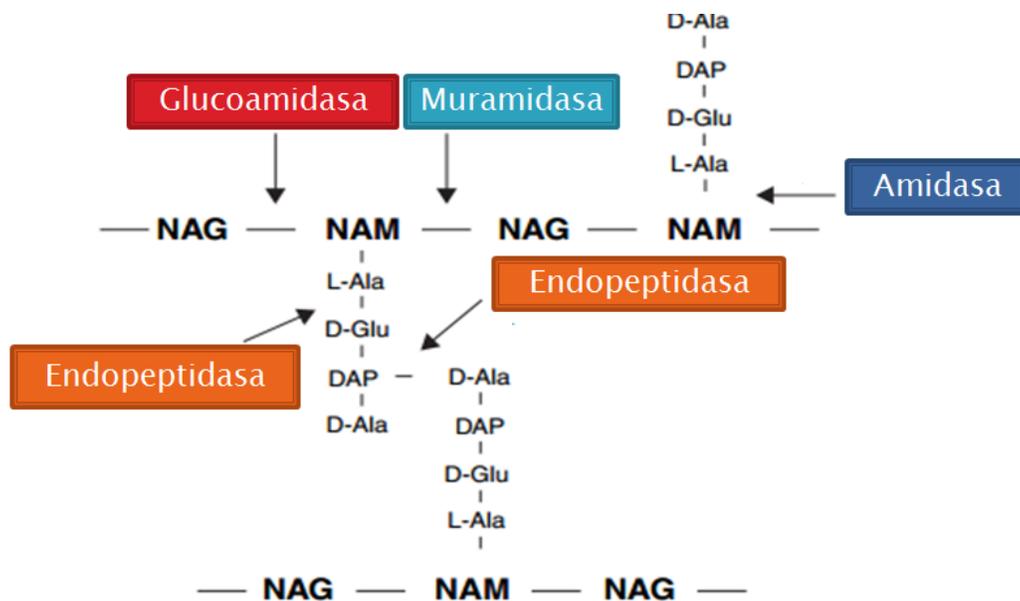


Figura 1. Estructura del peptidoglucano de *E. coli* y clasificación de las PGH [Callewaert *et al*, 2011].

Se ha reportado que algunas bacterias poseen autolisinas (otra forma de llamar a las PGH), poseen más de un tipo de actividad o diferentes autolisinas con la misma actividad [Østlie *et al*, 2007]. En la Tabla 2 se presentan las PGH reportadas en BAL, con sus respectivas actividades.

Tabla 2. PGH reportadas en BAL

BAL ´s	Actividad lítica	Referencia
<i>Lactobacillus casei</i>	Glucoamidasa	Cappa <i>et al</i> , 1996
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Endopeptidasa	Mora <i>et al</i> , 2003
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Glucoamidasa y Endopeptidasa	Cibik <i>et al</i> , 2004
<i>Lactococcus lactis</i>	Glucoamidasa, Muramidasa y Endopeptidasa	Huard <i>et al</i> , 2004
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Muramidasa	Lortal <i>et al</i> , 2005
<i>Leuconostoc citreum</i>	Glucoamidasa y Endopeptidasa	Lortal <i>et al</i> , 2005
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Glucoamidasa y Amidasa	García-Cano <i>et al</i> , 2011

1.4.1. Funciones de las PGH

Las PGH están involucradas en diferentes funciones celulares, como el crecimiento, la división y la autólisis, además de poseer roles determinantes en procesos más específicos en la célula como en el ensamblaje de los flagelos o en la formación de bio-películas (Tabla 3) [Smith *et al*, 2000; Huard *et al*, 2004; Vollmer *et al*, 2008].

Tabla 3. Funciones de las peptidoglucano hidrolasas [Vollmer *et al*, 2008].

Función	Observaciones
Extensión del peptidoglucano	Ruptura de enlaces para permitir la expansión del peptidoglucano durante el crecimiento
Recambio del peptidoglucano	Desarrollo de fragmentos solubles de peptidoglucano durante el crecimiento
Producción de moléculas de señalización	Inducción de la β -lactamasa por productos de recambio del peptidoglucano

Productos del recambio de reciclaje del peptidoglucano	Ruptura de productos de recambio para reutilizarlos en la síntesis del peptidoglucano
Separación celular durante y antes de la división celular	Ruptura de la pared celular durante la división celular en bacterias Gram-negativas. Ruptura del entrecruzamiento después de la división en bacterias Gram-positivas
Lisis de células	Secreción de peptidoglucano hidrolasas para degradar el peptidoglucano de células blanco
Formación de bio-películas	Las peptidoglucano hidrolasas son necesarias para la construcción inicial de células con superficies hidrofóbicas

1.4.2. Control de la actividad de PGH

La actividad de las PGH debe estar altamente regulada, por lo que se han propuesto diferentes mecanismos para lograrlo. Estos incluyen alteraciones físicas o químicas del peptidoglucano que dan como resultado cambios conformacionales [Koch *et al*, 1985] y modificaciones covalentes [Clarke y Dupont, 1992; Bera *et al*, 2005] del sustrato natural de estas enzimas. La presencia o ausencia de ciertos compuestos químicos que se encuentran en la pared celular tales como: ácidos teicoicos, cardiolipina y ácidos lipoteicoicos, inhiben la actividad de PGH de muchas especies Gram-positivas. Por otra parte, se ha demostrado también que el crecimiento a bajos valores de pH inhibe la actividad autolisina, probablemente por el cambio en el entorno iónico y el estado energético de la membrana [Vollmer *et al*, 2008].

1.4.3. Clasificación de PGH

Las PGH pueden ser agrupadas en dos clases de enzimas. En el primer grupo se encuentran las autolisinas, las cuales son secretadas del citoplasma por un péptido señal en el extremo N-terminal y degradan el peptidoglucano de la pared celular en sitios específicos durante el desarrollo de la célula. Como las autolisinas son peligrosas para la integridad de la célula, su expresión o actividad debe estar bien regulada. Una vez producida la PGH, su regulación se lleva a cabo por algunas proteasas asociadas a la pared celular que disminuyen drásticamente su capacidad autolítica. En el segundo grupo se encuentran las endolisinas, que están codificadas en bacteriófagos y son exportadas por holinas (pequeños polipéptidos que se insertan dentro de la membrana citoplasmática de la bacteria hospedera). La función de las endolisinas es la hidrólisis completa de la pared celular para la liberación de los bacteriófagos. La inducción del profago puede ser causada por un agente mutagénico o por estrés ambiental, por ejemplo choque térmico [Lortal *et al*, 2005].

1.4.4. Aplicaciones de las PGH en alimentos

La globalización del mercado de alimentos, los nuevos procesos de manufactura en alimentos, el crecimiento en la demanda de alimentos menos procesados y el aumento en la venta de alimentos listos para comer requieren una más amplia y compleja cadena de producción lo cual incrementa el riesgo de contaminación microbiológica [García *et al*, 2010]. A su vez la resistencia a antibióticos se ha extendido entre las bacterias presentes en los alimentos, por transmisión horizontal de genes, a partir del uso indiscriminado de los mismos. Esto ha

complicado el control de las enfermedades producidas por bacterias, provocando que la causa de mortandad por estas enfermedades aumente a nivel mundial [García *et al*, 2010; Moellering, 2011]. Esto ha llevado a la investigación, desarrollo y diversificación de alternativas para el control de bacterias patógenas [Donovan *et al*, 2006; Fischetti, 2010]. Estas peptidoglucano hidrolasas cuentan con una potente actividad *in vivo* e *in vitro* especialmente contra bacterias Gram-positivas. Además de la poca probabilidad de que se genere resistencia contra ellas, estas enzimas se pueden modificar por ingeniería genética de forma relativamente fácil obteniendo enzimas recombinantes con un gran potencial antibacteriano. Algunos autores también denominan a este tipo de enzimas como enzibióticos [Parisien *et al*, 2008; Borysowski *et al*, 2006; Donovan *et al*, 2006].

Dentro de las aplicaciones de los enzibióticos se encuentran la eliminación de la colonización bacteriana a membranas de la mucosa del aparato digestivo, el tratamiento en infecciones provocadas por bacterias, el biocontrol de bacterias en alimentos y la protección de plantas contra bacterias fitopatógenas (Tabla 4).

Tabla 4. Aplicaciones de peptidoglucano hidrolasas de bacteriófagos

Nombre de la PGH	Uso o potencial aplicación	Referencia
Ply511 y Ply118	Control de <i>L. monocytogenes</i> en quesos madurados	Gaeng <i>et al</i> , 2000
Ply3626 amidasa	Contra <i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	Zimmer <i>et al</i> , 2002
PlyV12	Actividad lítica contra <i>Enterococcus faecalis</i>	Yoong <i>et al</i> , 2004
PlyG	Inhibe <i>Bacillus anthracis</i>	Fischetti, 2008

Ply700	Actividad lítica contra estreptococos que causan mastitis	Obeso <i>et al</i> , 2008
CD27L	Inhibe diversas cepas de <i>Clostridium difficile</i>	Fenton <i>et al</i> , 2010
LysH5	Inhibe <i>S. aureus</i> en leche pasteurizada	García <i>et al</i> , 2010

Además de los enzibióticos existen otras PGH que ya se aplican como antibacterianos en los alimentos, como es el caso de la lisostafina y la lisozima.

- Lisostafina. Es una PGH producida y distribuida comercialmente como antibacteriano, gracias a que tener una actividad bactericida muy alta; es una metaloenzima dependiente de zinc de 27 kDa, presenta actividad de endopeptidasa, glucosaminidasa y amidasa, es producida por *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. El blanco natural de la lisostafina es el enlace peptídico de la pentaglicina y su actividad está limitada a *Staphylococcus aureus* y especies relacionadas [Fedorov *et al*, 2003; Turner *et al*, 2007].
- Lisozima. Es una muramidasa de la cual se tienen tres diferentes tipos, los cuales muestran similitudes en su estructura tridimensional, pese a no tener mucha relación a nivel de estructura primaria. La HEWL (Hen Egg White Lysozyme) es el tipo de lisozima más extensamente estudiado y de los pocos agentes antibacterianos aprobado como bioconservador en Estados Unidos y otros países [Callewaert *et al*, 2011].

1.4.5. Clonación y expresión de PGH

Una opción para la producción y su posterior aplicación en los alimentos de estas enzimas es la clonación y expresión, por ejemplo el gen *Iss* que codifica para la lisostafina ha sido clonado en distintas BAL como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sake*, para su potencial uso en alimentos cárnicos [Cavadini *et al*, 1996].

1.4.5.1. Clonación

La clonación consiste en amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el gen de interés, esta reacción corresponde al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN molde son duplicadas por la ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 35) que integran la reacción, al final de cada uno de los ciclos las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, logrando una producción exponencial de millones de copias del gen (Figura 2). Se necesitan varios componentes para que la PCR se lleve a cabo: el ADN templado, la ADN polimerasa, los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTP's, sustratos para la ADN polimerasa), los cebadores, iones magnesio y otras sales necesarias para que se produzca la reacción [Pierce, 2010]; una vez contando con todo los componentes, los pasos a seguir de la reacción son los siguientes:

1. Desnaturalización. Calentamiento por encima de 90°C por un minuto o dos con el fin de separar las hebras del ADN templado
2. Alineación. Posteriormente hay una disminución en la temperatura a alrededor de 50°C a 60°C, permitiendo que los cebadores se

unan a sus secuencias complementarias específicas en las hebras del ADN templado.

3. Extensión. La temperatura se mantiene en 68–72°C por un minuto o dos, dependiendo de la enzima utilizada, para que la polimerasa comience a elongar las nuevas hebras a partir de los cebadores (Figura 2).

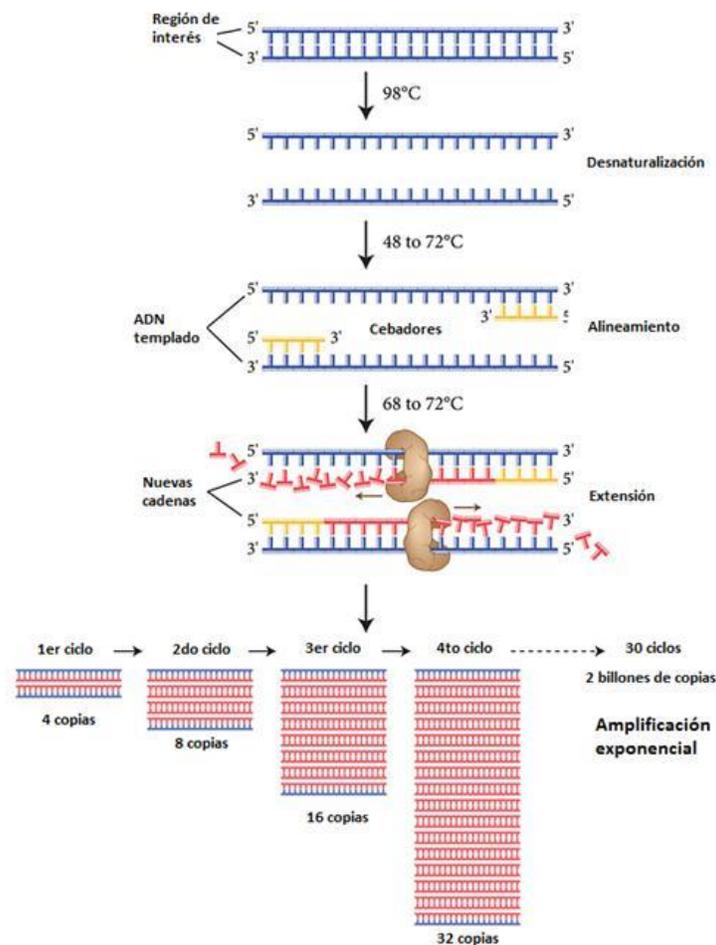


Figura 2. Diagrama general de la PCR [Tomado y modificado de New England BioLabs Inc., 2013].

Posteriormente el gen de interés (ADN a clonar) se introduce de un vehículo molecular (vector) y este se reproduce dentro de un organismo. Estos vectores son pequeñas moléculas de ADN circular que se encuentran en bacterias de forma independiente al ADN cromosomal

que no son esenciales para la sobrevivencia de las mismas; adicionalmente se le insertan pequeñas regiones de ADN que contienen sitios de restricción donde ciertas enzimas (endonucleasas) reconocen estas regiones para generar cortes y así poder introducir el gen de interés sin afectar la reproducibilidad del mismo, dichas regiones se les conoce como sitios múltiples de clonación. Estos sitios se localizan dentro de un gen que codifica para una marca detectable, tal como una enzima que da una reacción colorida cuando se agrega el sustrato adecuado o alguna actividad que confiera resistencia a un antibiótico. Los plásmidos recombinantes formados son introducidos en las bacterias, por un procedimiento de transformación, que se fundamentan en la formación de poros en la membrana y pared celular para permitir la entrada del material genético hacia el interior de la célula [Peredelchuk *et al*, 1997; Baneyx, 1999]. Si el organismo hospedero es una bacteria o una levadura la replicación o división celular ocurrirá frecuentemente y el número de copias del ADN producidas será muy alto [Maldonado, 1998]. En la figura 3 se muestra un diagrama general de clonación.

En un experimento típico de clonación se requiere: (1) el ADN de interés; (2) el vector de clonación; (3) enzimas de restricción (endonucleasas); (4) ADN ligasa; y (5) el hospedero (células procariontes o eucariontes). Es muy importante que el gen de interés así como el vector de clonación se traten con las mismas enzimas de restricción para producir sitios específicos de incisión en el ADN que da lugar a que los dos sean complementarios, y esto permite que se puedan alinear para producir la molécula recombinante (construcción). La ADN ligasa se utiliza para unir los extremos compatibles de los dos fragmentos de ADN, después de que esta enzima selle los dos extremos de la construcción puede ser físicamente insertada en el hospedero por

alguna de las diferentes técnicas de transformación (electroporación, micro-inyección, por choque térmico, etc.) [Rodríguez y Tait, 1983].

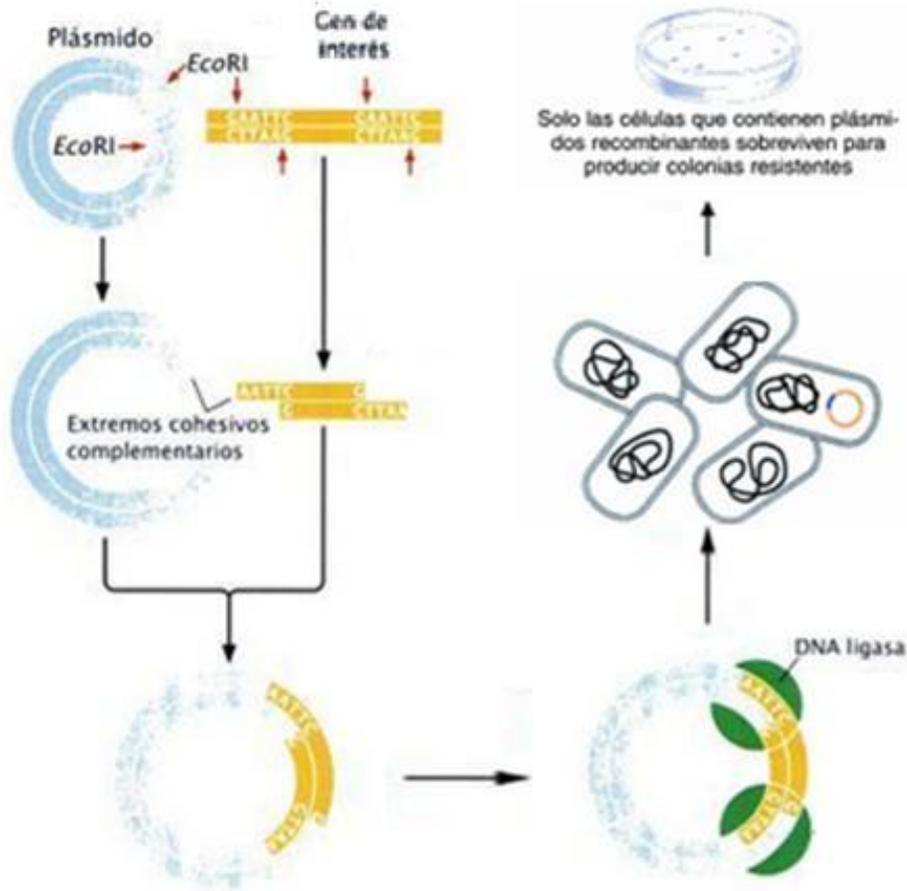


Figura 3. Clonación en un vector (plásmido) [Tomado y modificado de Watson, 2008 y Pierce, 2010].

1.4.5.2. Expresión de proteínas recombinantes

Para la producción de proteínas recombinantes se hace uso de uno de los múltiples sistemas de expresión disponibles comercialmente o aquellos desarrollados con fines de investigación, o bien se pueden diseñar y construir sistemas de expresión según necesidades específicas. Un sistema de expresión lo conforma un organismo

hospedero y un vector de expresión o fragmentos de ADN que poseen los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicho organismo.

Para la selección de un sistema de expresión adecuado para la síntesis de una proteína recombinante se tienen que tener en consideración: (i) el origen biológico, ya que generalmente un sistema de expresión eucariota es más eficiente para sintetizar proteínas de origen eucariota que un sistema de expresión procariota. (ii) Las propiedades químicas y biológicas también son importantes para evaluar el peso molecular, punto isoeléctrico y tipo de modificaciones postraduccionales presentes, la estabilidad al pH y a la temperatura, la posible toxicidad sobre el hospedero, el destino celular deseado y el grado de pureza deseado. (iii) También es importante conocer la aplicación que se le dará posteriormente, así como considerar el bioproceso en que la proteína recombinante se empleará para su producción específicamente el tipo y condiciones operacionales de cultivo y la escala de producción [Guerrero-Olazarán y Viader-Salvadó, 2004].

En actividades de investigación y en producción industrial se emplea una gran variedad de hospederos que van desde organismos unicelulares tales como bacterias, hongos, levaduras y líneas celulares de mamíferos, insectos o plantas, hasta organismos completos como animales y plantas transgénicas. Dentro de las bacterias, *E. coli* ha sido la más empleada para estos fines, aunque también se han utilizado *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescents*, *Pseudomonas sp.*, *Streptomyces lividans*, *Lactobacillus lactis*, entre otras [Walsh y Headon, 1995].

1.4.5.3. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

E. coli es una bacteria con un cromosoma circular de cerca 3 millones de pares de bases (pb) de longitud, que puede crecer rápidamente en medio mínimo que contenga una fuente de carbono y sales que proporcionen nitrógeno, fósforo y algunas trazas de metales. Esta bacteria ha sido el huésped procarionte más utilizado para la expresión de proteínas recombinantes debido a que su genética molecular, fisiología y sistema de expresión han sido ampliamente caracterizados [Makrides, 1996; Choi *et al*, 2004], además de ser barato respecto a otros métodos de expresión y facilidad de obtener cultivos con una alta densidad celular que han facilitado la obtención de proteínas recombinantes [Jeong *et al*, 1999; Gerigk *et al*, 2002; Mijts *et al*, 2003; Jeong *et al*, 2004]. La expresión de proteínas recombinantes mediante este sistema requiere de vectores específicos, de los cuales existe una gran variedad con una gran diversidad genética que facilitan la localización y purificación de la proteína expresada. Por otra parte, la expresión de proteínas en estas bacterias requiere que el vector presente un promotor transcripcional fuerte e inducible para controlar la expresión del gen a un alto nivel. El más utilizado es el operón *lac*, que consta de tres genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*. Cuando las células crecen en un medio mínimo en presencia de glucosa, la transcripción es bloqueada por el represor *Lac* (producto del gen *lacI*) el cual se une a un único sitio río arriba del gen *lacZ* y evita que la ARN polimerasa transcriba los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*, de los cuales dos de estos productos son necesarios para el crecimiento en presencia de lactosa. Para la expresión de proteínas recombinantes generalmente se emplean inductores químicos o térmicos, de los cuales el más común es el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) el cual interacciona con el represor *Lac* evitando que se inhiba la transcripción de genes que se

encuentren bajo el control de este promotor [Sørensen *et al*, 2005]. La transcripción y expresión basal en la ausencia de un inductor es minimizado en presencia de un inhibidor o represor, lo cual es de vital importancia cuando la proteína expresada produce una situación de estrés celular y permite la pérdida del plásmido o la muerte celular. El inhibidor de la transcripción basal más empleado durante la expresión de proteínas recombinantes es la glucosa, puesto que disminuye la concentración de AMPc, el cual se une a la proteína de unión a AMPc (CAP) y activa la transcripción de este operón [Grossman *et al*, 1998; Kuo *et al*, 2003]. El operón *lacUV* es una versión mutada del operón *lac*, cuya actividad basal es menos sensible al incremento de niveles intracelulares de AMPc y al igual que el operón *lac*, se activa tras el uso de análogos de lactosa. Otro factor fundamental que se debe tener en cuenta para la expresión de proteínas recombinantes es la cepa de *E. coli* hospedera, puesto que se debe caracterizar por tener una baja expresión de proteasas a fin de evitar la degradación de la proteína de expresión. La cepa de *E. coli* que es utilizada en estos protocolos es la BL21(DE3), la cual se caracteriza por alcanzar una alta densidad óptica, no es patogénica y es deficiente en la expresión de proteasas, en especial, una extracelular (*ompT*) y una intracelular (*Lon*), que pueden degradar la proteína de interés. Adicionalmente, esta cepa presenta la secuencia que codifica la RNA polimerasa T7 que depende del promotor *lacUV5* y la expresión del represor *lacI*, por esta razón los vectores de expresión utilizados con esta cepa deben presentar el promotor con la secuencia de reconocimiento para esta RNA polimerasa. Algunos vectores generan proteínas de fusión, proteínas ligadas a péptidos o a otras proteínas (por ej. His-Tag) de características conocidas, que proporcionan un marcador de reconocimiento y en teoría simplifican el proceso de purificación [Sørensen *et al*, 2005].

2. ANTECEDENTES

2.1. *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Pediococcus acidilactici es una BAL de la familia *Lactobacillaceae*, tiene forma de coco y se agrupa en pares o tétradas, además de ser una cepa no patógena. Esta cepa también es capaz de producir ácido láctico a partir de glucosa, galactosa, arabinosa, manitol y dextrina. Es homofermentativa usada en la preparación de cultivos iniciadores y presente como microbiota secundaria en diferentes tipos de queso. También se sabe que esta cepa produce un efecto de bioconservación en productos cárnicos, como en embutidos tipo salami [Rivera, 2004].

En *P. acidilactici* ATCC 8042 se ha reportado actividad de PGH intracelular, que fue relacionada con la autólisis del microorganismo, que se presentó (entre 40% y 90%) después de 48 h de incubación a 37°C [Mora *et al*, 2003]. Esta cepa no codifica para la producción de pediocinas [Mora *et al*, 2000], por lo que el efecto bactericida que presenta se debe a otro tipo de sustancias. También se ha reportado 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 (Tabla 5) [Velasco-Pérez, 2010].

Tabla 5. Espectro antibacteriano reportado (halos de inhibición (mm)/ concentración de proteína (mg)) [tomado y modificado de Velasco-Pérez, 2010].

	Microorganismo	Actividad (mm/mg proteína)
Gram-positivas	<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	206.4
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	127.2
	<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218	188.9
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	180.2
	<i>Enterococcus faecium</i> QB	99.4
	<i>Enterococcus faecalis</i> QB	88.9
	<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	77.8
	<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	89.6
	<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	79.2
Gram-negativas	<i>Salmonella typhimorium</i> ATCC 14028	200.6
	<i>Escherichia coli</i> DH5a	76.6
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.0

En trabajos más recientes se reportó dos bandas con actividad lítica contra *M. lysodeitkticus* a los 110 y 99 kDa. La banda de 110-kDa es una proteína putativa de *P. acidilactici* 7_4 que contiene a una región conservada de transportador ABC, mientras que la banda de 99 kDa presentó un dominio de *N*-acetilmuramidasa que ha sido reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7_4, además de encontrarse sitios catalíticos putativos de *N*-acetilglucosaminidasa y de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa [García-Cano *et al*, 2011]. En la Figura 4 se muestra la secuencia de la proteína de 99 kDa, donde se pueden observar los sitios catalíticos putativos ya mencionados, además de presentar regiones muy conservadas de unión a carbohidratos y una región de unión a Zn²⁺.

Posteriormente se trató de purificar estas dos proteínas para caracterizarlas bioquímicamente, pero debido a la similitud de pesos moleculares y de propiedades físico-químicas, no se logró purificarlas. El extracto que las contenía las dos enzimas se caracterizó por zimografía en función de temperatura óptima, pH óptimo, activadores, inhibidores y especificidad por sustrato y se obtuvieron los siguientes resultados [Valenzuela-Rosas, 2012]:

- La preparación parcialmente pura con actividad de peptidoglucano hidrolasa obtenida de *P. acidilactici* ATCC 8042 presentó máxima actividad y estabilidad a la temperatura después de haber sido incubada 90 min a 37°C. La actividad lítica disminuye conforme aumenta la temperatura, cuando la preparación se incubó 90 min a 80°C, en estas condiciones pierde el 50% de actividad.
- A pH de 4 se observó un aumento de la actividad lítica del 10% con respecto al control (extracto sin tratamiento), 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 inhibió la actividad el EDTA en concentraciones de 1 y 10 mM.
- El ión que tuvo un efecto positivo sobre la actividad fue Mg^{2+} en concentración 10 mM.
- La fracción semi-pura presentó actividad de muramidasa y endopeptidasa.

1 MFKSGKKWAF ASIATASLGL VALNTNAEKA HADSDAQANT NSASQLDQQT KTAPVNEKQV
 61 TLAKPATVKA SAAVTAQSA APAPSAAQSA AKVNADSTAK ADQHSAAAKV GTKATTSSAV
 121 KPAKEAASAN AVKAAPASSA AKKVSTSVAS SAAPSSAASK TVTSAAVKDS AAKEAVSSAA
 181 NVKSSSAAAK TSVNSSAVSE AAKKDAKAEK TAEKKTDNSS KDYTIDNTYR LADNEGSDQK
 241 TNNKIIVAHAVGQYSSARDV AIYEKREWDS SETYVQYIVG DGGRVYAVGE EGYVAWGAGK
 301 WANENAPVQV ELAQYSDSQ FKKDYQTYVN LLRDSAKKWN IPTTLDSEY TGIKSHVWVT
 361 EHVWGNHVDYGYLGTHGIT KEQFAHDLAY GFDNDAANDN QNNNQNDNHQ NDNQNNQNNN
 421 HQNDSSNNHG NQNNQSYHVG DKVTIKNSAS HWATGQSIYN GVKGHTYKII QTNGHKLILLD
 481 QVISWINDGD VYKAGSNSGS SNNHNNNHTT NNADIKVGTV VTINNNASHW ATGQSIYSGV
 541 KGKSYKVIQT NGNRLLLDKV ISWINKGDVH VPGSNSNNNN SGNQNHNNGN NHHNNGNTES
 601 IHVGSKVTIN NNAKRWATGQ NIYSGVKGKT YTVIQMNGSR LLLDKVISWI NKGDVHLPGS
 661 NGSQNNNNNN NNHANNDGT IRVGTNVTIK PSAKRWATGQ NIYYGVKGKT YKVIQMNGNR
 721 LLLDKVISWI NKGDVYVPGS SNNNNSNSNN NHHNNGSNYH FTNQNWTAQA TNFVNSIASD
 781 VMNVCQNNHL YASVAMAQAV VESAYGASTL AQEAHNLFGI KADSTWHGAT YTKNTQEVIN
 841 GRVVTISAAF RKYDSFKDSI ADYAKLESR PQYANAFSNH AHNYVESVKA IKAGGYATAP
 901 TVSSIVNCI NNYGFYKLDG LNSAISL

Figura 4. Traducción a aminoácidos de la enzima de 99 kDa presente en el genoma de *P. acidilactici* 7_4 con las siguientes regiones conservadas: función de N-acetilmuramidasa (morado), sitio de unión a Zn²⁺ (amarillo), función de N-acetilglucosaminidasa (verde), péptido señal (rojo) [NCBI, 2012].

Debido a que en el proceso de purificación de la preparación con actividad de PGH obtenida de *P. acidilactici* ATCC 8042 no se logró la separación eficiente de las dos enzimas se decidió aislar el gen correspondiente y expresar la enzima de 99 kDa en un hospedero heterólogo, en este caso, *E. coli*. A partir de las regiones conservadas que presentó en la secuencia en el análisis *in silico* (Figura 4), se plantea el uso de oligonucleótidos a emplearse como cebadores para amplificación por PCR. No se reportan en la bibliografía enzimas con estas características en el genoma de *P. acidilactici* ATCC 8042.

3. OBJETIVOS

CLONAR Y EXPRESAR LA PEPTIDOGLUCANO HIDROLASA DE 99 kDa DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

3.1. Objetivos particulares

- Determinar las condiciones óptimas de inducción de la proteína recombinante.
- Determinar la actividad lítica por zimogramas contra *Micrococcus lysodeikticus*.
- Determinar la localización celular en la que se encuentra la mayor actividad lítica.

4. METODOLOGÍA

4.1. Clonación

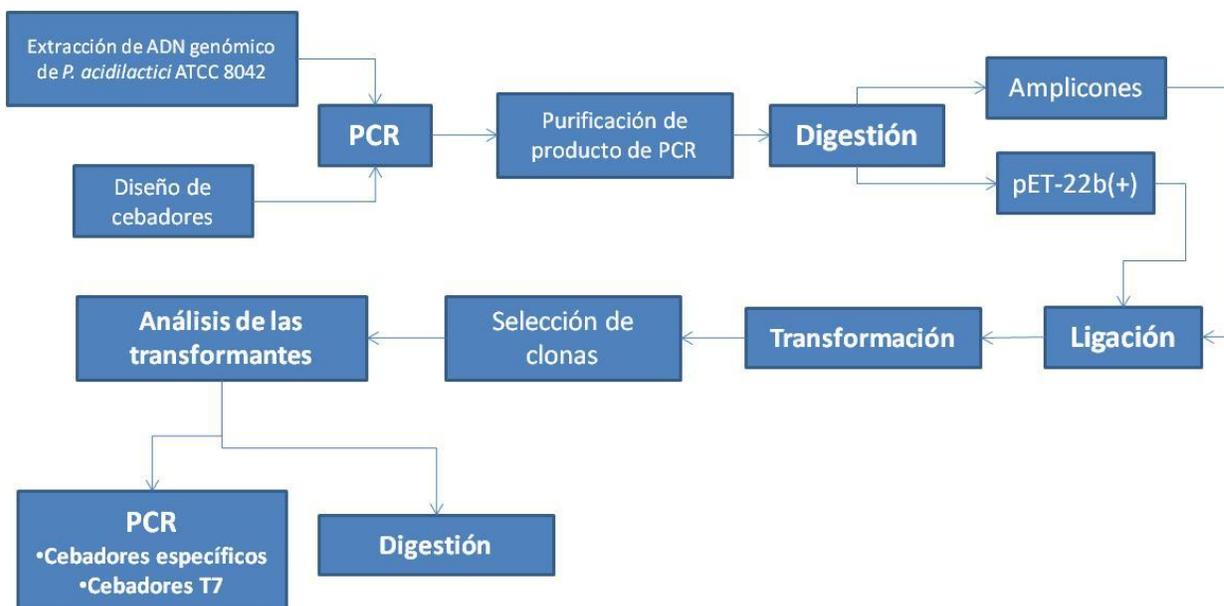


Figura 5. Diagrama general de la metodología a seguir en la clonación de la peptidoglucano hidrolasa de 99 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042.

4.1.1. Cepas y plásmidos utilizados

Las cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Cepas y plásmidos usados

Cepa / plásmido	Observaciones
<i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	Se obtuvo de la colección de cultivos microbianos del CINVESTAV, México
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	Cepa de clonación y expresión (Stratagene, USA)
pET-22b (+)	Vector de expresión, resistencia a Ampicilina, promotores T7 <i>lac</i> , <i>His-Tag</i> en el carboxilo terminal, presente un péptido señal direccionando la proteína a periplasma (Novagen, USA)

La cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 se almacenó a -20 °C en crioviales con esferas de vidrio y en caldo MRS (DeMan Rogosa and Sharp, Oxoid) adicionado con 20% (v/v) de glicerol al 80%.

4.1.2. Extracción de ADN genómico de *P. acidilactici* ATCC 8042

Se realizó un preinóculo partiendo de la cepa conservada a -20°C de *P. acidilactici* ATCC 8042, y se adicionaron 200 µL a un tubo con 10 mL de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe). El preinóculo se incubó a 29°C durante 12 h (Incubadora Innova 4000, New Brunswick Scientific). Se realizó una resiembra adicionando 1.5 mL del preinóculo a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo MRS, el cual se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 a una longitud de onda de 600nm (DO₆₀₀) (Biomate 3 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 8,500 rpm durante 20 min a 4°C (Biofuge primo R Centrifuge, Heraeus). El paquete celular se lavó dos veces con solución salina 0.85% de NaCl pH = 7.0, se centrifugó bajo las mismas condiciones y se guardó el paquete celular a -20°C, hasta su uso. Se tomaron aproximadamente 200 mg de las células para la extracción de ADN, la cual se realizó con el Kit FAST ID® (Genomic DNA Extraction Kit, Genetic ID NA INC) siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. Después de la extracción se cargaron 2 µL de ADN en un gel de agarosa al 0.1% con bromuro de etidio 0.01% para verificar integridad.

4.1.3. Geles de agarosa

Los geles se ocuparon al 1% de agarosa, utilizando buffer TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM). Las muestras se mezclaron

con buffer de carga 6X (Loading Dye 6X, Fermentas). Se corrieron los geles a 90 V y se revelaron con bromuro de etidio al 0.01% sobre un transiluminador de luz UV.

4.1.4. Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores específicos (Tabla 7) para amplificar el gen de interés de *P. acidilactici* ATCC 8042, utilizando el software Oligocalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) y analizando las secuencias reportadas en la base de datos del genoma de *P. acidilactici* 7_4. Se insertaron sitios de corte para las enzimas de restricción EcoRI y XhoI.

Tabla 7. Cebadores utilizados en este trabajo

Cebador	Cebador (5' → 3')	Longitud	Tm (°C)
EEcoRIOK	GCC <u>GAA TTC</u> GTT TAA GTC AGG GAA GA EcoRI	26 pb	58.9°
EXhoIOK	TGA <u>CTC GAG</u> CAA CGA AAT TGC TGA GTT CAA XhoI	30 pb	60.3°

4.1.5. Amplificación del gen 99 (Referencia de la secuencia en el NCBI: ZP_06196916.1)

Para la amplificación del gen de interés se realizaron reacciones de PCR (Termociclador Maxigene, Axygen®) con la enzima HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN, USA), se utilizó el ADN extraído de *P. acidilactici* ATCC 8042 (100 ng). Los cebadores (Tabla 7) se utilizaron a una concentración final de 0.2 µM y los dNTP's (Fermentas, USA) a 0.2 mM.

De la enzima se ocuparon 1.25 U y el buffer de la enzima (10X PCR buffer, QIAGEN) se diluyó a una concentración final de 1X. Se adicionó agua para llevar a 25 µL por cada reacción. Las condiciones térmicas de la reacción fueron las siguientes:

Tabla 8. Condiciones térmicas de la PCR para la amplificación del gen 99

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	15 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	35
Alineamiento	59°C	30 s	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

4.1.6. Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa

Se utilizó el Kit GenElute Minus EtBr Spin Columns (Sigma, USA) y se siguieron las especificaciones recomendadas por el proveedor. Se añadieron 100 µL de buffer 1X TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) a una columna de purificación, se centrifugó a 14,000 rpm durante 5-10 s y desechó el eluido. Se cortó la banda seleccionada del gel de agarosa, después fue colocada en la columna y se centrifugó por 10 min. Al ADN obtenido se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH= 5.2, y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Se centrifugó el tubo durante 15 min y se descartó el sobrenadante. El ADN se lavó con etanol al 70% y se centrifugó por 5 min para posteriormente resuspender el pellet en agua o buffer TE 1X.

4.1.7. Construcción pET22-99 (Digestión y Ligación)

El fragmento amplificado y purificado del gen se digirió con dos enzimas de restricción, EcoRI (Fermentas) y XhoI (Fermentas), y se insertó en el plásmido pET-22b(+) (Novagen) utilizando la T4 DNA ligasa (Fermentas) para generar la construcción pET22-99. La mezcla de reacción de la digestión del gen consistió en 500 ng de ADN; se utilizaron 2.5 U de cada enzima de restricción (EcoRI y XhoI), además de buffer de reacción a una concentración final 2X (10X Buffer Tango, Fermentas). El volumen de cada reacción de digestión fue de 25 µL. Esta mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 h, y posteriormente se inactivaron las enzimas a 85°C durante 20 min. El plásmido pET-22b(+) también se digirió de la manera anteriormente descrita.

Para saber la cantidad de inserto que se necesitaba, se ocupó la siguiente fórmula, que muestra la relación molar entre el inserto y el vector:

$$\frac{ng \text{ dl vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = ng \text{ de inserto}$$

En este caso se utilizaron 50 ng del vector pET-22b(+), utilizando una relación molar de 5:1 (inserto:vector). Sustituyendo en la fórmula da como resultado:

$$\frac{50 \text{ ng} \times 2.784 \text{ kb}}{5.493 \text{ kb}} \times \frac{5}{1} = 127 \text{ ng de inserto}$$

Una vez conocida la cantidad necesaria de inserto se realizó la mezcla de la reacción de ligación que se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Mezcla de reacción de ligación

Reactivo	Concentración final
Vector digerido pET-22b(+)	50 ng
Inserto digerido (gen 99)	127 ng
T4 DNA Ligasa	1 U
Buffer de la enzima	1X
Agua cbp	20 μ L

Esta mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 h, posteriormente se mantuvo a 70°C durante 10 min para inactivar a la enzima. Una vez obtenida la construcción pET22-99 se utilizó para transformar en *E. coli* XL1-Blue.

4.1.8. Transformación en *E. coli* XL1-Blue

Se realizó un preinóculo de *E. coli* XL1-Blue, se tomaron 200 μ L de células y se inoculó un tubo con 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) (Tabla 10); se dejó crecer 12 h a 37°C, 200 rpm. Posteriormente se realizó una resiembra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio LB, tomando 500 μ L del preinóculo; se incubaron a 37°C, 200 rpm, hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0.1$. Una vez alcanzada esa densidad óptica se centrifugaron los 50 mL de medio a 8,500 rpm, 10 min, 4°C, y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 15 mL de $CaCl_2$ 100 mM y se incubó en hielo durante 30 min. Después se centrifugó bajo las mismas condiciones. El paquete se resuspendió en 2 mL de $CaCl_2$ 50 mM, se incubaron en hielo por lo menos 2:30 h antes de realizar la transformación.

Tabla 10. Composición del medio Luria-Bertani

Reactivo y Marca	Cantidad (para 1 L)
Bacto - Triptona (Becton, Dickinson and Company, USA)	10 g
Extracto de levadura (Becton, Dickinson and Company, USA)	5 g
Cloruro de sodio (J.T. Baker, USA)	10 g

Posteriormente se realizó la mezcla de transformación, que consiste en 50 μ L de células + 5 μ L de la ligación, se dejó incubar 30 min en hielo. Después se les aplicó un choque térmico, elevando la temperatura a 42°C durante 2 min, se incubaron en hielo durante 5 min, se transfirieron los 50 μ L de la mezcla de transformación a un tubo de 1.5 mL, se le agregó 1 mL de medio LB para recuperar las células (37°C, 200 rpm, 1 h). Se centrifugó el tubo a 12,500 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante para resuspender el pellet en 200 μ L de medio LB y se plaqueó sobre cajas de agar LB con ampicilina (concentración final 100 μ g/mL). Se seleccionaron colonias al azar y se inocularon tubos de 5 mL de medio LB con ampicilina que se incubaron 12 h a 37°C y 200 rpm.

4.1.9. Extracción de plásmido

Para la extracción de plásmido se ocupó el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas). Se colectó el paquete celular de los tubos inoculados con las colonias que crecieron en las cajas de la transformación, para lo cual se centrifugó a 12,500 rpm, 5 min a 4°C y posteriormente se siguieron las indicaciones señaladas por el proveedor. Para determinar la concentración del plásmido se utilizó el lector de placas Epoch Biotek con el software Gen 5 1.10, a una longitud de onda de 260/280 nm.

4.1.10. Análisis de las transformantes (PCR y Digestión)

PCR: se realizó la amplificación del gen de interés con los cebadores específicos (EEcoRIOK y EXhoIOK) y con los cebadores universales T7 (Invitrogen, USA) se realizaron ambas reacciones de PCR, con la enzima High Fidelity PCR (Thermo Scientific* Fermentas, USA). Se utilizó como ADN templado de estas reacciones 2 μ L del plásmido extraído de cada colonia presuntamente positiva. Los dos pares de cebadores se utilizaron a una concentración final de 0.2 μ M y los dNTP's (Fermentas, USA) a una concentración final de 0.2 mM. De la enzima se ocuparon 1.25 U (High Fidelity PCR Enzyme Mix 5 U/ μ L, Fermentas) y del buffer de la enzima (10X High Fidelity PCR buffer, Fermentas) se ocupó la cantidad para llegar a una concentración final de 1X. Se adicionó agua para completar un volumen final de 25 μ L por cada reacción. Las condiciones térmicas de la reacción se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones térmicas de PCR del análisis de las transformantes

Etapas	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	35
Alineamiento	55 y 59°C	30 s	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

Digestión: El plásmido extraído con el kit se digirió con HindIII (Fermentas) debido a que esta enzima solo corta en un sitio toda la secuencia a la construcción, es decir, para linearizarlo y así corroborar si el tamaño del producto (8277 pb) concuerda con el tamaño del vector más el inserto. La mezcla de reacción de la digestión del plásmido consistió de aproximadamente 500 ng de ADN; se utilizaron 5U de la enzima de restricción (HindIII), además de buffer R a una concentración

final 1X (10X Buffer R, Fermentas). El volumen de cada reacción de digestión fue de 25 μ L. Esta mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 h 20 min y posteriormente se inactivó a 80°C durante 20 min. Estas reacciones se cargaron en un gel de agarosa para observar si estaban presentes los productos esperados.

4.1.11. Conservación de la cepa con la construcción (pET22-99 XL1-Blue)

La conservación de la cepa que contenía la construcción se realizó haciendo un preinóculo en un tubo con 5 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL), tomando una alícuota de 200 μ L de los tubos que contenían a las colonias positivas incubando a 37°C, 200 rpm, durante 12 h. Posteriormente se realizó una resiembra en un tubo con 5 mL de medio LB más ampicilina, incubando a las mismas condiciones hasta llegar a una $DO_{600nm} = 0.8$, después se tomaron 0.8 mL del cultivo adicionando 0.2 mL de glicerol al 80% y se colocaron en un criovial para ser almacenados a -70°C.

4.1.12. Secuenciación de la construcción (pET22-99 XL1-Blue)

Se decidió mandar a secuenciar la construcción pET22-99 XL1-Blue para verificar que tuviera el gen de interés, fue necesario realizar una extracción de plásmido a una transformante positiva y se mandó a MacroGen Inc (Seúl, Corea). Para esto se diseñaron 4 diferentes cebadores para secuenciar, que van desde la mitad de la proteína hacia el amino terminal (VF1_pET2299 y VF2_pET2299) y el carboxilo terminal (VR1_pET2299 y VR2_pET2299) respectivamente; además de también utilizar los cebadores universales T7 tanto el promotor como el

terminador. Todos los cebadores ya mencionados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Cebadores utilizados para la secuenciación (pET22-99 en *E. coli* XL1-Blue)

Cebadores	Orientación	Secuencia 5'-3'	Longitud
T7 promotor	Directa	TAATACGACTCACTATAGGG	20 pb
T7 terminador	Reversa	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	21 pb
VF1_pET2299	Reversa	CCGCTATAAATATTTTGACCAGTTGCC	27 pb
VF2_pET2299	Reversa	CGGAATCACGGAGTAAGTTAACGT	24 pb
VR1_pET2299	Directa	GGGCAACTGGTCAAAATATTTATAGCGG	28 pb
VR2_pET2299	Directa	CGTAACTTACTCCGTGATTCCGC	24 pb

4.2. Expresión

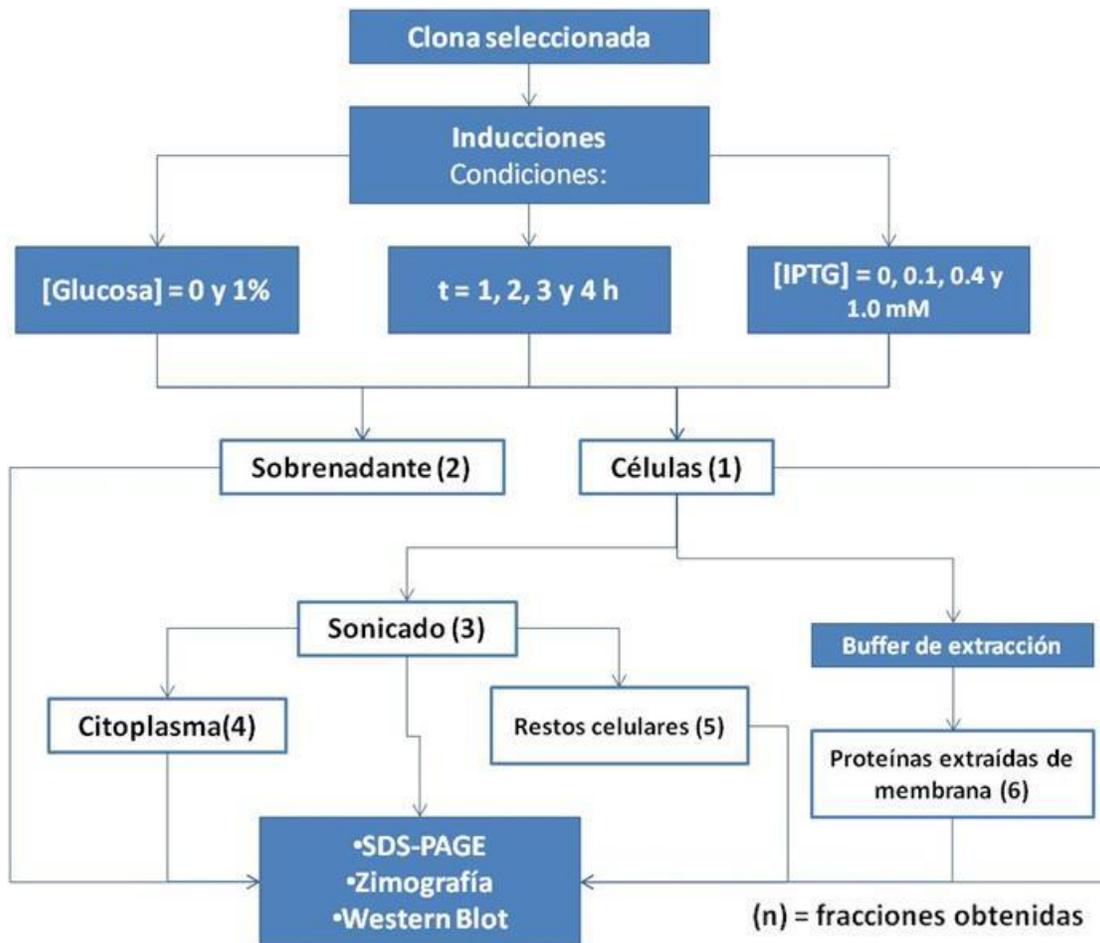


Figura 6. Diagrama general de la metodología a seguir en la expresión de la peptidoglucano hidrolasa de 99 kDa.

4.2.1. Selección de condiciones óptimas de inducción (pET22-99 XL1-Blue)

Se realizó un preinóculo partiendo de la construcción conservada a -70°C , adicionando $200\ \mu\text{L}$ por cada tubo de $5\ \text{mL}$ de medio LB más ampicilina, incubado a 37°C , $200\ \text{rpm}$, durante $12\ \text{h}$. Este preinóculo se sembró tomando una alícuota de $250\ \mu\text{L}$ que fue adicionado a matraces Erlenmeyer con medio LB más ampicilina, que se incubaron a 37°C , $200\ \text{rpm}$, hasta llegar a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 0.5 y 0.8 .

Posteriormente se adicionó IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (Fermentas) como inductor en diferentes concentraciones (0.1, 0.4 y 1 mM). Una vez adicionado el IPTG se incubó a diferentes tiempos (1, 2, 3 y 4 h) a 37°C y 200 rpm. En la Tabla 13 se muestran todas las condiciones evaluadas.

Tabla 13. Condiciones de la inducción de pET22-99 XL1-Blue

Condición	T (°C)	Tiempo inducción (h)	[IPTG] mM
A	37	1, 2, 3, 4	0
B	37	1, 2, 3, 4	1
C	37	1, 2, 3, 4	0.1
D	37	1, 2, 3, 4	0.4

Además de probar las condiciones antes mencionadas, también se utilizó glucosa en el medio de cultivo, que se agregó al mismo tiempo que se adicionó el IPTG ($DO_{600nm} = 0.5 - 0.8$). La concentración final utilizada en el medio fue 1% v/v, partiendo de una solución al 20% p/v esteril [pET System 11th edition].

4.2.2. Localización de la mayor actividad lítica de la proteína recombinante

Posteriormente se buscó la fracción en donde se observara la mayor actividad lítica. Se corrió una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes y se hicieron zimogramas contra *M. lysodeikticus* para detectar actividad lítica, técnicas que se describirán más adelante. Las fracciones con las que se trabajó se mencionan a continuación:

a) células enteras

- b) extracto libre de células (sobrenadante)
- c) células rotas por ultrasonificación
- d) citoplasma
- e) restos celulares
- f) proteínas solubilizadas con buffer de extracción

A continuación se describe cómo se obtuvo cada fracción.

El medio de cultivo obtenido con las condiciones óptimas de la inducción se centrifugó a 8,500 rpm durante 10 min a 4°C para separar las células del sobrenadante. Las células enteras (a) se resuspendieron en buffer Tris-HCl 10 mM, pH = 7.6 ajustando a una $DO_{600nm} = 2.0 - 3.0$, posteriormente se tomó una alícuota de 20 μ L y se les adicionó 10 μ L de buffer de carga 4x (Tris-HCl 125 mM, SDS (dodecilsulfato sódico) 4%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.02%, 2-mercaptoetanol 10%) y se calentaron a ebullición durante 5 min. Para el extracto libre de células (b) se tomó una alícuota de 30 μ L y se le adicionó 10 μ L de buffer de carga 4x.

Parte del paquete celular se resuspendió en buffer Tris-HCl 10 mM pH= 7.6 ajustando a una $DO_{600nm} = 5.0$, posteriormente las células se rompieron por 21 ciclos de ultrasonificación (20 s) a una temperatura de 4°C con intervalos de 20 s. Una alícuota del sonicado (c) se conservó intacta para así cargarla en los geles, el resto de las células ultrasonificadas se centrifugaron a 17,000 rpm durante 30 min a 4°C, para separar el citoplasma (d) de los restos celulares (e).

Paralelamente parte del paquete celular se resuspendió en buffer de extracción que contenía: 10 mM Tris-HCl, pH= 8.0, 10 mM EDTA (ácido etilendiaminotetracético), 10 mM NaCl y 2% SDS, se agitó y se colocó

en baño de agua a ebullición durante 10 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó dos veces a 17,000 rpm por 20 min a 10°C [Velasco-Pérez, 2010]. Se dializó el sobrenadante obtenido durante 12 h a 4°C con una membrana de 50 kDa y después se ultra-filtro (Amicon®, Merck-Millipore, USA) a través de una membrana de 100 kDa.

4.2.3. Determinación del perfil electroforético y de actividad lítica por zimogramas de *M. lysodeikticus*

El perfil proteico de todas las fracciones fue determinado por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (BIORAD, Power-Pac 300) a 120 V durante 3 h. Los geles se prepararon al 10% de poliacrilamida con los reactivos necesarios para la elaboración según lo indicado por el proveedor (manual de BIORAD Mini-PROTEAN 3). Los SDS-PAGE se tiñen con azul de Coomasie y se destiñen con solución destiñidora (20% etanol/20% ác. acético/60% agua) en agitación suave.

Para la elaboración de los zimogramas se prepararon geles con SDS al 10% de poliacrilamida, con 0.2% de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* como sustrato (Leclerc *et al.*, 1989). Una vez realizada la electroforesis, el gel se lavó con agua desionizada, se adicionaron 70 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 (BIORAD, USA).

4.2.4. Western-Blot

Para corroborar la producción de la enzima recombinante, identificarla y conocer su peso molecular, se realizaron ensayos de Western-Blot utilizando anticuerpos para reconocer el tallo de histidinas. Se corrió un SDS-PAGE 10% y posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en inglés) PolyScreen® (Perkin-Elmer, USA) a 15 V durante 1 h en un equipo Trans Blot® SD Semi-dry Transfer cell (Bio-Rad), con un buffer de transferencia de Tris 25 mM, Glicina 190 mM y metanol al 10% (v/v). La membrana fue bloqueada con leche descremada (Skim milk, Difco) al 3% (p/v) en buffer TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) adicionado con Tween 20 al 0.05% (v/v) dejando en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Después de este tiempo, la membrana fue lavada con 20 mL de buffer TBS + Tween dos veces durante 30 s y se le adicionó el anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (anti-his) 1:7500, se incubó durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Al final de este tiempo se lavó la membrana nuevamente con 20 mL de buffer TBS + Tween, dos veces durante 30 s y se adicionó la solución reveladora de NBT/BCIP (Perkin-Elmer), que se dejó actuar hasta la aparición de bandas moradas, que indican la presencia de las proteínas con el tallo de histidinas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Clonación

5.1.1. Extracción de ADN genómico de *P. acidilactici* ATCC 8042

En la Figura 7 se observa el ADN extraído de *P. acidilactici* ATCC 8042, que se obtuvo en una concentración de 200 ng/μL.

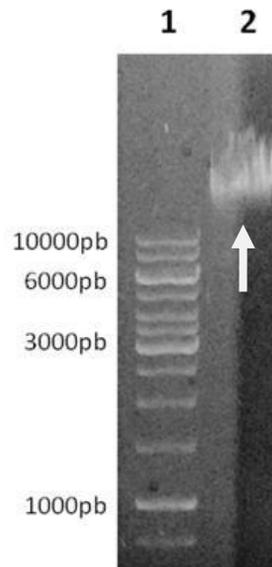


Figura 7. Determinación de integridad de ADN genómico de *P. acidilactici* ATCC 8042. Carril 1 Marcador 1kb (Fermentas). Carril 2. ADN extraído de *P. acidilactici* ATCC 8042. Gel de agarosa al 1%.

5.1.2. Amplificación del gen 99 (Referencia de la secuencia en el NCBI: ZP_06196916.1).

En la Figura 8 se observa el amplicón del gen de interés a partir del ADN genómico, utilizando los cebadores específicos (EEcoRIOK y EXhoIOK). Se aprecia una banda intensa por debajo de 3000 pares de bases (pb) que concuerda con el tamaño del gen ≈ 2800 pb.

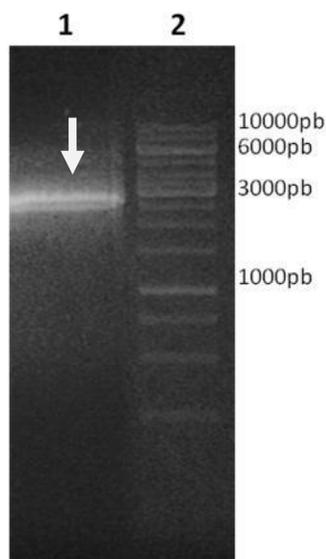


Figura 8. Amplificación del gen (99) a partir de ADN genómico de *P. acidilactici* ATCC 8042. Carril 1. Amplicón \approx 2800pb. Carril 2. Marcador 1kb (Fermentas). Gel de agarosa al 1%.

5.1.3. Construcción pET22-99 (Digestión y Ligación).

Se utilizó el vector pET-22b(+) en este trabajo debido a que se ha reportado el uso de este tipo de plásmidos en la clonación y expresión de PGH [Scheurwater *et al*, 2007]. Cuenta con el operon *lac*, que es altamente inducible; con un péptido señal que direcciona la proteína recombinante al periplasma, donde se encuentra el sustrato natural, y también cuenta con un tallo de histidinas que facilitaría el proceso de purificación en etapas posteriores [pET System Manual, 11th edition].

Se realizó la digestión del pET-22b(+) y del amplicón obtenido por la reacción de PCR a partir del DNA genómico, estos productos de se cargaron en geles de agarosa para observar la calidad de los productos, además de observar si los amplicones que aparecen en el gel coinciden con el tamaño esperado de cada uno de ellos, el pET-22b(+) tiene un

tamaño de 5493 pb y el gen 99 de 2784 pb. Los amplicones mostrados en la Figura 9 coinciden con el tamaño esperado de cada uno de los dos productos. La concentración obtenida del pET-22b(+) digerido fue de 7.0 ng/μL y la concentración del gen digerido fue de 13.0 ng/μL.

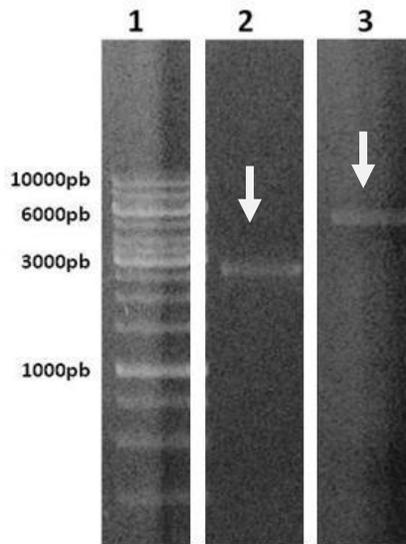


Figura 9. Productos de las digestiones. Carril 1. Marcador 1kb (Fermentas). Carril 2. Gen 99 digerido \approx 2800 pb. Carril 3. pET-22b(+) digerido \approx 5500 pb. Gel de agarosa al 1%.

Una vez que se corroboró la calidad y la concentración de los productos de digestión se realizó la ligación, teniendo en cuenta la relación molar 5:1 (inserto: vector), tomando 50 ng de pET-22b(+) digerido y 117 ng de inserto.

El producto de ligación se transformó en *E. coli* XL1-Blue, cepa que es ampliamente utilizada en biología molecular y apropiada para expresar proteínas recombinantes. Esta cepa es deficiente en endonucleasa (*endA*) y en recombinación (*recA*), lo que incide favorablemente en la estabilidad de la construcción. La mutación en el gen *hsdR* previene que el ADN clonado sea cortado por las endonucleasas del sistema *EcoK*. [Manual of Competent Cells, Stratagene, 2008].

Después de seleccionar las colonias que presentaban inserto, se extrajo el plásmido de cada una de ellas. Se utilizó el kit GeneJET Plasmid Miniprep. Se obtuvo una concentración promedio de ADN de 150 ng/μL. Con este ADN se procedió a realizar el análisis de las transformantes para verificar que la colonia seleccionada si contenía el gen de interés.

5.1.4. Análisis de las transformantes (PCR y Digestión)

En la Figura 10 se observan los amplicones obtenidos después de las reacciones de PCR y de la digestión del plásmido extraído de una colonia que contenía la construcción pET22-99. En el carril 2 se ve el producto de reacción de PCR con cebadores específicos (EEcoRIOK y EXhoIOK) a partir de la construcción pET22-99, que consiste en un amplicón de ≈ 2800 pb, similar al tamaño esperado del gen 99, que es de 2784 pb. En el carril 3 se observa el producto de reacción de PCR con cebadores T7 a partir de la construcción pET22-99, que resulta en un amplicón de ≈ 3000 pb, que se observa más arriba que el carril 2, debido a que además de amplificar el gen 99, se amplifican las regiones T7, de aproximadamente 300 pb de bases adicionales al gen de interés, lo que lleva a un total de 3100 pb, que concuerda con el tamaño de este amplicón. En el carril 4 se digirió el producto de la construcción pET22-99, este producto presentó un tamaño de ≈ 8000 pb, que coincide con la suma de los elementos empleados en la construcción: vector (5493 pb) más gen 99 (2784 pb).

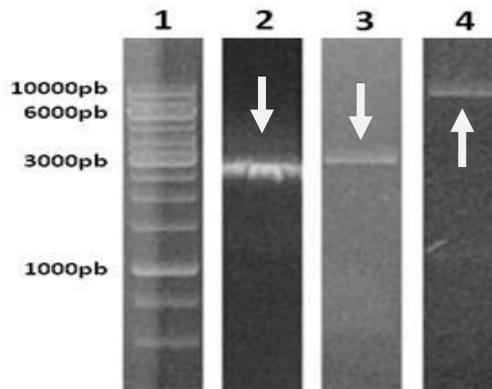


Figura 10. Análisis de los productos de amplificación y del producto recombinante. Carril 1. Marcador 1 kb (Fermentas). Carril 2. Amplificación del gen (99) con cebadores específicos. Amplicón ≈ 2800 pb. Carril 3. Amplificación del gen (99) con cebadores T7. Amplicón ≈ 3100 pb. Carril 4. Producto de la digestión de pET22-99 en *E. coli* XL1-Blue. Amplicón ≈ 8000 pb. Gel de agarosa al 0.01%..

5.1.5. Secuenciación de la construcción (pET22-99 XL1-Blue)

Una vez que se contaba con una transformante que parecía contener el gen de interés tras el análisis de restricción, se realizó la extracción de plásmido y se obtuvo en una concentración de $79 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Se procedió a la secuenciación del inserto para comprobar la identidad del gen. Se utilizaron 6 diferentes cebadores para tener una mayor cobertura de secuenciación de la construcción pET22-99 y en la Figura 11 se muestran las regiones que se amplificaron.

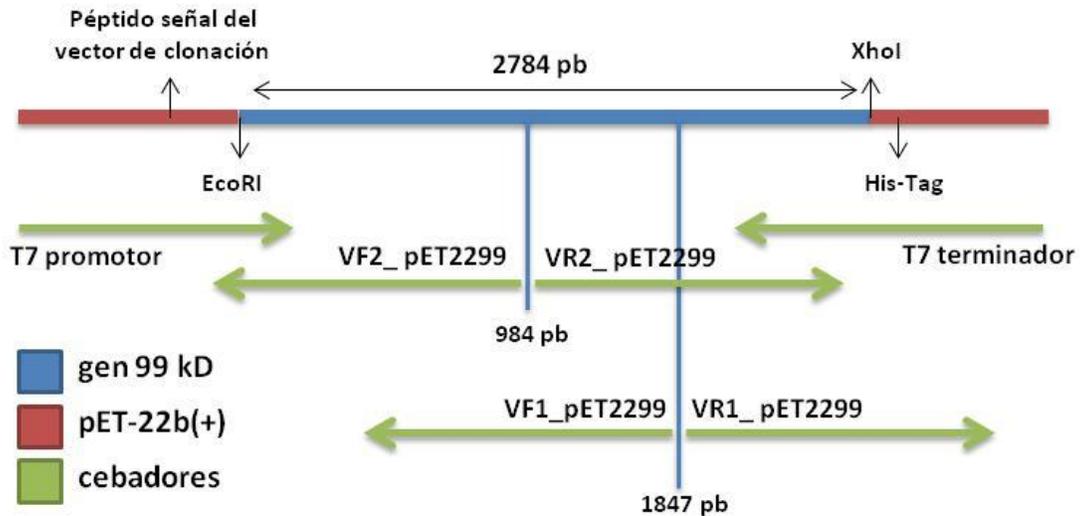


Figura 11. Regiones amplificadas para secuenciar

Las secuencias obtenidas se compararon y se alinearon entre ellas con el programa Multalin, versión 5.4.1 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>) para obtener y ensamblar el consenso de los 6 diferentes cebadores utilizados. Posteriormente el consenso fue analizado mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information) para corroborar la presencia del gen que codifica para la peptidoglucano hidrolasa de interés. Como se observa en la Figura 12, la secuencia obtenida alinea con un 98% de identidad con la secuencia de la N-acetilmuramidasa de *Pediococcus acidilactici* 7_4, con un porcentaje de cobertura de 95% y un valor E= 0.0. Esto confirmó que la construcción contiene el gen que codifica a la proteína de interés.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
N-acetylmuramidase [Pediococcus acidilactici 7_4] >gb EFA26586.1 N-acetylmuramidase [Pediococcus acidilactici 7_4]	1449	1449	95%	0.0	98%
N-acetylmuramidase [Pediococcus acidilactici MA18/5M] >gb EHJ23451.1 N-acetylmuramidase [Pediococcus acidilactici MA18/5M]	1466	1466	95%	0.0	98%
N-acetylmuramidase [Pediococcus acidilactici DSM 20284] >gb EFL94801.1 N-acetylmuramidase [Pediococcus acidilactici DSM 20284]	1481	1481	95%	0.0	97%
N-acetylmuramidase [Pediococcus lolii NGR1 0510Q] >dbj GAC45853.1 N-acetylmuramidase [Pediococcus lolii NGR1 0510Q]	1456	1456	95%	0.0	95%
N-acetylmuramidase [Pediococcus pentosaceus ATCC 25745] >gb ABJ67549.1 N-acetylmuramidase [Pediococcus pentosaceus ATCC 25745]	549	1030	74%	2e-177	64%

Figura 12. Resultados obtenidos de BLAST

Analizando más a fondo la secuencia se pudo determinar que solo cinco aminoácidos eran diferentes con respecto a la secuencia ya reportada en *Pediococcus acidilactici* 7_4 (Tabla 14), tres de los cinco aminoácidos que cambian tienen estructuras muy similares (Alanina y Valina) que entran en el mismo grupo de clasificación (sombreados en la Tabla 14). Ninguno de ellos se encuentra en los dos sitios putativos catalíticos, ni en los sitios de unión a zinc o a carbohidratos. En la Figura 13 se muestra qué aminoácidos cambian, además de su posición con respecto a las regiones conservadas de la proteína.

Tabla 14. Aminoácidos diferentes entre las secuencias comparadas.

Posición del a.a.	a.a. en la proteína de <i>P. acidilactici</i> 7_4	Clasificación	a.a. en la proteína recombinante	Clasificación
84	Prolina	No polar	Serina	Polar sin carga
90	Alanina	No polar	Valina	No polar
144	Valina	No polar	Alanina	No polar
203	Lisina	Polar con carga +	Glutamina	Polar sin carga
208	Alanina	No polar	Valina	No polar

1 MFKSGKKWAF ASIATASLGL VALNTNAEKA HADSDAQANT NSASQLDQQT KTAPVNEKQV
 61 TLAKPATVKA SAAVTAQSA APAP[SAAQSA] AKVNADSTAK ADQHSAAAKV GTKATTSSAV
 121 KPAKEAASAN AVKAAPASSA AKK[V]STSVAS SAAPSSAASK TVTSAAVKDS AAKEAVSSAA
 181 NVKSSSAAAK TSVNSSAVSE AA[K]KDAK[A]EK TAEKKTDNSS KDYTIDNTYR LADNEGSDQK
 241 TNNK[V]A[A]HA VGQYSSARDV AIYEKREWDS SETYVQYIVG DGGRVYAVGE EGYVAWGAGK
 301 WANENAPVQV ELAQTYSDSQ FKKDYQTYVN LLRDSAkkWN IPTTLDSDEY TGIKSH[V]WVVT
 361 EHVWGNH[V]DP YGYLGTHGIT KEQFAHDLAY GFDNDAANDN QNNNQNDNHQ NDNQNNQNNN|
 421 HQNDSSNNHG NQNNQSYHVG DKVTIKNSAS HWATGQSIYN GVKGHTYKII QTNGHKLLLD
 481 QVISWINDGD VYKAGSNSGS SNNHNNNHTT NNADIKVGTV VTINNNASHW ATGQSIYSGV
 541 KGKSYKVIQT NGRLLLDKV ISWINKGDVH VPGSNSNNNN SGNQNHNNGN NHNNNGNTES
 601 IHVGSKVTIN NNAKRWATGQ NIYSGVKGKT YTVIQMNGSR LLLDKVISWI NKGDVHLPGS
 661 NGSQNNNNNN NNHANNNDGT IRVGTNVTIK PSAKRWATGQ NIYGVKGT YKVIQMNGNR
 721 LLLDKVISWI NKGDVVYVPGS SNNNSNSNN NHNNNGSNYH FTNQNWTAAG TNFVNSI[ASD]
 781 VMNVCQNNHL YASVAMAQAV VESAYGASTL AQEAHNLFGI KADSTWHGAT YTKNTQEVIN
 841 GRVVTISAAF RKYDSFKDSI ADYAKKLESR PQYANAFSNH AHNYVESVKA IKAGGYATAP
 901 TYVSSIVNCI NNYGFYKLDG LNSAISL

Figura 14. Secuencia de la enzima de 99 kDa de *P. acidilactici* 7_4. Regiones conservadas: función de N-acetilmuramidasa (morado), sitio de unión a Zn²⁺ (amarillo), función de N-acetilglucosaminidasa (verde). Aminoácidos que cambian según la secuenciación (rojo).

Se calcularon el punto isoeléctrico y el peso molecular teórico con el programa ProtParam tool (ExPasy, Swiss Institute of Bioinformatics) tanto de la proteína de 99 kDa de *P. acidilactici* 7_4, como la secuencia en aminoácidos de la proteína recombinante. Como se aprecia en la Tabla 15, ni el punto isoeléctrico ni el peso molecular varían significativamente entre las secuencias, lo que indica que el cambio de los 5 aminoácidos no afecta estos parámetros.

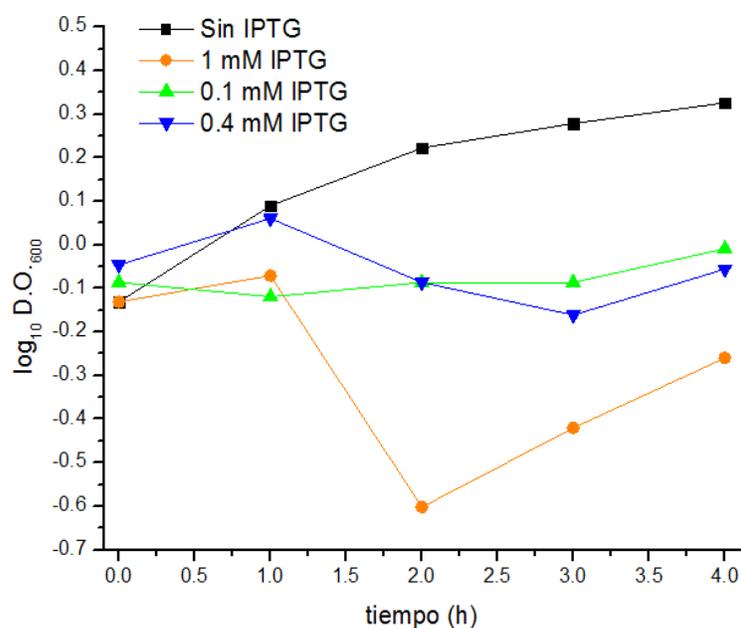
Tabla 15. Comparación de los parámetros teóricos de ambas secuencias

Secuencia	Punto isoeléctrico (teórico)	Peso molecular (teórico)
Proteína de 99 kDa de <i>P. acidilactici</i> 7_4	9.10	99.37 kDa
Proteína recombinante	8.98	99.15 kDa

5.2. Expresión

5.2.1. Selección de condiciones óptimas de inducción (pET22-99 XL1-Blue)

Cualquier proteína recombinante expresada en *E. coli* interfiere con las funciones normales de la célula, por lo que se puede volver "tóxica" para el hospedero. De acuerdo al grado de toxicidad, los niveles de expresión basal pueden alterar el crecimiento [pET System Manual, 11th edition]. Como ya se mencionó, el gen a clonar codifica para una PGH, enzima relacionada con diferentes funciones celulares (Tabla 3), una de las cuales es la lisis celular, por esta razón la proteína recombinante se considera demasiado tóxica para el hospedero. En las 4 condiciones, donde la variable evaluada fue la concentración de IPTG, se observó un comportamiento similar de la densidad óptica (Gráfica 1). En todos los casos, con la adición del inductor (IPTG), la densidad óptica disminuyó con respecto al tiempo.



Gráfica 1. Efecto de diferentes concentraciones de IPTG utilizadas durante la inducción sobre el crecimiento celular de *E. coli* XL1-Blue pET22-99.

Después de observar que entre las concentraciones de IPTG evaluadas se presentó la misma tendencia, se optó por utilizar 1.0 mM, debido a que comparada contra las otras concentraciones de inductor, la disminución de la DO_{600nm} era más drástica, de hasta un 80% (Tabla 16), lo que puede indicar una mayor producción de la proteína recombinante con actividad lítica.

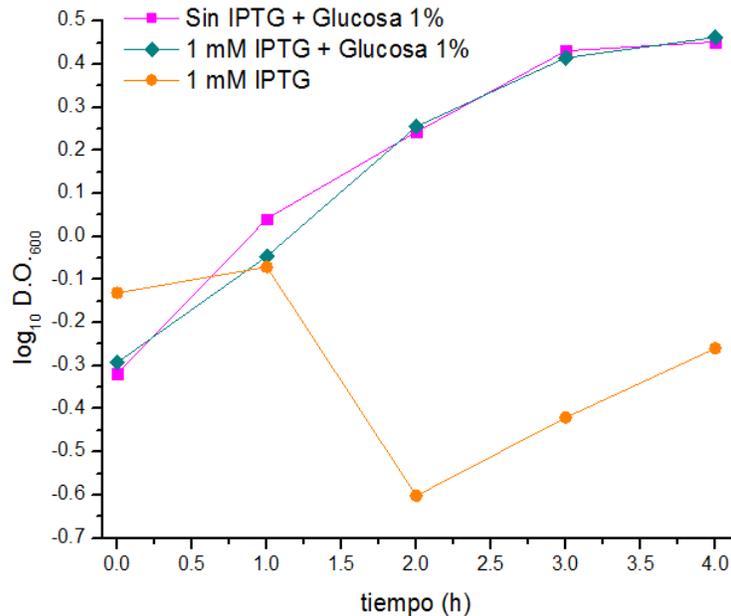
Tabla 16. Porcentaje de disminución de la densidad óptica

t (h)	[IPTG] (mM)		
	1mM	0.4 mM	0.1 mM
1	31%	10%	38%
2	80%	51%	51%
3	80%	64%	57%
4	74%	58%	54%

Esta disminución de la DO_{600nm} indica que la proteína recombinante si se está produciendo, pero los niveles de expresión son altos, interfiriendo con el crecimiento celular del hospedero. Para disminuir los niveles de expresión se agregó el 1% de glucosa al medio de cultivo, ya que en presencia de este nutrimento la concentración del cAMP (adenosín monofosfato cíclico) disminuye, lo que desencadena la disminución de los niveles de síntesis de la T7 RNA polimerasa, regulando negativamente la expresión de la proteína recombinante [Sørensen *et al*, 2005].

En la Gráfica 2 se observa que en presencia de glucosa la curva de crecimiento evaluada por el seguimiento de DO_{600nm} mantiene el mismo comportamiento, tanto como cuando se le adiciona el inductor al medio, como cuando no hay inductor. Sin embargo el crecimiento aumenta considerablemente con respecto a las condiciones en las que no se

agrega glucosa al medio. Este comportamiento se debe a la regulación de la expresión basal de la proteína, lo cual permite que el microorganismo siga produciendo la proteína, sin interferir con el crecimiento celular.



Gráfica 2. Efecto de la adición de la glucosa durante la inducción sobre el crecimiento celular de *E. coli* XL1-Blue pET22-99.

Con los resultados anteriores se decidió trabajar en las siguientes etapas con una concentración de inductor de 1 mM y la adición de 1% v/v de glucosa al medio. Paralelamente se evaluó la actividad lítica por zimografía contra *M. lysodeikticus* (Figura 14). Para determinar a qué tiempo se producía la mayor actividad lítica se emplearon células enteras, debido a que la proteína recombinante tiene un péptido señal en el extremo amino terminal (Figura 4) que direcciona a periplasma, donde se encuentra el sustrato natural, el peptidoglucano. También el vector usado para clonar esta proteína (pET-22b(+)) cuenta con un péptido señal que direcciona a periplasma [pET Manual System, 11th edition], por lo que probablemente la mayor parte de la proteína recombinante producida se encuentre en el periplasma o en el

citoplasma. Como no se observa una disminución en la DO_{600nm} , lo que indicaría que las células se estarían lisando, se puede suponer que la proteína recombinante se mantiene dentro de las células. Paralelamente se realizó un SDS-PAGE (Figura 13) para conocer el perfil electroforético de las proteínas presentes con estas condiciones. En los geles que se presentan a continuación se cargaron en cada pozo una alícuota de 20 μ L de células más 10 μ L de buffer de carga 4X; después se calentaron a temperatura de ebullición en un baño de agua durante 10 min como ya se mencionó en la metodología. En el perfil electroforético de proteínas (Figura 13) se observan dos bandas muy intensas: una de aproximadamente 97 kDa, muy cerca al peso de la proteína recombinante (99 kDa) y otra de aproximadamente 75 kDa, ambas presentes en todos los tiempos monitoreados. Sin embargo, éstas son más intensas en los carriles donde se adicionó el IPTG (3, 5, 7, 9) lo que indica que la proteína se está sobre-expresando en presencia del inductor.

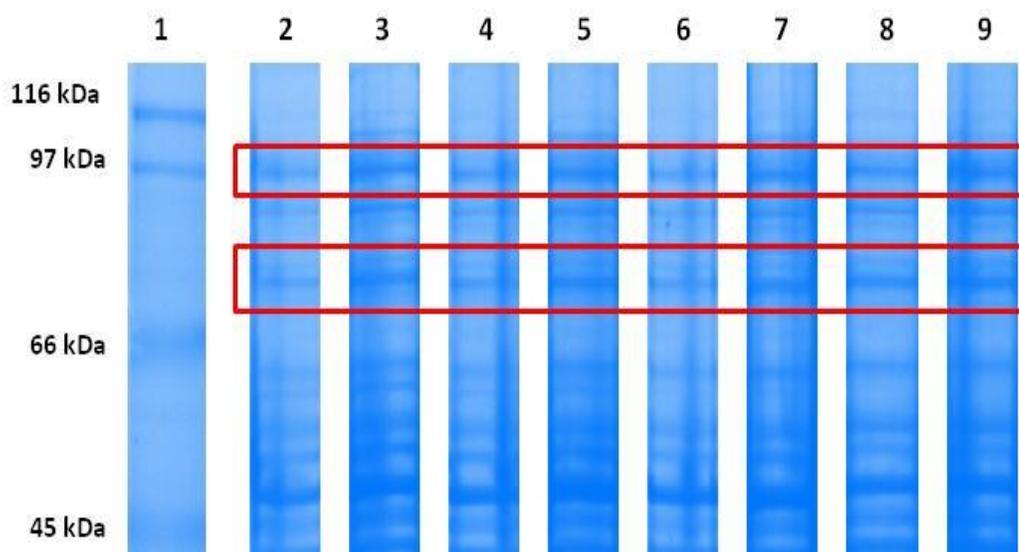


Figura 13. Perfil proteico obtenido en diferentes condiciones de inducción. Condiciones: [IPTG]= 1 mM; 1% de glucosa (v/v). Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. 1 h sin IPTG. Carril 3. 1 h con IPTG. Carril 4. 2 h sin IPTG. Carril

5. 2 h con IPTG. Carril 6. 3 h sin IPTG. Carril 7. 3 h con IPTG. Carril 8. 4 h sin IPTG.
Carril 9. 4 h con IPTG. SDS-PAGE 10% acrilamida.

A las mismas fracciones se les determinó actividad lítica en zimogramas, resultado que se presenta en la Figura 14. En todos los carriles se observan bandas de lisis, siendo más claras las de los carriles 5 y 7 (2 y 3 h con IPTG). Sin embargo las bandas de actividad se observan más abajo del peso estimado de la proteína de interés, aproximadamente entre 70 y 75 kDa.

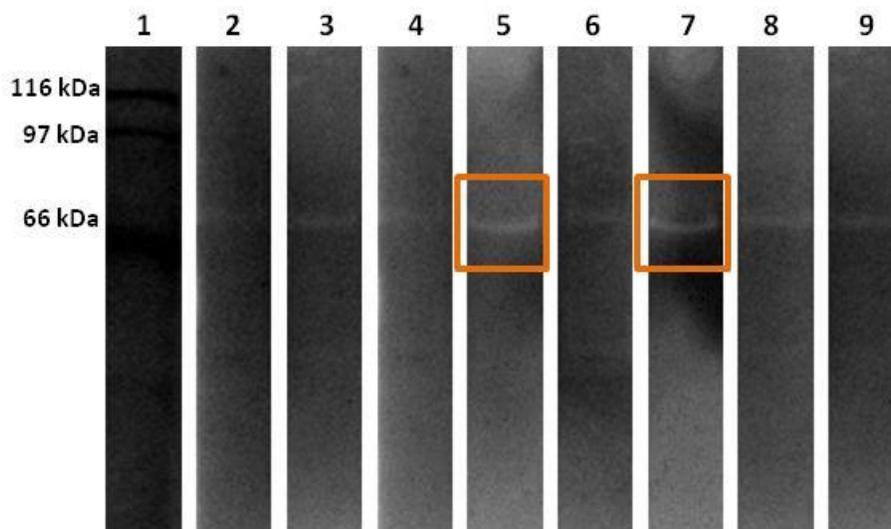


Figura 14. Determinación de actividad lítica mediante zimograma contra *M. lysodeikticus* 0.2% condiciones: [IPTG]= 1 mM; 1% de glucosa (v/v). Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. 1 h sin IPTG. Carril 3. 1 h con IPTG. Carril 4. 2 h sin IPTG. Carril 5. 2 h con IPTG. Carril 6. 3 h sin IPTG. Carril 7. 3 h con IPTG. Carril 8. 4 h sin IPTG. Carril 9. 4 h con IPTG.

Con base a los resultados anteriores se puede afirmar que las condiciones óptimas para inducción son:

- 3 h de inducción
- 1 mM de IPTG
- 1% de glucosa en el medio

Existen diferentes reportes de la expresión de enzimas con actividad lítica en los sistemas pET (Tabla 17). En todos los casos, las condiciones de expresión reportadas son similares a las usadas en este trabajo para la producción de la enzima, con excepción de la adición de glucosa al medio. En comparación, tanto el inductor y la concentración, además del tiempo de inducción utilizados en este trabajo, son muy similares a los reportados. En la Tabla 17 además de observar las condiciones se indican las cepas de expresión que se utilizaron en cada trabajo, en todos los reportes se expresó en *E. coli* y en sólo dos referencias se utilizó la misma cepa de expresión que en este trabajo [Sugahara *et al*, 2007; Inagaki *et al*, 2009].

Tabla 17. Sistemas pET y condiciones utilizadas para la expresión de proteínas con actividad lítica.

Referencia	Sun <i>et al</i> , 2006	Scheurwater <i>et al</i> , 2007	Sugahara <i>et al</i> , 2007	Inagaki <i>et al</i> , 2009	Supungul <i>et al</i> , 2010
Característica					
Cepa(s) de expresión	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	-XL1-Blue -NovaBlue (DE3)	-BL21 (DE3) -XL1-Blue	-Rosetta (DE3) pLys
Vector usado	pET-32a	pET-30a	pET-15b	pET-15b	pET-19b
Promotor	T7lac	T7lac	T7lac	T7lac	T7lac
Inductor	IPTG	IPTG	IPTG	IPTG	IPTG
IPTG [mM]	NR	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Tiempo de inducción	NR	3 h	2 h	2 h	4 h

NR: no reportado

5.2.2. Localización de la mayor actividad lítica de la proteína recombinante

A continuación se decidió evaluar en qué fracción se observaba la mayor actividad lítica y se trabajó con 6 fracciones:

- a) células enteras
- b) extracto libre de células (sobrenadante)
- c) células rotas por ultrasonificación
- d) citoplasma
- e) restos celulares
- f) proteínas solubilizadas con buffer de extracción

cuyos perfiles proteínicos y zimogramas contra *M. lysodeikticus* fueron evaluados.

En el SDS-PAGE (Figura 15) se observa un patrón similar en todos los carriles. En las fracciones de células enteras y restos celulares se aprecia que la concentración de proteína cargada en el gel es muy alta, por esta razón se observa un barrido en todo el carril, lo que dificulta la resolución de las bandas. Sin embargo en todos los carriles, excepto en el sobrenadante (carril 3), existen bandas de actividad, una de 97 kDa y otra alrededor de 70 kDa aproximadamente, bandas que corresponderían a la actividad presente en el zimograma.

En la Figura 16 se observa que en todas las fracciones se presenta actividad lítica, excepto en el extracto libre de células (sobrenadante). Esto indica que la proteína no es secretada al exterior de la célula, debido a que se direcciona a periplasma. Cabe hacer notar que la concentración de proteína presente en esta fracción no fue suficiente para ser detectada por esta técnica, que es altamente sensible, pues puede detectar hasta un 1 μ g de lisozima pura (LeClerc *et al*, 1989).

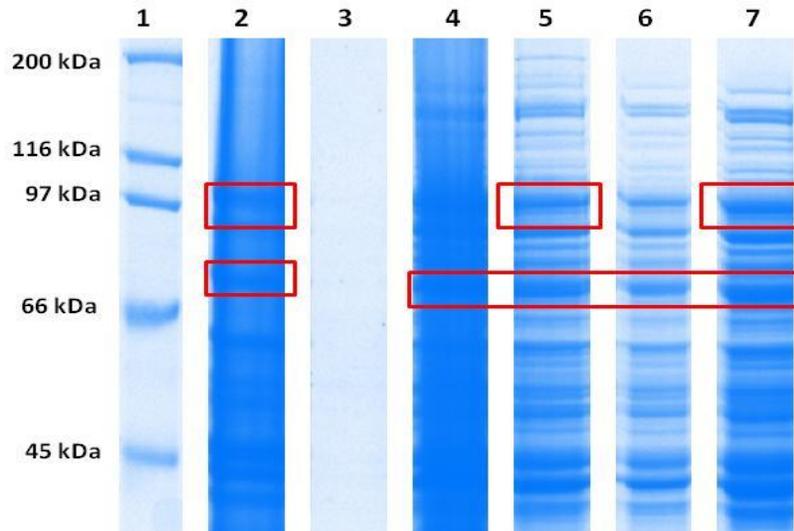


Figura 15. Perfil proteico de diferentes fracciones de cultivo. Condiciones: [IPTG]= 1 mM; 1% de glucosa (v/v); 3 h de inducción. Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. Células enteras. Carril 3. Sobrenadante. Carril 4. Restos celulares. Carril 5. Células rotas por sonicación. Carril 6. Citoplasma. Carril 7. Proteínas solubilizadas con buffer de extracción. SDS-PAGE 10% acrilamida.

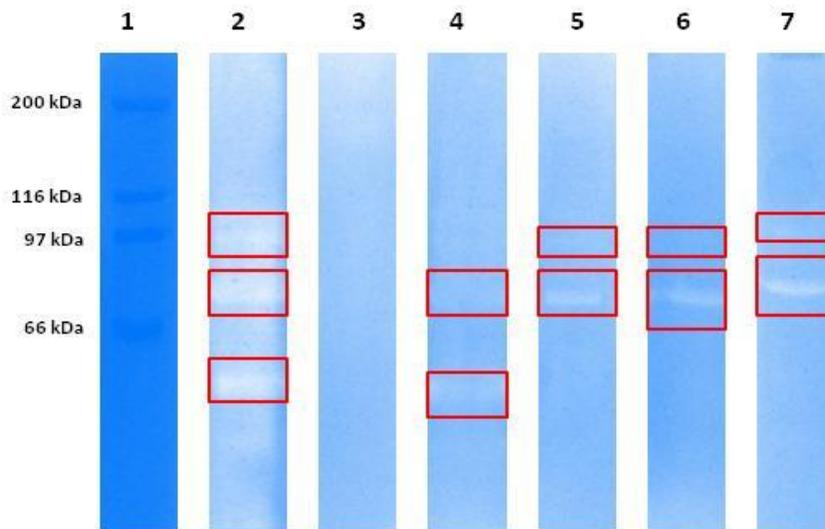


Figura 16. Localización de la mayor actividad lítica mediante zimograma contra *M. lysodeikticus* 0.2% condiciones: [IPTG]= 1 mM; 1% de glucosa (v/v); 3 h de inducción. Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. Células enteras. Carril 3. Sobrenadante. Carril 4. Restos celulares. Carril 5. Células rotas por sonicación. Carril 6. Citoplasma. Carril 7. Proteínas solubilizadas con buffer de extracción.

En todas las fracciones restantes: células enteras, células rotas por sonicación, citoplasma, restos celulares y proteínas solubilizadas con buffer de extracción, se observan varias bandas de actividad. En los

carriles 2, 5, 6, 7 se observa una banda muy tenue a los 97 kDa, masa muy cercana a la de la proteína recombinante (99 kDa). Sin embargo la banda más intensa se encuentra debajo del peso de la proteína, en 70 kDa. Además en las fracciones de células enteras (carril 2) y restos celulares (carril 4) se observa también una banda muy intensa a 50 kDa. La banda de actividad lítica más intensa y definida se encuentra en el carril 7 (Figura 16), que corresponde a la fracción de proteínas solubilizadas con buffer de extracción, lo cual sugiere que la mayor parte de la actividad de esta enzima se encuentra adherida a membrana. Tanto en el gel SDS-PAGE (Figura 15) como en el zimograma contra *M. lysodeikticus* (figura 16), se señalan con recuadro las bandas que corresponderían a la actividad lítica, después de hacer el análisis y calcular los pesos moleculares en el programa Image Lab 3.0 (BIORAD).

5.2.3. Western-Blot

Se realizó un ensayo de Western-Blot con anticuerpos Anti-His para identificar a la proteína recombinante con el tallo de histidinas. Para este ensayo el gel que se transfirió a la membrana de PVDF contenía las mismas fracciones probadas en la localización de la mayor actividad lítica de la proteína recombinante, además este gel también se corrió en condiciones desnaturizantes como todos los ensayos presentados anteriormente. En todas la fracciones, con excepción del extracto libre de células (carril 3), se observan bandas que generan señal positiva. En los carriles 5, 6, 7, se aprecian dos bandas, aproximadamente de 35 kDa y 37 kDa respectivamente. En las fracciones de células enteras (carril 2) y restos celulares (carril 4) se observa solo una banda positiva cerca de 35 kDa. Sin embargo en todos los carriles se observa un barrido muy tenue desde una altura cercana a 105 kDa.

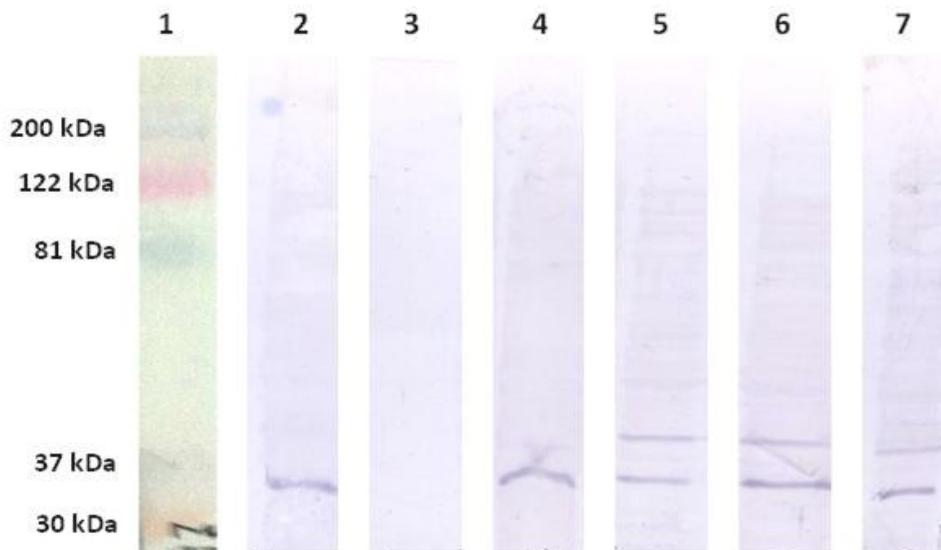


Figura 17. Western-Blot (membrana de PVDF). Condiciones: [IPTG]= 1 mM; 1% de glucosa (v/v); 3 h de inducción. Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. Células enteras. Carril 3. Sobrenadante. Carril 4. Restos celulares. Carril 5. Células rotas por sonicación. Carril 6. Citoplasma. Carril 7. Proteínas solubilizadas con buffer de extracción.

Relacionando los resultados obtenidos en el ensayo de Western-Blot y de actividad lítica contra *M. lysodeikticus*, se puede afirmar que posiblemente la proteína recombinante está sufriendo algún tipo de degradación o modificación post-traducciona, ya que las bandas presentes en los dos ensayos se observan por debajo del peso esperado de la enzima (99 kDa): en el zimograma la banda más intensa está en 70 kDa y en el Western-Blot alrededor de 35 kDa, que si se suman ambos pesos dan aproximadamente 105 kDa, cercano a la masa molecular de la proteína recombinante. Estos resultados sugieren que la enzima sufre alguna ruptura en el extremo C-terminal, donde se encuentra el tallo de histidinas del vector de clonación, La reacción inmunológica del Western-Blot indica que la proteína recombinante se traduce de manera correcta, pero que la enzima por alguna razón se fragmenta y aún así, mantiene la actividad lítica.

7. CONCLUSIONES

- Se logró clonar y expresar la peptidoglucano hidrolasa de 99 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 en la cepa de *E. coli* XL1-Blue. Esta presentó actividad lítica en zimogramas contra *M. lysodeikticus*, debida a una banda con una masa molecular de alrededor de 70 kDa.
- La enzima se expresó mejor al usar como condiciones de inducción las siguientes:
 - 3 h de inducción
 - 1 mM de IPTG
 - 1% de glucosa en el medio
- La fracción donde se encontró la banda más intensa de actividad lítica fue la de las proteínas de membrana obtenidas con el buffer de extracción. No se observó actividad lítica en el extracto libre de células.
- La proteína recombinante sufre algún tipo de degradación o ruptura, ya que la banda observada en el inmunoanálisis (Western-Blot) corresponde al tallo de histidinas. Esta se encuentra 35 kDa, mucho menor que el tamaño esperado.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, J. (2012) **Metodos de conservación de alimentos**. Primer edición. Red tercer milenio S.C. Mexico. pp 51-53.
- Baneyx F. (1999) **Recombinant protein expression in *Escherichia coli***. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 411-421.
- Barbosa-Cánovas V., Pothakamury R., Palou E. (1998) **Conservación no térmica de alimentos**. Marcel Dekker Inc. Ed. Acibia pp. 217-226, 228-230, 234-236.
- Bello J. (2000) **Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos**. Editorial Díaz de Santos. España. pp 388-390.
- Bera A., Herbert S., Jakob A., Vollmer W., Gotz F. (2005) **Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus***. *Molecular Microbiology*. 55:778–787.
- Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A. (2006) **Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents**. *Society for Experimental Biology and Medicine* 366-377.
- Branen L., Davidson M., Salminen S., Thorngate III H. (2002) **Food Additives**. Marcel Dekker Inc. pp 1-9, 563-564, 578-579.
- Callawaert L., Walmagh M., Michels C., Lavigne R. (2011) **Food applications of bacterial cell wall hydrolases**. *Current Opinion in Biotechnology*. 22: 164-171.
- Cappa F., Bottazzi V. (1996) **Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 1St261**. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 46: 299–310.
- Caprice E., Fitzgerald G. (1999) **Food fermentations: role of microorganism in food production and preservation**. *Internacional Journal of Food Microbiology*. 50 (1-2): 131-149.
- Cavadini C., Hertel, C., Hammes, W. (1996) **Stable expression of the lysostaphin gene in meat lactobacilli by introducing**

deletions within the prosequence. *Systematic and Applied Microbiology*. 19:21-27.

- Choi J., Lee S. (2004) **Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 625–635.
- Cibik R., Chapot-Chartier M. (2004) **Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*.** *Letters in Applied Microbiology*. 38: 459-463.
- Clarke A., Dupont C. (1991) **O-acetylated peptidoglycan: its occurrence, pathobiological significance, and biosynthesis.** *Canadian Journal of Microbiology*. 38: 85–91.
- Cotter P., Hill C., Ross RP. (2005) **Bacteriocins: Developing innate immunity for food.** *Nature Reviews Microbiology*. 3: 777-788.
- Cubero N. (2002) **Aditivos alimentarios.** Colección: Tecnología de alimentos. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp 53-54.
- Donovan D., Dong S., Garrett W., Rousseau G., Moineau S., Pritchard D. (2006) **Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities.** *Applied and Environmental Microbiology*. 4: 2988-2996.
- Fedorov T., Surovstev V., Pletnev V., Borozdina M., Gusev V. (2003) **Purification and some properties of lysostaphin, a glycylglycine endopeptidase from the culture liquid of *Staphylococcus simulans boivar staphylolyticus*.** *Biochemistry (Moscow)*. 68 (1): 61-65.
- Fennema O. (2000) **Química de los alimentos.** 2da edición. Acirbia. España. pp 908-909.
- Fenton M., Ross P., McAuliffe O., O'Mahony J., Coffey A. (2010) **Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials.** *Bioengineered Bugs*. 1(1): 9-16.
- Fischetti V. (2008) **Bacteriophage lysins as effective antibacterials.** *Current Opinion in Microbiology*. 11: 393-400.

- Fischetti V. (2010). Bacteriophage endolysins: **A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens**. *International Journal of Medical Microbiology*. 300: 357-362.
- Gaeng S., Scherer S., Neve H., Loessner M. (2000) **Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis***. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2951-2958.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R., Ben, O. (2007) **Bacteriocin-based strategies for food biopreservation**. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.
- García P., Rodríguez L., Rodríguez A., Martínez B. (2010) **Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins**. *Trends in Food Science and Technology*. 21:373-382.
- García-Cano I., Velasco-Perez L., Rodrigues-Sanoja R., Sánchez S., Mendoza-Hernandez G., Farrés A. (2011) **Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042**. *Journal of Applied Microbiology*. 111: 607-615.
- Gerigk M., Bujnicki R., Ganpo-Nkwenkwa E., Bongaerts J., Sprenger G., Takors R. (2002) **Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant *Escherichia coli***. *Biotechnology and Bioengineering*. 80: 746-754.
- Grossman T., Kawasaki S., Punreddy R., Osburne S. (1998) **Spontaneous cAMP-dependet repression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability**. *Gene*. 209: 95 - 103.
- Guerrero-Olarzarán M., Viader-Salvadó J. (2003) ***Pichia pastoris* como hospedero para la producción de proteínas recombinantes**. *Procesos Biotecnológicos*. Universidad Autónoma de Nuevo León. pp 136-156.
- Huard C., Miranda G., Redko Y., Wessner F., Foster S., Chapot-Chartier M. (2004) **Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactococcus lactis*: Identification of a third**

N-acetylglucosaminidase, AcmC. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 3493-3499.

- Inagaki, N., Iguchi, A., Yokoyama, T., Yokoi, K., Ono, Yamakawa, A., Taketo A., Kodaira K. (2009) **Molecular properties of the glucosaminidase AcmA from *Lactococcus lactis* MG1363: Mutational and biochemical analyses.** *Gene* 447:61-71.
- Jeong J., Choi H., Yoo M., Keum C., Yoo C., Lee Y., Sung H. (2004) **Constitutive production of human leptin by fed-batch culture of recombinant rpoS- *Escherichia coli*.** *Protein Expression and Purification*. 36: 150-156.
- Jeong J., Lee Y. (1999) **High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification.** *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3027-3032.
- Koch A. y Doyle R. (1985). **Inside-to-outside growth and turnover of the wall of gram-positive rods.** *Journal of Theoretical Biology*. 117 (1): 137-157.
- Kruszewska D., Podgurniak P., Ljungh A., Sebastian A., Larsson L., Zajdel-Dabrowska J., Pierzynowski S. (2005) **Extremely low electrical current generated by porcine small intestine smooth muscle alters bacterial autolysin production.** *Experimental Physiology*. 90: 855-863.
- Kuo J., Chang Y., Tseng C. (2003) **Growth rate regulation of *lac* operon expression in *Escherichia coli* is cyclic AMP dependent.** *FEBS Letters*. 553: 397 - 401.
- Leclerc, D y Asselin, A. (1989) **Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.** *Canadian Journal of Microbiology*. 35: 749-753.
- Leroy F., De Vuyst L. (2004) **Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry.** *Trends in Food Science and Technology*. 15 (2): 67-78.
- Lortal S., Chapot-Chartier M. (2005) **Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese.** *International Dairy Journal*. 15: 857-871.

- Lortal S., Valence F., Bizet C., Maubois J. (1997). **Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species.** *Research in Microbiology*. 148: 461-474.
- Makrides C. (1996) **Strategies for Achieving High-level Expression of Genes in *Escherichia coli*.** *Microbiological Review*. 60: 512-538.
- Maldonado E. (2002) **Biología Molecular en Medicina.** Limusa. México. pp 12-15.
- McCann D., Barrett A., Cooper A., Crumpler D., Dalen L., Grimshaw K., Kitchin E., Lok K., Porteus L., Prince E., Sonuga-Barke E., OWarner J., Stevenson J. (2007) **Food additives and hyperactive behavior in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial.** *Lancet*. 370: 1560-1567.
- Mijts N., Schmidt-Dannert C. (2003) **Engineering of secondary metabolite pathway.** *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 597-602.
- Moellering R. (2011) **Discovering new antimicrobial agents.** *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37:2-9.
- Mora D., Musachio F., Fortina M. Senini L., Machini P. (2003) **Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains.** *Journal Applied Microbiology*. 94: 561-570.
- Novagen (2006) **pET System Manual.** 11va edición. USA.
- Obeso J., Martinez B., Rodriguez A., Garcia P. (2008) **Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage phiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk.** *International Journal of Food Microbiology*. 128:211-8.
- Østlie H., Vegarud G., Langstrud T. (2007) **Autolysis of propionic bacteria detection of autolytic enzymes by renaturing SDS-PAGE and additional buffer studies.** *International Journal of Food Microbiology*. 117: 167-174.

- Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C. (2008) **Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides.** *Journal of Applied Microbiology.* 104:1-13.
- Peredelchuk M., Bennett G. (1997) **A method for construction of E. coli strain with multiple DNA insertions in the chromosome.** *Gene.* 187: 231-238.
- Pierce B. (2010). **Genética, un enfoque conceptual.** 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. pp 510 - 515.
- Raddadi N., Cherif A., Mora D., Brusetti L., Borin S., Boudabaous A., Daffonchio D. (2005) **The autolytic phenotype of the Bacillus cereus group.** *Journal of Applied Microbiology.* 99: 1070-1081.
- Reis J., Paula A., Casarotti S. (2012) **Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications.** *Food Engineering Reviews.* 4: 124-140.
- Rivera J. (2004) **Evaluación del efecto de bioconservador en Salamis al adicionar Pediococcus acidilactici ATCC 8042.** Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Rodríguez Gómez J. (2006) **Microorganismos y salud. Bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas.** Ed. Complutense. pp. 2-3.
- Rodriguez R., Tait R. (1983). **Recombinant DNA techniques: an introduction.** Addison-Wesley. USA. pp. 1-26.
- Salminen S, von Wright A, Ouwehand A. (2004) **Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects.** 3ra edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos. pp. 19-35, 389-400.
- Scheurwater E., Pfeffer J., Clarke J. (2007) **Production and purification of the bacterial autolysin N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase B from Pseudomonas aeruginosa.** *Protein Expression & Purification.* 56: 128-137.
- Silla H. (2004) **Dieta mediterránea y alimentos funcionales: seguridad alimentaria.** Universidad Politécnica de Valencia. España. pp 72-73.

- Simitsopoulou M., Vafopoulou A., Choli-Papadopoulou T., Alichanidis E. (1997) **Purification and partial characterization of a tripeptidase from *Pediococcus pentosaceus* K9.2.** *Applied and Environmental Microbiology*. 63(12): 4872-4876.
- Smith T., Blackman A., Foster S. (2000) **Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions.** *Microbiology*. 146: 249–262.
- Sørense H., Mortense K. (2005) **Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*.** *Journal of Biotechnology*. 115: 113 – 128.
- Stiles, M. (1996) **Biopreservation by lactic acid bacteria.** *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 331-345.
- Sugahara, K., Yokoi, K., Nakamura, Y., Nishino, T., Yamakawa, A., Taketo A., Kodaira K. (2007) **Mutational and biochemical analyses of the endolysin LysgaY encoded by the *Lactobacillus gasser* JCM 1131T phage ϕ gaY.** *Gene*. 404:41–52.
- Sun, B.J. Wang, G., Xie, H., Gao, Q., Nie P. (2006). **Gene structure of goose-type lysozyme in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with analysis on the lytic activity of its recombinant in *Escherichia coli*.** *Aquaculture*. 252:106–113.
- Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Aoki, T., Hirono I., Tassanakajon A. (2010) **Molecular characterization and expression analysis of a c-type and two novel muramidase-deficient i-type lysozymes from *Penaeus monodon*.** *Fish & Shellfish Immunology*. 28:490-498.
- Turner M. S., Hafner L., Walsh T., Giffard P. (2004) **Identification, characterization and specificity of a cell wall lytic enzyme from *Lactobacillus fermentum* BR11.** *FEMS Microbiology Letters*. 238: 9–15.
- Turner M., Waldherr F., Loessner M., Giffard P. (2007) **Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria.** *Systematic and Applied Microbiology* 30, 58–67.

- Valenzuela-Rosas A. (2011) **Caracterización de las peptidoglucano hidrolasas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Velasco-Pérez L., (2010) **Caracterización y espectro antibacteriano de la Peptidoglucano Hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Villarruel R., Huizar R., Corrales M., Sánchez T., Islas A. (2004) **Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune.** Invest Salud. 6: 170-179.
- Vollmer W., Joris B., Charlier P. and Foster S. (2008) **Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases.** *FEMS Microbiology Reviews.* 32: 259–286.
- Walsh G., Headon D. (1995) **Protein biotechnology.** John Wiley and Sons. pp. 1, 13-15.
- Watson J. (2006) **Biología Molecular del Gen.** 5ta edición. Editorial Médica Panamericana. España. pp. 696-699.
- Yoong P., Schuch R., Nelson D., Fischetti V. (2004) **Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.** *Journal of Bacteriology.* 186: 4808-4812.
- Zimmer M., Vukov N., Scherer S., Loessner M. (2002) **The murein hydrolase of the bacteriophage f3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains.** *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5311-5317.

Sitios web consultados

- **National Center of Biotechnology Information**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Fecha de consulta: 16 de octubre 2012)

- **Ley General de Salud** (última reforma publicada Diario Oficial de la Federación 24-04-2013).

<http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/142.pdf> (Fecha de consulta: 17 de mayo de 2013)

- **Oligocalc: Oligonucleotide Properties Calculator**

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> (Fecha de consulta: 24 de octubre 2012)

- **ExPasy, Swiss Institute of Bioinformatics**

<http://web.expasy.org/> (Fecha de consulta: 8 de febrero 2013)

- **Multiple sequence alignment**

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> (Fecha de consulta: 10 de abril 2013)