



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PEPTIDOGLUCANO HIDROLASA DE *Pediococcus acidilactici* ATCC
8042: DETECCIÓN, LOCALIZACIÓN CELULAR Y EVALUACIÓN DE SU
POTENCIAL COMO ANTIBACTERIANO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ISRAEL GARCÍA CANO

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D. F., DICIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PEPTIDOGLUCANO HIDROLASA DE *Pediococcus acidilactici* ATCC
8042: DETECCIÓN, LOCALIZACIÓN CELULAR Y EVALUACIÓN DE SU
POTENCIAL COMO ANTIBACTERIANO

Reconocimientos

Jurado asignado:

<u>Presidente:</u>	Dr. Agustín López-Munguía Canales	I. Biotecnología, UNAM.
<u>Vocal:</u>	Dr. José Adelfo Escalante Lozada	I. Biotecnología, UNAM.
<u>Vocal:</u>	Dra. María del Carmen Wachter Rodarte	Fac. Química, UNAM.
<u>Vocal:</u>	Dra. Bertha González Pedrajo	I. Fisiología Celular, UNAM.
<u>Secretario:</u>	Dr. Francisco Ruiz Terán	Fac. Química, UNAM.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 312 del Conjunto E, departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Amelia Farrés

Los miembros del Comité Tutor fueron:

Dra. Romina Rodríguez Sanoja	I. I. Biomédicas, UNAM.
Dr. Sergio Sánchez Esquivel	I. I. Biomédicas, UNAM.

Dra. Amelia Farrés González- Saravia
TUTOR

Israel García Cano
SUSTENTANTE

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
Bacterias Ácido Lácticas (BAL) como bioconservadores	4
Género <i>Pediococcus</i>	4
Peptidoglucano hidrolasas (PGH)	5
Aplicaciones de PGH en alimentos	7
Actividad de PGH en BAL	9
ANTECEDENTES	9
PGH en <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	9
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Detección y localización de la actividad lítica en <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	12
Cepas utilizadas	12
Curva de crecimiento de <i>P. acidilactici</i>	13
Detección de la actividad antibacteriana mediante pruebas de difusión en agar	13
Localización de la enzima con actividad lítica en <i>P. acidilactici</i>	13
Perfil de proteínas y zimogramas	15
Determinación de proteína	15
Purificación parcial de la PGH	16
Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS/MS)	16
Espectro antibacteriano	16
Efecto de la actividad PGH parcialmente pura durante la curva de crecimiento de microorganismos modelo	16
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	17
Clonación y expresión de la proteína de 99-kDa con actividad lítica	17
Plásmido y cepa utilizados para la clonación y expresión de la proteína de 99-kDa	17
Extracción de ADN de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	18
Diseño de cebadores	18
Amplificación del gene	19
Purificación de productos de PCR	19
Obtención de amplicones internos del gen <i>paci99</i> para conocer la secuencia completa	20
Digestión y ligación	21
Células competentes y transformación	22
Expresión de la proteína recombinante	23
Identificación de la proteína recombinante por Western-blot	24
Obtención de la proteína recombinante de 99-kDa	24
Actividad de PGH utilizando 4-Nitrofenil <i>N</i> -acetil- β -D-glucosamina	25
Purificación parcial de la proteína recombinante	25

Cromatografía de afinidad	25
Cromatografía de exclusión molecular	26
Zimogramas utilizando 4-Nitrofenil <i>N</i> -acetil- β -D-glucosamina como sustrato	26
Caracterización bioquímica de la proteína recombinante de 99-kDa	27
Efecto del pH sobre la actividad de PGH	27
Estabilidad al pH	27
Temperatura óptima de actividad	27
Estabilidad térmica	27
Efecto de iones metálicos, inhibidores y agentes quelantes sobre la actividad	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Detección y localización de la actividad lítica en <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	29
Curva de crecimiento	29
Localización de la enzima con actividad lítica en <i>P. acidilactici</i>	29
Purificación parcial de la PGH	31
Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS/MS)	33
Análisis de las secuencias	33
Espectro antibacteriano	35
Efecto de la actividad PGH parcialmente pura durante la curva de crecimiento de microorganismos modelo	36
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	38
Clonación y expresión de la proteína de 99-kDa con actividad lítica	39
Extracción de ADN	39
PCR (Polymerase Chain Reaction)	40
Obtención de amplicones internos del gen <i>paci99</i> para conocer la secuencia completa	41
Análisis de secuencia en aminoácidos	41
Digestión, ligación y verificación de la inserción del gen <i>paci99</i> en pET-19b(+)	43
Expresión y obtención de la proteína recombinante	44
Purificación parcial de la proteína recombinante	45
Caracterización bioquímica de la proteína recombinante de 99-kDa	48
Efecto del pH sobre la actividad de PGH	48
Estabilidad al pH	49
Temperatura óptima de actividad de la PGH	50
Estabilidad a la temperatura	51
Efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima recombinante de 99-kDa	52
Efecto de inhibidores y agentes quelantes sobre la actividad de la proteína de 99-kDa	54
Espectro de inhibición de la proteína recombinante de 99-kDa	55
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS	59

RESUMEN

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) se usan como cultivos iniciadores para conservar los alimentos procesados, ya que producen una amplia gama de metabolitos antibacterianos como: ácidos orgánicos, bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas (PGH). Estas últimas enzimas hidrolizan los enlaces glicosídicos o péptidicos que se encuentran en el peptidoglucano de todas las bacterias, produciendo la lisis celular, además están implicadas en diversas funciones celulares, tales como el crecimiento, la división y la autólisis. La BAL *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 es utilizada en productos cárnicos como cultivo iniciador, y se ha reportado que tiene la capacidad de inhibir microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*. Este efecto se puede deber a la actividad de PGH que ha sido reportada, con bandas de actividad lítica alrededor de 116- y 45-kDa, que fueron activas contra *Micrococcus lysodeikticus*. En el grupo de trabajo se identificó una banda de actividad lítica en 116-kDa, la cual fue obtenida a partir de extractos libres de células en bajas concentraciones y presentó actividad contra el mismo microorganismo blanco. Debido al efecto lítico de la BAL sobre bacterias patógenas y a que no se conoce la naturaleza de dicha actividad, el objetivo de este trabajo fue localizar celularmente, identificar y purificar la banda con actividad lítica. En primer lugar, se determinó la ubicación de la enzima en la célula y la fase en la cual se encontraba la mayor actividad lítica con respecto a la curva de crecimiento. La mayor actividad lítica, determinada por la prueba de difusión en agar contra *S. aureus*, fue a las 8 h de crecimiento en la fracción de proteínas unidas a membrana. Posteriormente, se realizó la extracción de la enzima lítica y se sometió a diferentes procesos de purificación. Se obtuvieron dos enzimas con actividad lítica y pesos moleculares muy cercanos entre sí (110- y 99-kDa). Las dos bandas fueron identificadas por LC-MS/MS. La proteína de 110-kDa, es una enzima con función desconocida, pero con sitios conservados de transportador tipo ABC; la segunda proteína (99-kDa), es una enzima con doble actividad de PGH; en el N-terminal presenta una región conservada de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasas, mientras que, en el C-terminal tiene una región conservada de *N*-acetilglucoamidasas. Con la fracción que contenía las dos enzimas se realizó el espectro de inhibición contra diferentes grupos de bacterias de interés sanitario, presentando actividad contra *Listeria*

monocytogenes, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella thyphimorium* y *Escherichia coli*. De la misma forma, las dos enzimas presentaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 2.1 μg contra *S. aureus*. Debido a la similitud en peso molecular de las dos proteínas con actividad lítica, y con la intención de conocer el efecto que presentan por separada las enzimas líticas, se decidió clonar y expresar la proteína de 99-kDa en un sistema heterólogo. El gen que codifica para la proteína de 99-kDa fue amplificado a partir de ADN genómico de *P. acidilactici*, digerido y ligado en un vector de expresión (pET-19b(+)); esta construcción fue transformada en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) y expresada con IPTG como inductor. Se obtuvo una proteína recombinante de 100-kDa, con actividad sobre *M. lysodeikticus*. La proteína fue purificada utilizando cromatografía de exclusión molecular, resultando en dos bandas, una de 100-kDa con actividad de *N*-acetilglucoamidasas y otra banda de 34-kDa sin actividad de PGH, lo que probablemente indique degradación de la proteína recombinante. Se caracterizó la enzima bioquímicamente. El pH óptimo de actividad fue de 6, y presentó estabilidad al pH en un intervalo de 7 a 5. La temperatura óptima de actividad fue de 60 °C, la cual fue abatida en su totalidad a 70 °C durante una hora. El EDTA no presentó inhibición sobre la actividad de PGH, sin embargo el EGTA disminuyó la actividad al 100 %, lo que indica probablemente que el ion Zn^{2+} no sea importante para la catálisis, sin embargo el ion Ca^{2+} presentó un efecto positivo sobre la actividad. El ion Zn^{2+} inhibió la enzima recombinante y ningún otro catión fue capaz de incrementar la actividad de PGH. La PGH de 100-kDa presentó actividad antibacteriana contra diversas cepas patógenas y contra BAL's, sin embargo la actividad fue menor con respecto a la actividad observada en el espectro de inhibición con la preparación de las dos proteínas juntas. Debido a la actividad observada de *N*-acetilglucoamidasas es de interés en la industria de los alimentos y la biotecnología, ya que puede ser utilizada como la lisozima para el control de patógenos, alargando la vida de anaquel del producto.

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria are starter cultures to preserve food because they produce a wide variety of antibacterial metabolites such as: bacteriocins and peptidoglycan hydrolases (PGH). PGH hydrolyze peptidoglycan of all bacteria. *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 has the ability to inhibit pathogenic microorganisms such as *Staphylococcus aureus* and produce a band of lytic activity in 116-kDa. Due to the lytic effect since it is not aware of the nature of this activity, the aims of this work was find the growth phase and localization of the lytic activity and purification of hydrolytic enzyme. The highest PGH activity was found during the logarithmic growth phase in the protein fraction bound to the cell membrane. Proteins were extracted from cells and purified. The protein profile and zymogram shows two proteins with lytic activity (110- and 99-kDa). The 110-kDa protein corresponded to a protein of unknown function, but with conserved sites of ABC type transporter, the second protein is an enzyme with double domain of PGH activity. We performed the inhibition spectrum against pathogenic bacteria. The minimum inhibitory concentration was 2.1 μg against *S. aureus*. In order to purify the enzyme, it was decided to clone and express the 99-kDa protein in a heterologous system. The 99-kDa gene was ligated into a vector and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and the protein was expressed with IPTG as inducer. The purified protein resulted in two bands, a 100-kDa N-acetilglucoamidasa activity and a 34-kDa band without PGH activity. The pH optimum of activity was 6 and the pH stability was 7-5. The optimum temperature for activity was 60 °C. EDTA showed no activity inhibition on PGH, contrary to EGTA which inhibited all activity. The Ca^{2+} ion showed a positive effect on activity. Ion Zn^{2+} inhibited the recombinant enzyme and any other cation was able to increase the activity of PGH. The 100- kDa PGH showed antibacterial activity against pathogenic and lactic acid bacteria.

INTRODUCCIÓN

Bacterias Ácido Lácticas (BAL) como bioconservadores

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentran en muchos ambientes ricos en nutrientes y de forma natural en diferentes alimentos como: productos lácteos, cárnicos y vegetales. Las BAL son utilizadas tradicionalmente como bioconservadores naturales de alimentos, lo que implica alargar la vida útil del producto, proporcionar una mayor seguridad, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos y/o responsables de la descomposición del alimento, además puede generar diferentes beneficios al producto como: sabor, color, textura, etc. (Leroy y De Vuyst, 2004; Gálvez *et al.*, 2007). Algunos de los géneros que conforman el grupo de BAL son: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Salminen *et al.*, 2004). Las BAL producen una amplia gama de sustancias con actividad antibacteriana, un ejemplo son las bacteriocinas, que son sustancias de naturaleza peptídica, pequeñas (no mayores a 30 kDa), y se pueden presentar con mecanismos de acción diferentes (Cotter *et al.*, 2005; O' Shea *et al.*, 2013).

Género *Pediococcus*

El género *Pediococcus* se encuentra principalmente en plantas y alimentos fermentados como embutidos y quesos (Leroy y De Vuyst, 2004). *Pediococcus* es utilizado en alimento para animales como potenciador nutricional y desde algunos años se ha utilizado en la industria de los polímeros en la producción de empaques biodegradables (Dobson *et al.*, 2002), además es utilizado como cultivo iniciador en la elaboración de salchichas y como microorganismos secundarios en la maduración del queso (Danilović *et al.*, 2011; Irmiler *et al.*, 2013). Esta BAL es una bacteria Gram-positiva de la familia *Lactobacillaceae* y presenta un metabolismo homofermentativo esto es, el producto final de la fermentación de las hexosas es el ácido láctico (Leroy y De Vuyst, 2004). Normalmente se presenta en pares o tétradas, en forma de coco (1.0–2.0 μm de diámetro). Las especies que pertenecen al género son 13: *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. argentinicus*, *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, *P.*

ethanolidurans, *P. inopinatus*, *P. lolii*, *P. parvulus*, *P. siamensis*, *Pediococcus dextrinicus* y *P. stilesii* (Haakensen *et al.*, 2009).

Algunos autores reportan que cepas de *Pediococcus* al ser combinadas con el género *Lactobacillus* pueden acelerar la maduración e incrementar el sabor de algunos quesos (Barouei *et al.*, 2011). Aunado a estos factores, al utilizar este género como cultivo iniciador, se ha observado que microorganismos patógenos en alimentos como *S. aureus*, *E. coli*, y *L. monocytogenes*, son inhibidos (Wang *et al.*, 2013; Vidhyasagar y Jeevaratnam 2013). La capacidad antibacteriana de *P. acidilactici* se debe, probablemente, a la producción de bacteriocinas, ácido láctico y peptidoglucano hidrolasas (Mora *et al.*, 2003; Ghanbari *et al.*, 2013; Vidhyasagar y Jeevaratnam, 2013).

Peptidoglucano hidrolasas (PGH)

El peptidoglucano (o mureína) es un heteropolímero de azúcares y aminoácidos, sintetizados solamente por los procariontes. Esta molécula forma una barrera que recubre la membrana plasmática y protege a la célula contra la presión osmótica interna en condiciones hiposmóticas. El peptidoglucano consiste en cadenas de residuos alternados de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico, los cuales se encuentran unidos mediante enlaces β -1,4. El ácido *N*-acetilmurámico se encuentra unido por un tetrapéptido poco común, que contiene aminoácidos de forma D y L (Vollmer *et al.*, 2008). El peptidoglucano es un exoesqueleto en forma de red, el cual es suficientemente poroso para permitir la difusión de los metabolitos a la membrana plasmática (Sitkin *et al.*, 2003; Vollmer *et al.*, 2008-a). Durante todo su crecimiento, las células necesitan romper de manera controlada los enlaces del peptidoglucano. Las enzimas responsables de este proceso son conocidas como peptidoglucano hidrolasas o PGHs (Eckert *et al.*, 2006).

Las PGHs se involucran en un gran número de funciones que requieren el peptidoglucano: durante el crecimiento, la división celular, la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células hijas durante la división, formación de flagelo (en algunos casos) y la autólisis, que generalmente se induce en condiciones adversas

como la falta de nutrientes (Fig 1). Para las bacterias patógenas, las PGHs juegan un papel importante en la adhesión y en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, además, están involucradas en los fenómenos de lisis en las bacterias (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Eckert *et al.*, 2006; Vollmer *et al.*, 2008-b).

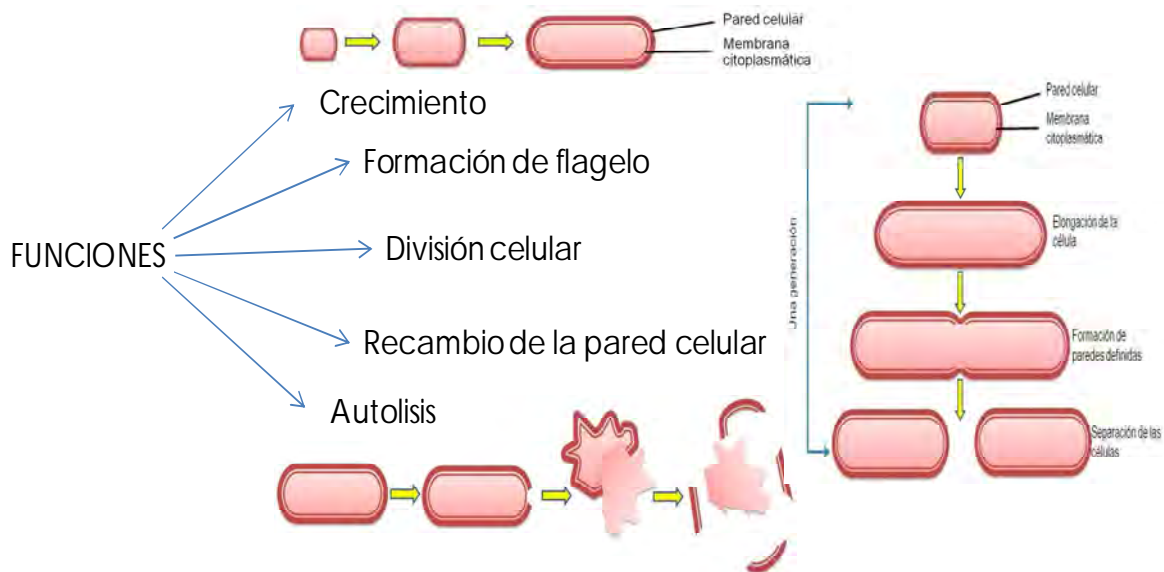


Figura 1. Algunas funciones celulares de las PGHs.

Las PGHs se clasifican de acuerdo al enlace del peptidoglucano que hidrolizan: Las *N*-acetilglucoamidasas hidrolizan el enlace β -1,4 de la cadena de glicanos dejando un extremo *N*-acetilglucosamina reductor; las *N*-acetilmuramidasa hidrolizan el mismo enlace, sin embargo dejan un extremo ácido *N*-acetilmurámico reductor libre, estas enzimas también son llamadas lisozimas, y si forman un anillo 1,6-anhidro en el *N*-acetilmurámico, son llamadas transglicosilasas líticas. Las *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa rompen el enlace amida entre el *N*-acetilmurámico y la L -alanina del péptido. Las peptidasas son capaces de hidrolizar el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos (carboxipeptidasas), o de romper completamente los puentes formados por los péptidos (endopeptidasas) (Fig. 2) (Vollmer *et al.*, 2008-b; Layec *et al.*, 2008).

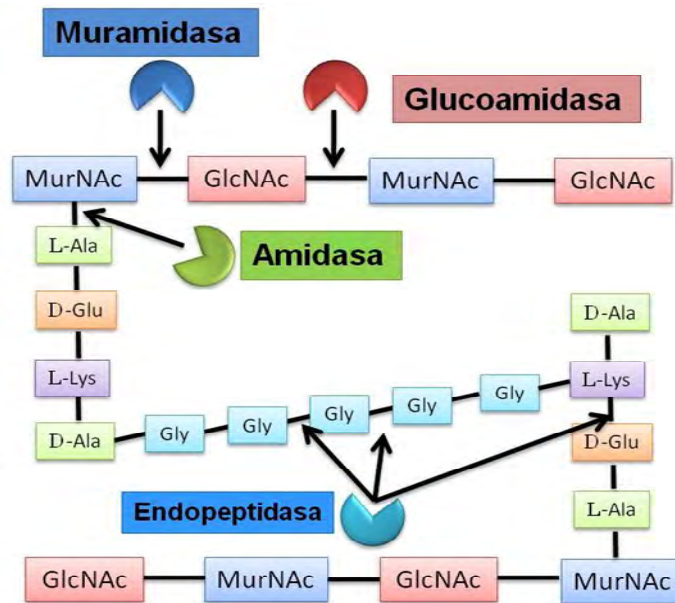


Figura 2. Estructura del peptidoglucano de *S. aureus*. Las flechas indican el tipo de enlace que hidrolizan sobre la pared bacteriana (MurNAc, *N*-acetilmurámico; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina) (Tomado y modificado de Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

En las bacterias Gram-positivas, el peptidoglucano forma múltiples capas y presenta una conformación tridimensional que origina una pared celular muy fuerte y rígida. Puede estar asociada a otro tipo de compuestos, como ácidos teicóicos y lipoteicóicos y/o polisacáridos. El peptidoglucano de la pared celular de las bacterias Gram-negativas constituye una sola capa delgada; no contienen ácidos teicóicos ni lipoteicóicos (Vollmer *et al.*, 2008-b, Das *et al.*, 2013).

Aplicaciones de PGH en alimentos

La resistencia de algunas cepas a antibióticos, como es el caso de *S. aureus* Resistente a Meticilina (MRSA) (Graham y Coote 2007), y aunado al crecimiento de alimentos no procesados, incrementan el riesgo de contaminación del producto, lo que puede desencadenar en enfermedades de tipo bacteriana. Por lo tanto se han creado nuevas estrategias para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos que son transmitidos por alimentos (Donovan *et al.*, 2006; García *et al.*, 2010; Fischetti, 2010). En los últimos años el uso de enzimas con actividad lítica como agentes antibacterianos en la industria de los alimentos ha ido incrementando debido a que provee ventajas hacia el producto y el consumidor. Dentro de estas ventajas está la eliminación de la

colonización bacteriana a membranas de la mucosa del aparato digestivo, el tratamiento en infecciones provocadas por bacterias y el biocontrol de bacterias patógenas en alimentos (García *et al.*, 2010; Fischetti, 2010; Fenton *et al.*, 2011).

El caso mas concreto sobre el uso de PGH en la industria de alimentos es la lisozima. Esta enzima presenta actividad de *N*-acetilmuramidasa y se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. En plantas y animales, constituyen un mecanismo de defensa natural contra bacterias patógenas. La lisozima es un excelente bioconservador debido a que se encuentra en el cuerpo humano y en algunos productos alimenticios y no es considerada como aditivo. La lisozima proveniente de huevo de gallina es la más utilizada y es aplicada como conservador en alimentos como carnes, embutidos, pescado, verduras, frutas, vino y leche en polvo. Su uso en la producción de vino es de importancia debido a que inhibe el crecimiento de BAL no deseadas, debido a que acidifican el producto. Además son utilizadas en la prevención del deterioro de quesos. También es utilizada en cosméticos y en la industria farmacéutica (Nakimbugwe *et al.*, 2006; Maidment *et al.*, 2009).

Otro ejemplo del uso de las PGH es la lisostafina, enzima producida por *Staphylococcus simulans* y es altamente específica por la pared celular de *S. aureus*, la cual esta compuesta de un enlace interpeptídico de cinco glicinas unidas. Debido a esta alta especificidad la actividad está limitada a *S. aureus* y especies relacionadas (Fedorov *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2007). Esta proteína es una metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} , con un peso molecular de 27 kDa. La actividad específica de la lisostafina por la pared celular de *S. aureus* tiene numerosas aplicaciones en la industria de alimentos, veterinaria y medica (Szweda *et al.*, 2012). En los últimos años la propuesta para el uso de la lisostafina ha sido la inserción del gen que codifica para la producción de la proteína lítica en sistemas heterólogos como en las BAL que son reconocidos por la FDA (Food Drug Administration) como GRAS (Generally Recognized As Safe). El uso de las BAL se debe a que aun no esta permitido el uso de la lisostafina en alimentos ya que proviene de una cepa calificada como patógena (Turner *et al.*, 2007).

Actividad de PGH en BAL

Diversos autores reportan que las BAL son una fuente importante de producción de PGH, y que pueden tener un uso potencial para el control de patógenos en la industria de los alimentos, donde el género que más se ha reportado es: *Lactobacillus* (Cibik y Chapot-Chartier, 2004; Turner *et al.*, 2004; Yokoi *et al.*, 2005; Donovan y Foster-Frey 2008; Fischetti, 2010; Ribelles *et al.*, 2012). Además se ha encontrado que una especie puede llegar a producir dos o hasta tres enzimas con actividad lítica (Baker *et al.*, 2006). Un ejemplo de este tipo de PGH es en *Lb. pentosus*, la actividad fue detectada en la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo (16 h), donde primero se trató a las células completas con un amortiguador que contenía SDS y se usó como sustrato *M. lysodeikticus*, la actividad se presentó a los 31-, 58- y 112-kDa, lo que sugiere que la actividad puede presentarse por dos o mas enzimas diferentes; utilizando otra fracción de células cosechadas en la misma fase de crecimiento se les adicionó LiCl, sorprendentemente se observaron las mismas bandas que en el caso anterior y otras tres bandas adicionales a los 37-, 43- y 77-kDa. Por último, otra fracción de células se sometió a sonicación; en la fracción citosólica solo presentó actividad a los 31-kDa; en la fracción de células rotas se reportó actividad a los 31-, 43-, 58-, 77-, 95- y 112-kDa, por lo que probablemente este tipo de enzimas se encuentran adheridas a membrana (Cibik y Chapot-Chartier, 2004).

ANTECEDENTES

PGH en *P. acidilactici* ATCC 8042

P. acidilactici es una BAL utilizada como cultivo iniciador y se encuentra presente como microbiota secundaria en diferentes tipos de queso (Lortal y Chaport-Chartier 2005). Esta especie es reportada como productora de pediocinas (Mora *et al.*, 2000), sin embargo, la cepa *P. acidilactici* ATCC 8042 es una de las pocas cepas que no produce bacteriocinas (Mora *et al.*, 2003), pero se ha reportado que presenta un efecto bactericida, el cual puede ser atribuido a enzimas con actividad lítica como las PGH, esto lo suponen debido a que la cepa presentó un alto porcentaje de autólisis (entre 40 y 90 %) después de 48 h de incubación. Posteriormente realizaron ensayos para

identificar que tipo de proteínas eran las responsables de la actividad lítica y para lo cual trabajaron con células colectadas en la fase logarítmica de crecimiento (aprox. 8 h). Detectaron una banda de actividad lítica en 116-kDa en las primeras horas de renaturalización del gel, usando células de *M. lysodeikticus* como microorganismo indicador. Adicionalmente se observaron otras bandas entre 45- y 110-kDa de actividad lítica, que probablemente indica proteólisis o modificaciones postraduccionales de la proteína (Mora *et al.*, 2003).

Rivera (2004) observó que las propiedades organolépticas en la elaboración de productos cárnicos tipo salami se veían favorecidas al adicionar *P. acidilactici* al inicio de la fermentación, además observó un efecto bioconservador al adicionar *S. aureus* la cual fue inhibida en su totalidad por la BAL, sin describir quién o quiénes eran los responsables de la inhibición.

En estudios más recientes, Llorente-Bousquets y cols. (2008) encontraron que los sobrenadantes del cultivo de *P. acidilactici* obtenidos en fase logarítmica presentaban actividad lítica muy tenue a los 116 kDa en zimogramas contra *M. lysodeikticus*, sin embargo no se identificó la proteína responsable de dicha actividad.

Con estos antecedentes, el siguiente trabajo pretende conocer la naturaleza de la actividad lítica reportada en *P. acidilactici*, por lo que quedan varias interrogantes como: ¿en que parte de la célula se encuentra la actividad lítica?, ¿en que fase de crecimiento de *P. acidilactici* se encuentra la mayor actividad?, ¿cuál es el espectro de inhibición? Además, encontrando la proteína responsable de la actividad lítica, quedaría purificar y caracterizarla bioquímicamente en función de pH, temperatura, activadores, inhibidores, con la intención de conocer sus propiedades y poder utilizarla como bioconservador en la industria de los alimentos.

HIPÓTESIS

La cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042, no pediocinogénica, presenta un efecto antibacteriano, y esta se debe a una peptidoglucano hidrolasa

OBJETIVOS

- 1.- Detección y localización de la actividad lítica en *P. acidilactici* ATCC 8042**
- 2.- Clonación y expresión de la proteína de 99-kDa con actividad lítica**

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección y localización de la actividad lítica en *P. acidilactici* ATCC 8042

Cepas utilizadas

En la tabla 1 se describen las cepas, la procedencia y el medio de cultivo utilizados en este trabajo. Todas las cepas se almacenaron a -20 °C en crio-viales con el medio de cultivo óptimo adicionado con glicerol (80-20 %, v/v). Para reactivar las cepas, se añadieron 100 µL de cada uno de los microorganismos almacenados a -20 °C a 10 mL del medio líquido fresco. Todos los microorganismos se incubaron a 37 °C, con excepción de *P. acidilactici* el cual se incubó a 30 °C.

Tabla 1. Descripción de las cepas utilizadas.

Microorganismo	Cepario/procedencia	Medio de cultivo
<i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	CINVESTAV, IPN	MRS
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Posgrado FESC-UNAM	BHI
<i>M. lysodeikticus</i> ATCC 4698	Sigma-Aldrich	
<i>Enterococcus faecalis</i> QB,	Dra. Maricarmen Quirasco	MRS
<i>Enterococcus faecium</i> QB	Dra. Maricarmen Quirasco	MRS
<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	Facultad de Química UNAM	MRS
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Facultad de Química UNAM	BHI
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	Facultad de Química UNAM	BHI
<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218	Facultad de Química UNAM	BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	Facultad de Química UNAM	BHI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Facultad de Química UNAM	BHI
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Facultad de Química UNAM	BHI
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Invitrogen	BHI

BHI= Brain Heart Infusion (DIFCO), MRS= DeMan Rugosa and Sharp (Oxoid)

Curva de crecimiento de *P. acidilactici*

Para determinar el crecimiento de *P. acidilactici*, se realizó un pre-inóculo que se dejó crecer 24 h y posteriormente se realizó una resiembra, para realizar un inóculo que se dejó crecer 12 h. A un matraz Fernbach con 1 L de medio MRS modificado se le adicionó el 1 % del inóculo de 12 h y se incubó a 30 °C, sin agitación (Precision Gravity Convection Incubator Modelo 4). Se tomó una alícuota de 1 mL del medio a las 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 24 h de fermentación, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (Biomate 3 Spectrophotometer, Thermo Scientific) y se determinó el pH (34 pH Meter Beckman).

Detección de la actividad antibacteriana mediante pruebas de difusión en agar

Para determinar el efecto antibacteriano *in vitro* se realizaron pruebas de difusión en agar. En la caja petri se colocaron 15 mL de agar BHI al 1 %, se dejó solidificar a 4 °C durante 15 min, posteriormente a la caja se le adicionaron 10 mL de agar al 0.6 % con 1×10^7 UFC/mL de *S. aureus*. Con un penicilindro se hicieron pozos sobre la doble capa de agar, a los cuales se les adicionaron 200 µL de cada una de las fracciones obtenidas y las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h. Se tomó como positiva la prueba cuando el diámetro del halo de inhibición del microorganismo indicador fue mayor a 1 mm, el que se correlacionó con la concentración de proteína total colocada en cada pozo.

Localización de la enzima con actividad lítica en *P. acidilactici*

Con la finalidad de determinar la fase de crecimiento en la que se presenta la mayor actividad de la enzima en estudio y su localización, se siguieron las técnicas descritas por Mora *et al.*, (2003) y Cibik y Chapot-Chartier (2004). Se cosecharon 100 mL de cada uno de los tiempos de la fermentación (4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 24 h), cada alícuota se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min a 4 °C. El paquete celular se lavó dos veces con un buffer 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 (buffer de trabajo), bajo las condiciones anteriormente descritas y posteriormente cada paquete se sometió a alguna de las condiciones detalladas a continuación:

1) Se resuspendió en 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA (ácido etilendiaminotetra acético), 10 mM NaCl y 2 % SDS (sodium dodecyl sulfate) (buffer de extracción), se adicionó el volumen necesario para llegar a una D.O._{600nm} de 2.0–2.5, la mezcla se agitó vigorosamente y se colocó en baño de agua a ebullición durante 10 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se centrifugó a 17,000 rpm por 25 min a 10 °C. El sobrenadante, que contenía las proteínas adheridas a membrana, se congeló a -70 °C, se sometió a liofilización (Labconco Freezone 4.5). Posteriormente las muestras se dializaron con una membrana con tamaño de corte de 1 kDa (Spectra/Por7, Spectra), contra agua destilada y en agitación constante a 4 °C toda la noche, con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de SDS posible.

2) Siguiendo el protocolo propuesto por Cibik y Chapot-Chartier (2004), cada paquete celular se resuspendió y se ajustó a una D.O._{600nm} de 2.0–2.5, y se sonicaron a una amplitud de 30 Hz con 20 ciclos de 20 s cada uno e intervalos de descanso de 20 s a 4 °C, (sonicador Fisher Scientific, 550). Posteriormente, se centrifugó a 17,000 rpm por 30 min a 4 °C. A la fracción soluble, que contenía el citosol, se le determinó la concentración de proteína y se guardó a -20 °C hasta su uso. Al botón residual de las muestras tomadas a diferentes tiempos se le adicionó el volumen necesario de buffer de extracción para llegar a una D.O._{600nm} de 2.0–2.5, se agitó vigorosamente y se colocó en baño de agua a ebullición durante 10 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 17,000 rpm por 25 min a 10 °C. El sobrenadante, que contenía las proteínas adheridas a restos celulares, se congeló a -70 °C, se sometió a liofilización y a diálisis como se describió anteriormente. Por lo tanto, tras seguir este procedimiento, se obtuvieron tres fracciones celulares:

- a) proteínas adheridas parcialmente a membrana,
- b) citosol
- c) proteínas adheridas a restos celulares.

A cada una de las fracciones se le determinó la concentración de proteína, el perfil de proteínas, se evaluó en zimogramas para detección de actividad de PGH y se probó la capacidad antimicrobiana en pruebas de difusión en agar.

Perfil de proteínas y zimogramas

El peso molecular de las proteínas de interés se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida co-polimerizada en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Se prepararon SDS-PAGE al 10 % con los reactivos necesarios (Bis-acrilamida 30 %, Tris-HCl 2 M, pH 8.8, SDS 10 %, H₂O, TEMED y APS 10 %). Se tomaron 30 µL de la muestra a evaluar y se les adicionaron 8 µL de amortiguador de carga (50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 2.5 % glicerol, 0.5 % β-mercaptoetanol y 0.5 % de azul de bromofenol) (Laemmli, 1970). Se trataron a ebullición durante 5 min y se cargaron en el gel (Bio-Rad, Power-Pac 300), el cual se corrió a 80 V durante 1.5 h. Después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua desionizada durante 30 min, se tiñó con azul de Coomassie (0.1 % azul de Coomassie R-250, 45 % metanol, 10 % ácido acético glacial y 45 % de agua) durante 2 h y se destiñó con 10 % de metanol, 10 % ácido acético glacial y 80 % agua. El peso molecular de las bandas de proteína se determinó por la comparación con marcadores de alto peso molecular (Bio-Rad, 161-0303). Para la elaboración del zimograma, se prepararon geles SDS al 10 % de poliacrilamida co-polimerizada con 0.2 % de células liofilizadas de *M. lysodeikticus*, como sustrato (Leclerc y Asselin, 1989), posteriormente, las células se resuspendieron con los reactivos necesarios para la elaboración del gel. Una vez transcurrida la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua desionizada durante 30 min, se incubó a 37 °C con amortiguador de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 con Tritón X-100 1 % v/v) durante 12-16 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 porcentaje de pureza de cada banda se calculó usando la densidad óptica, utilizando el software Image Lab (Bio-Rad).

Determinación de proteína

La concentración de proteína de cada fracción se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando un kit comercial (Bio-Rad) y albúmina sérica bovina como estándar.

Purificación parcial de la PGH

La fracción de proteínas solubilizadas con buffer de extracción se dializó con una membrana de tamaño de corte de 50 kDa (Spectra/Por7) contra agua y en agitación a 4 °C (Mee-Jung *et al.*, 2008), posteriormente se sometieron a ultrafiltración (Amicon, Millipore) con una membrana de tamaño de corte de 100 kDa (Ultrafiltration Membranes, regenerated cellulose, Millipore). En todos los pasos del tratamiento la muestra se conservó a 4 °C.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Las muestras se analizaron por LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem), técnica que permite identificar proteínas a partir del espectro de masas de su huella peptídica, e incluso de secuenciar *de novo* estos péptidos. Las secuencias de los péptidos se analizaron mediante el programa MASCOT (version 1.6b9, Matrix Science, London, U.K.). Posteriormente, se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center of Biotechnology Information) para encontrar regiones de similitud con secuencias de otras proteínas reportadas en la base de datos.

Espectro antibacteriano

Los microorganismos utilizados se describieron en la tabla 1. Cada cepa se reactivó a 37 °C por 24 h en el mismo medio de cultivo. Para evaluar la actividad contra cada uno de los microorganismos se realizaron pruebas de difusión en agar como se describió anteriormente.

Efecto de la actividad PGH parcialmente pura durante la curva de crecimiento de microorganismos modelo

Se utilizaron *S. aureus*, *E. coli*, y *P. acidilactici* como microorganismos indicadores. A un matraz Erlenmeyer con 50 mL de caldo BHI se adicionó el 2 % del pre-inóculo de cada uno de las cepas y se incubaron a 37 °C. Durante la fase logarítmica de crecimiento de cada microorganismo se adicionó PGH parcialmente pura (500 µg/mL), se monitoreó la D.O._{600nm} tomando una alícuota de 0.5 mL del medio cada 0.5 h y simultáneamente se tomó una alícuota para medir Unidades Formadoras de

Colonias por cada mL (UFC/mL). Para cada microorganismo se corrió un matraz control, al que no fue adicionada la fracción enzimática.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La CMI es definida como la mínima concentración de antibiótico (o sustancia con actividad inhibitoria) que puede inhibir el crecimiento de un organismo después de ser incubado toda la noche (Andrews, 2001). A cajas inoculadas con *S. aureus*, como se describió anteriormente, se adicionaron diferentes concentraciones de PGH (4 a 400 µg/mL), las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h. Se evaluó el diámetro del halo de inhibición del microorganismo de prueba.

Clonación y expresión de la proteína de 99-kDa con actividad lítica

Plásmido y cepa utilizados para la clonación y expresión de la proteína de 99-kDa

Se utilizaron el sistema pET (pET System, Novagen) y la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) para la clonación y expresión de la proteína recombinante.

El vector empleado fue el pET-19b(+) (5717 pb), debido a que posee algunas características que favorecen la expresión y purificación de la proteína, como: 1) cuenta con el operador *lac*, al cual se une el represor *lacI*, que hace más estricta la expresión, reduciendo los niveles basales de producción de la proteína; 2) puede recibir insertos de gran tamaño; 3) adiciona un tallo de histidinas en el N-terminal (10x His) que facilita la posterior purificación; 4) contiene un gen que le confiere resistencia a ampicilina, lo que facilita la selección de las colonias transformantes.

La cepa *E. coli* BL21(DE3), es ampliamente utilizada debido a que presenta algunas características en su genotipo que la hacen idónea para la clonación y expresión, dentro de las que destacan las siguientes: 1) *lon*: deficiente en esta proteasa que degrada las proteínas heterólogas; 2) *F*- incapaz de generar una sola hebra de DNA; 3) *gal*: deficiente en el metabolismo de galactosa; 4) Posee un gen de RNA pol T7.

Con las propiedades antes mencionadas y aprovechando la expresión de la RNA pol T7 se puede emplear en conjunto con esta cepa un vector que posea un promotor del mismo bacteriófago (T7) con lo cual se tiene un alto control sobre la expresión de la proteína de interés pues esta solamente es inducida cuando se añade al medio de cultivo un inductor del operón *lac*. Generalmente se utiliza IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) como inductor, por lo cual el sistema de vectores pET son la opción adecuada para introducir genes de interés (pET System Manual 11th Edition, Novagen).

Extracción de ADN de *P. acidilactici* ATCC 8042

Se utilizaron células de *P. acidilactici* cosechadas en fase logarítmica de crecimiento para la extracción de ADN por medio de un kit comercial (Fast ID Genomic DNA Extraction Kit), siguiendo las instrucciones del proveedor, adicionando 0.5 mg/mL de lisozima para ayudar a lisar la célula.

Diseño de cebadores

Se diseñaron los cebadores utilizando la secuencia en nucleótidos para la enzima de 99-kDa reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7_4. Esta tiene una longitud de 2784 pares de bases (NCBI Reference Sequence: NZ_GG730085.1) y se denomina *paci99*. Se utilizó el software Oligocalc (Kibbe, 2007) (Tabla 2) para diseñar los oligonucleótidos, los cuales se sintetizaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. En la dirección directa del oligonucleótido se insertó la secuencia para la enzima de restricción XhoI y en la dirección reversa el sitio de restricción para la enzima BamHI (Tabla 2, secuencias subrayadas).

Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificar el gen *paci99*.

Nombre	Orientación	Dirección (5' → 3')	Tm °C
FXhoI	Directa	CTACAC <u>CTCGAG</u> TTTAAGTCAGGGAAG	59.8
RBamHI	Reversa	ACCTG <u>GCTCGAG</u> CAACGAAATTGCTGA	58.0

Amplificación del gene

La amplificación del gen *paci99* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el termociclador Maxigene (Axygen®), con la enzima HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN). Se utilizaron el ADN extraído de *P. acidilactici* ATCC 8042 (100 ng) y los cebadores diseñados a una concentración final de 0.2 µM, los dNTP's (Fermentas) a 0.2 mM, 1.25 U de la enzima y 1x del buffer de la enzima (10x PCR buffer). Se adicionó agua con base para 25 µL de reacción. Las condiciones térmicas de la reacción se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones térmicas de la PCR para la amplificación del gen de interés

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

Purificación de productos de PCR

Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) utilizando buffer TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM). Las muestras obtenidas de la PCR se mezclaron con buffer de carga 6x (Loading Dye 6x, Fermentas). La electroforesis se corrió a 90 V durante 45 min y el gel se reveló con bromuro de etidio al 0.01 % sobre un transiluminador de luz UV.

Una vez identificada la banda del gen de interés, se purificó a partir del gel de agarosa utilizando el Kit GenElute Minus EtBr Spin Columns (Sigma-Aldrich), siguiendo las especificaciones recomendadas por el proveedor.

Obtención de amplicones internos del gen *paci99* para conocer la secuencia completa

La secuenciación del gen de interés no fue completa debido a que es de gran tamaño y los sistemas de secuenciación hasta el momento solo permite secuenciar cerca de 1000 pb, de las cuales sólo 700 pb son confiables, por lo que fue necesario diseñar cebadores internos para amplificar un fragmento más corto. En la tabla 4 se muestran los cuatro diferentes cebadores diseñados para obtener la secuencia del gen *paci99* completo. En la figura 3 se esquematiza las regiones amplificadas del gen, así como el nombre asignado a cada cebador. Todas las reacciones de PCR fueron sometidas en las mismas condiciones anteriormente descritas. Los productos de amplificación se purificaron y se enviaron a secuenciar a MacroGen Inc (Seúl, Corea).

Tabla 4. Cebadores diseñados para obtener la secuencia completa del gen *paci99*

Nombre	Cebador 5' → 3'	Tm °C	Tamaño esperado pb
FXhol	CTACACCTCGAGTTTAAGTCAGGGAAG	58	≈939
R199	GGGCAACTGGTCAAAATATTTATAGCGG	58	
F299	CCGCTATAAATATTTTGACCAGTTGCC	57	≈890
R299	CGTTAACTTACTCCGTGATTCCGC	57	
F399	CGGAATCACGGAGTAAGTTAACGT	56	≈1005
RBamHI	ACCTGCTCGAGCAACGAAATTGCTGA	60	

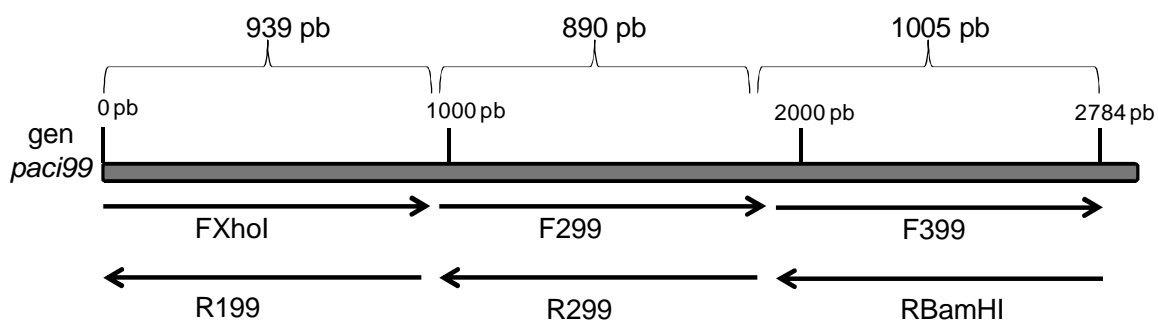


Figura 3. Esquema de las regiones internas amplificadas del gen *paci99*

Digestión y ligación

El gen *paci99* amplificado y purificado se digirió con las dos enzimas de restricción (XhoI y BamHI, Fermentas), y se insertó en el plásmido pET-19b(+) el cual previamente fue digerido con las mismas enzimas de restricción. En la tabla 5 se muestran las concentraciones utilizadas para la doble digestión del gen de interés y del vector.

Tabla 5. Concentraciones utilizadas para la doble digestión del gen y plásmido

Reactivo	Gen	Plásmido
Buffer Tango 10x	2x	2x
ADN	1 µg	500 ng
XhoI	2.5 U	2.5 U
BamHI	2.5 U	2.5 U
H ₂ O cpb	25 µL	25 µL

Cada una de las mezclas de reacción se incubó a 37 °C durante 1 h y se inactivaron las enzimas a 85 °C durante 20 min. Posteriormente, para purificar cada una de las reacciones se utilizó el kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras fueron concentradas a 50 µg/mL en un concentrador de ADN (DNA plus).

Para la ligación del inserto dentro del vector se utilizó la enzima T4 DNA Ligasa (Fermentas). Para saber la cantidad de inserto que se necesitaban, se ocupó la siguiente fórmula con una relación molar 5:1, inserto:vector.

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

La concentración de vector fue de 50 ng y la cantidad de inserto, resultado de la sustitución en la fórmula, fue de 127 ng. En la tabla 6 se muestra las cantidades ocupadas para la reacción de ligación.

Tabla 6. Mezcla de reacción de ligación

Reactivo	Concentración final
Vector pET-19b(+)	50 ng
Inserto	127 ng
T4 DNA Ligasa	1 U
Buffer de la enzima	1x
10x	
Agua cbp	20 μ L

La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 h y posteriormente se incubó a 70 °C durante 10 min para inactivar a la enzima. Una vez obtenida la construcción pET19-99 se transformó en *E. coli* BL21.

Células competentes y transformación

Se tomaron 200 μ L de células de *E. coli* BL21 y se adicionaron a un tubo con 5 mL de medio Luria-Bertani (LB: Bacto triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH=7.0); se dejó crecer 12 h a 37 °C, 200 rpm. Posteriormente, se realizó una resiembra del 1 % del pre-inóculo a 50 mL de medio fresco y se incubó en las mismas condiciones anteriormente descritas, hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.1. Una vez alcanzada esa densidad óptica se centrifugaron los 50 mL de medio a 8,500 rpm, 10 min, 4 °C. El pellet se resuspendió en 15 mL de CaCl₂ 100 mM y se incubó en hielo durante 30 min. Después se centrifugó bajo las mismas condiciones, se resuspendió en 2 mL de CaCl₂ 50 mM, y se incubó en hielo por lo menos 2:30 h para obtener células competentes.

La transformación consistió en tomar 50 μ L de células competentes, mas 5 μ L de la mezcla de ligación, mezcla que se dejó incubar 30 min en hielo. Después se le aplicó un choque térmico, elevando la temperatura a 42 °C durante 2 min, e inmediatamente se incubó en hielo durante 5 min. La mezcla de transformación se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se le adicionó 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 y el pellet se resuspendió en 200 μ L de medio LB. Se plaqueó sobre cajas de agar LB con

ampicilina (100 µg/mL concentración final), se incubó durante toda la noche a 37 °C, 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.

De todas las colonias seleccionadas se realizó la extracción de plásmido con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas), siguiendo las indicaciones del 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. Para verificar si el gen se encontraba insertado dentro del vector, se realizó una PCR con los cebadores específicos, siguiendo las indicaciones anteriormente descritas. Aquellas clonas que amplificaron el fragmento del tamaño esperado fueron seleccionadas como positivas y se almacenaron a -70 °C con glicerol al 20 % (v/v); además se enviaron para su secuenciación a MacroGen Inc, (Corea) para verificar que no presentaran mutación alguna.

Expresión de la proteína recombinante

Una vez obtenidas clonas positivas de acuerdo a los resultados de amplificación y secuenciación, se procedió a la expresión de la proteína de interés.

Campos-Gómez (2013) reportó las mejores condiciones de inducción para este tipo de enzimas, que resultan muy tóxicas para la célula hospedera. De acuerdo a esos resultados, se decidió trabajar con las siguientes condiciones: 37 °C de incubación, 2 h de crecimiento, 0.1 mM de IPTG como inductor. Una vez definidos estos parámetros, se realizó un preinóculo partiendo de la construcción conservada a -70 °C, adicionando 200 µL a un tubo con 5 mL de medio LB más ampicilina, incubado a 37 °C, 200 rpm, durante 12 h. De este pre-inóculo se tomaron 250 µL que fueron adicionados a 100 mL de medio LB más antibiótico y se incubaron a 37 °C, 200 rpm hasta llegar a una D.O._{600nm} entre 0.5 y 0.8. Posteriormente se adicionó 0.1 mM de IPTG (Fermentas), y se dejó crecer durante 2 h en las condiciones descritas anteriormente (Campos-Gómez, 2013).

Identificación de la proteína recombinante por Western-blot

Para confirmar la producción de la enzima recombinante, identificarla y conocer el peso molecular aproximado, se realizó un ensayo de Western-blot utilizando un anticuerpo específico contra el tallo de histidinas. Se corrió un SDS-PAGE al 10 % y posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, PolyScreen® Perkin-Elmer) a 15 V durante 1 h en un equipo Trans Blot® SD Semi-dry Transfer cell (Bio-Rad), utilizando buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM y metanol al 10%). La membrana se bloqueó con leche descremada (Skim milk, Difco) al 3 % (p/v) en buffer TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5, Tween-20 0.05 %) y en agitación suave a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se lavó la membrana con 20 mL de buffer TBS-T dos veces durante 30 s y se le adicionó el anticuerpo anti-his acoplado a fosfatasa alcalina (Anti-His(C-term)-AP, Invitrogen) en una dilución 1:7,500 en el mismo buffer y se incubó durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados de la membrana, para finalmente adicionar 15 mL de la solución reveladora de NBT/BCIP (nitro azul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato, Perkin-Elmer), que se dejó actuar hasta la aparición de bandas moradas, que indican la presencia de las proteínas con recombinante.

Obtención de la proteína recombinante de 99-kDa

Siguiendo las condiciones óptimas de inducción, el medio de cultivo se centrifugó a 8,500 rpm durante 10 min a 4 °C para separar las células del sobrenadante. El extracto libre de células se filtró con una membrana de 0.22 µm (Millipore) y posteriormente se ultrafiltró con una membrana de tamaño de corte de 10 kDa. A esta muestra se le determinó la concentración de proteína y actividad de *N*-acetilglucoamidasas.

Actividad de PGH utilizando 4-Nitrofenil *N*-acetil- β -D-glucosamina como sustrato

La actividad de PGH fue determinada utilizando como sustrato al 4-nitrofenil *N*-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma-Aldrich), el cual, al ser hidrolizado por la enzima libera *p*-Nitrofenol y *N*-acetil- β -D-glucosaminida. El *p*-nitrofenol en medio básico forma el ion *p*-nitrofenolato, el cual es de color amarillo y puede ser medido espectrofotométricamente a 405 nm.

En una microplaca de 96 pozos se colocaron 10 μ L de una solución de 1 mg/mL de NP-GlcNAc, 10 μ L de la enzima en estudio y 80 μ L de un amortiguador de citrato de sodio 100 mM, pH 4.8. Como control positivo se utilizó β -*N*-acetilglucoamidasasa (*Canavalia ensiformis*, Sigma-Aldrich) en una concentración 10 μ g/mL y como control negativo, a la lisozima (10 μ g/mL). El blanco consistió en 10 μ l del sustrato y 90 μ L amortiguador. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de carbonato de sodio 140 mM para detener la reacción e incrementar el color. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas Epoch de BioTek. También se midió la absorbancia de una solución estándar de *p*-nitrofenol 5 mM para realizar los cálculos de actividad. Una unidad se define como: la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de 4-nitrofenil *N*-acetil- β -D-glucosaminida a *p*-nitrofenol y *N*-acetil- β -D-glucosaminida en 1 min a 37 °C.

Purificación parcial de la proteína recombinante

Cromatografía de afinidad

La proteína recombinante contiene un tallo de histidinas en el extremo N-terminal proporcionado por el vector, lo que facilita la purificación por cromatografía de afinidad. Debido a que el tallo se une de manera no covalente a iones metálicos quelantes como el Cu^{2+} y el Ni^{2+} , se utilizó una columna de 5 mL de sefarosa niquelada (His-tagged Protein Purification, GE Healthcare) y el proceso de purificación se llevo acabo conectando la columna a un equipo de separación FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) (Biologic LP, Bio-Rad) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Se lavó la columna con 5 volúmenes (25 mL) de agua destilada, se equilibró con 5 volúmenes de solución de unión (20 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, 10 mM

imidazol, pH 7.4) con flujo de 1.0 mL/min. Una vez con la columna equilibrada, se pasaron 20 mL del extracto citosólico con una concentración de 4.3 mg/mL, el cual contenía 20 mM de imidazol. Posteriormente se realizó un lavado de la columna para eliminar las proteínas contaminantes pasando una solución de unión al mismo flujo hasta un valor constante de absorbancia a 280 nm (Abs_{280nm}) y cercano a cero. A continuación se aplicó un gradiente de 20 a 500 mM de imidazol, en un volumen final de 100 mL. Se colectaron fracciones de 1 mL una vez que se observó un aumento en la Abs_{280nm} , y hasta que terminó el gradiente. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por medio de SDS-PAGE y Western-blot.

Cromatografía de exclusión molecular

La columna de exclusión molecular utilizada fue Superdex 200 (Pharmacia Biotech) (2.6 x 60 cm). Se pasaron 20 mg de la muestra a través de la columna, la cual se encontraba conectada al equipo Biologic LP (Bio-Rad) con un flujo 1 mL/min en un amortiguador que contenía 100 mM Tris-HCl, pH 8.0. Se colectaron fracciones de 5 mL, las cuales fueron monitoreadas para detectar la cantidad de proteína a una absorbancia de 280 nm (Abs_{280nm}). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por medio de SDS-PAGE y zimogramas.

Zimogramas utilizando 4-Nitrofenil *N*-acetil- β -D-glucosamina como sustrato

Siguiendo el protocolo descrito para la elaboración de geles de poliacrilamida copolimerizada en condiciones desnaturalizantes y reductoras, se adicionó 3 mg del sustrato a los reactivos necesarios para realizar el gel. La electroforesis se corrió en las condiciones anteriormente descritas y posteriormente el gel se lavó dos veces con agua desionizada durante 10 min, se incubó a 37 °C con un amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 durante 1 h en agitación suave. La presencia de una banda de color amarillo indica la degradación del sustrato, la que conlleva a la liberación de *p*-nitrofenolato.

Caracterización bioquímica de la proteína recombinante de 99-kDa

Efecto del pH sobre la actividad de PGH

Para obtener el pH óptimo de actividad se utilizó una mezcla de amortiguadores: ácido cítrico 20 mM (intervalo de capacidad amortiguamiento: 2.1-4.1), ácido acético 20 mM (3.8-5.8), MES 20 mM (5.5-6.7), HEPES 20 mM (6.8-8.2), CHES 20 mM (8.6-10), ajustado a cada pH, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. La actividad se determinó con 10 μ L del sustrato, 85 μ L del cada uno de los amortiguadores. La reacción se inició con la adición de 5 μ L de la enzima para evitar una preincubación.

Estabilidad al pH

Para los estudios de estabilidad, 10 μ L de la enzima se incubaron con 85 μ L de cada uno de los amortiguadores durante 60 min, posteriormente se tomaron 10 μ L de esta mezcla de reacción y se adicionaron a 80 μ L de la mezcla de amortiguadores a pH 7, iniciando la reacción con la adición del sustrato. Como control se utilizó a la enzima sin la adición de la mezcla de amortiguadores.

Temperatura óptima de actividad

Se tomaron 5 μ L de la muestra con actividad lítica y se adicionaron 10 μ L del sustrato y 85 μ L de la mezcla de amortiguadores pH 7, la mezcla de reacción se incubó por 10 min a diferentes temperaturas (37, 45, 50, 60, 70, 80 y 90 °C). Posteriormente se paró la reacción y se leyó a 405 nm en un lector de placas, como anteriormente se describió.

Estabilidad térmica

Se tomaron 20 μ L de la fracción con la proteína recombinante y se colocaron en tubos de plástico de 0.6 mL, los cuales se sometieron a diferentes temperaturas: 37, 45, 50, 60, 70, 80 y 90 °C, y se incubaron durante 60 min. Al final de la incubación se tomaron 5 μ L de la muestra y se determinó actividad de *N*-acetilglucoamidasas. Como control se utilizó a la enzima sin ningún tratamiento térmico.

Efecto de iones metálicos, inhibidores y agentes quelantes sobre la actividad

Para determinar el efecto que tiene cada ion evaluado, (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y Na^{+}) sobre la actividad de la proteína recombinante se le adicionó EDTA en una concentración final de 100 mM para secuestrar los iones metálicos que pudieran estar presentes, ya que el EDTA es un agente quelante de iones Zn^{2+} (Morner y Braun, 1984). A 10 μ L de la enzima se le adicionó 100 mM del agente quelante y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 60 min. A partir de esta muestra, se tomaron alícuotas y se adicionó cada ion en una concentración final de 1 y 10 mM, posteriormente se evaluó la actividad de *N*-acetilglucoamidasas. Como control se evaluó la actividad de la muestra tratada con EDTA sin la adición de ningún ion.

Para determinar el efecto de agentes quelantes se utilizó EDTA y EGTA (ácido etilnglicol tetra acético, agente quelante de iones Ca^{2+}), y de un inhibidor serin-proteinasas como el PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) (Genckal y Tari, 2006), se utilizaron dos concentraciones 1 y 10 mM.

Se tomaron 10 μ L de la enzima y se le adicionó cada uno de los quelantes e inhibidor en las concentraciones mencionadas, se incubó por una hora a temperatura ambiente durante 60 min, posteriormente se determinó la actividad de *N*-acetilglucoamidasas. Como control se utilizó a la enzima sin ningún quelante e inhibidor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección y localización de la actividad lítica en *P. acidilactici* ATCC 8042

Curva de crecimiento

Se obtuvo la curva de crecimiento en medio de cultivo MRS. Tras un seguimiento por 24 h, la curva fue de tipo sigmoïdal y se produjo un decaimiento del pH que alrededor de 0.6 unidades (Fig. 4).

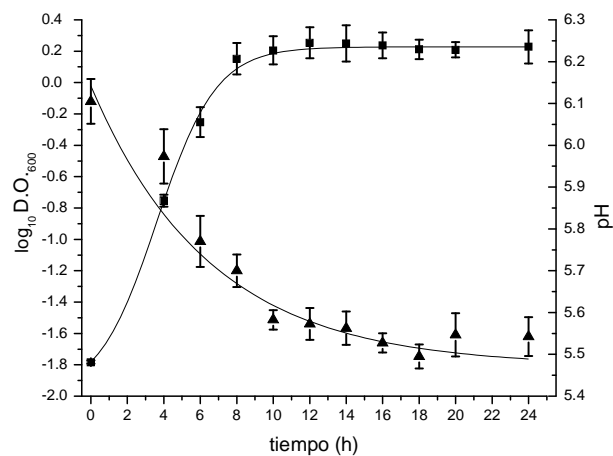


Figura 4. Curva de crecimiento de *P. acidilactici*. Se determinó la $D.O_{600nm}$ (■) y el pH (▲) en función del tiempo. Las barras representan la desviación estándar de 3 ensayos independientes.

Localización de la enzima con actividad lítica en *P. acidilactici*

Se llevaron a cabo dos procedimientos de recuperación de proteínas celulares; el empleo de un amortiguador de extracción (Mora *et al.*, 2003) y la ultrasonicación (Cibik y Chapot-Chartier, 2004). En cada uno de ellos se esperaba recuperar una fracción diferente de proteínas: en la primera, las proteínas adheridas parcialmente a membrana son extraídas fácilmente con un amortiguador. En la segunda, las proteínas intracelulares o citosólicas son obtenidas del proceso de ruptura, y las proteínas adheridas con mayor fuerza a la membrana son recuperadas de los restos celulares. Una vez obtenida cada fracción de proteínas, se evaluó la actividad lítica sobre *S.*

aureus como microorganismo de prueba por el método de difusión en agar, tal como se describió en materiales y métodos.

La fracción de proteínas adheridas parcialmente a membrana presentó la mayor actividad lítica a las 8 h de fermentación (Fig. 5-a). Probablemente la actividad observada está relacionada en el recambio de la pared, división, duplicación y crecimiento celular, y el leve repunte de la actividad en la fase final de crecimiento (24 h) se deba a la autólisis del microorganismo (Lortal y Chapot-Chartier, 2005) Las proteínas adheridas a restos celulares presentaron actividad durante toda la cinética de crecimiento, aunque la actividad en todos los casos fue menor a la obtenida con las proteínas adheridas a membrana (Fig. 5-b). Es posible que esto se deba a la sonicación, método mecánico del que se ha reportado que genera calor y forma burbujas ocasionando la desestabilización de proteínas con la consecuente disminución de la actividad (Zayas, 1997). La fracción citosólica no presentó actividad antibacteriana, evaluada por difusión en agar en ninguno de los tiempos de la curva de crecimiento (Fig. 5-c). Cabe señalar que en zimogramas, geles SDS en los que se evalúa la actividad lítica sobre células de *M. lysodeikticus*, las fracciones mostradas en 1-a Y 1-b presentaron dos bandas de actividad en 110 y 99 kDa en todos los puntos de la curva de crecimiento, mientras que con el material de la fracción 1-c, no hubo la presencia de bandas de actividad lítica (datos no mostrados).

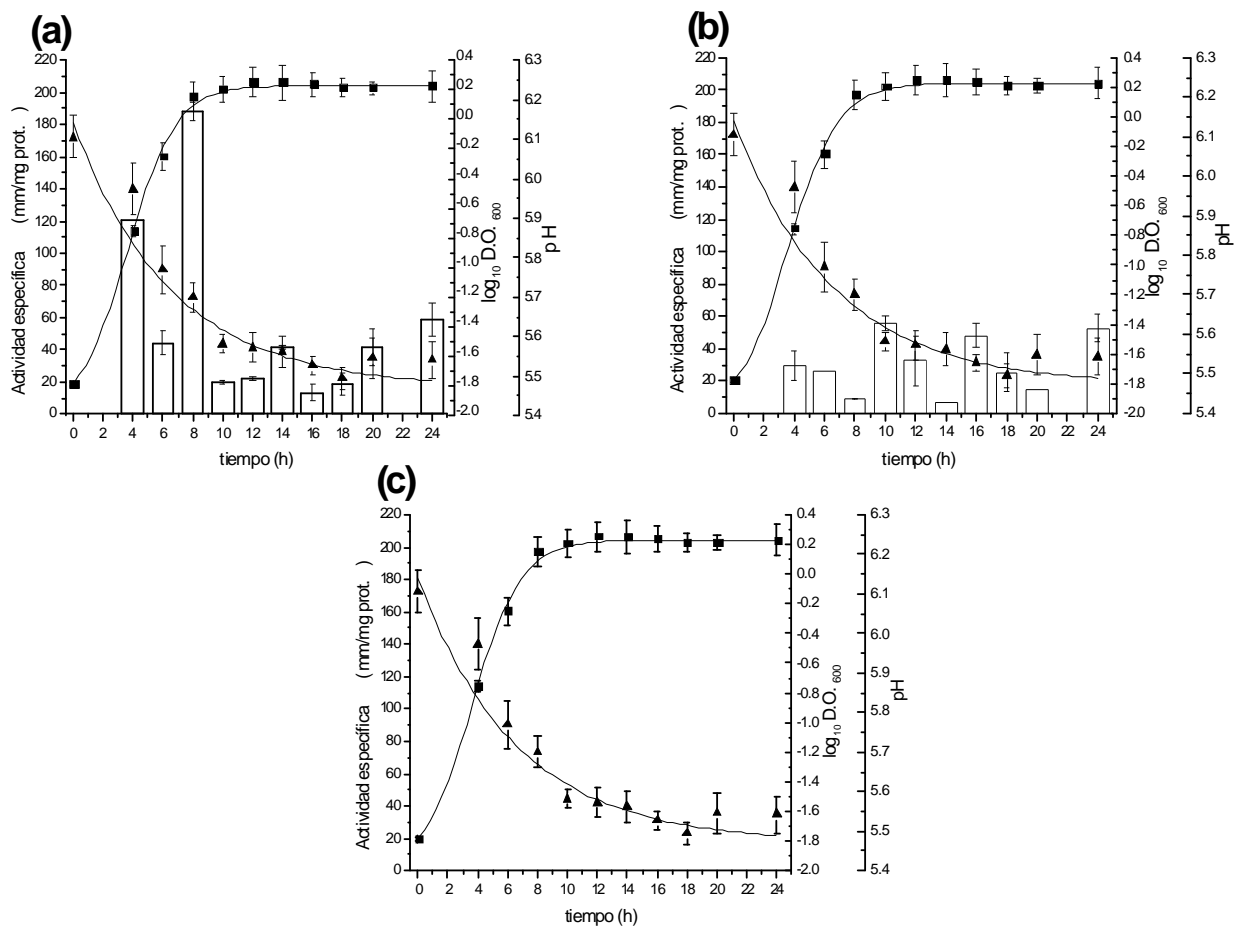


Figura 5. Localización de la enzima con actividad lítica en *P. acidilactici*. 1-a) Proteínas adheridas parcialmente a membrana. 1-b) proteínas adheridas a fragmentos celulares. 1-c) Fracción citosólica. Las barras vacías (□) indican la actividad en mm de inhibición/mg prot. D.O._{600nm}, cuadros (■); pH, triángulos (▲). Las barras de error son la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Purificación parcial de la PGH

Una vez localizada la fracción en la que se presenta la mayor actividad, se diseñó un proceso de purificación.

Las solubilización de proteínas con detergente, la diálisis con una membrana de tamaño de corte de 50 kDa y la concentración por ultrafiltración con una membrana de 100 kDa, resultó una buena estrategia para la purificación parcial de la actividad lítica, cuyo resultado se muestra en la figura 6.

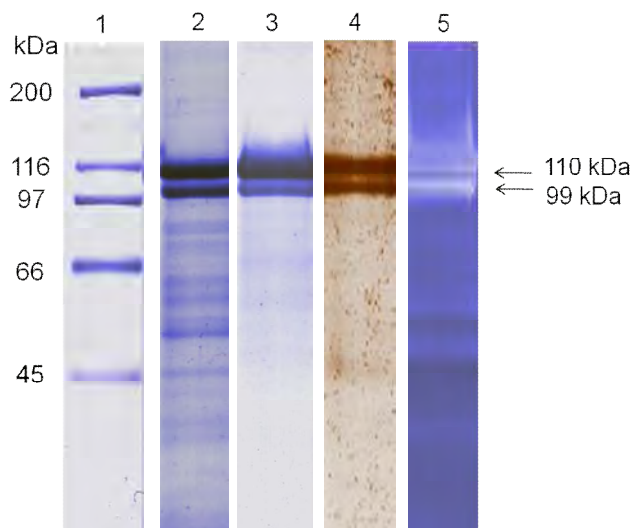


Figura 6. Purificación parcial. Carril 1 marcador de peso molecular alto; carril 2, proteínas extraídas de membrana; carril 3, SDS-PAGE al 10 %, teñido con azul de coomassie; carril 4, tinción de plata; carril 5, zimograma con *M. lysodeikticus* teñido con azul de metileno. Carril 2, 3 y 5, 30 μg de proteína total; carril 4, 10 μg de proteína total.

Las bandas de 110- y 99-kDa presentes en la muestra de proteínas adheridas a membrana (Fig. 6, carril 2) representan el 34.9 y 21.5 % respectivamente, de la proteína total, además se observan otras bandas en menor proporción que no son de interés. El porcentaje de pureza después de la purificación de esta fracción es mayor, la banda de 110-kDa representa el 63.1 % y la banda de 99-kDa representa el 31.4 %, el valor restante corresponde a proteínas que no pudieron ser eliminadas durante el proceso de purificación (aprox. 5.5 %) (carriles 3 y 4, Fig. 6). En el gel de actividad (carril 5, Fig. 6) se presentó el 50.2 % de prevalencia para la banda de 110-kDa y el 21.1 % para la banda de 99-kDa, el 28 % restante corresponde a otras bandas con actividad lítica, que pudieran ser péptidos generados por modificaciones post-traduccionales o degradación proteolítica, que conservan la actividad lítica. Este comportamiento se ha observado en *Lactococcus lactis* (Buist *et al.*, 1995) y en diferentes especies de *Pediococcus* (Mora *et al.*, 2003). Por lo tanto, se puede suponer que las bandas de 110- y 99-kDa son las responsables de la actividad lítica observada en este microorganismo.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Las bandas parcialmente puras fueron eluidas del gel, tal como se describe en materiales y métodos y procesadas en el laboratorio del Dr. Guillermo Mendoza (Facultad de Medicina, UNAM) y en la Unidad de Proteómica del IBT-UNAM.

Los péptidos generados de la digestión con tripsina de la banda de 110- y 99-kDa, tuvieron un score global de 2042 y 1120 respectivamente. Los péptidos de la banda de 110-kDa representan el 47 % de cobertura y tuvieron 100 % de identidad con una proteína putativa de peso molecular teórico de 110-kDa que se encuentra en *P. acidilactici* 7_4 (acceso: gi|270289973, Protein BLAST) con función desconocida hasta el momento. Los péptidos de la banda de 99-kDa representan el 45 % de cobertura de la secuencia del mismo microorganismo y presentaron 100 % de identidad con una proteína reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7_4 con actividad de *N*-acetilmuramidasa (acceso: gi|270290692, Protein BLAST), además presenta regiones conservadas de unión a carbohidratos, unión a Zn^{2+} y un sitio catalítico con actividad de *N*-acetilglucoamidasas.

Análisis de las secuencias

110-kDa. La proteína putativa que se reporta en *P. acidilactici* 7_4, hasta el momento no tiene función conocida en la célula, sin embargo se conoce que tiene una región conservada de transportador unido a membrana de tipo ABC (ATP-binding cassette) (residuos 905-1110). Dichos transportadores son los más estudiados en bacterias y tienen diferentes funciones en la célula, dentro de los que destaca la captación de nutrientes al interior de la célula, así como la expulsión de diferentes sustancias tóxicas y metabolitos generados durante el crecimiento (Kránitz *et al.*, 2002; Hollenstein *et al.*, 2007) (Fig. 7).

```

1 MVRKEWKFIR NNLKILISVL AIIFIPFLYS IFFLKSVDWF YGDTKNLPVA VVNLDPVKY QGQRLAVGDE MVDNLKHHQ
81 LGWHEVSAKK AKEGMDKDKY YTVVTIPKDF SANAATVTDK NPKKMQLKYS TNASLNYIGK VISDVGTEKL NSEVREQVTK
161 SYATAMFDQV KTAGKGFKA SDGAKKLDG AVQLNDGTTK YTAGVSQLHD GIATMAVSVK PLQAGVAQLA DGSSQLTNGL
241 DQLNGKTGAL SSGVSQLANG SGQVTTGAVA LSKGLNELQQ KSGALVTGVS QLNNGALQLK VKVPQYVNGV YQLNDGIQEL
321 NAKTGQLVGG IKQLSSGAGA LSAGVKQYTD GVSAGAGQLQ GGVAKLANDT KMPSSINAL HNGIADIAXS SKQLADANGK
401 ISTGLGQVAD QVSANDISKQ AAALKQOMAS IQTQLVALNK ATAGQTNGGN AAQSINNQLS EIKSEVGSLS NSSKTTTSTS
481 GGVSQATINS KIDGAGLSAE DAAKAKSALA GVANGSQNK TSQTVDTNKI ASIQKKITDV QGQVTKLNDL ANKQAEINKQ
561 VTSLTASFQK LAAGANELTG NSDDMKQLAA TLKLAAGSQ EVTTNLQALS SGSNTVAGKV GEFAGSASEL TDGVAQLDSG
641 AKSLASQTNK NSKDVKKLVS GSQELSSSLA MLDKQTPTLQ SKIGQLAAGS NQISAGTGAL AGGINQLSNG ISAASSQMPT
721 LVSGVSLLAN GGNQLAAGSS QVTGGLNTLN GQVPALVSGV AQLDNGGHQL NTGIQTLNSS TGTILINGVQ LNTGAAELDA
801 NSGALLDATK QISDNGGELS SKLADGAKQV NSVPLTDKTA NMFAPTKLK HTNYSYVENV GHALAPYVLS LALYVGAIVF
881 NFAYPIRKVS ERGGTPTQWF LSKVSVGTVV ALGMALVETT IMMIAGIHVD HVGQFYMTAI MISLASYIV MFLSMAFDNP
961 GRFVAMILLM LQLGGSGGTF EMEVTNHFYN VIHPLPLTY SILSFRQAIT SGLGDGTFEQ AMGALLLFAV IALALLWFSM
1041 NQLQKHLEN KSQLDDNQL QEVER

```

Figura 7. Los péptidos identificados por LC-MS/MS de la secuencia de 110-kDa, se encuentran subrayados.

99-kDa. En el genoma de *P. acidilactici* 7_4 se reporta una proteína de peso molecular de 99-kDa, con actividad de *N*-acetilmuramidasa en los residuos de aminoácidos del 245 al 373. Se describe como una proteína de reconocimiento al peptidoglucano (PGRPs) y que en algunos casos hidrolizan la pared bacteriana (Guan *et al.*, 2005). Además se encuentra una región conservada de unión a carbohidratos en los residuos 249, 250, 271, 275, 289, 296, 297, 303, 356, 360, 367, 369, dentro de la cual se reporta un sitio con actividad de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa (248, 275, 356, 367, 369) con sitio de unión a Zn²⁺ en la posición 248, 356 y 369 y otro sitio catalítico con actividad de *N*-acetilglucoamidasa (del residuo 777 al 915) (Fig. 8). Se ha reportado que este tipo de enzimas pueden catalizar hasta dos reacciones diferentes (Ohbuchi *et al.*, 2001). La secuencia de aminoácidos de la proteína de 110- y 99-kDa fueron sometidas a un alineamiento múltiple usando el programa ClustalW2 (EMBL-European Bioinformatics Institute) con la finalidad de conocer si tenían regiones o sitios idénticos entre sí, no se encontró relación alguna entre las dos secuencias con lo que podemos proponer de que se trata de dos enzimas con actividad lítica y peso molecular diferentes, que hasta el momento no han sido reportadas para este microorganismo.

```

1 MFKSGKKWAF ASIATASLGL VALNTNAEKA HADSDAQANT NSASQLDQQT KTAPVNEKQV TLAKPATVKA SAAAVTAQSA
81 APAPSAAQSA AKVNADSTAK ADQHSAAAKV GTKATTSSAV KPAKEAASAN AVKAAPASSA AKKVSTSVAS SAAPSSAASK
161 TVTSAAVKDS AAKEAVSSAA NVKSSSAAAK TSVNSSAVSE AAKKDAKAEK TAEKKTDNSS KDYTTIDNTYR LADNEGSDQK
241 TNMKIIVAHA VGQYSSARDV AIYEKREWDS SETYVQYIVG DGGRVYAVGE EGYVAWGAGK WANENAPVQV ELAQTYSDSQ
321 FKKDYQTYVN LLRDSARKWN IPTTLDSEY TGIKSHVWVT EHVWGNHVDP YGYLGTHGIT KEQFAHDLAY GFDNDAANDN
401 QNNNQNDNHQ NDNQNNQNNN HQNDSENNHG NQNNQSYHVG DKVTIKNSAS HWATGQSIYN GVKGHTYKII QTNGHKLLLD
481 QVISWINDGD VYKAGSNSGS SNMHNHNTT NNADIKVGTV VTINNNASHW ATGQSIYSGV KGKSYKVIQT NGNRLLLDKV
561 ISWINKGDVH VPGSNSNNNN SGNQNHNGN NNNNGNTES IHVGSKVTIN NNAKRWATGQ NIYSGVKGKT YTVIQMNGSR
641 LLLDKVISWI NKGDVHLPGS NGSQNNNNN NNHANNDGT IRVGTNVTIK PSAKRWATGQ NIYYGVKGT YKVIQMNGNR
721 LLLDKVISWI NKGDVVYVPGS SMNNSNSNM NNNNGSNYH FTNQNWTAQ TNFVNSIASD VMNVCQNNHL YASVAMAQAV
801 VESAYGASTL AQEAHNLEGI KADSTWHGAT YTKNTQEVIN GRVVTISAAF RKYDSFKDSI ADYAKKLESR PQYANAFSNH
881 AHNYVESVKA IKAGGYATAP TYVSSIVNCI NNYGFYKLDG LNSAISL

```

Figura 8. Los péptidos identificados por LC-MS/MS de la secuencia de 99-kDa, se encuentran subrayados.

Espectro antibacteriano

La proteína de 99-kDa, reportada en las bases de datos con actividad de *N*-acetilmuramidasa putativa, explicaría la acción antibacteriana detectada previamente contra *M. lysodeikticus* y *S. aureus*, aunque no se tenga del todo claro por qué la proteína de 110-kDa podría ejercer una actividad lítica.

En la actualidad las PGH son utilizadas para el control de patógenos en alimentos, tal es el caso de la lisozima (Callewaert *et al.*, 2011) y otras lisinas provenientes de fagos (Fenton *et al.*, 2010; García *et al.*, 2010). Por tanto, resulta importante conocer cuál es el espectro de acción de las enzimas en estudio.

En la tabla 7 se muestran los resultados de la actividad antibacteriana sobre los diferentes microorganismos utilizados. Todas las bacterias Gram-positivas, incluyendo los microorganismos patógenos, fueron inhibidas por la PGH parcialmente pura, destacando la actividad contra *L. monocytogenes* y *Bacillus cereus*. La primera cepa es relevante ya que es un microorganismo oportunista que se puede replicar en los macrófagos y moverse en el interior de la célula evitando así la eliminación por anticuerpos. *B. cereus* es el patógeno más importante dentro de su grupo ya que existe

una alta frecuencia de enfermedades gastroentéricas por alimentos. De las bacterias Gram-negativas evaluadas, *S. typhimorium* y *E. coli* presentaron inhibición, sin embargo *Pseudomonas aeruginosa* no presentó inhibición, probablemente se debe a que este género bacteriano sintetiza una cápsula de polisacáridos (conocida como exopolisacárido mucoide, cubierta de alginato o glucocálix), la cual protege al microorganismo de la fagocitosis y de la actividad de algunos antibióticos como los aminoglucósidos (Murray *et al.*, 2006).

Tabla 7. Inhibición de cepas bacterianas por la PGH parcialmente pura

Cepas	mm/mg prot.
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 typhimurium</i> ATCC 14028	200.6
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	76.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.0

Efecto de la actividad PGH parcialmente pura durante la curva de crecimiento de microorganismos modelo

El método de difusión en agar y las diferencias en tamaños de los halos de inhibición permiten tener una idea de la susceptibilidad de los microorganismos a esta enzima, pero existen diversos factores que pueden afectar el resultado de esta prueba. Por esta razón se decidió intentar tener más información cuantitativa al contar las células supervivientes a la acción de las enzimas líticas. Se emplearon tres microorganismos y se determinó el efecto de la adición de la preparación enzimática una vez iniciado el crecimiento en medios líquidos óptimos de crecimiento.

El conteo de UFC/mL disminuyó de forma considerable al adicionar la preparación de PGH. El mayor efecto inhibitorio se observó sobre *S. aureus* (Fig. 9-a), esta cepa fue inhibida en dos órdenes de magnitud en tan solo 0.5 h de crecimiento y en cuatro órdenes de magnitud a las 7 h de crecimiento. Se ha reportado que este microorganismo es el principal responsable de enfermedades intrahospitalarias producidas por catéteres (Wu *et al.*, 2003), así como de contaminación en leche bronca y de mastitis, enfermedad común en ganado vacuno (Rainard, 2005); hasta el momento solo la lisostafina es utilizada para combatir este microorganismo patógeno ya que es altamente afín al enlace pentaglicina del peptidoglucano de la pared celular (Rainard, 2005). Por lo cual resulta interesante la actividad de la PGH sobre *S. aureus* observada en corto tiempo después de la adición de la enzima extraída de *P. acidilactici*. Los otros dos microorganismos utilizados también fueron inhibidos por la PGH, sin embargo el efecto se observó en tiempos de crecimiento más prolongados. Para *E. coli* la UFC/mL disminuyeron en dos órdenes de magnitud después de 24 h de crecimiento (Fig. 9-b) y para la cepa productora (*P. acidilactici* ATCC 8042) las UFC/mL disminuyeron hasta en cuatro órdenes de magnitud a las 8 h de crecimiento (Fig. 9-c).

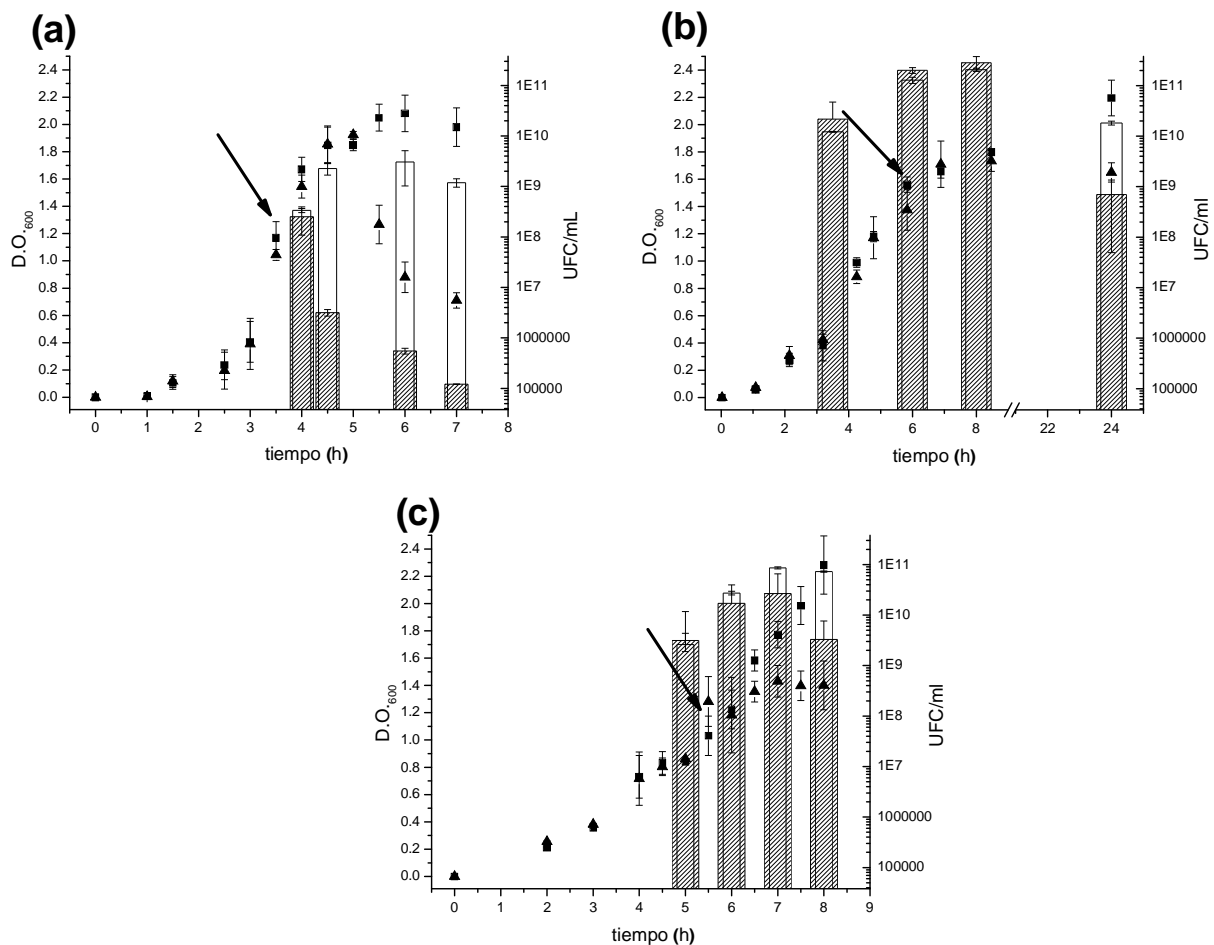


Figura 9. Cinética de crecimiento de: *S. aureus*, 3-a); *E. coli*, 3-b); *P. acidilactici* ATCC 8042, 3-c). Control D.O._{600nm}, cuadros vacíos (□); actividad inhibitoria D.O._{600nm} triángulos rellenos (▲); control UFC/mL, barras vacías (□); actividad inhibitoria UFC/mL, barras rellenas (■). La flecha indica el tiempo en el que se adicionó la PGH parcialmente purificada (500 µg/mL).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

En este tipo de enzimas es importante conocer la concentración mínima a la cual es capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo indicador, por lo que se realizaron pruebas por difusión en agar contra *S. aureus*. Se probaron varias concentraciones de la preparación enriquecida en PGH en un intervalo de 4 a 400 µg/mL. La concentración mínima a la cual se observó un efecto inhibitorio de la PGH sobre *S. aureus* fue de 10 µg/mL de proteína (Tabla 8), valores por debajo no tuvieron efecto alguno sobre dicho microorganismo. Esta CMI es mayor que la reportada para la

lisostafina recombinante, que es capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* en concentraciones por debajo de 2 $\mu\text{g/mL}$ y hasta 0.03 $\mu\text{g/mL}$ (Xin-Yi *et al.*, 2007).

Tabla 8. CMI de la preparación parcialmente pura de PGH sobre *S. aureus*

Proteína ($\mu\text{g/mL}$)	mm de inhibición
4	0.0
10	3.8
20	5.4
30	6.5
40	8.3
100	9
200	9.5
400	10.5

Con los resultados anteriormente descritos, se obtuvo una publicación. Sin embargo todavía quedan diversas preguntas para conocer el efecto de las dos PGH reportadas en *P. acidilactici*.

Clonación y expresión de la proteína de 99-kDa con actividad lítica de *P. acidilactici*

Para llevar a cabo la caracterización bioquímica de cada una de las proteínas de forma independiente, se intentó su separación por métodos físicos, lo cual resultó muy complicado debido a que las dos enzimas tienen un peso molecular muy parecido y un punto isoeléctrico teórico muy cercano (110-kDa = 9.3; 99-kDa = 9.1). Para alcanzar los objetivos planteados en este proyecto, se optó por la clonación y expresión de la enzima de 99-kDa, por ser la que contiene dominios de actividad reportada como PGH.

Extracción de ADN

Se extrajo ADN por medio de un kit comercial (Genetic Fast ID) a células de *P. acidilactici* cosechadas en fase logarítmica de crecimiento. En la figura 10 se observa una banda intensa en la parte superior, con lo que se confirma la integridad del ADN extraído, el cual tuvo una concentración de 238 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

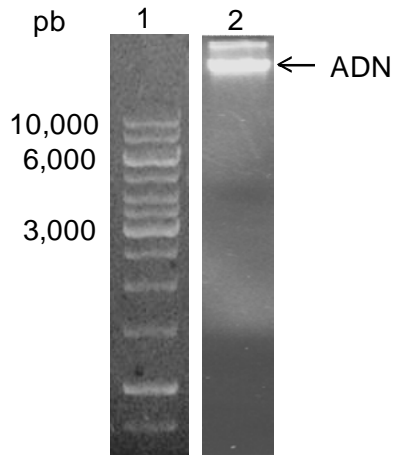


Figura 10. Extracción de ADN de *P. acidilactici*. Carril 1, marcador 1 kb plus (Fermentas); carril 2, ADN extraído de *P. acidilactici*. Gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Con el ADN y los cebadores sintetizados, se llevó a cabo la reacción de PCR. La figura 11 muestra el amplicón obtenido, el cual coincide con el peso esperado de $\approx 2,800$ pb.

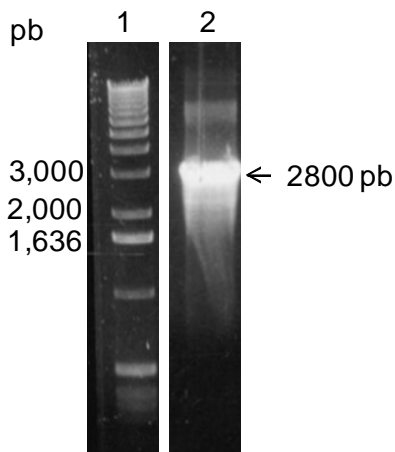


Figura 11. Amplicón obtenido de la reacción de PCR. Carril 1, marcador 1 kb (Fermentas); carril 2, amplicón del gen *paci99*. Gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio.

Obtención de amplicones internos del gen *paci99* para conocer la secuencia completa

Cada uno de los amplicones obtenidos se secuenció en los laboratorios de MacroGen Inc, Corea (Fig. 12), con la finalidad de conocer la secuencia completa del gen *paci99*, que se obtuvo tanto en la forma directa como reversa. Se realizó un alineamiento múltiple contra la secuencia del genoma de *P. acidilactici* 7_4, utilizando el software Multaline (Corpet, 1988). Los resultados mostraron alta identidad con la secuencia presente en el genoma reportada en la base de datos.

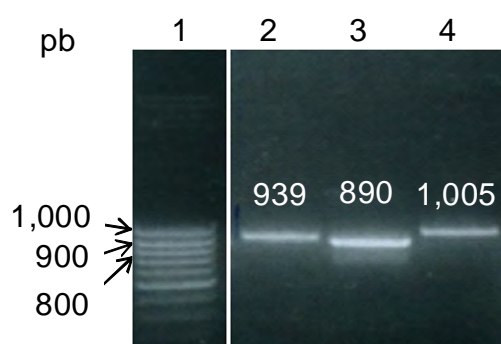


Figura 12. Amplicones internos del gen *paci99*. Carril 1, marcador 100 pb (Fermentas); carril 2, amplicón obtenido utilizando los cebadores FXhol y R199; carril 3, amplicón obtenido utilizando los cebadores F299 y R299; carril 4, amplicón obtenido utilizando los cebadores F399 y RBamHI. Gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio.

Análisis de secuencia en aminoácidos

Se realizó la traducción de nucleótidos a aminoácidos utilizando el software Translate Tool-Expasy Proteomics Server (Swiss Institute of Bioinformatics). Con la secuencia en aminoácidos se realizó el alineamiento múltiple con la secuencia del genoma de *P. acidilactici* 7_4, con la finalidad de conocer qué residuos de aminoácidos pudieron haber cambiado. En la tabla 9 se observan cinco residuos modificados, de los cuales cuatro (posición 84, 90, 144 y 208) presentaron las mismas características físico-químicas que los originales, y el único residuo que cambia de características está en la posición 203, de un aminoácido no polar con carga por un aminoácido polar sin carga (Fig. 13). Es probable que no influyan en la catálisis de la enzima, debido a que, la secuencia en aminoácidos de la proteína de 99-kDa presenta un péptido señal del

residuo 1 al 8 (Fig. 13 en rojo), un dominio de actividad de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa (del residuo 243 al 373) con una región conservada de unión a carbohidratos en los residuos 249, 250, 271, 275, 289, 296, 297, 303, 356, 360, 367 y 369 (Fig. 13 en gris, residuos en rojo), en los residuos 248, 275, 356, 367 y 369 (Fig. 13 en gris, residuos en azul), se encuentra el sitio catalítico de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa y la unión a Zn²⁺ se encuentra en la posición 248, 356 y 369 (Fig. 13 en gris, residuos en verde); por ultimo el sitio catalítico con actividad de *N*-acetilglucoamidasa se encuentra de los residuos 777 al 915 (Fig. 13 en azul). En las regiones anteriormente descritas, ninguno de los aminoácidos que cambiaron en la proteína clonada está involucrado en la unión al sustrato o en el sitio catalítico, por lo que probablemente la actividad de PGH no se ve afectada.

Tabla 9. Residuos de aminoácidos que cambiaron de la proteína clonada en comparación con la proteína reportada en la base de datos.

Secuencia de la proteína de 99-kDa del genoma <i>P. acidilactici</i> 7_4		Secuencia de la proteína clonada de <i>P.</i> <i>acidilactici</i> ATCC 8042		
Posición	Aminoácido	Tipo	Aminoácido	Tipo
84	P/prolina	No polar, sin carga	S/serina	No polar, sin carga
90	A/alanina	No polar, sin carga	V/valina	No polar, sin carga
144	V/valina	No polar, sin carga	A/alanina	No polar, sin carga
203	K/lisina	No polar, con carga	Q/glutamina	Polar, sin carga
208	A/alanina	No polar, sin carga	V/valina	No polar, sin carga

```

1  AF ASIATASLGL VALNTNAEKA HADSDAQANT NSASQLDQQT KTAPVNEKQV
61  TLAKPATVKA SSAAVTAQSA APPSAAQSA AKVNADSTAK ADQHSAAAKV GTKATTSSAV
121 KPAKEAASAN AVKAAPASSA AKKVSTSVAS SAAPSSAASK TVTSAAVKDS AAKEAVSSAA
181 NVKSSSAAAK TSVNSSAVSE AAKKDAKAEK TAEKKTDNSS KDYTIDNTYR LADNEGSDQK
241 TN [REDACTED]
301 [REDACTED]
361 [REDACTED] LGTHGIT KEQFAHDLAY GFDNDAANDN QNNNQNDNH QNDNQNNQNNN
421 HQNDSSNNHG NQNNQSYHVG DKVTIKNSAS HWATGQSIYN GVKGHTYKII QTNGHKLLLD
481 QVISWINDGD VYKAGSNSGS SNNHNNNHHT NNADIKVGTV VTINNNASHW ATGQSIYSGV
541 KGKSYKVIQT NGNRLLLDKV ISWINKGDVH VPGSNSNNNN SGNQNHNNGN NHNNNGNTES
601 IHVGSKVTIN NNAKRWATGQ NIYSGVKGKT YTVIQMNGSR LLLDKVISWI NKGDVHLPGS
661 NGSQNNNNNN NNHANNDGT IRVGTNVTIK PSAKRWATGQ NIYYGVKGKT YKVIQMNGNR
721 LLLDKVISWI NKGDVYVPGS SNNNNSNSNN NHNNNGSNYH FTNQNWTAQ TNFVNSI [REDACTED]
781 [REDACTED]
841 [REDACTED]
901 [REDACTED] YKLDG LNSAISL

```

Figura 13. Secuencia en aminoácidos de la proteína de 99-kDa. En negritas y subrayado, se muestran los aminoácidos que cambiaron de la secuencia clonada, en comparación con la secuencia de la base de datos. En amarillo se marca el péptido señal. En rojo se marca el sitio conservado de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa, los residuos de aminoácidos marcados en rojo corresponden al sitio de unión a carbohidrato, los residuos marcados en azul corresponden al sitio catalítico de actividad y los residuos marcados en verde al sitio de unión a Zn²⁺. En azul se marca el sitio catalítico de *N*-acetilglucoamidasa.

Digestión, ligación y verificación de la inserción del gen *paci99* en pET-19b(+)

El gen *paci99* amplificado y el vector purificado se digirieron con las dos enzimas de restricción (XhoI y BamHI, Fermentas) (Fig. 14, carril 2 y 3, respectivamente), posteriormente fueron purificados y ligados. La mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* BL21, las colonias que crecieron en las cajas fueron inoculadas en medio líquido para extraer la construcción pET19-99 (Fig. 14, carril 4), además se realizó la reacción de PCR con los cebadores específicos para comprobar que el gen de interés había sido insertado en el vector de expresión (Fig. 14, carril 5).

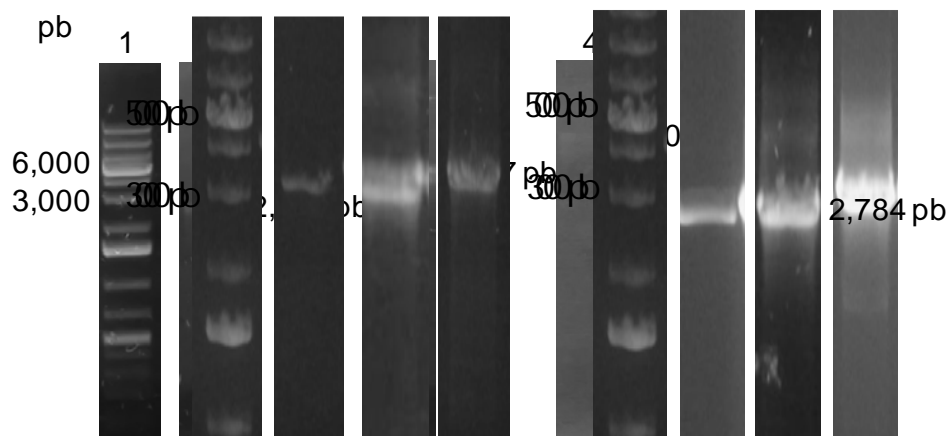


Figura 14. Digestión, ligación y verificación de la inserción del gen en el vector de expresión. Carril 1, marcador 1 kb (Fermentas); carril 2, gen *paci99* digerido; carril 3, pET-19b(+) digerido; carril 4, construcción pET19-99; carril 5, amplificación del gen *paci99* a partir de la construcción pET19-99. Gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio.

Expresión y obtención de la proteína recombinante de 99-kDa

Siguiendo las condiciones reportadas para la obtención de una proteína recombinante con actividad lítica (Campos-Gómez 2013), una de las clonas positiva fue cultivada en caldo LB con 0.1 mM de IPTG como inductor. Después de las 2 h de la adición del inductor, se separaron las células del sobrenadante, el cual fue concentrado por ultrafiltración, y cargado en un SDS-PAGE para conocer el perfil de proteínas y zimograma para detectar actividad lítica. En la figura 15 carril 2, se observa una banda alrededor de 100 kDa. Esta presentó actividad de PGH contra células de *M. lysodeikticus* (Fig. 15, carril 3). Con esta fracción se realizó un Western-blot en condiciones desnaturizantes para detectar la presencia del tallo de histidinas (Fig. 15, carril 4), prueba que resultó positiva; sin embargo, la banda es muy tenue y esto se pudo deber a que parte de la proteína que se está expresando presenta una hidrólisis parcial en el N-terminal, donde se encuentra el tallo de histidinas. Algunos autores reportan que en bacterias el amino terminal puede ser removido por una metionil aminopeptidasa y esta hidrólisis va a depender del penúltimo aminoácido que se encuentre en la cadena; así, si en esta posición se encuentran los residuos: arginina, lisina, fenilalanina, leucina, triptofano o tirosina, esta hidrólisis se llevará a cabo desestabilizando a la proteína de interés (Tobias *et al.*, 1991). En el caso de la proteína

de 99-kDa, en la secuencia en aminoácidos en el penúltimo residuo se encuentra una fenilalanina, con lo que probablemente la proteína esté sufriendo un procesamiento muy parecido al reportado por Tobias *et al.*, (1991), lo que conlleva a la pérdida del tallo de histidinas que se encuentra en el amino terminal.

Con este análisis y tratando de evitar la hidrólisis de la proteína, la muestra se ultrafiltró con una membrana de tamaño de corte de 10 kDa y fue sometida a SDS-PAGE y zimogramas para conocer la integridad y la actividad de PGH. En la figura 15, carril 5, se observa el perfil electroforético después de ultrafiltrar, en el carril 6 la banda de actividad a 100 kDa y una señal muy tenue para el tallo de histidinas en la imagen del Western-blot en el carril 7.

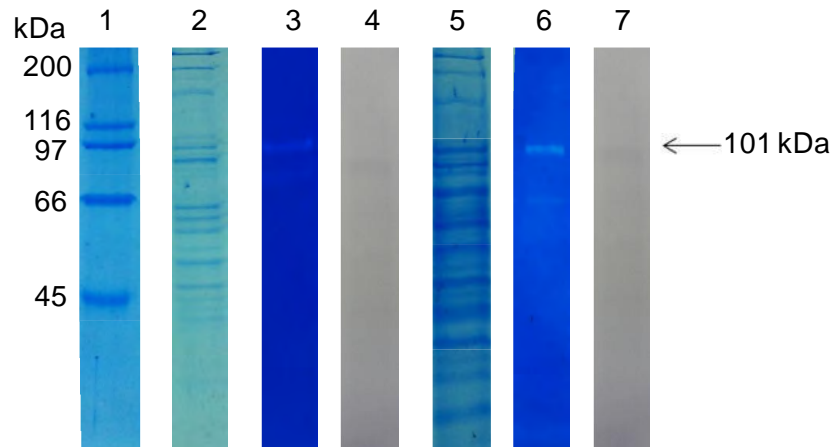


Figura 15. Expresión de la proteína recombinante de 99-kDa. Carril 1, marcador de alto peso molecular (Bio-Rad); carril 2, SDS-PAGE al 10 % de la fracción libre de células; carril 3, zimograma contra *M. lysodeikticus*; carril 4, Western-blot; carril 5, SDS-PAGE al 10 % del extracto libre de células ultrafiltrado; carril 6, zimograma contra *M. lysodeikticus*; carril 7, Western-blot.

Purificación parcial de la proteína recombinante de 99-kDa

Considerando que la proteína de interés presenta el tallo de histidinas y que muchas proteínas recombinantes han sido purificadas utilizando esta propiedad, se realizaron diversos intentos utilizando columnas de Ni^{2+} sin embargo, no se logró purificar la enzima en las condiciones evaluadas. Se esperaba que la enzima recombinante se uniera a la columna de Ni^{2+} no obstante, en todos los ensayos que se realizaron la proteína se encontró en los primeros lavados, lo que indica que no

presentó unión a la resina. Esto se corroboró por la detección de la actividad de PGH y zimografía contra *M. lysodeikticus* en la fracción de los lavados (datos no mostrados).

Con la intención de purificar la proteína de interés para conocer las propiedades bioquímicas y el uso potencial que pueda tener en biotecnología, la muestra después de ser ultrafiltrada con membrana de 10 kDa se pasó por la columna de exclusión molecular (Superdex 200). Se colectaron fracciones de 5 mL, bajo las condiciones descritas en materiales y métodos; a cada fracción se le determinó actividad de *N*-acetilglucoamidasas para conocer en que punto se encontraba la mayor actividad, y para monitorear la cantidad de proteína se midió la Abs_{280nm} . En la figura 16 se presenta el cromatograma obtenido de los parámetros evaluados, donde se observa que la mayor actividad de PGH se encuentra en la fracción 29, aunque la Abs_{280nm} es menor que con respecto a las fracciones posteriores. Las fracciones 26 a la 33, fueron sometidas a SDS-PAGE, y geles de actividad de *N*-acetilglucoamidasas, para conocer si la proteína se encontraba pura, y presentaba actividad de PGH.

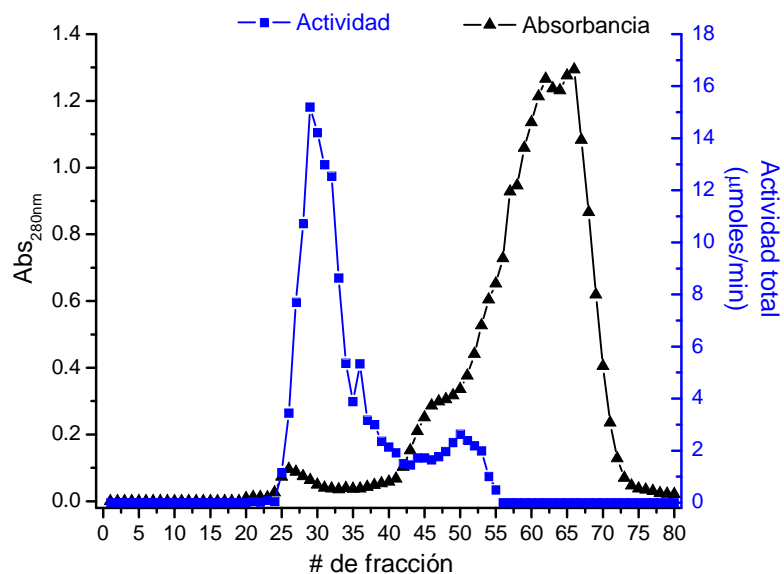


Figura 16. Cromatograma obtenido después de pasar la muestra por la columna Superdex 200. Los triángulos representan la Abs_{280nm} y los cuadros la actividad de *N*-acetilglucoamidasas.

Posteriormente cada muestra fue concentrada por liofilización y se resuspendió en 100 μ L de amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 8. En la figura 17-a se muestra el perfil

de proteínas de las fracciones 26, 27 y 28, donde se observan dos bandas, la primera alrededor de los 100 kDa, que corresponde al peso esperado de la proteína recombinante y que corresponde al 43 % de pureza; la segunda banda de 34 kDa corresponde al 57 % de pureza, la cual probablemente sea producto de degradación de la proteína de 100 kDa. Para confirmar esto sería interesante secuenciar ambas proteínas para conocer su identidad. En la figura 17-b se observa que la banda de 100 kDa es la que presenta actividad de PGH. El porcentaje de pureza de cada banda se calculó usando la densidad óptica, utilizando el software Image Lab (Bio-Rad).

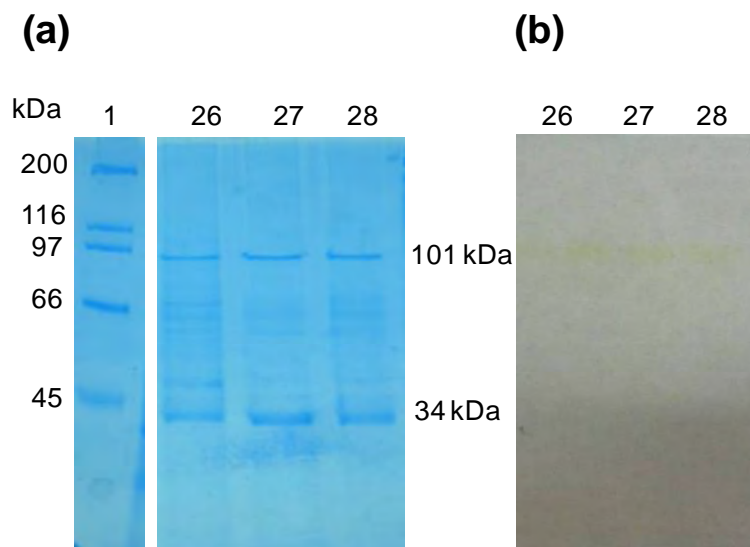


Figura 17. a) SDS-PAGE al 10 % de las fracciones 26, 27 y 28. b) gel de actividad de *N*-acetilglucoamidasas de las mismas fracciones evaluadas. Carril 1, marcador de peso molecular.

La PGH recombinante se logró purificar de una manera eficiente y rápida ya que solo consistió en la ultrafiltración y la columna de exclusión molecular. La tabla 11 resume los resultados durante las etapas de purificación. La purificación se inició con 42 mg de proteína inicial, y posterior a la ultrafiltración se obtuvieron 6 mg de proteína total, mientras que la actividad específica se incremento cerca de 5 veces. En el último paso de purificación la actividad específica se incrementó 50 veces y el rendimiento obtenido fue del 6 %

Tabla 11. Proceso de purificación de la PGH de 99-kDa

	Proteína total mg	Unidades totales $\mu\text{mol}/\text{min}$	Actividad específica $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg prot}$	Factor purificación	Rendimiento %
Sobrenadante	42 \pm 2	199 \pm 4	4.9 \pm 0.3	1	100
UF 10 kDa	6 \pm 1.5	129 \pm 2.1	22.3 \pm 1.3	4.5	65
Superdex 200	0.05 \pm 0.02	12.1 \pm 0.5	248 \pm 0.5	51	6

Caracterización bioquímica de la proteína recombinante de 99-kDa

Con la proteína recombinante pura se realizó la caracterización bioquímica en función del pH, temperatura, iones e inhibidores. Se usó la técnica descrita en materiales y métodos para la detección de PGH, utilizando como sustrato el 4-Nitrofenil *N*-acetil- β -D-glucosaminia.

Efecto del pH sobre la actividad de PGH

Como primer paso en la caracterización bioquímica de la proteína, se determinó el pH óptimo de actividad enzimática, el cual se encontró a pH 6 (Fig. 18), lo que posiblemente indique que en el sitio catalítico de la enzima esté involucrado un aminoácido ionizable a pH neutro (Ho-Shing y Ming-Ju, 2004; Basu *et al.*, 2008; Padmapriya y Williams, 2012). A valores de pH ácidos (pH 3 y 4), la enzima solo presentó el 50 % de actividad. A valores de pH por arriba de 7 la actividad disminuye un 20 %, y a pH 9 y 10, la actividad es abatida hasta en 80 %. Se ha reportado que, este tipo de enzimas requieren condiciones neutras o ligeramente ácidas para llegar al máximo de actividad, la cual disminuye rápidamente por arriba de pH 7.5-8 (Cheng y Fischetti 2007; Donovan *et al.*, 2006; Fukushima *et al.*, 2007; Sugahara *et al.*, 2007). Además, es de sumo interés el uso de la enzima en alimentos, debido a que el pH de la mayoría de los alimentos oscila entre 6 y 7, ya sea al inicio de la fermentación (si es que es un producto fermentado) o si es un alimento sin procesar o fresco. Por lo cual el uso de la PGH podría evitar el crecimiento de microorganismo no deseados en el producto ya que la mayor actividad lítica fue a pH 6 (Alvarado *et al.*, 2006).

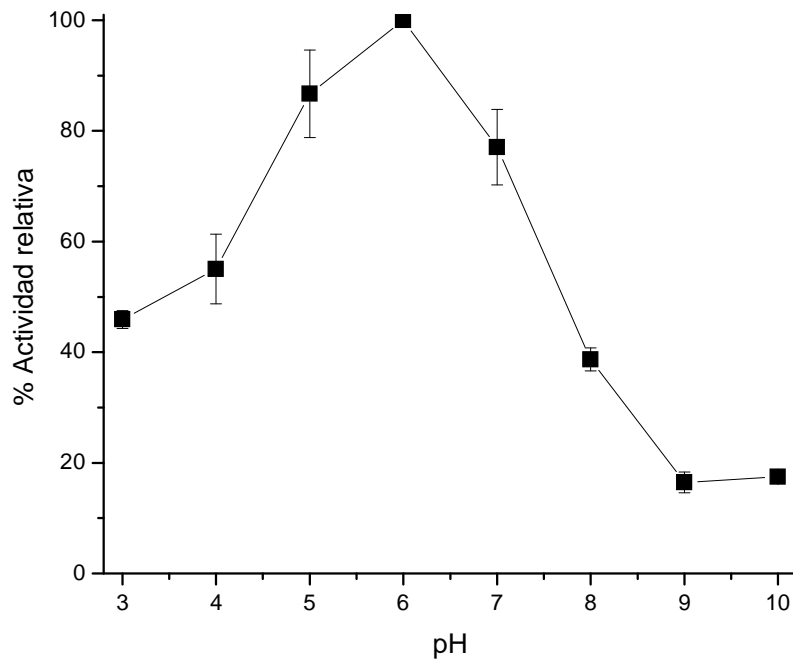


Figura 18. Determinación del pH óptimo de actividad de la enzima recombinante de 99-kDa.

Estabilidad al pH

En la figura 19 se muestra la estabilidad de la enzima a diferentes pH. La proteína de interés presentó estabilidad a pH 6, incrementando la actividad en un 60 %. A pH de 5 la actividad se incrementó en un 30 % y pH 7 retuvo el 100 % de la actividad relativa con respecto a la proteína sin incubarse. A pH's de 3, 9 y 10 la enzima conservó la actividad en 30% después de 60 min de incubación. Este tipo de enzimas son utilizadas para la conservación de alimentos, los cuales, en la gran mayoría presentan pH por debajo de 7, por lo que es de importancia conocer el efecto que pueda presentar sobre la enzima en función del tiempo (Mendes de Souza *et al.*, 2010; Callewaert *et al.*, 2011).

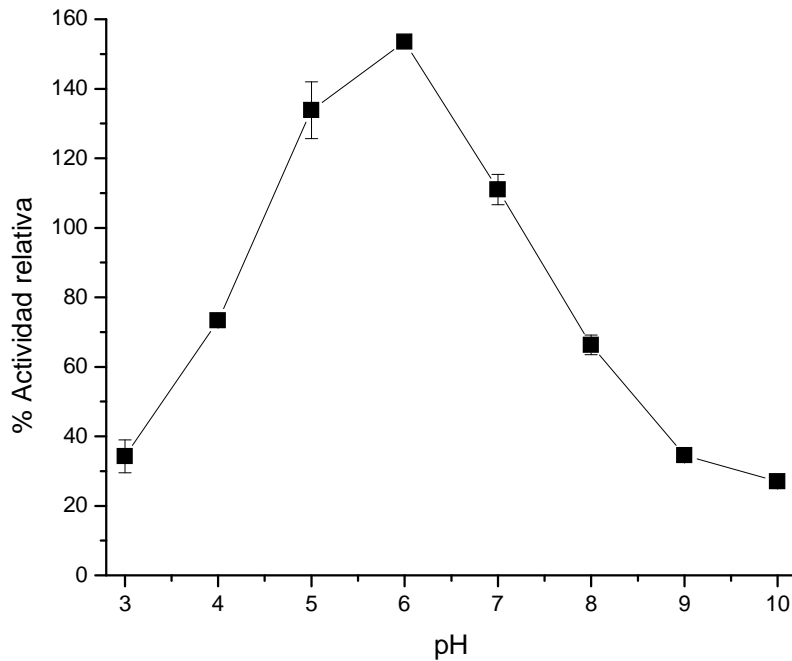


Figura 19. Estabilidad de la enzima recombinante de 99-kDa a diferentes valores de pH.

Temperatura óptima de actividad de la PGH

Es importante conocer la temperatura óptima de actividad la enzima recombinante, ya que se sabe que, al aumentar la temperatura de una reacción enzimática, la velocidad de la reacción aumenta, sin embargo al pasar unos cuantos grados por encima de su temperatura fisiológica la enzima puede llegar a desnaturalizarse (Núñez de Castro, 2001). La temperatura óptima de actividad de la enzima recombinante fue de 60 °C. A 37 y 45 °C disminuyó la actividad en 40 %, y perdió el 70 % a 70, 80 y 90 °C (Fig. 20), cabe resaltar que a esta última temperatura la PGH conservó actividad relativa con respecto la enzima sin tratamiento térmico, lo que probablemente indique que sea una proteína resistente a la temperatura, sin embargo para conocer si la enzima es termoestable, se incubó durante 1 h a las temperaturas evaluadas. El intervalo de temperatura en el cual se encuentra la máxima actividad de algunas PGH's oscila entre los 37 y 60 °C las cuales tienen un uso potencial en biotecnología (Simitsopoulou *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Kyomuhendo *et al.*, 2007).

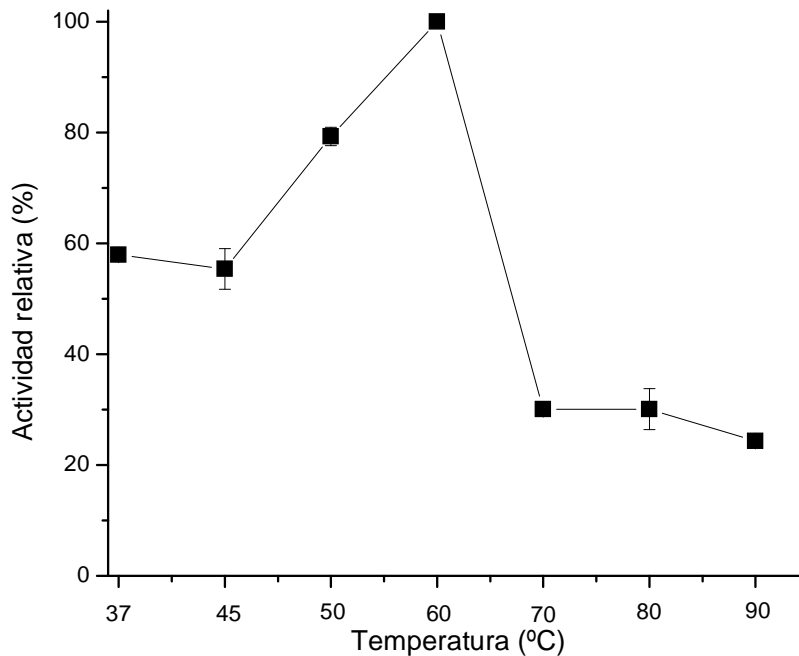


Figura 20. Determinación de la temperatura óptima de actividad de la proteína recombinante de 99-kDa.

Estabilidad a la temperatura

En la figura 21 se muestra la estabilidad a la temperatura de la proteína recombinante, la cual presentó activación a 37, 40 y 50 °C, siendo esta última temperatura donde se incrementó hasta en un 50 % la actividad lítica relativa a la enzima sin ningún tratamiento térmico. A 60 °C el 90 % de la actividad se mantuvo, este resultado es de interés en diversos procesos en alimentos, ya que probablemente pueda inhibir microorganismos patógenos como *E. coli* y *Salmonella* spp. sin perder actividad a esta temperatura (Gong, 2007). La actividad fue abatida en su totalidad después de incubar a la proteína a 70 °C durante 60 min. Se ha reportado, que la proteína con actividad lítica de *P. aeruginosa* resiste temperaturas de 100 y 120 °C, reteniendo el 50 y 21% de su actividad, respectivamente, después de ser incubada 1 h, esta proteína no contiene puentes disulfuros que indicaran su probable resistencia a la temperatura (Lavigne *et al.*, 2004). En otros trabajos se ha reportado que esta enzima comienza a desnaturalizarse (desplegarse) a 50 °C, sin embargo presenta una alta

estabilidad cinética, es decir, resistencia a la desnaturalización irreversible que permite que la proteína se repliegue rápidamente al disminuir la temperatura (Briers *et al.*, 2008). En el caso de la proteína recombinante de 99-kDa la caída prominente después de la incubación a 70 °C por 60 min, sugiere una desnaturalización irreversible como sucede con otras proteínas con actividad lítica de PGH (Kyomuhendo *et al.*, 2007).

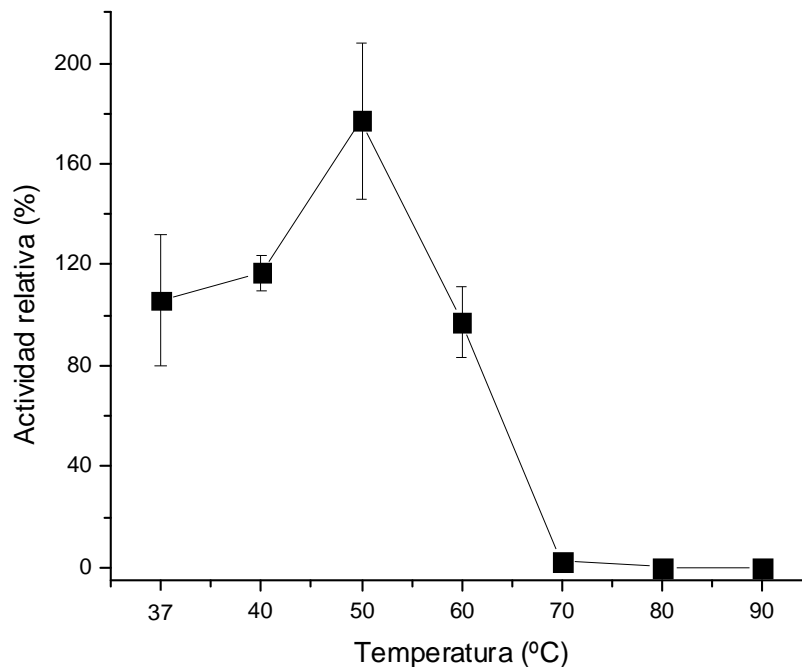


Figura 21. Estabilidad a la temperatura de la proteína recombinante de 99-kDa

Efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima recombinante de 99-kDa

Se sabe que algunas enzimas con actividad lítica requieren de la unión de un ion en el dominio catalítico. La endolisina LysB4 del bacteriófago B4 requiere de iones Zn^{2+} o Mn^{2+} para presentar actividad (Son *et al.*, 2012). Diferentes autores han reportado que el tratamiento con EDTA en este tipo de enzimas reduce la actividad lítica, debido a que el quelante secuestra el ion metálico involucrado en el sitio catalítico de la proteína (McLaughlan y Foster, 1997; Schmelcher *et al.*, 2012). En nuestros ensayos la actividad de PGH no se ve afectada por la incubación con 100 mM de EDTA durante 60 min, esto

se puede explicar debido a que la enzima puede tener diferente afinidad de los iones metálicos al sitio de coordinación del quelante (McCafferty *et al.*, 1997). Sin embargo al incubar a la enzima con 1 y 10 mM de Zn^{2+} la actividad relativa con respecto a la enzima sin catión, se ve reducida hasta en un 40%. Este comportamiento no es común, sin embargo se sabe que la proteína $CHAP_K$ de *S. aureus* con actividad de endopeptidasa, presenta una inhibición del 100 % al ser tratada con 100 mM de iones divalentes (Fenton *et al.*, 2011). Los iones Ca^{+} y Mg^{2+} , en las concentraciones 1 y 10 mM, tuvieron un comportamiento similar entre ellos, al disminuir la actividad en un 10% con respecto al control. El único catión que no presentó efecto sobre la actividad fue el Na^{+} en 1 y 10 mM. Se ha reportado que la actividad de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa de *Listeria monocytogenes* se regenera hasta en un 100 % por la adición de 10 mM de Mg^{2+} y Ca^{2+} (Schmelcher *et al.*, 2012), esto se puede deber a que el ion Ca^{2+} aumenta la afinidad del sustrato por medio de dos residuos de aspartato, presentes en la enzima y la interacción con un cadena lateral ácida del sustrato (Claperon *et al.*, 2008) (Fig. 22). En nuestro caso solo el ion Na^{+} presentó el 100 % de la actividad.

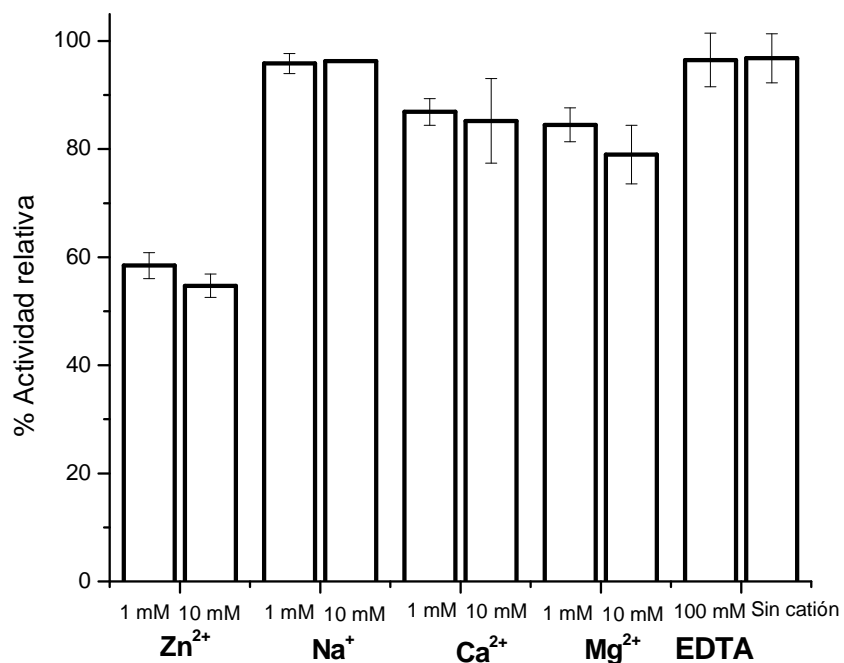


Figura 22. Efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima recombinante de 99-kDa.

Efecto de inhibidores y agentes quelantes sobre la actividad de la proteína de 99-kDa

La proteína de 99-kDa fue sometida a diferentes concentraciones de quelantes y un inhibidor. La enzima no presentó inhibición por EDTA en concentraciones de 1 mM y 10 mM, se sabe que el EDTA es un inhibidor de metaloenzimas, secuestrando el ion involucrado en la catálisis, que frecuentemente es el ion Zn^{2+} (Morner y Braun, 1984). Existe una gran cantidad de autores que reportan que las enzimas con actividad de PGH contienen un sitio de unión a Zn^{2+} , y que el ion es esencial para la catálisis (Popowska y Markiewicz, 2006; Schmelcher *et al.*, 2012; Sabala *et al.*, 2012). En nuestro caso la actividad de PGH no disminuyó, lo que indica, probablemente que este ion no es esencial para llevar a cabo la reacción (Vasala *et al.*, 1995), ya que putativamente esta enzima presenta un sitio de unión a Zn^{2+} (acceso: gi|270290692, Protein BLAST). El PMSF, que es un inhibidor de sitios con residuos de serina, aumentó la actividad en un 10 % (Fig. 23). Algunas PGH han sido inhibidas por PMSF y se reportan como serin-proteinasas (Stepnaya *et al.*, 2005) ya que contienen en el sitio activo una serina, sin embargo en la enzima de estudio el sitio catalítico de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa los aminoácidos involucrados en la catálisis no son residuos de serina. En la región de *N*-acetilglucoamidasas aún no se conoce qué residuos de aminoácidos están involucrados en la catálisis y el alineamiento con otras *N*-acetilglucoamidasas no indica qué sitios están involucrados en la unión a carbohidratos o el sitio catalítico de la enzima. El EGTA, un quelante de iones Ca^{2+} principalmente, inhibió en una concentración de 1 mM el 20 % de la actividad de PGH, e inhibió el 80% de la actividad cuando se adicionó en la concentración de 10 mM. Esto sugiere que la proteína de 99-kDa requiere del ion Ca^{2+} para llevar a cabo la hidrólisis del sustrato (Morner y Braun, 1984; Yoshimura *et al.*, 2006).

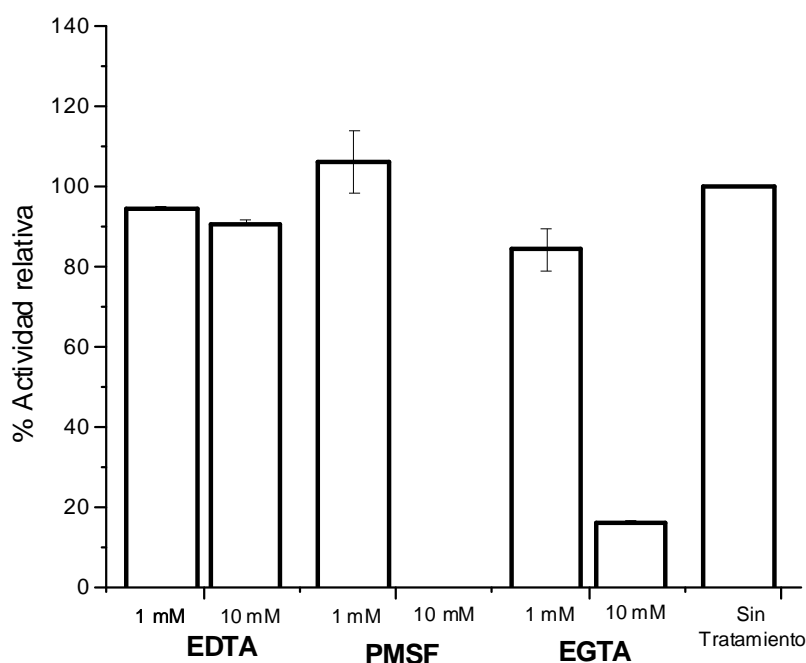


Figura 23. Efecto del EDTA, PMSF y EGTA, sobre la actividad de la enzima recombinante de 99-kDa.

Espectro de inhibición de la proteína recombinante de 99-kDa

Se evaluó el efecto antibacteriano de la PGH recombinante de 99-kDa contra diferentes bacterias patógenas y de colección (Tabla 12). La actividad solo se presentó contra 7 cepas, de las cuales destacan: *S. pyogenes*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, ya que son bacterias patógenas e indeseables en alimentos. La enzima también presentó actividad contra bacterias lácticas, incluyendo la cepa productora, esto quizá se deba a las funciones que presentan en la célula y a la similitud que existe en las paredes celulares (Vollmer *et al.*, 2008-a y 2008-b). En comparación con el espectro antibacteriano generado con la preparación de las dos PGH parcialmente puras y la PGH recombinante, la actividad disminuyó con esta última enzima, además de que no presentó inhibición contra bacterias Gram-negativas, lo que probablemente sigue que la enzima de 99-kDa requiera de la presencia de la proteína de 110-kDa para generar una mayor actividad.

Tabla 12. Inhibición de cepas bacterianas por la PGH recombinante de 99-kDa

Cepas	mm/mg prot.
Gram-positivas	
<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218	40.8
<i>Enterococcus faecium</i> QB	25.8
<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	24.7
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	23.6
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	22.1
<i>Enterococcus faecalis</i> QB	19.9
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	11.4
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	0.0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.0
Gram-negativas	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0.0
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	0.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.0

La PGH de 99-kDa presentó actividad de *N*-acetilglucoamidasas, sin embargo quedan diversos estudios para conocer si tiene la capacidad de degradar otros enlaces de la pared celular. Por otra parte, sería interesante conocer el espectro de inhibición solo de la proteína de 110-kDa, la cual ya ha sido clonada y expresada en el grupo de trabajo y se sabe que tiene actividad lítica, por medio de difusión en agar, contra *S. aureus* y *M. lysodeikticus*. Las dos enzimas recombinantes puras se podrían combinar y evaluar la capacidad antibacteriana, con la intención de dilucidar si una actividad depende de la otra y si esto ayuda a incrementar el efecto lítico o bien, si el efecto de inhibición es una sinergia de las PGH.

CONCLUSIONES

En la bacteria ácido láctica *P. acidilactici* se localizó e identificó la actividad lítica responsable, probablemente, del efecto de bioconservador reportado sobre el producto cárnico, salami. Esta enzima tiene un uso potencial en el área de la biotecnología, debido al amplio espectro que tiene sobre bacterias patógenas.

Se localizó la mayor actividad antibacteriana a las 8 h de crecimiento, en la fracción de proteínas unidas a membrana. Sorprendentemente, no solo es una proteína la responsable de la actividad, ya que se obtuvo una preparación con dos proteínas parcialmente puras (110- y 99-kDa), las cuales presentaron actividad lítica visualizada por medio de zimogramas y un amplio espectro de inhibición contra bacterias patógenas. Usando la preparación de las dos proteínas juntas, se logró inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *S. aureus* y *E. coli*, así como a la cepa productora, durante el crecimiento en medio líquido. De la misma forma, las dos enzimas presentaron una concentración mínima inhibitoria de 2.1 µg contra *S. aureus*.

La proteína de 110-kDa fue identificada como un transportador tipo ABC, del cual por primera vez se reporta con actividad lítica. Y la proteína de 99-kDa es una *N*-acetilmuramidasa, con dos regiones conservadas de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa y *N*-acetilglucoamidasa.

El gen que codifica para la proteína de 99-kDa, se amplificó, secuenció e insertó en un vector de expresión. Se obtuvo la proteína recombinante a los 100-kDa, con actividad lítica de *N*-acetilglucoamidasa, determinada tanto espectrofotométricamente como por medio de zimogramas.

Utilizando cromatografía de exclusión molecular la proteína de 100-kDa se purificó, sin embargo se observa una banda alrededor de 34-kDa, lo que probablemente indica degradación. La enzima pura mostró un pH óptimo de actividad de 6, y mostró estabilidad al pH en un intervalo de 5 a 7. La temperatura óptima de actividad fue de 60 °C, perdiendo el 100 % de la actividad a 70 °C durante 1 h, sin embargo en ese tiempo a 60 °C retuvo el 95 % de la actividad lítica. El ion Zn^{2+} y el EGTA presentaron inhibición de la PGH recombinante. El EDTA no presentó inhibición y ningún catión incrementó la actividad lítica.

El espectro antibacteriano de la enzima recombinante fue menor con respecto al espectro generado con las dos enzimas parcialmente puras, inhibiendo solo tres bacterias patógenas y todas las BAL.

Hasta el momento solo la lisozima es la única PGH utilizada en la industria de los alimentos, sin embargo existen numerosos estudios donde hay un potencial uso de estas proteínas, no solo en productos procesados, sino también en la industria farmacéutica y en el ámbito de la medicina. Con este trabajo se pretende sentar las bases para que en un futuro esta enzima pueda ser utilizada o comercializada a nivel industrial.

REFERENCIAS

- Alvarado C., García B.E., Martin S.E. and Regalado C. (2006) Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods. *Rev Latinoam Microbiol* **48**, 260-268.
- Andrews J.M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* **48**, 5–16.
- Baker J.R., Liu C., Dong S. and Pritchard D.G. (2006) Endopeptidase and glycosidase activities of the bacteriophage B30 lysin. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6825-8.
- Barouei J., Karbassi A., Ghodousi H.B., Mortazavi A., Ramezani R. and Moussavi M. (2011) Impact of native *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Pediococcus* spp. as adjunct cultures on sensory quality of Iranian white brined cheese. *Int J Dairy Technol* **64**, 526 –535.
- Basu B., Banik A. and Das M. (2008) Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. *World J Microbiol Biotechnol* **24**, 449–455.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Briers Y., Miroshnikov K., Chertkov O., Nekrasov A., Mesyanzhinov V., Volckaert G. and Lavigne R. (2008) The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage phiKZ. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 747–751.
- Buist G., Kok J., Leenhouts K.J., Dabrowska M., Venema G. and Haandrikman, A.J. (1995) Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene Encoding the Major Peptidoglycan Hydrolase of *Lactococcus lactis*, a Muramidase Needed for Cell Separation. *J Bacteriol* **177**, 1554-1563.
- Callewaert L., Walmagh M., Michiels C. and Lavigne R. (2011) Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Curr Opin Biotech* **22**, 164–171.
- Campos-Gómez M. (2013) Clonación y expresión de la peptidoglucano hidrolasa de 99 kDa producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- Cheng Q. and Fischetti V. (2007) Mutagenesis of a bacteriophage lytic enzyme PlyGBS significantly increases its antibacterial activity against group B streptococci. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 1284–1291.
- Cibik R. and Chapot-Chartier M.-P. (2004) Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Lett Appl Microbiol* **38**, 459-463.

- Claperon C., Rozenfeld R., Iturrioz X., Inguibert N., Okada M., Roques B., Maigret B. and Llorens-Cortes C. (2008) Asp218 participates with Asp213 to bind a Ca²⁺ atom into the S1 subsite of aminopeptidase A: a key element for substrate specificity. *Biochem J* **416**, 37–46.
- Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* **16**, 10881-10890.
- Cotter P.D., Hill C. and Ross R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* **3**, 777-788.
- Danilović B., Joković N., Petrović L., Veljović K., Tolinački M. and Savić D. (2011). The characterisation of lactic acid bacteria during the fermentation of an artisan Serbian sausage (Petrovská Klobása). *Meat Sci* **88**, 668-74.
- Das D., Hervé M., Elsliger M.A., Kadam R.U., Grant J., Chiu H.J., Knuth M.W., Klock H.E., Miller M.D., Godzik A., Lesley S.A., Deacon A.M., Mengin-Lecreulx D. and Wilson I.A. (2013) Structure and function of a novel LD-carboxypeptidase A involved in peptidoglycan recycling. *J Bacteriol* [Epub ahead of print].
- Dobson C.M., Deneer H., Lee S., Hemmingsen S., Glaze S. and Ziola B. (2002) Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2003-10.
- Donovan M., Lardeo M. and Foster-Frey J. (2006). Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11endolysin. *FEMS Microbiol Lett* **265**, 133–139.
- Donovan D.M. and Foster-Frey J. (2008) LambdaSa2 prophage endolysin requires Cpl-7-binding domains and amidase-5 domain for antimicrobial lysis of streptococci. *FEMS Microbiol Lett* **287**, 22–33.
- Eckert C., Lecerf M., Dubost L., Arthur M. and Mesnage S. (2006) Functional Analysis of AtIA, the Major N-Acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **188**, 8513-8513.
- Fischetti V.A. (2010) Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol* **300**, 357–362.
- Fedorov T., Surovstev V., Pletnev V., Borozdina M. and Gusev V. (2003) Purification and some properties of lysostaphin, a glycyglycine endopeptidase from the culture liquid of *Staphylococcus simulans boivar staphylolyticus*. *Biochem (Moscow)* **68**, 61-65.
- Fenton M., Ross R.P., McAuliffe O., O'Mahony J. and Coffey A. (2011) Characterization of the staphylococcal bacteriophage lysin CHAP(K). *J Appl Microbiol* **111**, 1025-1035.

- Fukushima T., Yao Y., Kitajima T., Yamamoto H. and Sekiguchi J. (2007) Characterization of new L,D-endopeptidase gene product CwlK (previous YcdD) that hydrolyzes peptidoglycan in *Bacillus subtilis*. *Mol Genet Genomics* **278**, 371–383.
- Gálvez A., Abriouel H., López R. and Ben O. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* **120**, 51-70.
- García P., Rodríguez L., Rodríguez A. and Martínez B. (2010) Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends Food Sci Tech* **21**, 373-382.
- Genckal H. and Tari C. (2006) Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme Microb Technol* **39**, 703–710.
- Ghanbari M., Mansooreh J., Domig K. and Kneifel W. (2013) Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - A review. *Food Sci Technol-leb* **54**, 315-324.
- Gong C.M. (2007) Microbial safety control of compost material with cow dung by heat treatment. *J Environ Sci* **19**, 1014-9.
- Graham S., and Coote P.J. (2007) Potent, synergistic inhibition of *Staphylococcus aureus* upon exposure to a combination of the endopeptidase lysostaphin and the cationic peptide ranalexin. *J Antimicrob Chemother* **59**,759–762.
- Guan R., Roychowdury A., Ember B., Kumar S., Boons G.-J. and Mariuzza R.A. (2005) Crystal structure of a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in complex with a muramyl tripeptide from Gram-positive bacteria. *J Endotoxin Res* **11**, 41-46.
- Haakensen M., Dobson C.M., Hill J.E. and Ziola B. (2009) Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 615-21.
- Ho-Shing W. and Ming-Ju T. (2004) Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. *Enzyme Microb Tech* **35**, 488–493.
- Hollenstein K., Dawson R.J.P. and Locher K.P. (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Op Struct Biol* **17**, 412-418.
- Irmmler S., Bavan T., Oberli A., Roetschi A., Badertscher R., Guggenbühl B. and Berthoud H. (2013) Catabolism of serine by *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus*. *Appl Environ Microbiol* **79**,1309-15.
- Kibbe W.A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**, 25.

- Kim SY., Ohk SH., Bai DH. and Yu JH. (1999) Purification and properties of bacteriolytic enzymes from *Bacillus licheniformis* YS-1005 against *Streptococcus mutans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 73-7.
- Kránitz L., Benabdelhak H., Horn C., Blight M.A., Holland I.B. and Schmitt L. (2002) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the ATP-binding domain of the ABC transporter haemolysin B from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 539-541.
- Kyomuhendo P. Myrnes B. and Nilsen I. (2007) A cold-active salmon goose-type lysozyme with high heat tolerance *Cell Mol Life Sci* **64**, 2841 – 2847.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **15**, 680-685.
- Lavigne R., Briers Y., Hertveldt K., Robben J. and Volckaert G. (2004) Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2753–2759.
- Layec S., Decaris B. and Leblond-Bourget N. (2008). Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Res Microbiol* **159**, 507-515.
- Leclerc D. and Asselin A. (1989) Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing gel electrophoresis. *Can J Microbiol* **35**, 749-753.
- Leroy F., and De Vuyst L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Tech.* **15**, 67-78.
- Lortal S. and Chapot-Chartier M. (2005) Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int Dairy J.* **15**, 857-871.
- Llorente-Bousquets A., Pérez-Munguía M. and Farrés A. (2008) Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATTC 8042. *Can J Microbiol* **54**, 694-699.
- Maidment C., Dyson A., and Beard J. (2009) A study into measuring the antibacterial activity of lysozyme-containing foods *Nut Food Sci* **39**, 29-35
- McCafferty D.G., Lessard I.A. and Walsh CT. (1997) Mutational analysis of potential zinc-binding residues in the active site of the enterococcal D-Ala-D-Ala dipeptidase VanX. *Biochem* **36**, 10498–10505
- McLaughlan A.M. and Foster SJ. (1997) Characterisation of the peptidoglycan hydrolases of *Listeria monocytogenes* EGD. *FEMS Microbiol Lett* **152**, 149-54.
- Mee-Jung H., Hongseok Y. and Sang Yup L. (2008) Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology. *Biotechnol Adv* **26**, 591-609.

- Mendes de Souza P., Fernández A., López-Carballo G., Gavara R. and Hernández-Muñoz P. (2010) Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme. *Food Hydrocolloid* **24**, 300-306.
- Mora D., Fortina M.G., Parini C., Daffonchio D. and Manachini P.L. (2000). Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin ACh/PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiol* **146**, 2027-2038.
- Mora D., Musacchio F., Fortina M.G., Senini L. and Manachini P.L. (2003) Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *J Appl Microbiol* **94**, 561-570.
- Morner S. and Braun V. (1984) Murein hydrolase (N-acetyl-muramyl-L-alanine amidase) in human serum. *Arch Microbiol* **140**, 171 – 177.
- Murray P.R., Rosenthal K.S. and Pfaller M.A. (2006) *Pseudomonas* and related bacteria. In *Medical Microbiology*, ed. Murray, P.R. pp. 357-360. Philadelphia: MMV Elsevier Inc.
- Nakimbugwe D., Masschalck B., Deckers D., Callewaert L., Aertsen A. and Michiels C.W. (2006) Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts. *FEMS Microbiol Lett* **259**, 41-6.
- Núñez de Castro I. (2001) Condiciones de la reacción enzimática. *Enzimología*, ed. Núñez de Castro, I. pp. 91-94. Madrid, España, Pirámide.
- Ohbuchi K., Hasegawa K., Hamachi M., Ozeki K. and Kumagai C. (2001) Isolation of a New Lytic Enzyme for Hiochi Bacteria and Other Lactic Acid Bacteria. *J Biosci Bioeng* **91**, 487-492.
- O' Shea E.F., Cotter P.D., Ross R.P. and Hill C. (2013) Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **24**, 130-4.
- Padmapriya M. and Williams B. (2012) Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Biotech Res* **2**, 612-618.
- Popowska M. and Markiewicz Z. (2006) Characterization of *Listeria monocytogenes* protein Lmo0327 with murein hydrolase activity. *Arch Microbiol* **186**, 69–86.
- Rainard P. (2005) Tackling mastitis in dairy cows. *Nat Biotechnol* **23**, 430-432.
- Ribelles P., Rodriguez I. and Suarez J.E. (2012) LysA2, The *Lactobacillus casei* bacteriophage A2 lysin is an endopeptidase active on a wide spectrum of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**, 101–110.
- Rivera J. (2004) Evaluación del efecto de bioconservador en Salamis al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.

- Sabala I., Jonsson I., Tarkowski A. and Bochtler M. (2012) Anti-staphylococcal activities of lysostaphin and LytM catalytic domain. *BMC Microbiol.* **12**, 97.
- Salminen S., von Wright A. and Ouwehand A. (2004) Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3^a edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos. pp. 50, 131-149, 375-398.
- Schmelcher M., Waldherr F. and Loessner M. (2012) *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 633–643.
- Simitsopoulou M., Vafopoulou A., Choli-Papadopoulou T. and Alichanidis E. (1997) Purification and partial characterization of a tripeptidase from *Pediococcus pentosaceus* K9.2. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4872-6.
- Sitkin B.V., Lysanskaia V., Tsfasman I.M., Stepnaia O.A. and Kulaev, I.S. (2003) The structure of peptidoglycan from *Lysobacter* sp.--a producer of extracellular bacteriolytic enzymes. *Biochem (Mosc)* **72**, 136-7.
- Son B., Yun J., Lim J.A., Shin H., Heu S. and Ryu S. (2012) Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4. *BMC Microbiol* **15**, 12-33.
- Stepnaya O.A., Tsfasman I.M., Logvina I.A., Ryazanova L.P., Muranova T.A. and Kulaev I.S. (2005) Isolation and characterization of a new extracellular bacteriolytic endopeptidase of *Lysobacter* sp. XL1. *Biochem (Mosc)* **70**, 1031-7.
- Sugahara K., Yokoi K., Nakamura Y., Nishino T., Yamakawa A., Taketo A. and Kodaira K. (2007) Mutational and biochemical analyses of the endolysin Lys_{gaY} encoded by the *Lactobacillus gasser* JCM 1131^T phage ϕ gaY. *Gene* **404**, 41–52.
- Szweda P., Schielmann M., Kotlowski R., Gorczyca G., Zalewska M. and Milewski, S. (2012) Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**, 1157–1174.
- Tobias J.W., Shrader T.E., Roca G. and Varshavsky A. (1991) The N-end rule in bacteria. *Science* **254**, 1374-7.
- Turner M.S., Hafner L.M., Walsh T., and Giffard P.M. (2004) Identification, characterization and specificity of a cell wall lytic enzyme from *Lactobacillus fermentum* BR11. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 9–15.
- Turner M., Waldherr F., Loessner M. and Giffard P. (2007) Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Syst Appl Microbiol* **30**, 58–67.

- Vasala A., Välikkilä M., Caldentey J. and Alatossava, T. (1995) Genetic and biochemical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H lysin. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4004.
- Vidhyasagar V. and Jeevaratnam K. (2013) Bacteriocin activity against various pathogens produced by *Pediococcus pentosaceus* VJ13 isolated from Idly batter. *Biomed Chromatogr*. doi: 10.1002/bmc.2948.
- Vollmer W., Blanot D., and de Pedro M.A. (2008-a) Peptidoglycan structure and architecture *FEMS Microbiol Rev* **32**, 149-67.
- Vollmer W., Joris B., Charlier P., and Foster S. (2008-b) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 259–286.
- Wang Y., Ametaj B.N., Ambrose D.J. and Gänzle M.G. (2013) Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. *BMC Microbiol* **29**, 13:19.
- Wu J.A., Kusuma C., Mond J.J. and Kokai-Kun J.F. (2003) Lysostaphin Disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms on Artificial Surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3407-3414.
- Xin-Yi Y., Cong-Ran L., Ren-Hui L., Yue-Ming W., Wei-Xin Z., Hui-Zhen C., Qing-Shan H., Yan-Xing H., Jian-Dong J. and Xue-Fu Y. (2007) In vitro activity of recombinant lysostaphin against *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in Beijing, China. *J Med Microbiol* **56**, 71–76.
- Yokoi K.J., Shinohara M., Kawahigashi N., Nakagawa K., Kawasaki K., Nakamura S., Taketo A. and Kodaira K. (2005) Molecular properties of the two-component cell lysis system encoded by prophage phigaY of *Lactobacillus gasseri* JCM 1131T: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **99**, 297–308.
- Yoshimura G., Komatsuzawa H., Hayashi I., Fujiwara T., Yamada S., Nakano Y., Tomita Y., Kozai K. and Sugai M. (2006) Identification and molecular characterization of an N-Acetylmuraminidase, Aml, involved in *Streptococcus mutans* cell separation. *Microbiol Immunol* **50**, 729-42.
- Zayas J.F. (1997) Solubility of Proteins. In *Functionality of Proteins in Food*, ed. Zayas, J.F. pp. 43-44. New York, NY, USA: Springer.