



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS DE *Lactobacillus amylovorus*  
EN UN MEDIO RICO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**HERIBERTO MARTÍNEZ MÁRQUEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Alejandro Camacho Cruz**

**VOCAL:**                   **Profesor: Gloria Díaz Ruíz**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Romina Ma. de la Paz Rodríguez Sanoja**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: Norma Angélica Camacho de la Rosa**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Beatriz Ruíz Villafan**

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

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

**Romina Ma. de la Paz Rodríguez Sanoja**

## **SUSTENTANTE (S):**

---

**Heriberto Martínez Márquez**

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>

## ABREVIATURAS

A<sub>450</sub> (Absorbancia a 450 nanómetros)

Aa (aminoácidos)

ATP (Adenosín trifosfato)

BAL (Bacterias ácido lácticas)

CEPs (Proteasas unidas a pared)

cm (centímetro)

Da (Dalton)

DO (densidad óptica)

EDTA (ácido etildiaminotetraacético)

h (horas)

IUBMB (Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular)

kDa (kilo Dalton)

M (molar)

mA (miliAmper)

mg (miligramo)

min (minutos)

ml (mililitro)

mM (milimolar)

mm (milímetro)

MW (Peso molecular)

nm (nanómetro)

PBS (buffer fosfato salino)

PMSF (Fenilmetilsulfonilfluorido)

rpm (revoluciones por minuto)

SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

TCA (Ácido tricloro acético)

TNBSA (ácido trinitrobencensulfónico)

V (volt)

v/v (volumen/volumen)

$\mu$ l (microlitro)

## INTRODUCCIÓN

Las proteasas de las bacterias ácido lácticas (BAL) son esenciales para su crecimiento y juegan un papel clave en el proceso de maduración de productos alimenticios, así como en su adaptación a diferentes nichos ecológicos.

Pese a que se cuenta con gran información acerca del sistema proteolítico de diferentes especies de BAL, que sirven principalmente como cultivos iniciadores en la producción de alimentos fermentados como el yogurt y el queso, poco se sabe acerca del sistema proteolítico de lactobacilos aislados de fermentaciones vegetales.

*Lactobacillus amylovorus* es un lactobacilo que fue aislado de residuos de maíz y que aparece frecuentemente asociado a fermentaciones vegetales tradicionales. Recientemente ha sido estudiado como comensal en ganado porcino y probado como probiótico en diferentes sistemas biológicos. Este organismo fue originalmente aislado por su capacidad amilolítica, sin embargo nada se conoce acerca de su fisiología, de las enzimas que produce, de su capacidad de hidrolizar o utilizar diferentes sustratos, etc.

Este trabajo pretende acercarse por primera vez al sistema proteolítico de *Lactobacillus amylovorus* describiendo el número y localización de las proteasas que produce.

Se buscarán proteasas tanto secretadas, ancladas a pared celular como proteasas intracelulares. La información obtenida permitirá aumentar nuestro conocimiento de la fisiología de este microorganismo.

## ANTECEDENTES

### Proteasas

Las proteasas son un tipo de enzimas capaces de catalizar la ruptura hidrolítica de los enlaces peptídicos presentes en las proteínas; también son denominadas como péptido hidrolasas o peptidasas. De acuerdo a la nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB por sus siglas en inglés) estas enzimas se clasifican dentro del grupo de las “hidrolasas” que, dependiendo del sitio dentro de la cadena polipeptídica sobre la que actúan, se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas. Estas últimas se clasifican de acuerdo a su estructura terciaria y a sus sitios catalíticos en serín-proteasas, aspartil-proteasas, metaloproteasas y cisteín-proteasas (Tavano, 2013).

De manera general las proteasas extracelulares son responsables de la hidrolisis de proteínas grandes a péptidos pequeños que posteriormente son absorbidos por la célula, las proteasas intracelulares además de completar el metabolismo de los péptidos entrantes, juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo celular, como es la renovación proteica mediante una constante degradación de proteínas mal plegadas o que ya no necesita la célula, la activación de formas zimógenas por proteólisis o la inactivación proteolítica de otras enzimas (Savijoki *et al.* 2006).



## Clasificación de las proteasas

La IUBMB clasifica a las proteasas con base a tres amplios criterios: 1) tipo de reacción catalizada, 2) naturaleza química del sitio catalítico, 3) Relación evolutiva con referencia a su estructura (Rao y col. 1998).

De manera general son subdivididas en dos grandes grupos: exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo de su sitio de acción como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Tipos de peptidasas designadas por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (1992).

Número E.C.	Tipo de peptidasa	Acción
<b>EXOPEPTIDASAS</b>		
3.4.11.	Aminopeptidasa	Liberación del residuo N-terminal
3.4.14.	Dipeptidasa	Actúa sólo en dipéptidos
3.4.13.	Dipeptidil peptidasa Tripeptidil peptidasa	Liberación del residuo N-terminal Liberación del residuo N-terminal
3.4.15.	Peptidil dipeptidasa	Liberación del residuo C-terminal
3.4.16.	Carboxipeptidasa (serína)	Liberación del residuo C-terminal
3.4.17.	Carboxipeptidasa (metaló)	Liberación del residuo C-terminal
3.4.18.	Carboxipeptidasa (cisteína)	Liberación del residuo C-terminal
3.4.19.	Omega peptidasa	Liberación de residuos modificados del N- o C-terminal
<b>ENDOPEPTIDASAS</b>		
3.4.21.	Endopeptidasas de serina	
3.4.22.	Endopeptidasas de cisteína	
2.4.23.	Endopeptidasas de aspático	
3.4.24	Metaló-endopeptidasas	
3.4.99	Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido	

## **Exopeptidasas**

Son las proteasas que actúan en los extremos de la cadena polipeptídica, liberando dipéptidos, tripéptidos o aminoácidos. Se dividen en aminopeptidasas o carboxipeptidasas en función del extremo de la cadena polipeptídica sobre la que actúan. Las carboxipeptidasas a su vez pueden ser divididas en tres grandes grupos en función de su mecanismo catalítico en: carboxipeptidasas de serina, carboxipeptidasas de cisteína y metalocarboxidasas, teniendo en cuenta los residuos de aminoácidos del sitio activo de la proteasa (Tavano, 2013).

## **Endopeptidasas**

Son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de regiones internas de la cadena polipeptídica. Las endopeptidasas a su vez se subdividen en cuatro subgrupos que van de acuerdo al grupo funcional presente en el sitio activo: proteasas de serina, proteasas aspárticas, proteasas de cisteína y metaloproteasas (Tavano, 2013).

Sin embargo, existen otras proteasas que quedan fuera de esta clasificación como aquellas proteasas dependientes de ATP, las cuales requieren ATP para llevar a cabo su actividad catalítica.

## **Sistema Proteolítico en Bacterias Ácido Lácticas (BAL)**

Las bacterias ácido lácticas están definidas como bacterias Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativas, anaeróbicas facultativas con un metabolismo fermentativo. Dentro de éstas se encuentran los géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

*Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Axelsson, 1998).

Las BAL tienen una amplia gama de aplicaciones en la elaboración de diferentes alimentos fermentados, bebidas y productos alimenticios (Leroy y Devuyst, 2004). De manera particular, del género *Lactobacillus*, existen cepas que cada vez son más comercializadas como un promotores de la salud como probióticos (Saxelin *et. al.* 2005), mientras que otras cepas de *Lactobacillus* se cree, producen péptidos bioactivos a partir de la leche que tienen beneficios a la salud (Meisel y Bockelman, 1999; Korhonen y Pihlanto, 2003). *Lactococcus lactis* es la bacteria ácido láctica más estudiada y el segundo microorganismo Gram positivo más estudiado respecto a genética, fisiología y biología molecular; por lo que a partir de los estudios realizados en éste microorganismo, se han establecido modelos de cómo opera el sistema proteolítico en las BAL.

La aplicación más importante de las BAL es su uso como cultivos iniciadores en la manufactura de diversos productos lácteos fermentados. Durante el proceso de fermentación de la leche, el sistema proteolítico de las BAL juega un papel clave en el crecimiento de estas bacterias, con lo que se asegura una fermentación adecuada. Las BAL son microorganismos que requieren de fuentes exógenas de aminoácidos y péptidos, que en general se derivan de la proteólisis de la caseína de la leche.

La degradación de la caseína por parte de las BAL se inicia con la acción de las proteasas unidas a pared (CEPs) que hidrolizan las proteínas en oligopéptidos que subsecuentemente son ingresados a la célula a través de los sistemas de transporte de oligopéptidos, los cuales a su vez son hidrolizados en pequeños péptidos y aminoácidos por la acción de diferentes peptidasas intracelulares [Figura 1] (Savijoki *et al.* 2006). Mientras que muchas cepas de BAL contienen CEPs, varias de estas cepas, por ejemplo, bacterias ácido lácticas no iniciadoras

de cultivo, no las poseen, por lo tanto, dependen de las BAL iniciadoras para obtención de péptidos y aminoácidos. El sistema proteolítico de *L. lactis* ha sido ampliamente estudiado, hasta llegar a un modelo completo para la hidrólisis de caseína, incluyendo transporte y degradación de los péptidos derivados, así como su regulación (Tynkkynen *et al.* 1993; Hagting *et al.* 1994; Foucaud *et al.* 1995; Guédon *et al.* 2001a, b; den Hengst *et al.* 2005a, b).

Además del sistema para la degradación de caseína, las bacterias ácido lácticas, al igual que cualquier otra célula, codifican enzimas proteolíticas inducibles por estrés quienes son las responsables del procesamiento de proteínas anormales, por ejemplo, aquellas que son de choque térmico (Frees e Ingmer, 1999).

Estudios genómicos han revelado algunas diferencias entre los sistemas proteolíticos de las BAL, las cuales se piensa que reflejan los distintos nichos ambientales que éstas bacterias ocupan (Boekhorst *et al.* 2004). En comparación con *L. lactis*, los lactobacilos presentan una marcada deficiencia en la capacidad para sintetizar aminoácidos, sin embargo esto se ve compensado con la habilidad para codificar un gran número de proteasas, peptidasas, permeasas de aminoácidos así como diversos sistemas de transporte de oligopéptidos (Opp) (Klaenhammer *et al.* 2005).

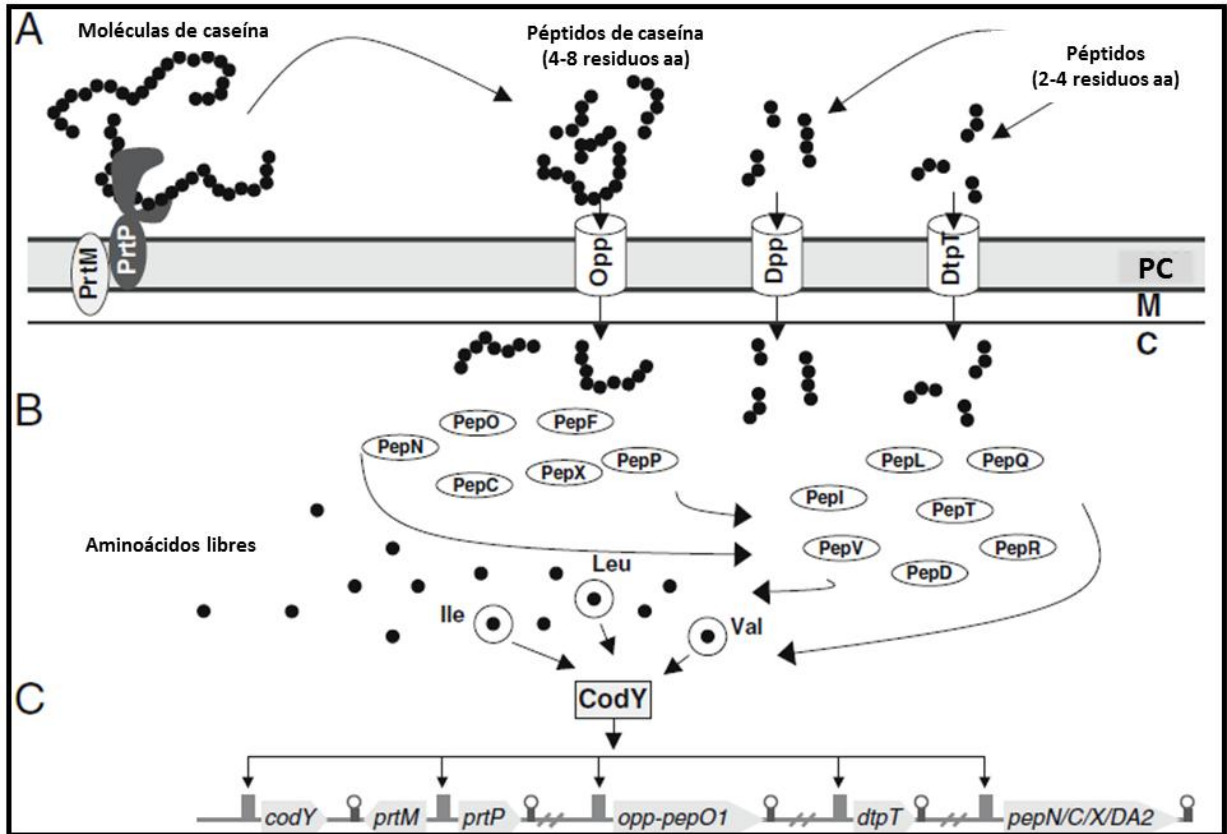


Figura 1. Modelo general del funcionamiento y regulación del sistema proteolítico para la hidrólisis de caseína en *Lactococcus lactis*. (Savijoki *et al.* 2006). **A.** *PrtP*, Proteasa unida a pared, *Opp*, Oligopéptido permeasa, *DtpT*, Transportador de di- y tripéptidos por unión iónica y *Dpp* que es un transportador para péptidos que van de 2 a 9 aminoácidos. **B.** Peptidasas intracelulares: *PepO* y *PepF* son endopeptidasas, *PepN/PepC/PepP* aminopeptidasas generales, X-prolil dipeptidil aminopeptidasa *PepX*, tripeptidasa *PepT*, prolidasa *PepQ*, prolinasa *PepR*, prolin iminopeptidasa *PepI*, dipeptidasas *PepD* y *PepV*. **C.** El represor transcripcional *CodY* es sensible a la concentración de aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina), estos residuos sirven como cofactores de *CodY* para la represión de la expresión de los genes que comprenden al sistema proteolítico en *L. lactis*.

## Proteasas unidas a pared (CEP)

Las proteasas unidas a pared de las BAL, típicamente son sintetizadas como zimógenos de un tamaño aproximado de 2 000 aminoácidos (MW ~180-190 kDa), generalmente son del tipo serin-proteasas y están formadas por diferentes dominios funcionales (Fernández-Espla *et al.* 2000; Sienzen, 1999) [Fig 2]. Partiendo del extremo N terminal las CEPs contienen: un predominio (PP) que corresponde un péptido señal (~40 residuos) requerido para la secreción y una pro-secuencia (~150 residuos) que es removida por un proceso autocatalítico; el dominio catalítico (PR) (~ 500 residuos) que es del tipo serin proteasa; un dominio de inserción (I) (~150 residuos) que posiblemente modula la especificidad de la proteasa por el sustrato; el dominio A (~400 residuos) de función desconocida; el dominio B (~500 residuos) que posiblemente está involucrado en la estabilización de la actividad y especificidad de la CEP; el dominio hélice (H) (~200 residuos) sólo encontrado en las CEP de *L. lactis*, *L. paracasei* y *S. thermophilus* y del que solo se sabe está involucrado en el posicionamiento de los dominios A y B fuera de la célula. Un dominio hidrofílico W (~100 residuos) que funciona como un espaciador de pared celular. En *L. paracasei* y *S. thermophilus* el dominio W va seguido de un dominio de anclaje (AN) que contiene un péptido de localización típico de proteínas de membrana de bacterias Gram positivas (Navarre y Schneewind, 1994).

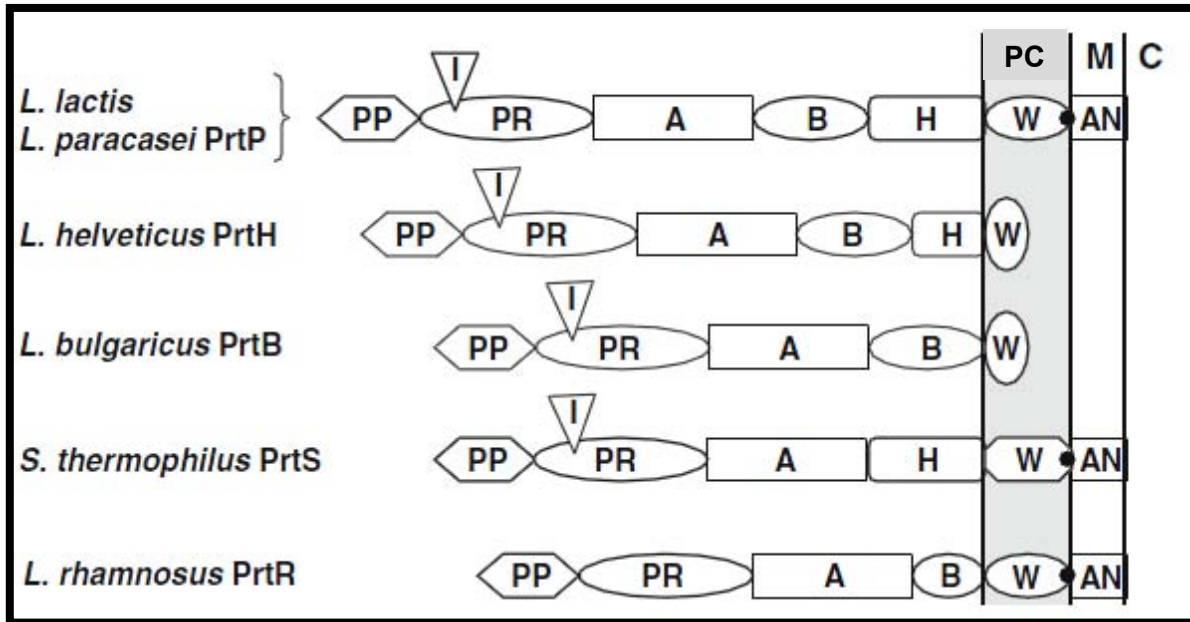


Figura 2. Esquema de las Proteasas unidas a pared de diferentes cepas de BAL (modelo según Sienzen 1999). *PC*, Pared celular, *M* membrana celular, *C* citoplasma, *PP* predominio, *PR* dominio catalítico, *I* dominio de inserción, *A* dominio A, *B* dominio B, *H* dominio de hélice, *W* dominio espaciador de pared celular y *AN* dominio de anclaje.

### Sistemas de transporte de péptidos

Posterior a la degradación de la caseína por parte de las CEPs, el siguiente paso consiste en el transporte de los péptidos generados al interior de la célula, por medio de la acción de los sistemas de transporte de péptidos y oligopéptidos (Opp). Este sistema está compuesto por una serie de proteínas pertenecientes a una súper familia de transportadores de unión a ATP (transportadores ABC) y son los responsables de mediar la entrada de los péptidos obtenidos de la caseína degradada (Higgins, 1992).

Algunos otros transportadores que se han identificado en cepas de *L. lactis* funcionan a través de una fuerza motriz de protones para el transporte de

dipéptidos/tripéptidos, Dtpt y de pequeños péptidos, Dpp (Hagting *et al.* 1994; Foucaud *et al.* 1995).

## Peptidasas intracelulares

Después de la captación celular de los péptidos derivados de la caseína, éstos son degradados por la acción de peptidasas con diferentes especificaciones de acción (Kunji *et al.* 1996) [Tabla 2].

Tabla 2. Resumen general de los tipos de peptidasas identificadas en BAL (GenBank/UniProt).

Peptidasa		kDa	Estructura	Tipo	Cepas de donde se han identificado
Aminopeptidasa	PepC	~ 50	Hexámero y tetrámero	C	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i>
Aminopeptidasa	PepN	~ 95	Monómero	M	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. casei</i> , <i>S. thermophilus</i>
	PepA	~ 40	Multímetro	M	<i>L. lactis</i>
XPDAP	PepX	~ 90	Monómero y dímero	S	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. casei</i> , <i>S. thermophilus</i> ,
Dipeptidasa	PepD	~ 53	Octámero	C	<i>L. helveticus</i>
Dipeptidasa	PepV	~ 51	Monómero	M	<i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. sake</i> , <i>L. sanfrancisco</i> , <i>L. lactis</i>
Pro- iminopeptidasa	PepI	~ 34	Dímero y trímero	S	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. helveticus</i>
Prolidasa	PepQ	~ 41	Monómero y dímero	M	<i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i>
Prolinasa	PepR	~ 35	Dímero y tetrámero	S	<i>L. helveticus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. curvatus</i> ,
	PepL	~ 35	?	S	<i>L. delbrueckii</i>
	PepP	~ 43	Monómero	M	<i>L. lactis</i>
Tripeptidasa	PepT	~ 50	Dímero	M	<i>L. lactis</i>
Endopeptidasa	PepE	~ 52	?	C	<i>L. helveticus</i>
	PepG	~ 50	?	C	<i>L. delbrueckii</i>
Endopeptidasa	PepO	~ 70	Monómero	M	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i>
Endopeptidasa	PepF	~ 70	Monómero	M	<i>L. lactis</i>

M Metalopeptidasa, C cisteínopeptidasa y S serinopeptidasa.



Las peptidasas intracelulares principalmente son aminopeptidasas generales (PepN y PepC), que junto con las X-prolil-dipeptidil-aminopeptidasas (PepX) son las primeras enzimas en actuar sobre los oligopéptidos recién ingresados. Ninguna de estas enzimas puede hidrolizar caseína intacta pero poseen la habilidad de hidrolizar los enlaces péptidicos internos de los péptidos derivados de la degradación de la caseína. Posteriormente los di/tripeptidos generados por la acción de las peptidasas anteriores, son el siguiente objetivo de las peptidasas especializadas en cortar los diferentes tipos de di/tripéptidos (Kunji *et al.* 1996).

### **Sistema proteolítico de BAL relacionado con estrés**

Las respuestas celulares al estrés, incluyen la rápida y transitoria inducción de actividad proteolítica causada generalmente por los cambios en las condiciones del medio de cultivo. Sabiendo que varias de las proteasas inducidas por estrés, son capaces de degradar la caseína en ensayos *in vitro* (Katayama-Fujimura *et al.* 1987; Laskowska *et al.* 1996), se podría especular que algunas de estas proteínas desempeñan un papel relevante en las fermentaciones lácticas.

### **Regulación del sistema proteolítico**

Las BAL son propensas a responder a los cambios en la disponibilidad de nitrógeno del medio, mediante la regulación de su sistema proteolítico para poder asegurar un equilibrio adecuado de nitrógeno en la célula. Se ha sugerido que di o tripéptidos con residuos hidrofóbicos, actúan como moléculas efectoras en la regulación transcripcional del sistema de transporte de oligopéptidos y en consecuencia a todo el sistema proteolítico en *L. lactis* (Kunji *et al.* 1995, 1996; Detmers *et al.* 1998).

En general, los mecanismos de regulación del sistema proteolítico en lactobacilos han sido muy poco estudiados. La concentración de péptidos en el medio de cultivo parece tener un efecto de control en la biosíntesis de proteasas de pared en especies como *L. helveticus* y *L. rhamnosus* (Hebert *et al.* 2000; Pastar *et al.* 2003). También se sabe que factores ambientales como la concentración de oxígeno, pueden afectar la expresión de ciertos genes de peptidasas. A la fecha solo se ha podido identificar con certeza una proteína reguladora, PepR1 de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 7290, que controla directamente la expresión de genes pertenecientes al sistema proteolítico (*pepQ*, *pepX*, y *brnQ*) (Stucky *et al.* 1996; Schick *et al.* 1999).

### **Aspectos tecnológicos de la proteólisis generada por BAL**

La proteólisis está considerada como uno de los procesos bioquímicos más importantes en el proceso de manufactura de diversos productos lácteos fermentados (Fox, 1989). Por ejemplo, en la elaboración del queso, la proteólisis de la caseína es fundamental debido a que los aminoácidos resultantes de la proteólisis son los principales precursores de compuestos que brindan sabor y aroma, tales como alcoholes, aldehídos, ácidos orgánicos, ésteres y compuestos azufrados (Smith *et al.* 2005). Adicionalmente, la autólisis de las BAL, es otro elemento importante en el proceso de elaboración de productos fermentados de la leche, ya que es así como se liberan las peptidasas intracelulares al medio que son un prerrequisito en la formación de ciertas características organolépticas (Crow *et al.* 1995).

Además de la importancia de las enzimas proteolíticas de BAL en las propiedades sensoriales del producto final, ciertas cepas de BAL se sabe que contribuyen a la liberación de péptidos bioactivos, que se cree que promueven la salud más allá de

la nutrición básica (Pihlanto y Korhonen, 2003; Meisel, 2004). Las moléculas de caseína en la leche son de particular interés ya que en su secuencia se incluyen péptidos bioactivos que son liberados por proteólisis. A la fecha, algunas BAL atribuidas con dicha actividad incluyen cepas como *L. helveticus* CP790, *L. rhamnosus* GG, *L. bulgaricus* SS1, y *L. lactis* subsp. *cremoris* FT4 (Gobbetti *et al.*, 2002). Varios informes indican que los péptidos bioactivos, además de existir naturalmente en quesos madurados y otros productos fermentados, también pueden ser producidos *in vivo* después de la ingesta de proteínas de la leche (Meisel, 2004). La fabricación de estos péptidos a escala industrial para su uso como suplementos dietéticos y preparados farmacéuticos, ha recibido un gran interés en los últimos años (Korhonen y Pihlanto 2003; Meisel, 2004).

En fermentaciones vegetales, como las de masas de cereales, la degradación de proteínas durante la fermentación depende principalmente de las enzimas propias del cereal (Gänzle *et al.* 2008). En la elaboración del pan, por ejemplo, los eventos proteolíticos durante la fermentación proporcionan los sustratos necesarios para el crecimiento microbiano y la conversión de aminoácidos a compuestos precursores de sabor y metabolitos antifúngicos (Gobbetti *et al.* 1996; Thiele *et al.* 2002). La acidificación y la acumulación de tioles, principalmente glutatión que es liberado por la reducción de su forma oxidada, aumentan la solubilidad de las proteínas del gluten y por lo tanto su susceptibilidad a la degradación enzimática (Thiele *et al.* 2004; Jänsch *et al.* 2007). Con ésta acidificación cambia el pH de la masa al pH óptimo de las aspártico proteasas, que son el tipo principal de proteasas en granos de trigo y centeno (Bleukx *et al.*, 1998; Brijs *et al.*, 1999). La proteólisis primaria depende de las proteasas endógenas del cereal, mientras que los lactobacilos convierten los péptidos a aminoácidos por medio de peptidasas intracelulares específicas de cada cepa (Gänzle *et al.* 2008).

Así como en los productos fermentados de la leche, en las masas fermentadas también se han encontrado péptidos y aminoácidos con actividades antioxidantes, antihipertensivas o que ayudan a prevenir el cáncer (Gobbetti, 2012).

### ***Lactobacillus amylovorus***

*Lactobacillus amylovorus* es una bacteria Gram positiva, no móvil, no formadora de esporas, catalasa negativa, de metabolismo homofermentativo, anaerobia facultativa, capaz de metabolizar el almidón crudo, excreta una  $\alpha$ -amilasa y fue aislada de restos de maíz (Nakamura, 1981).



Figura 3. *Lactobacillus amylovorus*, 100x, Tinción Gram

Esta bacteria es parte de la microbiota intestinal de porcinos y se ha probado como probiótico de lechones destetados, observándose que el empleo de *L. amylovorus* impacta sobre la calidad de la carne de estos animales, al mejorar el perfil de ácidos grasos insaturados en el músculo de los porcinos (Ross, 2012).

Dentro del genoma de *L. amylovorus* están reportadas diferentes tipos de proteasas que en su mayoría son aminopeptidasas y peptidasas, [Tabla 3] así

como proteasas putativas. Esta bacteria fue originalmente aislada por su capacidad amilolítica y es probablemente la razón por la que al día de hoy no hay estudios sobre la importancia de la peptidasas en su fisiología, condiciones de producción de las enzimas o características bioquímicas.

Tabla 3. Enzimas proteolíticas reportadas en el genoma de *Lactobacillus amylovorus* cepa GRL 112 y 118 (GenBank/UniProt).

Nombre	Aa	Masa(Da)	Localización	Actividad	Función
Subunidad proteolítica de la proteasa Clp dependiente de ATP (Endopeptidasa Clp)	194	21,327	Citoplasma	Serín proteasa, endopeptidasa.	Escinde proteínas en varios péptidos en procesos que requieren hidrólisis de ATP. Degradación de proteínas mal plegadas.
ATP-dependent protease ATPase subunit HslU (Unfoldase HslU)	465	52,553	Citoplasma	ATPasa; Unión a ATP; peptidasa, actúa sobre péptidos con L-aminoácidos.	Subunidad de ATPasa del complejo de degradación del proteosoma; esta subunidad también presenta actividad de chaperona.
Subunidad de la proteasa HslV dependiente de ATP	174	18,686	Citoplasma	Unión a ión metálico; endopeptidasa del tipo treonina.	Subunidad proteasa del complejo de degradación del proteosoma.
Subunidad ClpX de unión a ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP	423	46,89	Citoplasma	Unión a ATP; peptidasa; unión a Zn	Componente específico dependiente de ATP de la proteasa Clp. direcciona a la proteasa a sustratos específicos. Puede actuar como chaperona en ausencia de ClpP.
Homólogo de la proteasa HtpX	295	32,765	Membrana Celular	Metalopeptidasa; Unión a Zn	
Subunidad de unión ATP de la proteasa Clp	709	78,817		Unión a ATP; peptidasa	

Nombre	Aa	Masa(Da)	Localización	Actividad	Función
Subunidad ClpE de unión a ATP de la proteasa Clp	682	75,955	Citoplasma	Unión a ATP; peptidasa	
Proteasa de la familia de proteínas con amino terminal CAAX	272	29,711	Citoplasma	Peptidasa	
Proteasa putativa	404	46,198	Citoplasma	Metalopeptidasa	
Proteasa putativa	416	47,53	Citoplasma	Metalopeptidasa	
Serin proteasa de choque térmico	414	42,585	Citoplasma	Endopeptidasa del tipo serinproteasa	
Serin proteasa	282	31,777	Citoplasma	Peptidasa	
Peptidasa T	427	48,246	Citoplasma	Metalopeptidasa de unión a Zn; aminopeptidasa de tripéptidos	
Peptidasa T	414	46,87	Citoplasma	Metalopeptidasa de unión a Zn; aminopeptidasa de tripéptidos	
Pirrolidina carboxilato peptidasa (5 oxoprolil peptidasa) (Piroglutamato peptidasa I)	200	21,628	Citoplasma	Cisteín peptidasa; piroglutamil peptidasa	Remueve 5-oxoprolina de los penultimos aminoácidos de la cadena excepto la L-prolina.
X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase	793	90,638	Citoplasma	Dipeptidil proteasa; serin proteasa	Remueve dipeptidos del extremo N-terminal de polipéptidos que no están sustituidos.
Metaloproteasa de Zn FtsH dependiente de ATP	722	79,137	Membrana Celular	ATPasa; Unión a ATP; Metalopeptidasa con unión a Zn	Juega un papel en el control de calidad de las proteínas integrales de membrana.
Metionin aminopeptidasa (MAP) (MetAP)	275	30,867	Citoplasma	Metalloaminopeptidasa	Remueve metionia del extremo N-terminal de proteínas nacientes.

Nombre	Aa	Masa(Da)	Localización	Actividad	Función
Aminopeptidasa G	437	50,468	Citoplasma	Aminopeptidasa; Cisteín endopeptidasa	
Aminopeptidasa C	449	51,63	Citoplasma	Aminopeptidasa; Cisteín endopeptidasa	
Aminopeptidasa E	438	50,083	Citoplasma	Aminopeptidasa; Cisteín endopeptidasa	
Aminopeptidasa putativa	438	50,39	Citoplasma	Aminopeptidasa; Cisteín endopeptidasa	
Prolin iminopeptidasa (PIP) (Prolil aminopeptidasa)	293	33,759	Citoplasma	Aminopeptidasa	Remueve prolina del extremo N-terminal de los polipéptidos.
Prolin iminopeptidasa (PIP) (Prolyl aminopeptidasa)	305	35,12	Citoplasma	Aminopeptidasa	Remueve prolina del extremo N-terminal de los polipéptidos.
Péptido señal peptidasa de lipoproteína (Peptido señal peptidasa II)	154	17,515	Membrana Celular	Aspartil endopeptidasa	Cataliza específicamente la hidrólisis del péptido señal de prolipoproteínas.
D-alanil-D-alanin carboxipeptidasa	432	47,237	Citoplasma	Serin carboxipeptidasa	
Aminopeptidasa N	844	95,802	Citoplasma	Metal aminopeptidasa de unión a Zn	
Aminopeptidasa I Metaloproteasa de Zinc	360	39,966	Citoplasma	Aminopeptidasa; metaloproteasa de unión a Zn	
Proteasa putativa	219	25,016	Citoplasma		
Proteína de infección abortiva	266	30,325	Citoplasma		
Aminopeptidasa N	504	57,212	Citoplasma	Aminopeptidasa; metaloproteasa de unión a Zn	
Proteína de infección abortiva	99	11,303	Citoplasma		
Prepilin peptidasa Tipo IV	227	26,034	Citoplasma	Aspartil endopeptidasa	

## JUSTIFICACIÓN

Pese a que se cuenta con gran información acerca del sistema proteolítico de diferentes especies de BAL, que sirven principalmente como cultivos iniciadores en la producción de alimentos fermentados lácteos como el yogurt y el queso, poco se sabe acerca del sistema proteolítico de lactobacilos aislados de fermentaciones vegetales.

La información obtenida permitirá aumentar nuestro conocimiento de la fisiología de este microorganismo y poder a futuro descubrir potenciales aplicaciones de las proteasas encontradas.

## OBJETIVOS

Identificar la presencia de proteasas en la bacteria *Lactobacillus amylovorus*.

Objetivos particulares:

- Localizar las proteasas que expresa *L. amylovorus*.
- Caracterizar la actividad proteasa encontrada.
- Identificar por secuenciación la(s) proteasa(s) encontrada(s)



## MATERIALES Y MÉTODOS

- Características y conservación del microorganismo.

Microorganismo	Características
<i>Lactobacillus amylovorus</i> NRRL B-4540 (Agriculture Reserch Service culture collection, U.S. Deparment of Agriculture, Peoria, Illinois)	Cepa productora de la alfa-amilasa aislada de desperdicios de maíz fermentado de USA (Nakamura 1981).

*L. amylovorus* se conservó en glicerol al 40% a -70°C.

- Selección del medio de cultivo y crecimiento de *L. amylovorus*.

La activación de la cepa se realizó inoculando al 1% a *L. amylovorus* a partir de un tubo de conservación (glicerol 40%), en medio MRS-almidón, incubando a 29 °C durante 24 horas. Posteriormente se realizaron dos cultivos de 12h para obtener el pre-inóculo, bajo las mismas condiciones de reactivación.

Se evaluaron 6 medios de cultivo (Tabla 4) para probar la producción de proteasas, todos los medios tenían almidón al 2% como fuente de carbono y fueron inoculados al 1% con el preinóculo descrito. Se incubaron a 29°C y se monitoreó el crecimiento cada cuatro horas por densidad óptica (DO) a 600 nm.

Tabla 4. Medios de cultivo empleados para la producción de proteasas en *Lactobacillus amylovorus*.

Medio de cultivo	Fuente de nitrógeno
1. MRS-almidón (Mendel, O., Tesis UNAM 2010)	Peptona pancreática 1% Extracto de carne 0.5% Extracto de levadura 0.5% Citrato de Amonio 0.217 %
2. Medio definido (Castillo, Tesis en trámite)	Extracto de levadura 0.12%
3. Medio mínimo c/caseína 0.2%	Caseína 0.2%

Medio de cultivo	Fuente de nitrógeno
4. Medio mínimo c/citrato de Amonio	Citrato de amonio 0.3%
5. Medio mínimo c/citrato de Sodio	

La composición de los medios se describe en el anexo II.

Para la extracción de proteínas se seleccionaron los tiempos de 8, 12, 24, 60 y 96 h de fermentación, como tiempos representativos de las diferentes etapas de desarrollo en la curva de crecimiento, que ya había sido reportada en estudios previos de laboratorio (Mendel, O., Tesis UNAM 2010).

- Análisis de proteínas extracelulares

El sobrenadante de las muestras a los tiempos seleccionados fue concentrado 50 veces por diafiltración (corte 10 kDa), sublimación y precipitación con TCA/acetona (10%/90%). A las muestras concentradas se les adicionaron buffer de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, 2% SDS, 2.5 % glicerol, 0.5%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.5% de azul del bromofenol) al 2X, se incubaron a ebullición por 5 min y se analizaron en SDS-PAGE y Zimograma para identificar las bandas de proteínas presentes en el sobrenadante y la actividad proteolítica sobre caseína.

- Extracción de proteínas asociadas a pared celular

Se tomaron las células cosechadas de cada uno de los tiempos seleccionados y se lavaron tres veces con buffer Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 0.15M, Sacarosa 0.6M; posteriormente cada pellet de células se resuspendió en 10 ml de la solución de extracción 1: LiCl 1 M, Tris 0.1 M, NaCl 0.015 M, MgCl<sub>2</sub> 0.05 M, lisozima 40  $\mu$ g/ml (Rojas *et al.* 2002) y se incubó 1 h a 4 °C. Se separó el sobrenadante por centrifugación a 10 000 rpm, 4°C, 10 min y se almacenó a 4°C, las células se re-suspendieron nuevamente ahora en 10 ml de la solución de

extracción 2: Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 10mM, NaCl 10mM, SDS 2% y se incubaron 10 min a ebullición y en agitación vigorosa. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 10 000 rpm, 4°C, 10 min y se almacenó a 4°C (García-Cano *et al.* 2011).

- Extracción de proteínas intracelulares

Las células obtenidas de la extracción de proteínas asociadas a pared fueron lisadas con dos tratamientos diferentes:

1) Las células se resuspendieron en 10 ml de una solución con lisozima 10 mg/ml en buffer PBS, y se incubaron 1 h a 37°C. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 10 000 rpm, 4°C, 10 min y se almacenó a 4°C. Mientras que las células se sometieron a un choque osmótico con agua helada. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 10 000 rpm, 4°C, 10 min y se almacenó a 4°C.

2) Se realizó una sonicación de las células recuperadas, resuspendiéndolas en 1.0 ml de buffer PBS y aplicando 3 ciclos de 20 segundos. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 10 000 rpm, 4°C, 10 min y se almacenó a 4°C.

- Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se analizó tanto *in vitro* como *in situ*.

Actividad *in vitro*:

➤ Determinación de la actividad proteolítica usando caseína como sustrato (Current Protoccols in Food Analytical Chemistry).

En un microtubo de 1.5 ml se colocaron 10 µl del extracto proteico con 90 µl de caseína al 1%, la mezcla de reacción se incubó por 10 min a 37°C en

agitación suave (300 rpm). Pasado el tiempo de incubación la reacción se detuvo agregando 100  $\mu$ l de ácido tricloro acético (TCA). La muestra se reposó 20 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 8 000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. El contenido de proteína soluble se midió por el método de Bradford, usando una curva patrón de albúmina sérica bovina como estándar. Se usa un blanco de reacción en donde se agrega el ácido antes de agregar el sustrato (caseína) para precipitar a la enzima. El cambio de absorbancia entre el blanco y la muestra se relaciona con la curva estándar de proteína que indica la cantidad liberada o hidrolizada por la proteasa en 10 min.

➤ Pierce Protease Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC ®)

De acuerdo con las instrucciones del kit, en un pocillo de microplaca se colocaron 100  $\mu$ l de caseína succinilada con 50  $\mu$ l de extracto proteico, esta mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 20 minutos, posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ l de ácido trinitrobencensulfónico (TNBSA) al 5% para detener la reacción y se dejó incubando por 20 minutos a temperatura ambiente antes de medir la absorbancia a 450 nm en el lector de placas. Se usa un blanco de reacción en donde se agrega el ácido antes de agregar el sustrato (caseína) para precipitar a la enzima. El cambio de absorbancia a 450 nm ( $\Delta A_{450}$ ) se compara contra una curva estándar de  $\Delta A_{450}$  contra una concentración de enzima, para calcular unidades relativas respecto a la proteasa estándar que en este caso fue tripsina.

### Actividad *in situ*:

La actividad se identificó en zimogramas SDS-PAGE con caseína 0.05% copolimerizada con la acrilamida, como sustrato para las proteasas. Después de correr el gel, se lavó con una solución de tritón al 2.5% en buffer Tris-HCl 0.04 M pH 7.6, posteriormente se realizaron 3 lavados con buffer Tris-HCl 0.04M pH 7.6, y se incubó toda la noche en este mismo buffer con los cofactores  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$  2mM a 4°C. El gel se tiñó con azul de Coomassie por 30 min (0.1 % Coomassie R-250, Etanol, 45%, 10% Ácido acético y 45% agua v/v) y se destiñó (20% Etanol, 10% Ácido acético glacial y 70% agua v/v) hasta observar las bandas de hidrólisis de caseína en el gel (Naggie *et al.* 1997).

- pH óptimo

Para determinar el intervalo de pH y el pH óptimo en el cual se presenta la actividad proteolítica, se llevaron a cabo zimogramas con 0.05% de caseína. Después de la separación de proteínas, los geles se incubaron con diferentes amortiguadores a distinto pH: buffer citrato-fosfato 50 mM (pH 3, 4, 5 y 6), buffer Tris 50 mM (pH 7.6 y 8) y buffer Glicina-NaOH (pH 9 y 10), adicionándoles  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$  2 mM durante toda la noche a 4°C y finalmente se tiñeron con azul de Coomassie (Negrete-Abascal *et al.* 1999).

- Estabilidad a la temperatura

Para determinar la estabilidad a la temperatura de las proteasas, previo a la electroforesis, las muestras se mantuvieron a diferentes temperaturas durante 10 min (4, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C) Finalmente los geles se trataron con el procedimiento normal del zimograma antes mencionado (Negrete-Abascal *et al.* 1999).

- Efecto de inhibidores

Para poder determinar el tipo de proteasa(s) de que se trataba(n), las muestras se incubaron a temperatura ambiente por media hora con diferentes inhibidores de proteasa: EDTA 20, 50 y 100 mM, PMSF 5 mM, Coctel de inhibidores de proteasa de uso general SIGMA-ALDRICH® (AEBSF, aprotinina, clorhidrato de bestatina, N-(trans-Eoxysuccinil)-L-leucina, pestatina A, hemisulfato de leupeptina) en las proporciones: 1:100, 1:50, 1:20, 1:10. Después las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE para zimograma con caseína al 0.05%, incubados en amortiguador con el pH óptimo de actividad que derivó de la prueba previa de efecto del pH, más cada uno de los agentes inhibidores a la misma concentración. Para comprobar el efecto de los agentes quelantes se agregaron  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$  2 mM durante el periodo de incubación del gel en el buffer de renaturalización, para reactivar la proteasa (Negrete-Abascal *et al.* 1999).

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

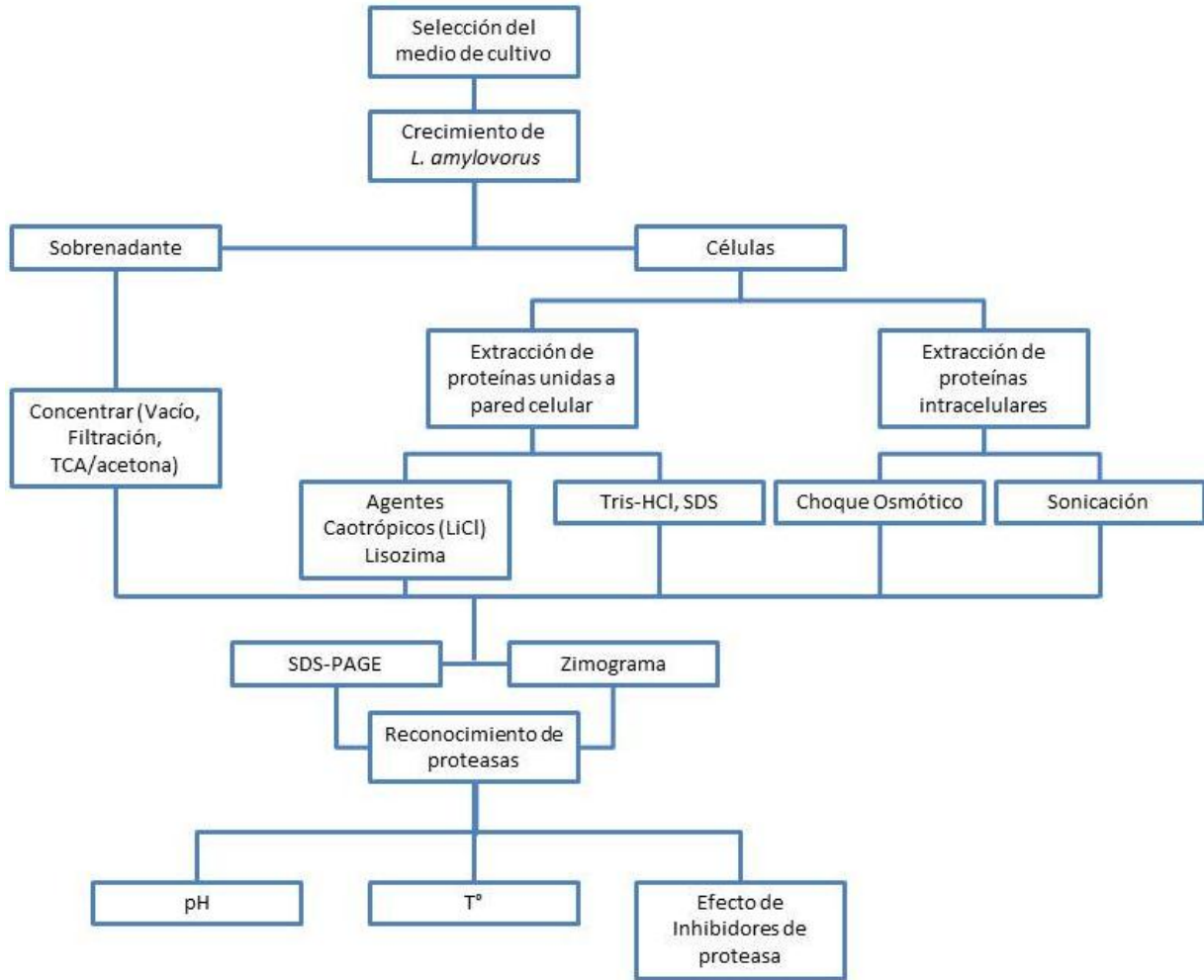


Figura 4. Diagrama experimental del proceso para la extracción y análisis de proteasas de *L. amylovorus*.

## RESULTADOS

- Selección del medio de cultivo

Los resultados obtenidos al crecer a *L. amylovorus* en diferentes medios de cultivo (Tabla 4), se muestran en la Figura 5. En medio MRS-almidón, *L. amylovorus* alcanza a las 12 horas una  $DO_{600}$  mayor a 7, punto alrededor del cual se detiene el crecimiento; dicho comportamiento fue muy similar en el medio definido, aunque solo se alcanzó una  $DO_{600}$  de 3, probablemente debido a la menor concentración de péptidos necesarios para el crecimiento de la bacteria.

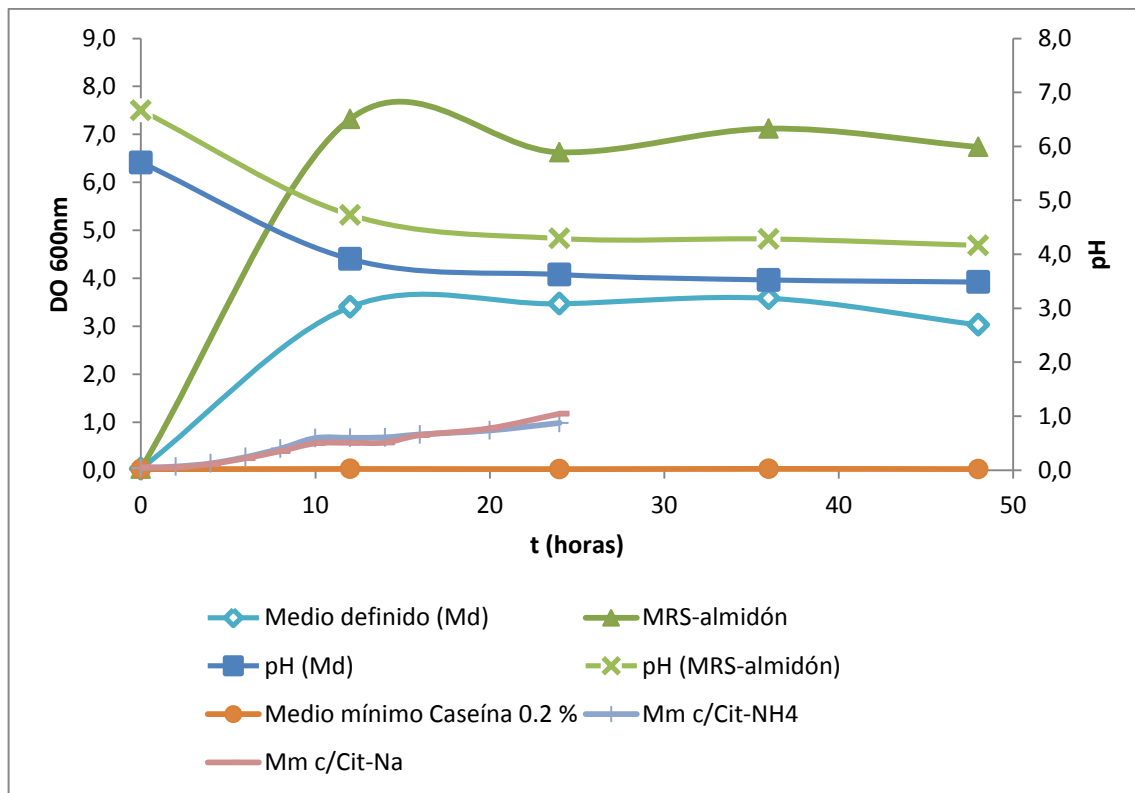


Figura 5. Crecimiento de *L. amylovorus* en medio definido (Md), medio mínimo (Mm) suplementado con caseína, medio mínimo (Mm) suplementado con fuentes inorgánicas de nitrógeno (citrato de amonio), medio MRS-almidón y seguimiento del pH en los medios MRS-almidón y Medio definido.



Con el objetivo de inducir la expresión de proteasas, se creció también en medio mínimo suplementado con caseína al 0.2%; sin embargo no se observó crecimiento alguno, lo cual ya sugería que la bacteria no contaba con proteasas extracelulares. Al suplementar con citrato de amonio y de sodio, el crecimiento fue un poco mayor que al suplementarlo con caseína, pero mucho menor en comparación con el crecimiento de la bacteria en medio definido.

El pH en medio definido y medio MRS-almidón, tuvo una caída de 2 puntos aproximadamente, llegando a valores circundantes a 4.0. En los otros medios de cultivo no se midió el pH ya que no hubo crecimiento alguno para el caso del medio mínimo con caseína al 2% y en los casos de medio mínimo con citrato de amonio y de sodio, es posible que se hubiera dado un poco de hidrólisis del almidón, ya que se observó un crecimiento muy pequeño del microorganismo.

Los resultados observados en las extracciones proteicas, así como de la identificación de la actividad proteolítica en zimograma, de los diferentes tiempos seleccionados fueron prácticamente los mismos (anexo I).

- Localización de la actividad proteolítica

De la curva obtenida en medio MRS, se seleccionaron los tiempos de 8, 12, 24, 60 y 96 horas (éstos dos últimos tiempos no se muestran en la curva de crecimiento), como tiempos representativos de las diferentes fases de crecimiento. Se corrieron geles SDS-PAGE y zimogramas de caseína al 0.05%, para conocer el perfil de proteínas extraídas y observar actividad de proteasas.

Los sobrenadantes de cada tiempo se concentraron 50 veces por vacío, diafiltración y precipitación TCA/Acetona. No se observaron bandas en los geles de electroforesis después de teñirlos con azul de Coomassie y tampoco se observaron bandas de actividad proteolítica en los zimogramas.

En el caso de la extracción de proteínas asociadas a membrana para todos los tiempos, se observaron diversas bandas de proteína, pero no se observa actividad proteolítica con ninguno de los dos métodos de extracción empleados (anexo I).

Cuando las proteínas intracelulares se extrajeron por choque osmótico, tampoco se observó actividad proteolítica. Sin embargo en la extracción por sonicación celular, se observa un halo de actividad proteolítica por debajo de los 30 kDa (figura 6, sección señalada en rojo).

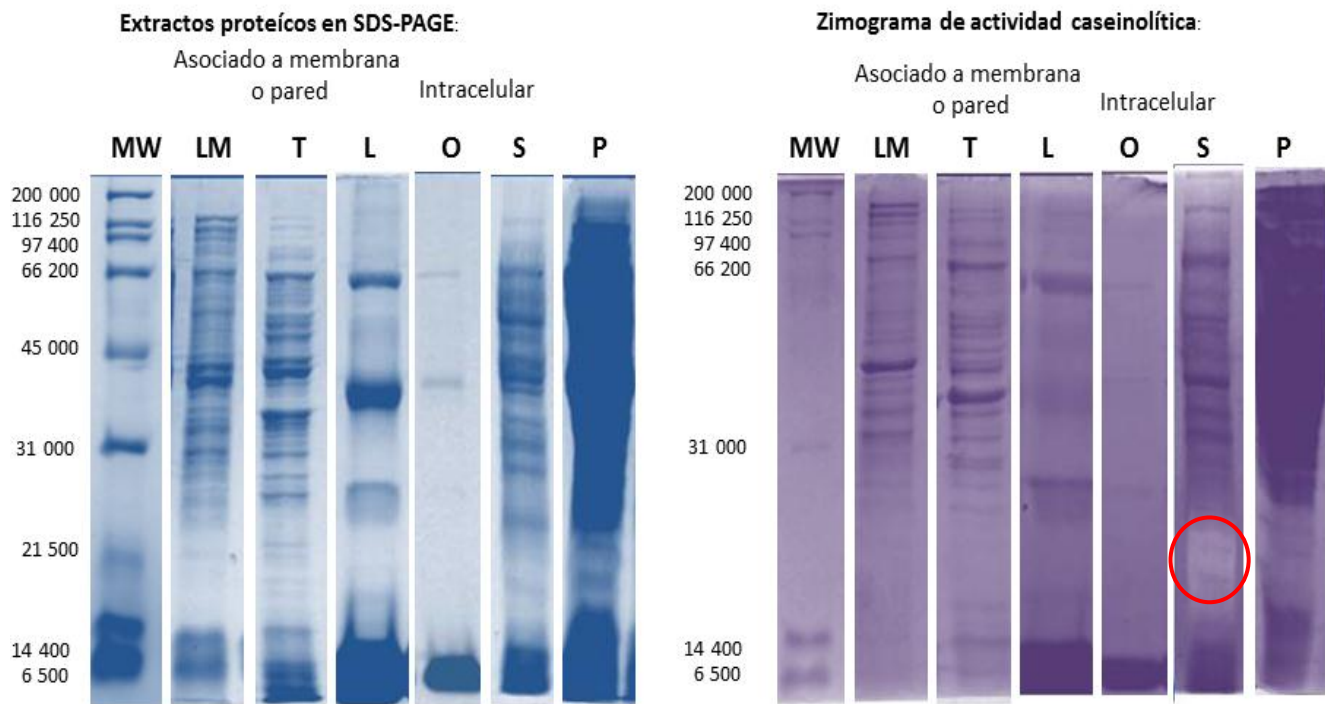


Figura 6. Localización de la actividad proteolítica en los diferentes extractos celulares (12 horas). **LM:** LiCl 1M, Tris 0.1M, NaCl 0.015M, MgCl<sub>2</sub> 0.05M, Lisozima 40µg/ml; **T:** Tris-HCl 10mM, pH 8, EDTA 10mM; **L:** Lisozima 10mg/ml; **O:** Choque osmótico con agua helada; **S:** Sonicación en PBS; **P:** Pellet.

Para corroborar que se trataba de una proteasa, se realizó una electroelución de las bandas sospechosas de ser proteasas y con esta muestra se corrió un nuevo zimograma, corroborando la presencia de actividad proteolítica (figura 7).

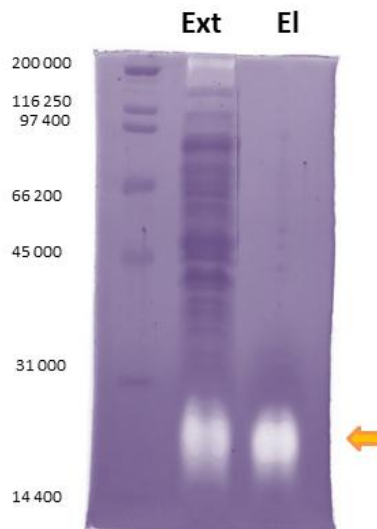


Figura 7. Zimograma de actividad proteolítica con caseína 0.05% (12 horas). **Ext:** extracto sonicado, **El:** muestra electroeluída. La flecha señala la zona de actividad proteolítica.

- Pruebas de actividad *in vitro*

No se obtuvo un resultado exitoso en los ensayos *in vitro* que se realizaron para la determinación de actividad proteolítica del extracto proteico, ya que las absorbancias entre los tubos blanco y los analitos, fueron prácticamente iguales, por lo que no se podía entablar una diferencia que indicara el cambio de concentración de aminoácidos y péptidos pequeños solubles, producto de la proteólisis.

- Caracterización de las proteasas encontradas

La actividad proteolítica de la banda detectada fue observada a los distintos valores de pH probados (figura 8). Por la intensidad de la banda de hidrólisis se observó que a pH ácido la actividad proteolítica es mayor que a valores de pH alcalinos.

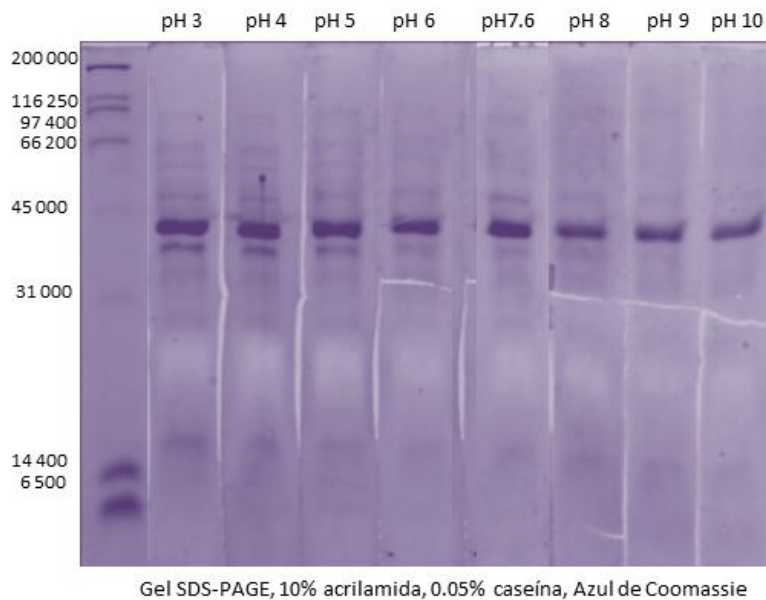


Figura 8. Efecto del pH en la actividad proteolítica. Buffer Citrato-Fosfato 50 mM pH 3, 4, 5 y 6; Buffer Tris-HCl 40 mM pH 7.6 y 8; Buffer Glicina-NaOH 50 mM pH 9 y 10.

En cuanto a la estabilidad al calor, se observó que después de incubar las muestras a diferentes temperaturas en un rango de 4 a 80°C, la enzima conservaba su actividad incluso a los 80°C (figura 9).

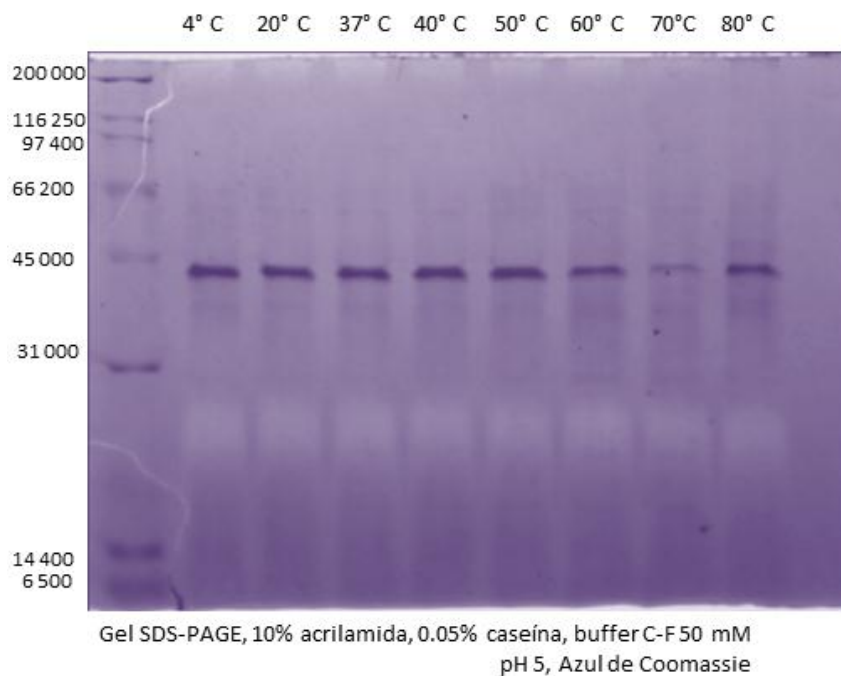


Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica (12 horas). De izquierda a derecha se incrementa la temperatura de incubación de la enzima, previo al corrimiento del gel.

La actividad proteolítica no se vio inhibida completamente por ninguno de los inhibidores empleados, sin embargo, si se observa que a mayor concentración del coctel de inhibidores de proteasa comercial, las bandas de actividad están mejor definidas en el zimograma, que cuando se usan bajas concentraciones, lo que probablemente indica disminución de la actividad.

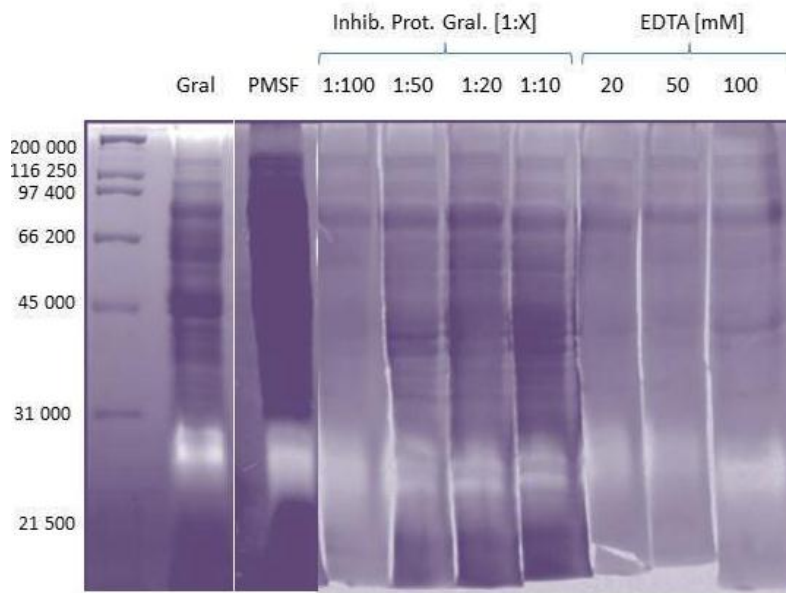


Figura 10. Efecto de los inhibidores de proteasa en la actividad proteolítica (12 horas). Gral: extracto sin inhibidor; PMSF 5 mM; Inh. Prot. Gral [1:X]: proporciones 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10; EDTA: 20 mM, 50 mM y 100 mM.

- Electroforesis Desnaturalizante Bidimensional (SDS-PAGE 2D) y Zimograma en 2D

A partir del extracto proteico obtenido por sonicación se decidió hacer una electroforesis en dos dimensiones para localizar la(s) proteasa(s) encontrada(s) con los resultados anteriores y mandar a secuenciar el spot de proteína correspondiente.

En el zimograma de actividad caseinolítica, se observa un spot de actividad hacia la zona de pH ácido (entre 4 y 5 aproximadamente) y por debajo de los 30 kDa, tal y como se esperaba (figura 11, sección señalada en rojo).



Figura 11. Electroforesis bidimensional en condiciones desnaturalizantes del extracto proteico obtenido por sonicación.

Se seleccionó un solo spot y se mandó al Institut De Recherche Clinique De Montreal (IRCM-Montreal) para su secuenciación.

- Secuenciación de proteínas

De los resultados obtenidos de la secuenciación por MS/MS se lograron identificar 2 proteasas intracelulares que se muestran en la tabla 5. De éstas proteasas, una de ellas (Subunidad proteolítica de la proteasa Clp dependiente de ATP) está reportada con actividad proteolítica sobre caseína (Maurizi, 2012), pudiendo ser la que se observa en los resultados de actividad proteolítica sobre los zimogramas de caseína previamente descritos.

Tabla 5. Proteasas identificadas por secuenciación MS/MS.

Nombre de la proteína	No. Acc	MW (Da)	No. PUI	Secuencia PUI	%C	% Id	pl
Subunidad proteolítica de la proteasa Clp dependiente de ATP	Q88YH9 - CLPP_LA CPL	21,529	5	AYDIYSR SDVQTIVMGMAASMASVLASSGTK FALPNSEILIHQPSGGAQQGQTEIEIVAAEILK INQILADNSGQSVEK LNHDTERDNYLSAQEAK	49	100	4,87
Metaloproteasa de zinc dependiente de ATP, FtsH	C6VKW6 - FTSH_LA CPJ	80,803	2	NVSIQPSGGVYK IPSGVLLEGPPGTGK	4	100	5,61

No. Acc. = Número de acceso (UniProt)

MW = Peso Molecular

No. PUI = Número de Péptido Únicos Identificados

Secuencia PUI = Secuencia de los Péptidos Únicos Identificados

% C = porcentaje de cobertura

% Id = Porcentaje de Identificación

pl = Punto Isoeléctrico teórico



## DISCUSIÓN

Para seleccionar el medio de cultivo del cual se iban a hacer las extracciones de proteínas a analizar, se creció a *Lactobacillus amylovorus* en diferentes medios de cultivo (tabla 4), que contenían diferentes fuentes de nitrógeno para observar el comportamiento en el crecimiento de la bacteria. De acuerdo con la figura 5, *L. amylovorus* no creció en un medio mínimo suplementado con caseína como fuente de nitrógeno, lo cual es indicativo que no cuenta con proteasas extracelulares necesarias para la degradación de macromoléculas como la caseína; este resultado concuerda con que en el genoma reportado para esta bacteria, no se reportan proteasas extracelulares y de las 3 proteasas reportadas que están ancladas a membrana (FtsH, metaloproteasa de Zn dependiente de ATP; Proteasa HtpX, Peptidasa de péptido señal de lipoproteína) (GenBank/UniProt), éstas tienen funciones de recambio y manutención de las proteínas que llegan a formar parte de la membrana celular, más no se encargan de la degradación de proteínas grandes para el suministro de péptidos y aminoácidos a la célula. Esto también iría de acuerdo con lo reportado para las fermentaciones de cereales, donde son las proteasas intrínsecas quienes actúan sobre los sustratos proteicos para la liberación de péptidos que posteriormente pueden ser aprovechados por la microbiota local (Gänzle *et al.* 2008).

Los lactobacilos son bacterias muy exigentes para su crecimiento, por lo que el medio mínimo, además de sales, debe contener cierta cantidad de péptidos indispensables para el crecimiento de la bacteria. Cuando se probó al medio mínimo con citrato de sodio y con citrato de amonio, el microorganismo alcanza apenas un crecimiento de alrededor de 1 unidad de  $DO_{600}$ , mientras que cuando se le suplementa con extracto de levadura alcanza valores de casi 4 unidades de  $DO_{600}$ , corroborándonos el hecho de la necesidad de péptidos en el medio de cultivo para su crecimiento.

El medio MRS-almidón es un medio rico en hidrolizados proteicos (anexo II), en donde *L. amylovorus* tiene un crecimiento que llega a valores de DO<sub>600</sub> superiores a 7.0. En función de este crecimiento, se escogió este medio de cultivo para buscar las proteasas tanto en la fracción extracelular como intracelular.

En general los lactobacilos no producen proteasas extracelulares, pero si expresan un amplio número de proteasas unidas a pared que les confieren una importante habilidad para degradar sustratos proteicos del alto peso molecular, la búsqueda de proteasas extracelulares se hizo principalmente porque en estudios previos en el laboratorio, se había observado en zimogramas de actividad proteolítica del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus amylovorus* crecido en medio MRS-almidón, una zona translúcida en forma de barrido que sugería la presencia de una proteasa en el medio de cultivo (datos no mostrados). Sin embargo, no se encontró actividad proteolítica extracelular ni *in vitro* ni *in situ* usando caseína como sustrato, con ninguno de los métodos probados, ni bajo ningún esquema de concentración de las proteínas (precipitación con TCA/acetona, concentración por diafiltración, concentración por vacío), por lo que solo se tomo como un defecto de la técnica, ya que tampoco era un evento reproducible. Como un control para intentar demostrar que el proceso de precipitación no afecta a la actividad enzimática, se realizó un zimograma de actividad amilolítica y con las 3 técnicas probadas se logró recuperar la actividad que corresponde a la presencia de una alfa-amilasa que el microorganismo excreta al medio.

Es bien sabido que la producción de proteasas ancladas a membrana en los microorganismos se ve influenciada en gran medida por las diferentes variables del proceso de fermentación; variables que pueden llegar a controlar positivamente la producción y sobre-expresión de proteasas en lactobacilos (Gupta, 2002; Potumarthi, 2007). Entre las variables más importantes está el

contenido de carbohidratos en el medio de cultivo, el cual se ha reportado que tiene influencia sobre la actividad de CEPs en algunas especies de lactobacilos termófilos (Schick, 1999, Titgemeyer *et al.*2002) ya que el hecho de que el gen que codifica para la proteína de control de catabolito (CcpA) se transcriba divergentemente con el gen de una prolidasa, sugiere que la expresión de esta proteasa pueda estar regulada por CcpA, vinculando así la utilización de carbono con la proteólisis (Titgemeyer *et al.*2002). En el medio MRS empleado para el crecimiento de *L. amylovorus* el almidón es la única fuente de carbono, del cual se liberan maltosas y glucosas principalmente por la acción de la alfa amilasa de la propia bacteria; estudios sobre el efecto de la utilización de carbohidratos en *Lactobacillus delbrueckii* en la producción de proteasas ancladas a pared, señalan a la maltosa como un catabolito que favorece la actividad proteolítica (Agyei *et al.* 2012), por lo cual resultaría interesante en un futuro hacer experimentos con diferentes fuentes de carbono en el medio de crecimiento de *L. amylovorus* a fin de observar si existe efecto alguno sobre la actividad proteolítica.

Para la identificación de proteasas unidas a la célula, se eligió el uso de LiCl para la extracción de las proteínas de la pared, ya que en un estudio realizado por Agyei *et al.*, (2012) se observó que el uso de agentes caotrópicos como el LiCl combinado con lisozima en una mínima concentración, resulta en una efectiva extracción de proteínas asociadas a la pared y además que las proteasas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* conservan significativamente su actividad. Como no se obtuvieron resultados positivos, también se probó el uso de una concentración alta (10 mg/ml) de lisozima así como el uso de detergentes (SDS 2%) como métodos alternativos de extracción; sin embargo, en ningún caso se observó actividad proteolítica en zimograma, a pesar de que dentro del genoma reportado están 3 proteasas localizadas en la membrana celular. Estas proteasas tienen funciones en el control de calidad de las proteínas que llegan a esta parte de la célula, siendo las mismas proteínas celulares el blanco de éstas proteasas y

por lo tanto es de esperarse que no presenten actividad caseinolítica. Finalmente, la actividad se encontró en un extracto proteico intracelular como un halo de hidrólisis en zimograma, lo que indicaba la actividad de una o más proteasas, cuyo peso se sugería un poco por debajo de los 31 kDa. Esta actividad no pudo ser identificada *in vitro*, es posible que en solución la proteasa no tuviera la conformación adecuada para la hidrólisis de caseína, como si la tiene estando retenida en el gel de poliacrilamida con caseína copolimerizada, por lo que una caracterización parcial se realizó en los geles, donde se observó que la hidrólisis de caseína fue más intensa a pH ácido (4-5) y que era capaz de mantener o recuperar su actividad aún después de ser incubada a 80 °C.

En las pruebas de inhibición realizadas, no se encontró inhibición con ninguno de los inhibidores utilizados; de metaloproteasas (EDTA), serin y cisteín proteasas (PMSF y Coctel de inhibidores de proteasa de uso general SIGMA-ALDRICH®) aunque ciertamente a muy altas concentraciones de inhibidores se puede observar una ligera disminución de la actividad. La falta de inhibición aunada al pH en el que la actividad de la enzima se observa mejor, sugiere que la enzima podría ser del tipo aspartil proteasa, sin embargo esta sugerencia solo esta delimitada por las observaciones en los zimogramas. Con el uso de inhibidores se pudo observar una mejor resolución de las bandas de hidrólisis, revelándose claramente más de una sola banda con actividad proteolítica; esto nos hablaría de la presencia de más de una proteasa con capacidad caseinolítica y que alguna de estas se este inhibiendo.

Dentro de las proteínas putativas como proteasas registradas en el genoma de *L. amylovorus* se encuentran 5 aminopeptidasas con un peso molecular alrededor de los 30 kDa, pero ninguna de éstas, según lo reportado en el genoma, es del tipo aspartil proteasa. Por secuenciación por espectrofotometría de masas se identificaron dos proteasas, una metaloproteasa de zinc dependiente de ATP,

FtsH, de 80 kDa, pero siendo que el spot observado está por debajo de los 30 kDa, es poco probable que sea esta, a menos que se este proteolizando. La otra proteasa identificada fue la subunidad proteolítica de la proteasa Clp dependiente de ATP, que contiene 196 aminoácidos, dos aminoácidos más que la misma proteína reportada en el genoma de la bacteria (75.51% de identidad), un peso molecular de 22 kDa, pI calculado de 4.87; es una enzima inducida por estrés que rompe proteínas en procesos que requieren ATP, su actividad es del tipo tripsina, por lo que es una serin proteasa y juega un papel importante en la degradación de proteínas mal plegadas.

Esta enzima (Clp) debe su nombre a la capacidad que tiene de degradar a la caseína, (**caseinolytic protease**, por su denominación en inglés) forma un complejo heptamérico ClcP que se puede acoplar a dos ATPasas (ClpA o ClpX) que en conjunto, forman el complejo proteolítico encargado principalmente de la degradación de proteínas durante el estrés celular (Maurizi, 2012). Requiere ATP y  $Mg^{2+}$  para llevar a cabo la hidrólisis, sin embargo en ausencia de ATP, perdura su actividad proteolítica pero sólo hacia péptidos de no más de 5 aminoácidos (Maurizi, 2012). La proteasa que se identificó en el zimograma, podría suponerse que se trata de esta subunidad proteolítica que se complementa con otra proteína que une ATP, y con ello observar el halo de hidrólisis, ya que se hicieron pruebas previas sobre la necesidad de cofactores iónicos y se determinó al final que para poder observar *in situ* no era necesario que se adicionara ningún cofactor, más que el extracto proteico; cabe mencionar que dentro de las secuencias obtenidas del spot que se mandó a secuenciación, se identificaron 5 proteínas de unión a ATP de 27 kDa, sin embargo pertenecen al grupo de transportadores ABC que son proteínas de membrana. Es posible que por esta razón al intentarse los ensayos *in vitro* no se pueda determinar actividad proteolítica y sean necesarios los cofactores que activen a la proteasa en solución.

Sin duda un factor primordial en la expresión de proteasas en lactobacilos es la disponibilidad de nitrógeno en el medio. En estudios bioquímicos y genéticos de lactobacilos de la leche como *L. helveticus* y *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Hébert, 2002) así como en *L. lactis* (Guédon, 2001a), se ha demostrado que éstos microorganismos reducen la expresión de sus proteasas cuando la cantidad de péptidos en el ambiente es abundante. Dado que en la leche la concentración de aminoácidos y péptidos es baja, la actividad de proteasas es un requisito indispensable para el crecimiento. En contraste, en los cereales (maíz, trigo) el nitrógeno proviene de aminoácidos que son producto de la actividad proteolítica intrínseca del grano y por lo tanto, durante su fermentación se soporta el crecimiento de microorganismos no proteolíticos (Gänzle *et al.* 2008) o al menos, como en el caso de *L. amylovorus*, sin proteasas extracelulares.

## CONCLUSIONES

En medio MRS, *Lactobacillus amylovorus* expresa al menos una proteasa intracelular capaz de hidrolizar caseína, con un peso menor de 30 kDa.

La(s) proteasa(s) identificadas permanecen activas en un amplio rango de pH (3-10), temperatura (4-80°C) y muestran un pH óptimo aparente entre 4 y 5. Por el perfil de inhibición la proteasa se sugiere como una aspártico proteasa.

No se encontró actividad proteolítica extracelular ni en proteínas ancladas en la pared celular.

## PERSPECTIVAS

Probar el efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de proteasas.

Evaluar el efecto de la relación Carbono/Nitrógeno en el crecimiento de *L. amylovorus* y la producción de proteasas.

Optimizar la técnica de extracción de proteínas ancladas a pared para *L. amylovorus*.

De las proteasas detectadas, realizar una caracterización de la actividad sobre diferentes sustratos proteicos.

Aislar una proteasa con potencial biotecnológico.



## REFERENCIAS

- Agyei, D. and Danquah, M.K. (2012) Carbohydrate utilization affects *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 313 cell-envelope-associated proteinase production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17: 787-794
- Axelsson, L. (1998) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A (eds) *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, New York, pp 1–72
- Bleukx, W., Brijs, K., Torrekens, S., van Leuven, F., Delcour, J.A. (1998) Specificity of a wheat gluten aspartic proteinase. *Biochimica Biophysica Acta* 1387:317-324
- Boekhorst, J., Siezen, R.J., Zwahlen, M.C., Vilanova, D., Pridmore, R.D., Mercenier, A., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., Brüssow, H., Desiere, F. (2004) The complete genomes of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus johnsonii* reveal extensive differences in chromosome organization and gene content. *Microbiology* 150: 3601–3611
- Brijs, K., Bleukx, W., Delcour, J.A. (1999) Proteolytic activities in dormant rye (*Secale cereale* L.) grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:3572-3578.
- Castillo Olvera, F. Obtención de bioproductos a partir de los residuos agrícolas de la cebada (*Hordeum vulgare*). Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Ambientales. Área Académica de Química. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. En trámite de titulación.
- Crow, V.L., Coolbear, T., Gopal, P.K., Martley, F.G., McKay, L.L., Riepe, H. (1995) The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int Dairy J* 5:855–875

Current Protocolls in Food Analytical Chemistry UNIT C2.2 Peptidase Activity Assays Using Protein Substrates.

den Hengst, C.D., van Hijum, S.A., Geurts, J.M., Nauta, A., Kok, J., Kuipers, O.P. (2005a) The *Lactococcus lactis* CodY regulon: identification of a conserved cis-regulatory element. *J Biol Chem* 280:34332–34342

den Hengst, C.D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O.P., Kok, J. (2005b) Probing direct interactions between CodY and the oppD promoter of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 187:512–521

Detmers, F.J., Kunji, E.R., Lanfermeijer, F.C., Poolman, B., Konings, W.N. (1998) Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* 37:16671–16679

Fernandez-Espla, M.D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F. (2000) *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* 66:4772–4778

Foucaud, C., Kunji, E.R., Hagting, A., Richard, J., Konings, W.N., Desmazeaud, M., Poolman, B., (1995) Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *J Bacteriol* 177:4652–4657

Fox, P.F. (1989) Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72:1379–1400

Frees, D., Ingmer, H. (1999) ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 31:79–87

Gänzle, M.G., Loponen, J., Gobbetti, M., (2008) Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science and Technology* 19:513–521

García-Cano, I., Velasco-Pérez, L., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Mendoza-Hernández, G. and Farrés, A. (2011) Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *J. Appl. Microbiol.* 111:607-615

Gobbetti, M., Smacchi, E., and Corsetti, A. (1996) The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3220–3226

Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R. (2002) Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 42:223–239

Gobbetti, M. (2012) How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. In: Koukka-Ihalainen, A. (Ed.), *V Symposium on Sourdough*. VTT, Espoo, p. 54.

Guédon, E., Renault, P., Ehrlich, D., Delorme, C. (2001a) Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *J Bacteriol* 183:3614–3622

Guédon, E., Serror, P., Ehrlich, S.D., Renault, P., Delorme, C. (2001b) Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 40:1227–1239

Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B. (2002) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:381-395.

Hagting, A., Kunji, E., Leenhouts, K., Poolman, B., Konings, W. (1994) The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J Biol Chem* 269:11391–11399

Hebert, E.M., Raya, R.R., De Giori, G.S. (2000) Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Appl Environ Microbiol* 66:5316–5321.

Hébert, E., Raya, R., De Giori, G.S. (2002) Modulation of the cell surface proteinase activity of thermophilic lactobacilli by the peptide supply. *Curr. Microbiol.* 45:385–389.

Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 67–113

International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (1992) Enzyme nomenclature. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.

Jänsch, A., Korakli, M., Vogel, R.F., Gänzle, M.G. (2007) Glutathione reductase from *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T: contribution to oxygen tolerance and thiol-exchange reactions in wheat sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4469-4476

Katayama-Fujimura, Y., Gottesman, S., Maurizi, M.R. (1987) A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 262:4477–4485

Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E. (2005) Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev* 29:393–409

Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003) Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des* 9:1297–1308

Kunji, E., Hagting, A., De Vries, C., Juillard, V., Haandrikman, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1995) Transport of  $\beta$ -casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* 270:1569–1574

Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:187–221

Laskowska, E., Kuczynska-Wisnik, D., Skorko-Glonek, J., Taylor, A. (1996) Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro. *Mol Microbiol* 22:555–571

Leroy, F., Devuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 15:67–78

Maurizi, M. R. (2012) Endopeptidase Clp. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Volume 1, Chapter 794, Third edition, Academic Press, pp 3593-3599

Meisel, H., Bockelman, W. (1999) Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:207–215

Meisel, H. (2004) Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors* 21:55–61

Naggie, S., Hu, Y.C., Pulliam-Holoman, T.R., Bentley, W.E. (1997) Substrate (gelatin) gel electrophoretic method for analysis of protease activity in insect (Sf-9) cells. *Biotechnology Techniques*. 11:297–300

Nakamura, L.K. (1981) *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from castle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:56-63

Navarre, W.W., Schneewind, O. (1994) Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in grampositive bacteria. *Mol Microbiol* 14:115–121

Negrete, A.E., Tenorio V.R., García C, de la Garza (1999) Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolated. *Curr. Microbiol.* 38:64-67

Oliver Ramirez Medel. “Especificidad de la adsorción de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*”. Tesis para obtener el título de Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM. 2010.

Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojic, M., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Topisirovic, L., Jovanovic, G. (2003) Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl Environ Microbiol* 69:5802–5811

Pihlanto A, Korhonen H (2003) Bioactive peptides and proteins. *Adv Food Nutr Res* 47:175–276

Potumarthi, R., Ch, S., Jetty, A. (2007) Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. *Biochem. Eng. J.* 34: 185-192.

Rao, B. M., Tanksale, M., Ghatge, M. S., Deshpande V. V. (1998) Molecular and Biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:(3) 597-635

Rojas, M., Ascencio F., Conway, P.L. (2002) Purificación and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl. Environ. Microbiol* 68:2330-2336

Ross, G.R., Van Nieuwenhove, C.P., González, S.N. (2012) Fatty Acid Profile of Pig Meat after Probiotic Administration, *J Agric Food Chem.* 60(23):5974-8

Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, H. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71: 394–406

Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W. (2005) Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol* 16:204–211

Schick, J., Weber, B., Klein, J.R., Henrich, B. (1999) PepR1, a CcpA-like transcription regulator of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis. *Microbiology* 145:3147–3154

Siezen, R.J. (1999) Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:139–155

Smith, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev* 29:591–610

Stucky, K., Schick, J., Klein, J.R., Henrich, B., Plapp, R. (1996) Characterization of pepR1, a gene coding for a potential transcriptional regulator of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis DSM7290. *FEMS Microbiol Lett* 136:63–69

Tavano, O.L. (2013) Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 90 1-11

Thiele, C., Gänzle, M.G., Vogel, R.F. (2002) Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavour. *Cereal Chem*. 79:45–51

Thiele, C., Grassl, S., Gänzle, M.G. (2004) Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:1307-1314.

Titgemeyer, F., Hillen, W. (2002) Global control of sugar metabolism: A Gram-positive solution. *Anton. Leeuw*. 82: 59-71.

Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G., Haandrikman, A. (1993) Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 175:7523–7532

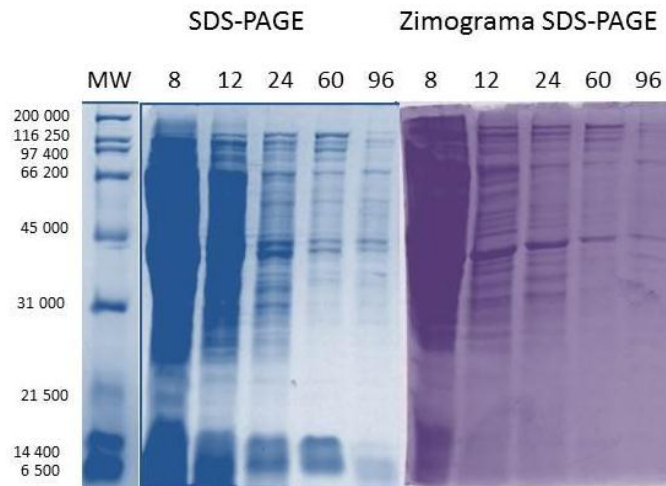


## ANEXOS

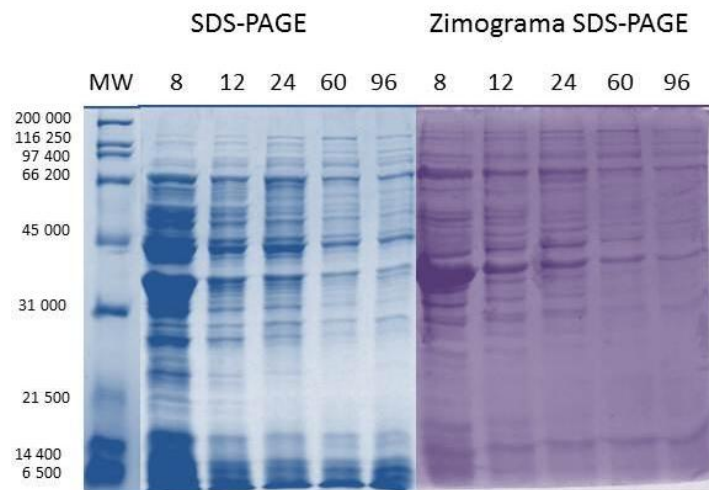
### I. Geles SDS-PAGE y Zimogramas SDS-PAGE de los diferentes extractos obtenidos.

Proteínas asociadas a pared

A: LiCl 1M, Tris 0.1M, NaCl 0.015M, MgCl<sub>2</sub> 0.05M, Lisozima 40 μ.

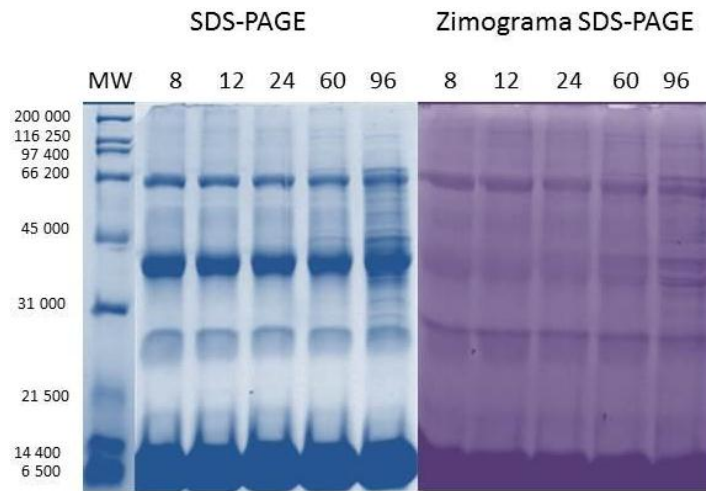


B: Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, SDS 2%.

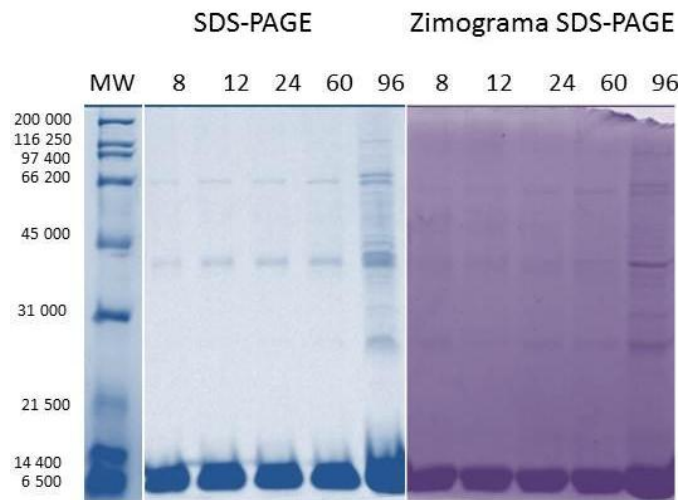


## Proteínas intracelulares

C: Lisozima 10 mg/ml; en amortiguador PBS pH 7.4.



D: Choque Osmótico con agua helada



E: Sonicado en amortiguados PBS pH 7.4.



## II. Composición de medios de cultivo

### Medio de cultivo MRS-almidón:

Reactivo	g/L
Peptona Pancreática	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio ( $C_6H_{14}N_2O_7$ )	2.17
Acetato de Sodio ( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ )	5
Sulfato de Magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.207
Sulfato de Manganeso ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ )	0.056
Fosfato dibásico de Potasio ( $K_2HPO_4$ )	2.62
Almidón soluble DIFCO	10

### Medio Mínimo

Reactivo	g/L
$KH_2PO_4$	1.2
$(NH_4)_2HPO_4$	1.2
Citrato de amonio ( $C_6H_{14}N_2O_7$ )	3
Sulfato de Magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.3
Sulfato de Manganeso ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ )	0.03
Almidón soluble DIFCO	10
Extracto de levadura	1.2
Caseína	0.2 %

### **III. Electroforesis de Proteínas en geles de Poliacrilamida (PAGE) [BIORAD]**

La separación y purificación de proteínas son procesos necesarios para su análisis y caracterización apropiada, así como de las subunidades y péptidos de las mismas. La electroforesis tiene su fundamento en que una molécula a la que se le impone una carga eléctrica, se desplazará como respuesta a un campo eléctrico aplicado. Si se colocan en un gel de poliacrilamida (PAGE), las proteínas van a migrar a través de los poros en la matriz del gel por efecto de un campo eléctrico. Esta migración depende de la intensidad del campo, la carga neta, el tamaño del poro del gel, tamaño y forma de las proteínas, viscosidad y temperatura del medio en el cual las proteínas se están moviendo.

El proceso electroforético se puede llevar a cabo en dos condiciones: nativa (N-PAGE) o desnaturalizantes (SDS-PAGE). La diferencia entre ambas condiciones está en la composición del gel y amortiguador de corrida, así como en el tratamiento de la muestra. En una N-PAGE, las proteínas mantienen su estructura tridimensional y las diferentes cadenas polipeptídicas pueden permanecer unidas, separándose en función tanto de su carga neta como de su forma y tamaño. En los Geles SDS-PAGE, es el detergente quien les confiere una carga (negativa).

#### **Geles de Poliacrilamida**

En un soporte se ensamblaron las placas de vidrio de 0.75 mm para la elaboración de los geles concentrador y separador. Primero se depositó el gel de separación dentro de las placas, aproximadamente de 5-6 cm de altura, uniformando la superficie con isopropanol; una vez que polimerizó el gel, se removió el isopropanol y se depositó el gel concentrador con un peine de 10 pozos. Se dejó que polimerizara a temperatura ambiente y posteriormente se retiró el peine. El gel se recorrió durante 15 min a 20 mA. Después de recorrer los geles se colocaron las muestras a analizar en cada uno de los pozos.

### **Preparación de las muestras para correr en geles SDS-PAGE**

Cada muestra se preparo en microtubos de 1.5 ml. Se tomaron 15 µl de cada extracto a los que se le agregaron 10 µl de amortiguador de carga 4X. Se hirvieron las muestras por 5 min a 95°C, posteriormente se colocaron en hielo y se centrifugaron por 1 minuto a 13 000 rpm para después cargarlas en los pozos del gel concentrador.

### **Corrimiento de un gel SDS-PAGE**

Cada gel se corrió a 20 mA, en una cámara de electroforesis de BioRad, con un amortiguador de corrida 1X, pH 8.3, hasta que saliera el frente.

### **Zimograma PAGE**

La técnica de zimogramas es usada para detectar y caracterizar colagenasas y otras proteasas dentro del gel. Estos geles se coopolimerizan generalmente con caseína o grenetina, que actúan como sustrato de las enzimas que son separadas en el gel bajo condiciones no reductoras. Las proteínas que son corridas con SDS (condiciones desnaturizantes) se separan por peso molecular. Después de la renaturalización e incubación para que se lleve a cabo la hidrólisis del sustrato, los geles son teñidos con azul de Coomassie, dejando zonas claras en donde actuaron las proteasas.

## Composición de los geles SDS-PAGE

Reactivo	Gel concentrador 10 %	Gel separador 4%	Gel concentrador con caseína 0.05%
Agua destilada	1.6 ml	0.605 ml	1.4 ml
Tris HCl 0.5M pH 6.8	-----	0.250 ml	-----
Tris HCl 1.5M pH 8.8	1.0 ml		1.0 ml
SDS 10%	40 µl	10 µl	40 µl
Persulfato de amonio 10 %	40 µl	5 µl	40 µl
Bis/Acrilamida 30%	1.33 ml	133 µl	1.33 ml
TEMED	10 µl	2.5 µl	10 µl
Caseína 1.0%	-----	-----	200 µl
Total	4.02 ml	1.0055 ml	4.02 ml

## Soluciones de tinción y destinción

Solución	Reactivo
Solución stock I	0.2% Azul de Coomassie
	90% Etanol
Solución stock II	20% Ácido acético
Tinción	Stock I 50%
	Stock II 50%
Destinción	Etanol 20%
	Ácido acético glacial 10%

#### IV. Amortiguadores empleados para el ensayo del efecto del pH en la muestra

##### Amortiguador Citrato-Fosfato pH 3, 4, 5 y 6

Soluciones stock:

A: Ácido cítrico 0.1 M (19.21 g en 1000 ml)

B: Fosfato dibásico de sodio 0.2 M (53.65 g de  $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 1000 ml)

x ml de A + y ml de B, diluidos en un total de 100 ml

x	y	pH
39.8	10.2	3.0
30.7	19.3	4.0
24.3	25.7	5.0
17.9	32.1	6.0

##### Amortiguador Tris-HCl

Soluciones stock:

A: Tris base 0.2 M (24.2 g en 1000ml)

B: HCl 0.2 M

50 ml de A + x ml de B, diluidos en un total de 100 ml

x	pH
38.4	7.6
26.8	8.0



## Amortiguador Glicina-NaOH

Soluciones stock:

A: Glicina 0.2 M (15.01 g en 1000 ml)

B: NaOH 0.2 M

50 ml de A + x ml de B, diluidos en un total de 200 ml

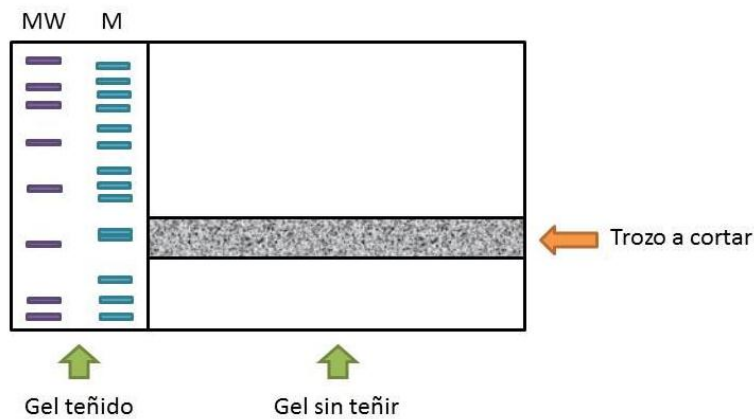
x	pH
4.0	9.0
8.8	10.0

### **V. Condiciones de renaturalización para proteasas después de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

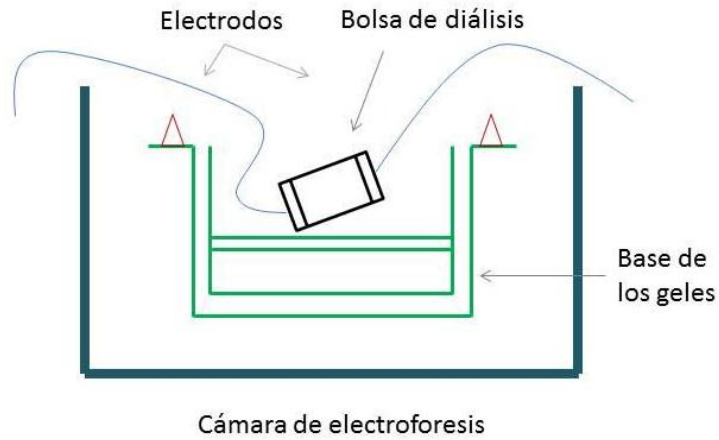
1. Al gel se le adicionó 30 ml de solución Tris 0.04 M pH 7.6 con 2.5% de Tritón X-100 por 15 minutos en agitación, a temperatura ambiente.
2. Lavar el gel tres veces a intervalos de 15 minutos en agitación a temperatura ambiente con solución Tris 0.04 M pH 7.6.
3. Se hicieron 5 lavados rápidos de aproximadamente 10 segundos con agitación a temperatura ambiente con solución Tris 0.04 M pH 7.6.
4. Dejar el gel toda la noche a 4°C en solución Tris 0.04 M pH 7.6 con 2 mM de CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>.
5. Teñir el gel con solución de tinción durante 30 min con agitación a temperatura ambiente. Desteñir el gel con solución de destinción hasta la aparición de bandas.

## VI. Electroelución de bandas de un gel de electroforesis de proteínas

1. Se hizo un gel de poliacrilamida y se corrió la muestra de interés (20 mA, hasta que salió el frente)
2. Se cortó el carril con marcador de peso molecular (Broad Range) y el carril siguiente con la muestra problema. Ambos se tiñeron con Azul de Coomassie y se localizaron las bandas de proteína de interés.
3. La otra parte se guardó mientras tanto en amortiguador Tris HCl 0.04 M pH 7.6, a 4°C.
4. Se “rearman” los dos pedazos y se corta el trozo del gel que corresponde a la banda deseada.



5. El pedazo de gel sin tinción que contiene la banda de interés se colocó dentro de una bolsa de diálisis y se electro eluyó en una cámara en una cámara de electroforesis a 150 V, por 8 h.



6. Se retira la bolsita de la cámara de electroforesis y se recupera el líquido del interior; éste pasa a otra bolsa de diálisis limpia y se deja dializando toda la noche a 4°C, contra el amortiguador de uso.
7. Se recupera el líquido de la bolsa de diálisis y se concentra en conos de ultrafiltración. Se hace un gel para SDS-PAGE y se verifica la eficiencia de la electroelución.

## VII. Inhibidores de proteasa empleados en este estudio

Inhibidor	Especificidad	Mecanismo de acción	Solubilidad/ estabilidad	Concentración de uso	Nota
PMSF (fenilmetilsulfonilfluorido)	Inhibe serin proteasas	Irreversible, modifica el sitio activo	Soluble a >10 mg/ml en isopropanol, etanol, metanol. En isopropanil al 100%, estable por 9 meses a +25°C	17 - 170 µg/ml (0.1 – 1 mM)	Peso molecular: 174.2
EDTA	Inhibe metaloproteasas	Extrae metales del sitio activo	Soluble en agua a 0.5 M a pH 8-9. Estable a +4°C por 6 meses	0.2 - 0.5 µg/ml (0.5 - 1.3 mM)	Peso molecular 372.24
<b>Coctel de inhibidores de proteasa de uso general SIGMA-ALDRICH®</b>					
PMSF (fenilmetilsulfonilfluorido)	Inhibe serin proteasas	Irreversible, modifica el sitio activo	Soluble a >10 mg/ml en isopropanol, etanol, metanol. En isopropanil al 100%, estable por 9 meses a +25°C	17 - 170 µg/ml (0.1 – 1 mM)	Peso molecular: 174.2
E-64 N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucin 4-guanidinobutlamida	Inhibe cisteínproteasas	Modificación del sitio activo	Soluble a 20 mg/ml en 1:1 (v/v) de etanol y agua. Estable entre pH 2-10	0.5 – 10 µg/ml (1.4 – 28.0 µM)	Peso molecular: 357.4
AESBF [4-(2-Aminoetil) bencenosulfonil fluorido hidrocloreto]	Inhibe serin proteasas	Irreversible	Soluble a >100 mg/ml en agua. Estable en solución por 1 – 2 meses a -20°C	0.7 µg/ml (1µM)	Peso molecular: 239.5
Apronitina	Inhibe serin proteasas		Soluble en agua. A -20°C estable por 6 meses	0.06 – 20 µg/ml (0.01 – 0.3 µM)	Peso molecular: 6.512
Bestatina hydrochloride	Inhibe aminopeptidasas		Soluble en agua. A -20°C estable por un mes	1 µM	Peso molecular: 344.83
Leupeptin hemisulfate salt	Inhibe serin y cisteín proteasas		Soluble en agua, metanol, ácido acético y DMF. Estable a -20°C por 6 meses	10 – 100 µM	Peso molecular: 463.0

Para el uso del coctel, se disuelve la pastilla en 10 ml del amortiguador de trabajo, posteriormente se lleva a un volumen de 100 ml y esta listo para usarse en la concentración deseada.

### **VIII. Ensayos de cuantificación de actividad proteolítica**

#### **Determinación de la actividad proteolítica usando caseína como sustrato (Current Protoccols in Food Analitycal Chemistry).**

1. Se equilibrio una solución de caseína al 1% en TrisHCl 0.1 M pH 8.8 a 37°C.
2. Se preparó una serie de microtubos para cada muestra a analizar con su blanco correspondiente, por triplicado.
3. Agregar 10 µl del extracto proteico a cada uno de los microtubos, equilibrar a 37°C la mitad de los tubos y la otra mitad correspondiente a los blancos de reacción, se almacenaron en hielo.
4. Una vez equilibradas las muestras, se inicio la reacción añadiendo 90 µl de la solución de caseína al 1%, en agitación suave. Se incubaron 10 min a 37°C. A los 5 min de incubación de la muestras, se colocaron los tubos blanco a 37°C para su equilibrio.
5. Pasados los 10 min, se terminó la reacción añadiendo 100 µl de ácido tricloro acético (TCA) al 10 % a todos los tubos.
6. Inmediatamente después de la adición del TCA, se añadieron 90 µl de la solución de caseína a los tubos blanco.
7. Se incubaron todos los tubos 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 8000 rpm.

8. Se tomó una alícuota del sobrenadante obtenido para la medición de los péptidos solubles por el método de Bradford, usando una curva patrón de albúmina sérica bovina como estándar.

#### **Pierce Protease Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC ®)**

1. Se colocaron 100  $\mu$ l de caseína succinilada en un pozo de microplaca y 100  $\mu$ l de buffer de ensayo en otro pozo que servirá de blanco.
2. Se añadieron 50  $\mu$ l del extracto proteico al pozo con caseína y al blanco. Se incubó la microplaca a temperatura ambiente por 20 minutos.
3. Se adicionaron 50  $\mu$ l de ácido trinitrobencensulfónico (TNBSA) al 5 % en cada pozo de reacción.
4. Se incubó la microplaca a temperatura ambiente por 20 minutos.
5. Se midió la absorbancia de los pozos a 450 nm en un lector de placas.
6. Para calcular el cambio de absorbancia a 450 nm ( $\Delta A_{450}$ ) se restaron los valores de  $A_{450}$  de los blancos a los correspondientes a los pozos con caseína. Este  $\Delta A_{450}$  es la absorbancia generada por la actividad proteolítica de la proteasa.
7. Se hizo una curva estándar ( $\Delta A_{450}$  contra una concentración estándar de proteasa) que se usó como referencia de la actividad proteolítica relativa en la muestra.