



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE *Bacillus pumilus* GMA1**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

MONSERRAT HERNÁNDEZ MALDONADO



MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO.

2017



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: Amelia María de Guadalupe Farrés González Sarabia
- VOCAL: Profesor: Óscar Hernández Meléndez
- SECRETARIO: Profesor: Carmina Montiel Pacheco
- 1er. SUPLENTE: Profesor: María del Carmen Ortiz Tafoya
- 2° SUPLENTE: Profesor: Sara Margarita Garza Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Sarabia

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Israel García Cano

SUSTENTANTE:

Montserrat Hernández Maldonado

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto "E", Facultad de Química.

La sustentante participó en el Subprograma 127 en el año 2016-2017.

Proyecto financiado por Programa PAIP Facultad de Química 5000-9095.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Género <i>Bacillus</i>	2
1.1.1 <i>B. pumilus</i> con actividad antimicrobiana	2
1.1.2 <i>B. pumilus</i> GMA1	3
1.2 Peptidoglucano	3
1.2.1 Composición de la pared celular de bacterias Gram-positivas	4
1.2.2 Composición de la pared celular de bacterias Gram-negativas	5
1.3 Peptidoglucano hidrolasas (PGHs)	6
1.3.1 Clasificación de PGHs	7
1.3.2 Función de las PGHs	8
1.3.3 Aplicaciones de PGHs en la industria	9
2. Antecedentes	10
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	13
4.1 Objetivo general	13
4.2 Objetivos particulares	13
5. Materiales y métodos	14
5.1 Crecimiento de <i>B. pumilus</i>	15
5.2 Tinción diferencial de Gram	15
5.3 Obtención de fracciones intra y extracelulares	15

5.4 Cuantificación de proteína	16
5.5 Geles de poliacrilamida	16
5.5.1 SDS-PAGE	16
5.5.2 Zimograma contra <i>M. lysodeikticus</i>	17
5.6 Identificación de proteína	17
5.6.1 Preparación de geles para secuenciación	17
5.6.2 Identificación de proteína por espectrometría de masas (LC-MS/MS)...	18
5.7 Especificidad de sustrato	19
5.7.1 <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanina amidasa.....	19
5.7.2 <i>N</i> -acetilglucosaminidasa	19
5.7.3 <i>N</i> -acetilmuramidasa	20
5.8 Concentración por ultrafiltración.....	21
5.9 Purificación	21
5.9.1 Columna de exclusión molecular	21
5.9.2 Concentración de proteína pura.....	22
5.9.3 Tinción con plata.....	22
5.10 Caracterización bioquímica	22
5.10.1 Condiciones de pH para evaluar la actividad de PGH	22
5.10.2 Estabilidad al pH (1 h de incubación).....	23
5.10.3 Condiciones de temperatura para evaluar la actividad de PGH	23
5.10.4 Estabilidad térmica (1 h de incubación)	24

5.10.5 Efecto de iones metálicos sobre la actividad de PGH.....	24
5.10.6 Efecto de inhibidores sobre la actividad de PGH.....	25
5.11 Espectro de inhibición por difusión en agar	25
6. Resultados y discusión.....	27
6.1 Producción de <i>B. pumilus</i> GMA1	27
6.2 Detección y localización de la actividad lítica de <i>B. pumilus</i> GMA1	28
6.3 Identificación de proteína por LC-MS/MS	29
6.3.1 Análisis de la secuencia de aminoácidos.....	31
6.4 Pruebas de especificidad de sustrato	40
6.5 Purificación por columna de exclusión molecular.....	41
6.6 Caracterización bioquímica	45
6.6.1 Condiciones de pH para evaluar la actividad de PGH	45
6.6.2 Estabilidad al pH (1 h de incubación).....	46
6.6.3 Condiciones de temperatura para evaluar la actividad de PGH	47
6.6.4 Estabilidad térmica (1 h de incubación)	49
6.6.5 Efecto de iones metálicos sobre la actividad de PGH.....	50
6.6.6 Efecto de inhibidores sobre la actividad de PGH.....	52
6.7 Espectro de inhibición	53
7. Conclusiones.....	56
8. Perspectivas.....	57
9. Referencias	58

Resumen

Las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) son enzimas que hidrolizan el peptidoglucano que se encuentra en la pared celular de los microorganismos, lo que genera un efecto inhibitorio en el desarrollo de los mismos.

Bacillus pumilus es un microorganismo que ha sido identificado como productor de compuestos antimicrobianos, por lo que es de interés buscar si la cepa que se aisló dentro del grupo de trabajo, *B. pumilus* GMA1, presenta actividad antibacteriana. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar si la cepa en estudio produce compuestos con actividad antimicrobiana y si esta actividad se debe a alguna proteína con características de PGH, con la intención de purificar, identificar y caracterizar bioquímicamente a la enzima para un uso posible en la industria de los alimentos.

Se detectó actividad lítica por medio de zimogramas en cada una de las fracciones celulares. La fracción citosólica fue la que presentó mayor actividad y con la que se continuó trabajando. A partir de SDS-PAGE la banda que presentó actividad fue escindida del gel y enviada para su secuenciación por LC-MS/MS; se identificó a la proteína como una flagelina de *B. pumilus*, siendo este el primer reporte de una enzima con actividad de PGH en este microorganismo. Utilizando diferentes sustratos sintéticos se determinó que la actividad de PGH corresponde a una *N*-acetil-muramoil-L-alanina-amidasa. Posteriormente se purificó la proteína usando la columna de exclusión molecular Sefacril S-300, proceso del cual se obtuvo a la enzima pura y con actividad de PGH. Se determinó que el valor de pH más conveniente para el ensayo de actividad es de 9, el intervalo de estabilidad al pH, durante 1 h, es de 7 a 10, la mejor temperatura de actividad es de 37°C y que el intervalo de estabilidad de temperatura, durante 1 h, es de 37°C a 50°C. Además se observó que la actividad de la proteína aumenta en presencia de diversos iones (Zn^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}), y que en presencia de EDTA y PMSF la actividad se abate. Posteriormente se realizó el espectro de inhibición y se observó que inhibe a la mayoría de los microorganismos Gram-positivos.

1. Introducción

1.1 Género *Bacillus*

Los miembros de este género son, en su mayoría, bacterias Gram-positivas con forma de bastón, anaerobias facultativas y formadoras de endosporas (Nazina *et al.*, 2001). Este género tiene dos ventajas sobre los demás microorganismos productores de enzimas, ya que muy pocas especies son patógenas y tienen una alta capacidad de secreción de enzimas (Mnisi *et al.*, 2005).

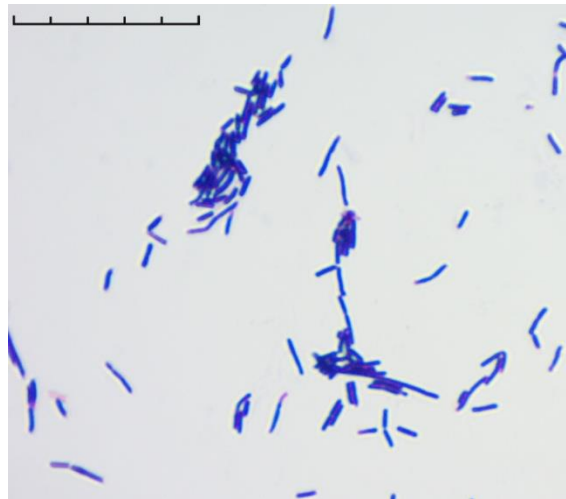


Figura 1. Tinción Gram de *B. pumilus* GMA1

1.1.1 *B. pumilus* con actividad antimicrobiana

Desde 1949 se observó la actividad antimicrobiana de *B. pumilus* pero no se logró aislar el compuesto activo que producía este efecto (Gilliver, 1949). A partir de entonces ha sido de gran interés la actividad antimicrobiana que tiene esta cepa y se realizaron estudios para aislar e identificar los compuestos que generaban este comportamiento. Fue entonces cuando comenzaron los reportes de la identificación de antibióticos que produce este microorganismo. Estos antibióticos se identificaron como Pumilina (Bhate, 1955), Pumilacidina (A, B, C, D, E, F y G) (Naruse *et al.*, 1990) y Pumilacidina (H e I) (Brack *et al.*, 2015). Además se reportó

la presencia de una bacteriocina, formada por péptidos de bajo peso molecular que también presentan la característica de ser antimicrobianos, a los que se les identificó como Pumilicina 4 (Aunpad y Na-Bangchang, 2007).

1.1.2 *B. pumilus* GMA1

Es un microorganismo aislado de las aguas termales mexicanas en la región de Los Azufres, Michoacán, crece bajo condiciones alcalinas y es termoresistente; además presenta actividad hidrolítica (xilanolítica y proteolítica) (Bustos, 1995). Ha sido estudiado por la producción de enzimas con actividad sobre ésteres carboxílicos. La actividad que se destaca entre algunas enzimas que produce este microorganismo es la actividad lipasa y diferentes carbohidrasas (Ayala-Esquivel, 2011).

1.2 Peptidoglucano

El peptidoglucano (Figura 2) es un heteropolímero de azúcares y aminoácidos, que compone la pared celular de las eubacterias y es más abundante en las Gram-positivas. Lo conforman residuos de *N*-acetil glucosamina (NAG) y ácido *N*-acetil murámico (NAM), unidos mediante enlaces β -1,4. A su vez se asocian transversalmente por cadenas de aminoácidos (Humann y Lenz, 2009). Los enlaces glucosídicos, que unen a los azúcares, junto con los enlaces peptídicos, con el que se entrecruzan las cadenas, dan la rigidez característica de la pared. El número de puentes peptídicos es variable en cada especie de bacteria y las paredes más rígidas son aquellas que tienen un mayor número de puentes intercatenarios. Algunas bacterias poseen sólo una capa de peptidoglucano, mientras que otras presentan varias capas (Madigan *et al.*, 2004).

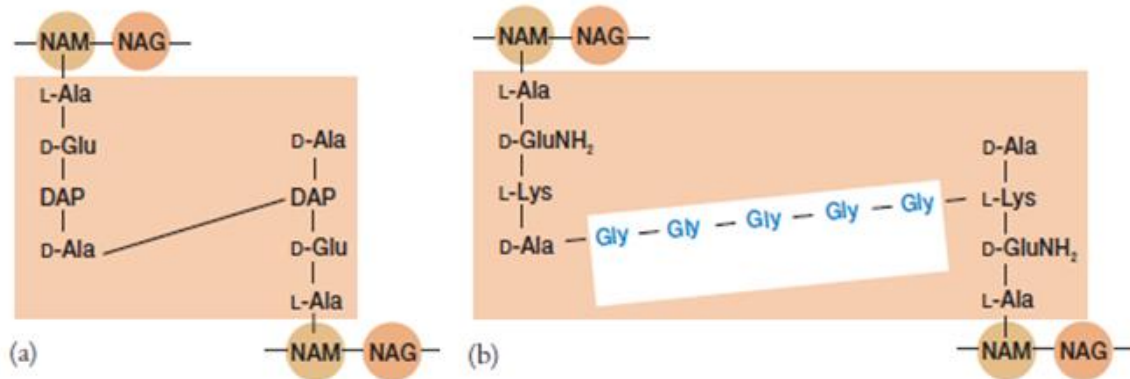


Figura 2. Enlaces del peptidoglucano de (a) *Escherichia coli* y (b) *S. aureus* (tomado y modificado de Prescott *et al.*, 2002)

1.2.1 Composición de la pared celular de bacterias Gram-positivas

En la mayoría de las bacterias Gram-positivas la pared celular está compuesta por varias capas de peptidoglucano que conforman una estructura gruesa y rígida. Además, contiene ácidos teicoicos, que están compuestos principalmente por un alcohol (glicerol o ribitol) y fosfato (Tortora *et al.*, 2007). Algunos de estos ácidos que contienen glicerol están unidos a lípidos de membrana, y se denominan ácidos lipoteicoicos (Madigan *et al.*, 2004) (Figura 3).

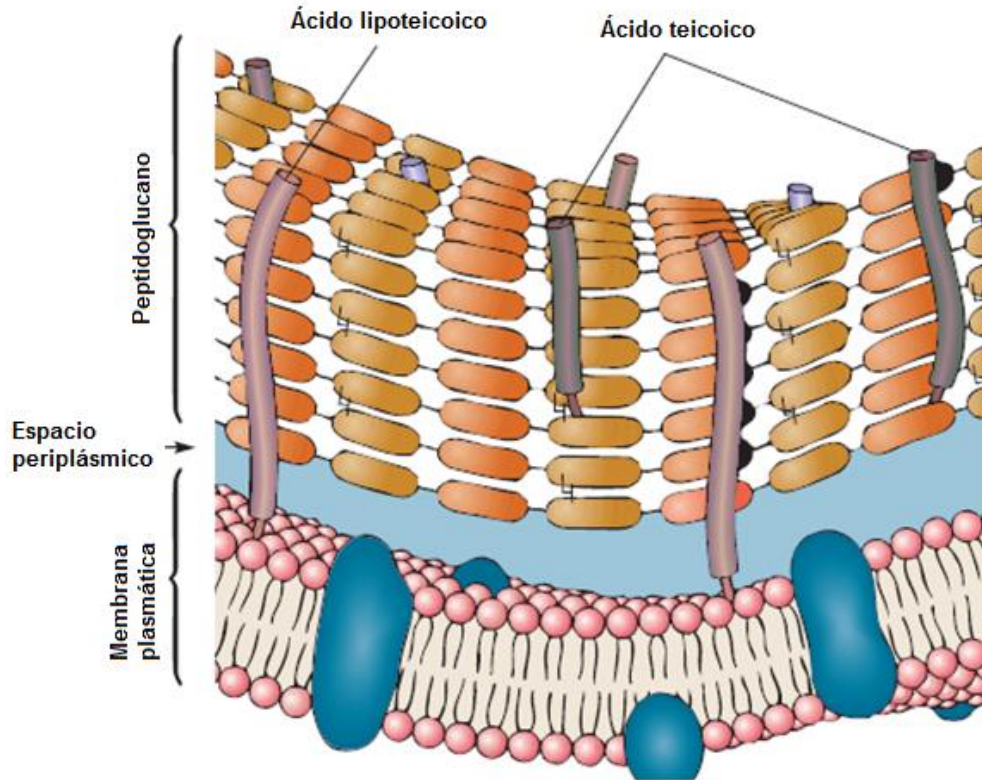


Figura 3. Pared celular de las bacterias Gram-positivas (tomado y modificado de Prescott *et al.*, 2002).

1.2.2 Composición de la pared celular de bacterias Gram-negativas

La pared celular de las Gram-negativas contiene solamente una capa delgada o muy pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa. El peptidoglucano está unido a lipoproteínas (lípidos unidos a proteínas mediante enlaces covalentes) de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una zona localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática. La membrana externa está compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos (Tortora *et al.*, 2007) (Figura 4).

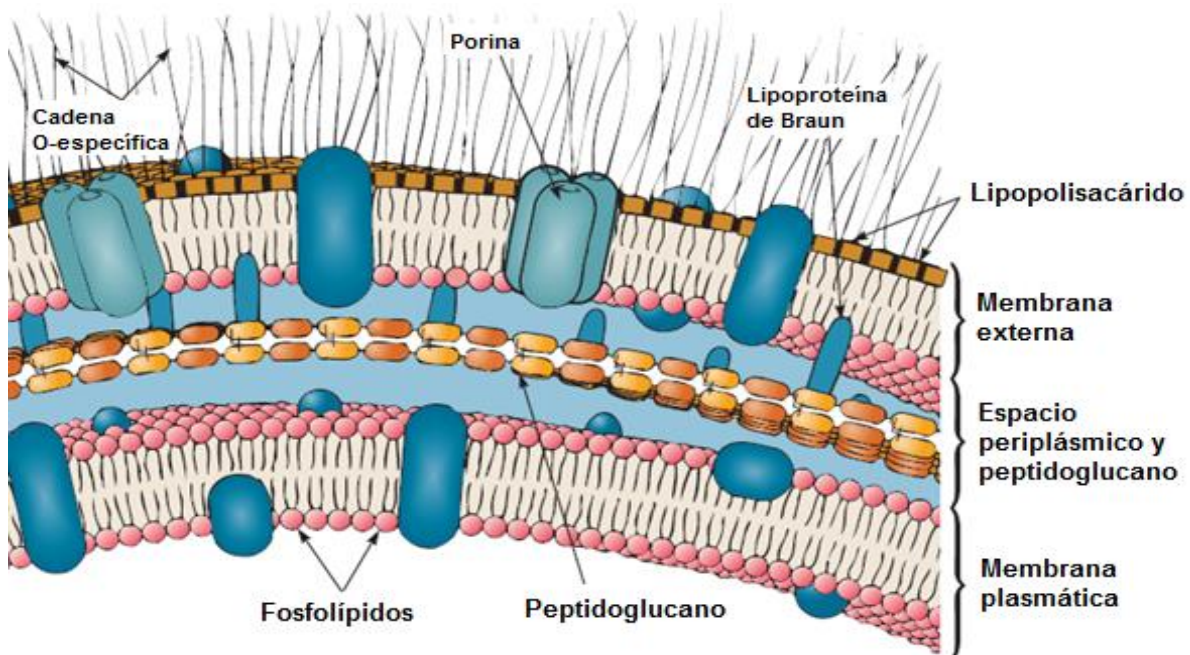


Figura 4. Pared celular de las bacterias Gram-negativas (tomado y modificado de Prescott *et al.*, 2002).

1.3 Peptidoglucano hidrolasas (PGHs)

Las PGHs son enzimas que hidrolizan el peptidoglucano que se encuentra en la pared celular de las bacterias. El peptidoglucano protege a la célula de la presión osmótica interna al recubrir la membrana plasmática, por lo que cuando se hidroliza este componente celular se lisan las células microbianas. Las PGHs tienen actividad antimicrobiana comprobada contra algunos microorganismos presentes en los alimentos. Las PGHs se han encontrado en todos los grupos taxonómicos y en algunos virus y su función principal es llevar a cabo la hidrólisis del peptidoglucano en fragmentos solubles (Vollmer, 2008) (Figura 5).

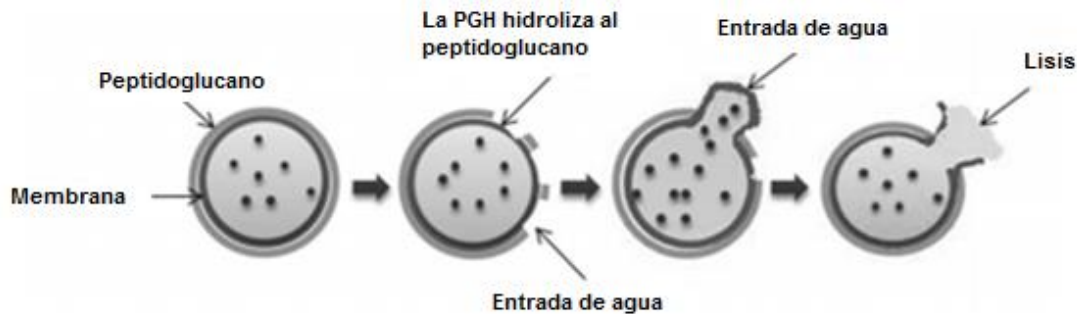


Figura 5. Formación de protoplastos: en una solución diluida, la rotura de la pared libera el protoplasto que inmediatamente se lisa al ser muy débil la membrana citoplasmática. (Tomado y modificado de Carrilo, 2013).

1.3.1 Clasificación de PGHs

Una de los sistemas de clasificación de estas enzimas está de acuerdo al tipo de enlace que hidrolizan (Vollmer *et al.*, 2008; Layec *et al.*, 2008) (Figura 6):

- Al hidrolizar el enlace β -1,4 y dejar libre un extremo NAG reductor se le llama *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa.
- Al hidrolizar el enlace β -1,4 y dejar libre un extremo NAM reductor se le llama *N*-acetilmuramidasa.
- Al hidrolizar el enlace amídico entre el NAM y el N-terminal de la L-alanina se llama *N*-acetil-muramoil-L-alanina-amidasa.
- Al hidrolizar los enlaces peptídicos de los aminoácidos que unen transversalmente a las cadenas de NAG y NAM se llama endopeptidasas y carboxipeptidasas.

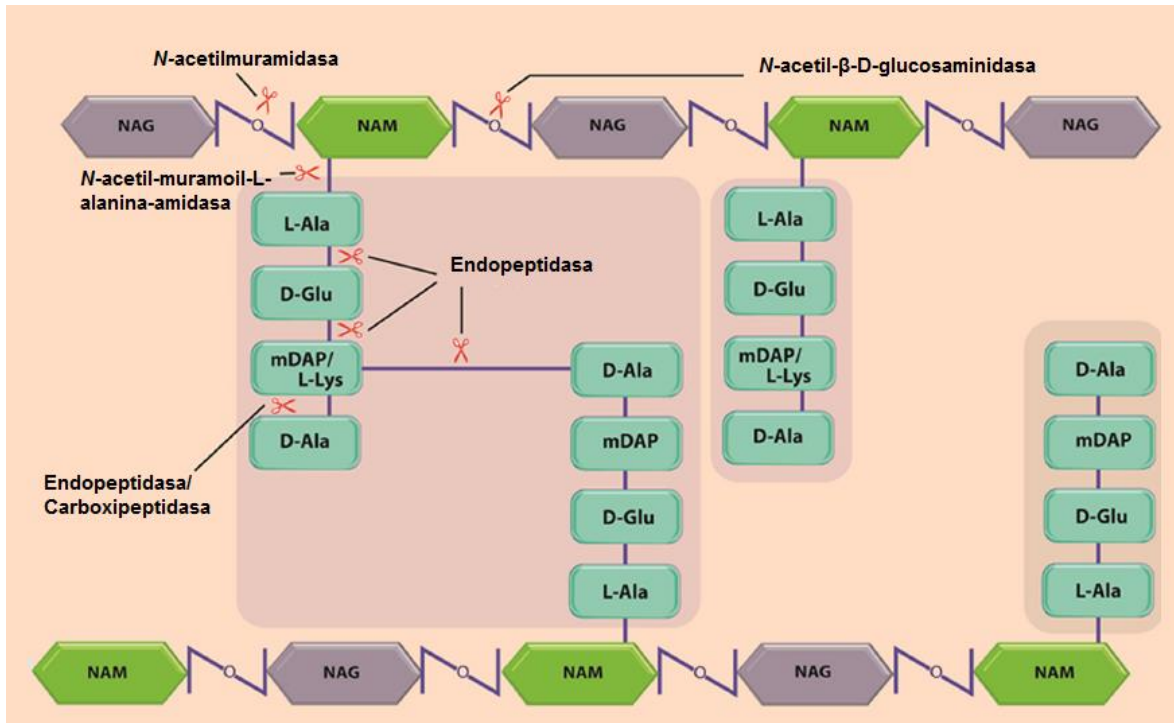


Figura 6. Representación esquemática del peptidoglucano, donde se observan las enzimas responsables de la hidrólisis del mismo (tomado y modificado de Sharma *et al.*, 2016).

1.3.2 Función de las PGHs

Se requiere de PGHs durante el crecimiento celular, la división celular, la regulación de la pared celular, el intercambio de unidades del 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. Para las bacterias patógenas, las PGHs juegan un papel importante en la adhesión y en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y además están involucradas en los fenómenos de lisis de las bacterias (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Eckert *et al.*, 2006; Vollmer *et al.*, 2008).

1.3.3 Aplicaciones de PGHs en la industria

Los microorganismos evolucionan y continuamente desarrollan resistencia a los agentes antimicrobianos, convirtiéndose en un problema alarmante e incluso muy recientemente se reportó la existencia de bacterias resistentes a la última generación de antibióticos (McGann *et al.*, 2016). Por lo tanto, la industria alimentaria busca agentes antimicrobianos eficaces. En la actualidad, existe mucho interés por los agentes antimicrobianos de origen natural, debido a que por lo general presentan baja toxicidad, amplio espectro microbiano y su obtención es económica (Carrilo, 2013).

Desde hace décadas la industria alimentaria ha utilizado como conservador la lisozima de huevo (Pellegrini *et al.*, 2003), que es una enzima con actividad de *N*-acetilmuramidasa. Otro ejemplo del uso de estas enzimas es la lisostafina, ya que es producida por *Staphylococcus simulans* y es altamente específica para *S. aureus* por el enlace interpeptídico de cinco glicinas unidas. Esta enzima tiene aplicación en la industria veterinaria y médica (Szweda *et al.*, 2012).

2. Antecedentes

El grupo de trabajo cuenta con una cepa aislada por el mismo, que produce varias enzimas de interés. Se ha identificado como *B. pumilus* GMA1 y fue aislada de las aguas termales de Los Azufres, Michoacán (Bustos, 1995). En el 2015 la FDA (Notice GRN No. 561) reconoció a *B. pumilus* como GRAS, lo que asegura que no causa efectos adversos en el humano. Por lo tanto, constituye una cepa de interés para la obtención de metabolitos para la industria, como enzimas. El microorganismo crece bajo condiciones extremas de temperatura y pH ya que es termoalcalino; por lo que las enzimas que se aíslen de este microorganismo también podrían tener este tipo de características bioquímicas, lo cual es de importancia y utilidad para su aplicación en la industria. Existen reportes de la actividad antimicrobiana de *B. pumilus* (Gilliver, 1949) y ésta se debe a diferentes factores: uno es la producción de antibióticos (Bhate, 1955; Naruse *et al.*, 1990; Brack *et al.*, 2015) y otro es la presencia de bacteriocinas (Aunpad y Na-Bangchang, 2007). Pero hasta el momento no existe algún reporte de que la actividad antimicrobiana se deba a la producción de PGHs. En el genoma de *B. pumilus*, se reporta la presencia de diversas proteínas con actividad de PGH, por lo cual es de interés identificar si la actividad antimicrobiana de *B. pumilus* GMA1 se deba a la presencia de estas enzimas.

Esta es la razón por la que se comenzó con un ensayo preliminar para saber si la cepa aislada por el grupo de trabajo, *B. pumilus* GMA1, era capaz de inhibir el crecimiento microbiano de algunas otras cepas. Se inoculó una estría recta en el centro de la caja Petri a *B. pumilus* GMA1 y se incubó durante 12 h, después se inocularon, perpendicularmente al crecimiento microbiano, diferentes cepas y se incubó durante 12 h más. Se observó que sí hay actividad antimicrobiana (García-Cano, comunicación personal) por la ligera inhibición del crecimiento microbiano de las cepas que se inocularon perpendicularmente al crecimiento celular de *B. pumilus* GMA1. Este ensayo se repitió con dos medios de cultivo diferentes y se observó el mismo efecto (Figura 7).

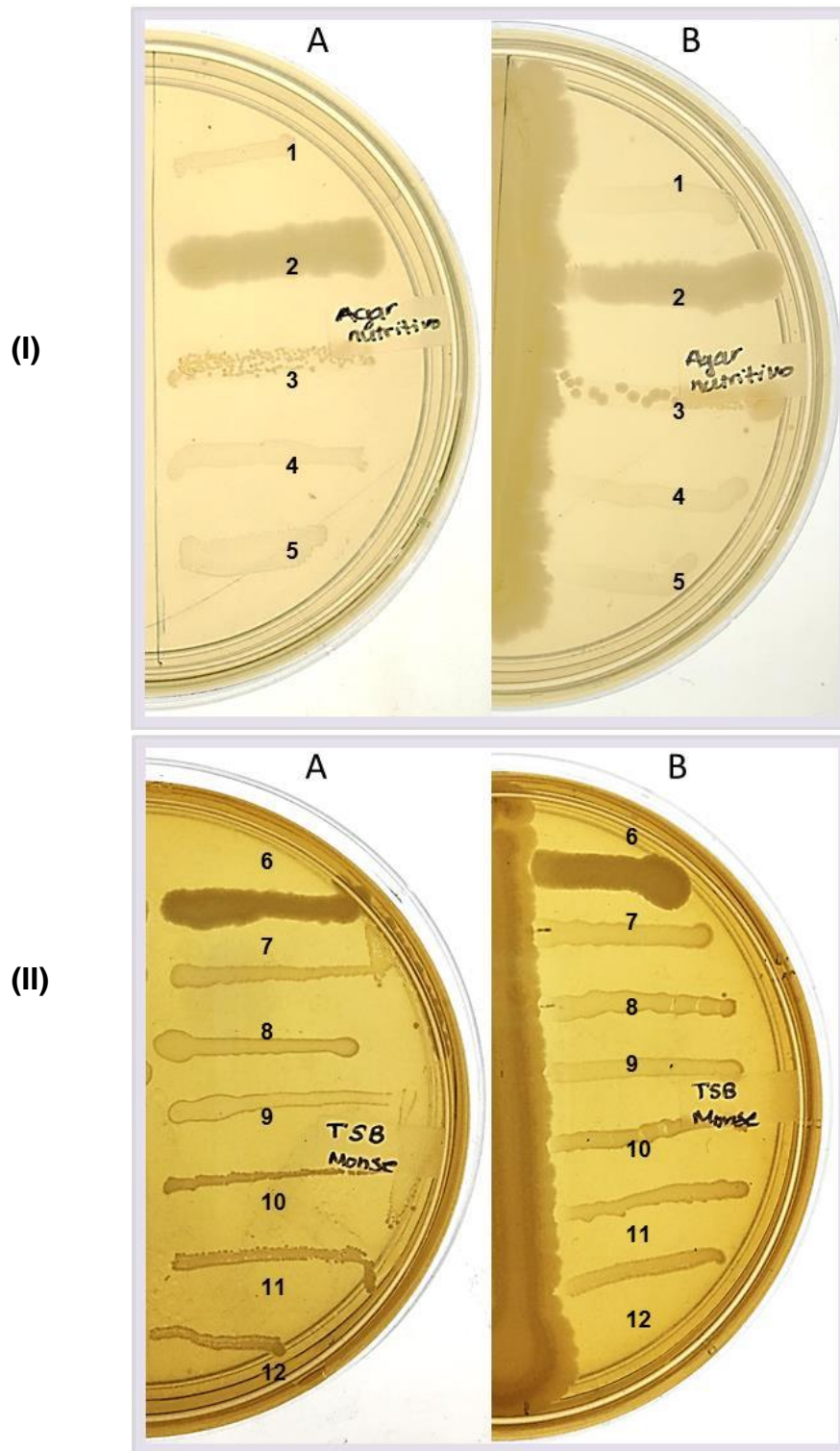


Figura 7. Pruebas antagónicas en (I) Agar nutritivo 1.5% y (II) Agar TSB 1.5%. (A) Control del crecimiento bacteriano, (B) prueba positiva con inóculo de *B. pumilus* GMA1. (1) y (10) *Salmonella typhimurium*, (2) y (6) *M. lysodeikticus*, (3) y (9) *S. aureus*, (4) y (7) *E. coli*, (5) y (8) *Listeria monocytogenes*, (11) *E. faecalis* y (12) *L. paracasei*.

Este resultado muestra que la cepa que se tiene dentro del grupo de trabajo sí presenta actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos, sin embargo no es posible dilucidar todas las causas de esta actividad; por lo que de aquí surgió la pregunta: ¿una de las causas de la actividad antimicrobiana de la cepa *B. pumilus* GMA1 es la acción de alguna proteína PGH? En virtud de que en los reportes de la actividad antimicrobiana de esta especie ya ha sido atribuida a la producción de antibióticos y bacteriocinas, es de interés buscar otra posible causa que contribuya a esta actividad y, como se mencionó anteriormente, en el genoma se reporta la presencia de diversas enzimas con actividad de PGH, lo que da pie a formular esta pregunta y a realizar esta investigación.

Las PGHs se han empezado a utilizar en la industria de alimentos y en procesos sanitarios (lisozima y lisostafina) (Fischetti, 2010; García-Cano *et al.*, 2011; Fenton *et al.*, 2011), de encontrarse la actividad buscada se contaría con una fuente GRAS y se profundizaría en el conocimiento del microorganismo.

Con estos antecedentes, el presente trabajo pretende identificar si existe la presencia de proteínas que contribuyan a la actividad lítica, y si es así identificar, purificar y caracterizar esta proteína.

3. Hipótesis

Si se encuentra que *Bacillus pumilus* GMA1 presenta una enzima con actividad antimicrobiana, entonces podría tratarse de una peptidoglucano hidrolasa.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Detectar, localizar, identificar, purificar y caracterizar bioquímicamente una proteína con actividad antimicrobiana presente en *Bacillus pumilus* GMA1. Y evaluar el espectro de inhibición de la proteína pura contra algunos microorganismos de interés en la industria de alimentos.

4.2 Objetivos particulares

- Localizar y detectar enzimas con actividad lítica en *B. pumilus* GMA1, mediante la extracción de las fracciones intracelulares y extracelulares y la aplicación de zimografía.
- Determinar la especificidad por sustrato de la enzima con actividad lítica.
- Identificar la enzima por la secuenciación de péptidos con el método de espectrometría de masas LC-MS/MS
- Purificar la enzima mediante el uso de una columna de exclusión molecular.
- Caracterizar bioquímicamente la actividad de PGH de la enzima pura, con la especificidad de sustrato.
- Determinar el espectro de inhibición de la enzima pura con actividad lítica mediante difusión en agar.

5. Materiales y métodos

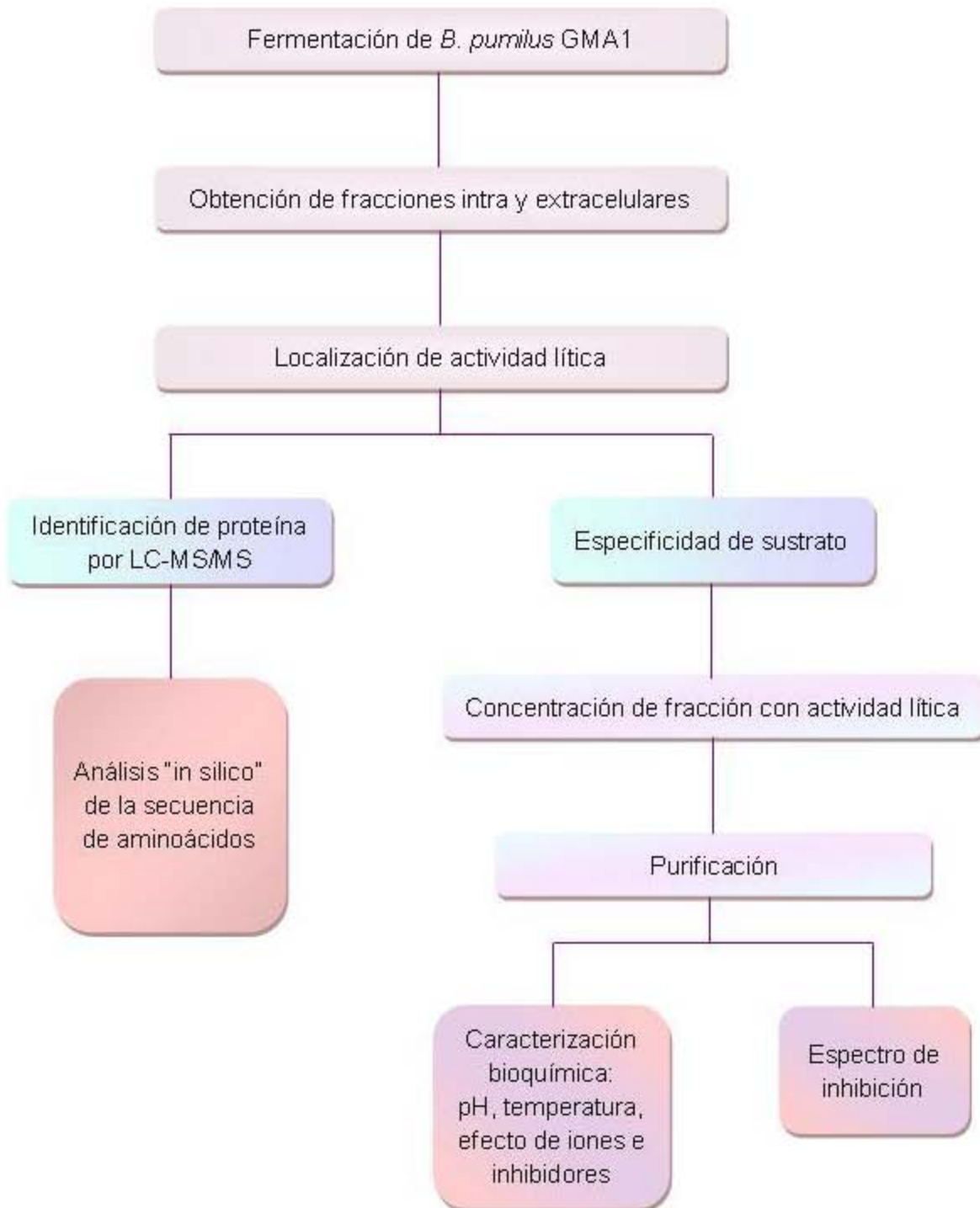


Figura 8. Esquema representativo de la metodología realizada para este trabajo.

5.1 Crecimiento de *B. pumilus*

Se utilizaron matraces de 250 mL con 50 mL de medio BHI (Brain Heart Infusion) (Difco, EUA) para inocular 12 μ L de esporas de *B. pumilus* GMA1, se incubó durante 24 h a 37°C en estufa estática (MOD E71, Aparatos de Laboratorio).

5.2 Tinción diferencial de Gram

Para asegurar la pureza del cultivo celular, en zona aséptica, se realizó un frotis fijo del crecimiento celular de *B. pumilus* GMA1 sobre un portaobjetos y posteriormente se realizó la tinción de Gram (Protocolo de prácticas de Microbiología Experimental, Facultad de Química). Finalmente se observó al microscopio (DMS-653) con el objetivo 100x, tras añadirle aceite de inmersión a la muestra.

5.3 Obtención de fracciones intra y extracelulares

El cultivo celular se centrifugó (Biofuge prime R, Heraeus) en tubos de plástico de 50 mL (8,500 rpm, 15 min y 4°C) para separar el sobrenadante del paquete celular. Se realizaron dos lavados de las células, cada uno con 10 mL de agua destilada estéril y se centrifugó nuevamente. Después, se resuspendió el paquete celular en un amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 8 (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA) hasta llegar a una densidad óptica (D.O.) de 2.0-2.5 (Biomate™ 3S, ThermoFisher Scientific). Esta mezcla se sometió a sonicación (Sonic Dismembrator, Fisher Scientific) durante 20 ciclos (20 s de sonicación y 20 s de descanso) a una amplitud de 3000 Hz, a 4°C y con volumen de muestra de 40 mL. Posteriormente se centrifugó (Beckman J2-MC) con el rotor JA20 en tubos con capacidad de volumen de 40 mL; a 10,000 rpm, 30 min y 4°C para finalmente obtener el citosol y los restos celulares.

5.4 Cuantificación de proteína

Para cuantificar la cantidad de proteína se siguió el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando un kit comercial (Bradford Protein Assay Bio-Rad®, California, EUA). En una microplaca de 96 pozos (Costar 3596, USA) se añadió 40 μL del reactivo de Bradford concentrado y 160 μL de muestra (realizando las diluciones necesarias para entrar en el intervalo de la curva patrón realizada con albúmina sérica bovina). Se leyó la absorbancia a 405 nm en el espectrofotómetro EPOCH (Biotek, USA) con el software Gen 5 1.10 (Biotek).

5.5 Geles de poliacrilamida

5.5.1 SDS-PAGE

Para observar el perfil proteico se elaboraron geles de poliacrilamida al 12%, en condiciones semi desnaturizantes, para evitar pérdida de actividad. El gel se preparó con H_2O desionizada, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (gel separador), 0.5 M Tris HCl pH 6.8 (gel concentrador), 30% bis-acrilamida, 10% dodecil sulfato de sodio (SDS), 10% APS y TEMED. En cada carril se cargó 35 μL de muestra (15 μg de proteína) y 5 μL de amortiguador de carga (H_2O desionizada, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.5% glicerol (Sigma-Aldrich), 10% SDS (Sigma-Aldrich) y 0.5% azul de bromofenol 4X). Se utilizó la cámara de electroforesis de proteínas (Mini-Protean 3Cell, Bio-Rad, California, E.U.A.) en donde se colocó el gel junto con el amortiguador de corrida (12 mM Tris-HCl, 186 mM glicina y 1% SDS). Se conectó la cámara de electroforesis a una fuente de poder (Power Pac300, Bio-Rad) que se utilizó a 80 V durante los primeros 30 min y posteriormente se aumentó el voltaje a 120 V durante 1 h 30 min.

Al término de la electroforesis el gel se lavó dos veces con 100 mL de H_2O desionizada durante 5 min a 60 rpm (Miniorbital shaker TSSM1). Posteriormente se tiñó con una solución de azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) (0.1% Coomassie

G-250, 45% metanol, 10% ácido acético glacial, 45% v/v H₂O) durante 12 h a 60 rpm; la sensibilidad de esta tinción va desde 8-50 ng de proteína. Pasado el tiempo de tinción, se utilizó una solución desteñidora (10% metanol y 10% ácido acético glacial) para observar el perfil proteico de las muestras. Se utilizó el marcador de bajo peso molecular (Low Range, Bio-Rad) para determinar el peso molecular experimental de las proteínas de interés. El equipo fotodocumentador que se utilizó es el Gel-Doc (Bio-Rad) y el software utilizado fue Image Lab (Bio-Rad).

5.5.2 Zimograma contra *M. lysodeikticus*

Para detectar actividad de PGH se preparó otro gel de poliacrilamida 12%, a la par de la elaboración del SDS-PAGE, al cual se le añadió 2% de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* (Sigma-Aldrich). Se llevó a cabo la electroforesis y se lavó el gel en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Se dejó 12 h, 37°C y 60 rpm con una solución renaturalizante (Tritón 1%). Posteriormente se tiñó con una solución de azul de metileno (0.01% KOH y 0.1% azul de metileno) durante 30 min a 60 rpm. Pasado el tiempo de tinción, se lavó el gel con H₂O para observar las bandas de actividad antimicrobiana de cada proteína. Se utilizó un escáner (HP) para fotodocumentar el gel y el software (TotalLab Quant) para calcular el peso molecular experimental.

5.6 Identificación de proteína

5.6.1 Preparación de geles para secuenciación

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, conforme a lo descrito en el punto 5.5.1 y cada solución que se utilizó para su elaboración, se preparó con agua desionizada, filtrada (0.22 µm) y estéril. A la par se preparó un zimograma contra

M. lysodeikticus conforme a lo descrito en el punto 5.5.2 para observar la presencia de la actividad de PGH de la muestra.

5.6.2 Identificación de proteína por espectrometría de masas (LC-MS/MS)

La banda correspondiente a la actividad de PGH observada en zimografía se cortó manualmente del gel de secuenciación, y se almacenó a -20°C hasta su envío al Instituto de Biotecnología (IBT/UNAM) donde se llevó a cabo un análisis espectrométrico por LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem) para la identificación de la proteína. La muestra fue reducida con ditioneitol (DTT), alquilada con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y digerida *“in gel”* con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin). Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co.) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 minutos utilizando una columna capilar hecha en casa (ID $0.75\ \mu\text{m}$ y 10cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 1^{+} , 2^{+} , 3^{+} y 4^{+} fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con cargas, superiores a 5^{+} y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos

fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos.

El análisis de identificación de proteínas se realizó a través del software Thermo Proteome Discoverer 1.4.1.14. Para la búsqueda se utilizó la base de datos de *Bacillus pumilus* (Uniprot). Con la secuencia proteínica que se obtuvo del análisis anterior, se realizó un análisis *in silico* para la predicción del comportamiento de la enzima.

5.7 Especificidad de sustrato

5.7.1 *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa

Para cuantificar la actividad de PGH como amidasa, el sustrato que se utilizó fue hidrocloreuro de L-alanina 4-nitroanilina (Sigma-Aldrich), que al hidrolizarse libera *p*-nitroanilina y L-alanina. El primer compuesto que se forma es de color amarillo y puede ser detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 400 nm.

Se utilizó una microplaca de 96 pozos, en cada pozo se colocó 10 μ L de muestra, 70 μ L de Tris-HCl 100 mM, pH 8 y 20 μ L de sustrato (a una concentración de 1 mg/mL). Como blanco se utilizó 80 μ L del amortiguador y 20 μ L de sustrato. La mezcla se incubó durante 1 h a 37°C, y posteriormente se leyó la absorbancia en el lector de microplacas 400 nm. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria (mg) para modificar 0.01 unidades la absorbancia en 1 min a 37°C.

5.7.2 *N*-acetilglucosaminidasa

El sustrato que se utilizó fue el 4-nitrofenil *N*-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma-Aldrich), que al hidrolizarse libera *p*-nitrofenol y *N*-acetil- β -D-glucosaminida. El

primer compuesto en medio básico forma el ion *p*-nitrofenolato, es de color amarillo y puede ser detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm.

Se utilizó una microplaca de 96 pozos y en cada pozo se colocó 10 μ L de muestra, 80 μ L de Tris-HCl 100 mM, pH 8 y 10 μ L de sustrato (a una concentración de 1 mg/mL). Como blanco se utilizó 90 μ L del amortiguador y 10 μ L de sustrato. La mezcla se incubó durante 20 min a 37°C, transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 100 μ L de carbonato de sodio 140 mM y posteriormente se leyó la absorbancia en el lector de microplacas a 405 nm.

5.7.3 *N*-acetilmuramidasa

El sustrato que se utilizó fue peptidoglucano extraído de *M. lysodeikticus* (Barbosa-González, comunicación personal), que al hidrolizarse el enlace β -1,4 que une los residuos de *N*-acetil-glucosamina y ácido *N*-acetil-murámico, libera el extremo reductor *N*-acetil-murámico. Este compuesto al tratarse químicamente se degrada a ácido láctico que a su vez se degrada en acetaldehído que puede ser determinado colorimétricamente con *p*-hidroxidifenil (PHD) y se puede detectar espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm.

En un tubo cónico de plástico de 1.6 mL se añadió 150 μ L de una solución de peptidoglucano (a una concentración de 4 mg/mL), 50 μ L de muestra y 300 μ L de H₂O. Se incubó durante 24 h, 37°C y 70 rpm (Shaker Bath). Pasado este tiempo se centrifugó durante 1 min a 14,000 rpm y se tomaron 400 μ L de la solución y se pasó a un tubo de vidrio de capacidad de 15 mL. Al tubo se le añadió 100 μ L de H₂O y 3 mL de H₂SO₄ concentrado. Se colocó una tapa de hule sobre el tubo y se calentó a ebullición durante 10 min. Se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se le añadió 50 μ L de sulfato de cobre (4%) y 100 μ L de PHD (1.5% en etanol absoluto). Se agitó en vigorosamente y tras 30 min a temperatura ambiente se leyó la absorbancia en una celda de cuarzo a 570 nm.

5.8 Concentración por ultrafiltración

Siguiendo la metodología anteriormente descrita sobre la producción de *B. pumilus* y la extracción de la fracción intracelular, se juntó el citosol obtenido de seis matraces inoculados. Se concentró 10X la muestra por ultrafiltración (Amicon®, Millipore, Margland, USA) con una membrana con tamaño de corte de 10 kDa (Millipore). Y se realizó un cambio de amortiguador a Tris-HCl 10 mM, pH 8 (amortiguador de trabajo). Se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford antes y después de concentrar.

5.9 Purificación

5.9.1 Columna de exclusión molecular

Se utilizó la columna de exclusión molecular Sefacril® S-300 (Sigma-Aldrich) que se conectó al equipo Biologic LP (Bio-Rad) programado con un flujo de 1 mL/min con el amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 8. Para calibrar la columna y tener un estimado de en qué fracciones se encuentra la proteína de interés, se pasaron estándares de pesos moleculares conocidos, que fueron albúmina (Sigma-Aldrich) y quimiotripsina (Sigma-Aldrich), con pesos moleculares de 66 y 25 kDa, respectivamente. Se le inyectaron 5 mL del citosol concentrado (2 mg/mL) y se colectaron 80 fracciones de 5 mL cada una. Para generar el cromatograma, cada fracción fue analizada a 280 nm y para la cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford. Se cuantificó la actividad de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de cada una de las fracciones recolectadas para localizar la fracción en la que se encontraba la proteína de interés.

5.9.2 Concentración de proteína pura

Después de identificar las fracciones que contenían a la proteína de interés, se concentraron por ultrafiltración utilizando centricones (Millipore) con el tamaño de poro de 10 kDa. Se concentró 100X a 6,000 rpm, 30 min a 4°C. Las muestras concentradas se utilizaron para realizar el perfil de proteínas y observar la actividad de PGH en zimograma.

5.9.3 Tinción con plata

Tras concentrar la muestra pura, se preparó un SDS-PAGE como se menciona en el punto 5.5.1, y éste se tiñó con plata, ya que es una técnica con mayor sensibilidad, las concentraciones de proteína que detecta son de 0.5-1 ng. Se dejó incubando durante 12 h el gel de poliacrilamida, en agitación (60 rpm) con una solución fijadora (30% etanol y 10% ácido acético); posteriormente se lavó 2 veces con etanol al 30%, cada lavado fue de 30 min. Después se lavó con agua desionizada 2 veces más, y cada lavado fue de 10 min. Se añadió una solución de AgNO_3 con una concentración final de 0.1% y se mantuvo en agitación hasta la aparición de bandas, pasado este tiempo se detuvo la reacción con una solución de Na_2CO_3 2.5% y formaldehído 37%. Al final se hizo un lavado al gel con agua desionizada.

5.10 Caracterización bioquímica

Se utilizaron las fracciones puras que se obtuvieron e identificaron previamente.

5.10.1 Condiciones de pH para evaluar la actividad de PGH

Primero se preparó una mezcla de los siguientes amortiguadores: 20 mM de ácido cítrico (con un intervalo de amortiguamiento de 2.1-4.1), 20 mM de ácido acético (3.8-5.8), 20 mM de MES (Sigma-Aldrich) (5.5-6.7), 20 mM de HEPES (Sigma-

Aldrich) (6.8-8.2) y 20 mM de CHES (Sigma-Aldrich) (8.6-10). Y se tomaron alícuotas para ajustar cada una a los siguientes valores de pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; esta mezcla se realizó para realizar el ensayo con la misma mezcla de amortiguadores y observar sólo el efecto del pH. Para establecer el efecto del pH sobre la actividad de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, se utilizó la microplaca donde se añadió 20 μ L de sustrato (1 mg/mL), 70 μ L de cada amortiguador y finalmente 10 μ L de la enzima pura. Para el blanco en lugar de añadir enzima se añadió el amortiguador de trabajo, y para el control se añadió el amortiguador de trabajo en lugar de añadir la mezcla de amortiguadores. Se dejó a temperatura ambiente durante 1 h y después se midió la absorbancia a 400 nm (García-Cano *et al.*, 2015).

5.10.2 Estabilidad al pH (1 h de incubación)

Se utilizó una microplaca que se cargó con 10 μ L de enzima pura y 90 μ L de la mezcla de amortiguadores a cada pH. En el caso del blanco, en lugar de añadir enzima pura se utilizó el buffer de trabajo y para el control se utilizó el amortiguador de trabajo en lugar de la mezcla de amortiguadores. Se incubó 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se midió la actividad de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa con 10 μ L de la mezcla de reacción anterior, 70 μ L del amortiguador de trabajo y 20 μ L de sustrato (1mg/mL). Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia a 400 nm (García-Cano *et al.*, 2015).

5.10.3 Condiciones de temperatura para evaluar la actividad de PGH

Se utilizaron tubos cónicos de plástico de 0.6 mL a los cuales se les adicionaron 40 μ L de enzima pura, 40 μ L del amortiguador de trabajo y 20 μ L de sustrato de amidasa (1mg/mL), y se dejaron incubar a 37, 45, 50, 60, 70, 80 y 90°C, durante 1 h. Transcurrido este tiempo se pasó la mezcla de reacción a una microplaca y se

leyó la absorbancia a 400 nm. Para cada temperatura se preparó un blanco de reacción que consistió de 80 μ L de amortiguador de trabajo y 20 μ L de sustrato. El control fue la muestra a temperatura ambiente (García-Cano *et al.*, 2015).

5.10.4 Estabilidad térmica (1 h de incubación)

En tubos cónicos de plástico de 0.6 mL se prepararon mezclas con 50% de enzima pura y 50% de amortiguador de trabajo, se incubaron durante 1 h a 37, 45, 50, 60, 70, 80 y 90°C. Transcurrido este tiempo se tomó 80 μ L de la mezcla de reacción anterior y se pasaron a una microplaca y se añadieron 20 μ L de sustrato de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (1 mg/mL), se incubó 1 h a 37°C y se determinó la actividad de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa a 400 nm. Se preparó un blanco de reacción que consistió de 80 μ L de amortiguador de trabajo y 20 μ L de sustrato. El control fue la muestra a temperatura ambiente (García-Cano *et al.*, 2015).

5.10.5 Efecto de iones metálicos sobre la actividad de PGH

Primero se adicionó 100 mM de EDTA a una muestra de enzima pura para que sirviera como agente quelante de los iones metálicos que pudieran estar presentes en la muestra y se incubó 1 h a temperatura ambiente. A partir de esta mezcla de reacción se tomaron alícuotas para añadir los iones Ca^{2+} , Na^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} en concentraciones 1 y 10 mM. Tras añadir cada ion, se determinó la actividad de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa. El control fue la muestra con la adición de EDTA y también se midió la actividad de la muestra sin ningún tratamiento.

5.10.6 Efecto de inhibidores sobre la actividad de PGH

Se utilizó el EDTA a concentraciones de 1 y 10 mM como agente quelante y PMSF en niveles de 1 y 10 mM como inhibidor. Se dejó incubando 1 h a temperatura ambiente y pasado este tiempo se midió la actividad de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa. El control fue la enzima sin el tratamiento de inhibidor o quelante.

5.11 Espectro de inhibición por difusión en agar

Tabla 1. Cepas utilizadas

Microorganismo	Procedencia
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	Facultad de Química UNAM
<i>Enterococcus faecalis</i> QB	Dra. Maricarmen Quirasco
<i>Enterococcus faecium</i> QB	Dra. Maricarmen Quirasco
<i>Escherichia coli</i> BL21	Invitrogen
<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	Facultad de Química UNAM
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	Facultad de Química UNAM
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	Sigma-Aldrich
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	Lab 312, FQ, UNAM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14028	Facultad de Química UNAM
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	Facultad de Química UNAM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Posgrado FESC-UNAM
<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218	Facultad de Química UNAM

En cajas Petri se vertieron 15 mL de agar (BD Becton, Dickinson and Company) BHI 1% y se dejó solidificar durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se mantuvo a 4°C durante 8 h.

A la par se inocularon cada uno de los microorganismos mencionados en la tabla 1. Esto se realizó en 5 mL de BHI contenidos en tubos de vidrio con taparrosca de 150 x 16 mm. Se incubó a 37°C, 200 rpm durante 8 h. Trascorrido este tiempo se hicieron diluciones 1:100 del crecimiento celular de cada uno de los microorganismos en tubos cónicos de 2.0 mL con medio BHI.

Sobre la primera capa solidificada de agar de la caja Petri, se vertieron 20 mL de agar BHI al 0.6% y se inoculó con 10 µL de cada una de las diluciones mencionadas anteriormente, se giró suavemente la caja 5 veces en el sentido de las manecillas del reloj, 5 veces en sentido inverso, 5 veces hacia adelante y atrás y 5 en sentido horizontal. Se dejó solidificar durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron pozos sobre la segunda capa de agar con una punta estéril con 0.9 mm de diámetro. Sobre los pozos se añadieron 50 µL de enzima pura y las cajas se incubaron a 37°C por 12 h.

6. Resultados y discusión

6.1 Producción de *B. pumilus* GMA1

Se observó el crecimiento celular en los cultivos inoculados, por la presencia de turbidez en el medio y crecimiento superficial membranoso con opacidad.

En la tinción Gram (Figura 9) se observó sólo la presencia de bacilos con extremos redondos, Gram-positivos. Esto es un indicativo que el cultivo estaba puro. La distribución era diversa, ya que se observaron diplobacilos, estreptobacilos y empalizados. Este resultado coincide con la bibliografía que reporta que *B. pumilus* es un bacilo Gram-positivo con formación de espora (Nazina *et al.*, 2001).

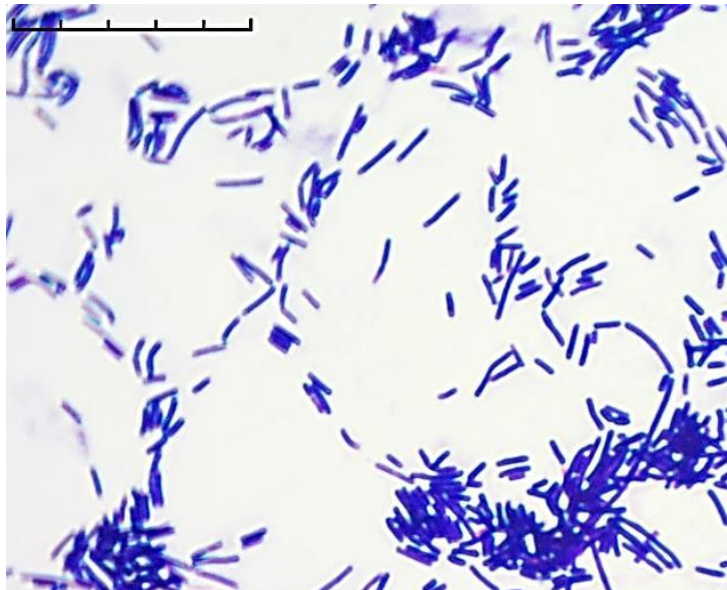


Figura 9. Tinción Gram del crecimiento celular de *B. pumilus* GMA1.

6.2 Detección y localización de la actividad lítica de *B. pumilus* GMA1

Se utilizaron las fracciones del sobrenadante, el paquete celular, el citosol y los restos celulares con la intención de localizar la actividad lítica, ya que se ha reportado que las PGHs se encuentran en cualquier fracción de acuerdo en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo y las necesidades que tiene fisiológicamente. El sobrenadante contiene los productos del metabolismo del microorganismo junto con los componentes del medio de cultivo, mientras que el paquete celular lo constituyen las células enteras obtenidas en el período de incubación y recuperadas por centrifugación. En el citosol están los componentes solubles que permanecían dentro de la célula y los restos celulares constan de la membrana, los organelos y demás compuestos insolubles que había dentro de la célula.

Se localizaron diversas bandas con actividad lítica (Figura 10) en todas las fracciones analizadas. En el sobrenadante se localizaron dos, en las células enteras tres, y tanto en el citosol como en los restos celulares una sola banda con actividad lítica. Tras el análisis de estos resultados, la fracción con la que se continuó este trabajo fue la fracción citosólica ya que sólo hay una banda con actividad y es una fracción soluble, lo que favorece su futuro análisis. Sin embargo no se descarta el interés de un estudio posterior de las demás fracciones con actividad lítica.

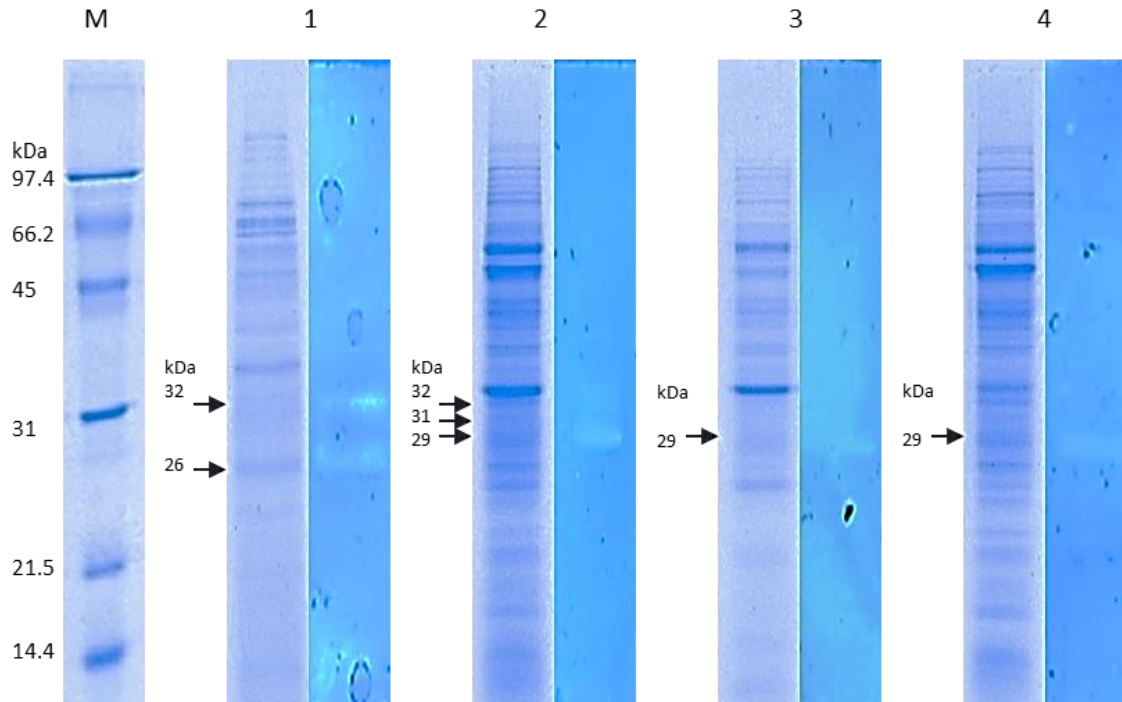


Figura 10. Perfil de proteínas (lado izquierdo) y zimograma contra *M. lysodeikticus* (lado derecho) de las fracciones intra y extracelulares de *B. pumilus*. (M) Marcador de peso molecular; (1) sobrenadante; (2) células enteras; (3) citósol; (4) restos celulares. En cada uno de los carriles se cargaron 15 µg de proteína total.

6.3 Identificación de proteína por LC-MS/MS

La identificación de la proteína por secuenciación de péptidos que se llevó a cabo por el método de espectrometría de masas, permitió la identificación de péptidos generados a partir de la digestión con tripsina, se obtuvo un score global de 722 y un porcentaje de cobertura del 30 % con una proteína de 321 aminoácidos y un peso molecular teórico de 34.1 kDa. La proteína está reportada en el genoma de *B. pumilus* y se denomina flagelina (acceso: WP_050943459, Protein BLAST) (Figura 11). Se realizó la búsqueda de dominios conservados y se encuentra que toda la secuencia se encuentra en el dominio de flagelina (Figura 12).

```

1 MRINHNIAAL NTLNRLSANN GASQKNMEKL SSGLKINRAG DDAAGLAISE KMRGQIRGLE
61 MASKNAQDGI SLIQTAEGAL TETHSILQRV RELVVQAGNT GTQDKESDLQ SIQDEIEALQ
121 EEVDGISNRT EFNGKKLLDG TFKGTLGTPA IPGDPDDPDD NGTFAVPASG NALVFQIGAN
181 ATQQISVHID KMSTDALGVK DANGIVANQA IKDIDVRKFA DNAADATDVG FDTQLSIVDA
241 AINQVSAQRG KLGAVQNRLE HTINNLGASA ENLTAAESRI RDVDMAKEMS EFTKNNILSQ
301 ASQAMLAQAN QQPQNVLQLL R
    
```

Figura 11. Secuencia de flagelina reportada en el genoma de *B. pumilus*, los péptidos identificados por LC-MS/MS están marcados en rojo.

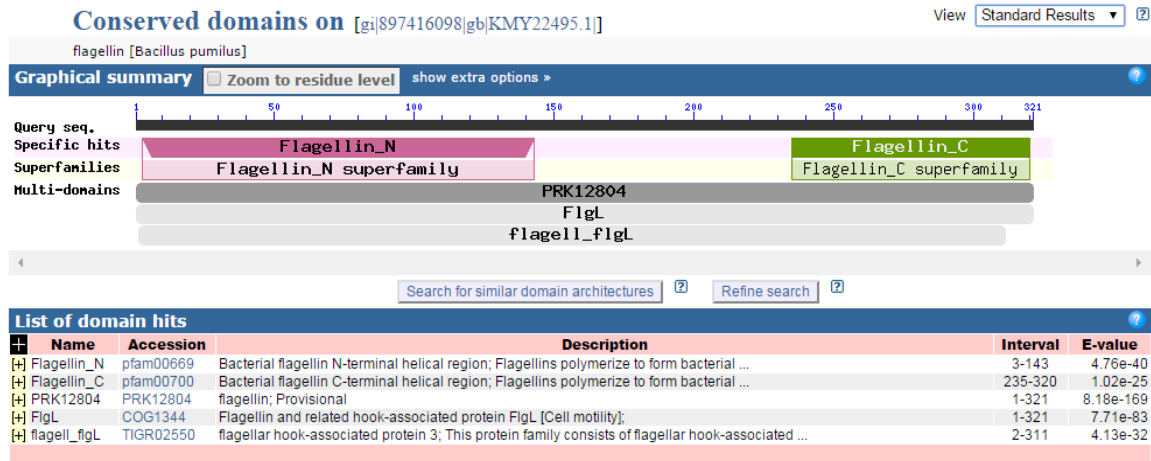


Figura 12. Dominios conservados de la secuencia de flagelina reportada en el genoma de *B. pumilus*.

Existen reportes de diferentes bacterias que son productoras de flagelinas con actividad putativa de PGH. En la tabla 2 se presentan algunos de los reportes y el tipo de actividad que presentan.

Tabla 2. Reporte de diferentes flagelinas con actividad putativa de PGH.

Nombre	Actividad	Microorganismo productor	Referencia
FlgJ	PGH y ensamblaje de la base de la estructura del flagelo	<i>S. typhimurium</i>	(Nambu, <i>et. al.</i> , 1999, Hirano, <i>et. al.</i> , 2001)
FlaA	PGH, invasión de microorganismos y movilidad de la bacteria	<i>L. monocytogenes</i>	(Popowska y Markiewicz, 2004)

Este es el primer reporte de la presencia de una flagelina con actividad de PGH para *B. pumilus* GMA1, lo cual es de gran interés, ya que este microorganismo no es formador de flagelos. Sin embargo en su genoma se encuentran diversas enzimas que codifican para la formación de flagelo, lo que permite suponer que es una proteína que ha sido producida por adaptación (Yuan y Gao, 2015). Esta información genera nuevo conocimiento sobre el microorganismo.

6.3.1 Análisis de la secuencia de aminoácidos

Debido a las múltiples herramientas de bioinformática que existen en la actualidad, fue posible realizar un análisis *in silico* para predecir las características o propiedades de la proteína a partir de su secuencia. Consecuente con lo anterior, a continuación se presentan cada uno de los análisis que se realizaron con diferentes programas bioinformáticos.

6.3.1.1 Valores teóricos del punto isoeléctrico y peso molecular

Se ingresó al portal de ExPASy, se seleccionó la herramienta Compute pI/Mw (Gasteiger *et al.*, 2005), con el cual se determinó el punto isoeléctrico (pI) teórico, que es de 4.85 y el peso molecular (pM) teórico de la proteína, que es de 34118.97 Da. El primer valor reportado es útil para predecir el comportamiento de la enzima a diferentes valores de pH, ya que el valor de pI es el pH al cual la molécula en solución está eléctricamente neutra y, por lo tanto, sus propiedades son diferentes; al estar el pH por arriba o por debajo de su pI, el comportamiento de las enzimas cambia (Liu *et al.*, 2004). Por otro lado al conocer su pM teórico y compararlo con el pM experimental, se observa que los valores son cercanos. Era de esperarse que los valores no fueran exactamente iguales, ya que en la electroforesis sólo se estima un valor de peso molecular cercano al real, ya que no es una técnica altamente sensible (Sharipo *et al.*, 1967) (Figura 13).

Promedio de los valores teóricos de pI/pM a partir de la secuencia de aminoácidos:						
10	20	30	40	50	60	
MRINHNIAAL	NTLNRLSANN	GASQKNMEKL	SSGLKINRAG	DDAAGLAISE	KMRGQIRGLE	
70	80	90	100	110	120	
MASKNAQDGI	SLIQTAEGAL	TETHSILQRV	RELVVQAGNT	GTQDKESDLQ	SIQDEIEALQ	
130	140	150	160	170	180	
EEVDGISNRT	EFNGKLLDG	TFKGTLGTPA	IPGDPDDPDD	NGTPAVPASG	NALVFQIGAN	
190	200	210	220	230	240	
ATQQISVHID	KMSTDALGVK	DANGIVANQA	IKDIDVRKFA	DNAADATDVG	FDTQLSIVDA	
250	260	270	280	290	300	
AINQVSAQRG	KLGAQNRLLE	HTINNLGASA	ENLTAAESRI	RDVDMAKEMS	EFTKNNILSQ	
310	320					
ASQAMLAQAN	QQPQNVLQLL	R				

Valores teóricos: pI/pM: 4.85/ 34118.97

Figura 13. Valores teóricos del punto isoeléctrico y del peso molecular de la flagelina de *B. pumilus*. Reporte de salida del servidor ExPASy, estimados con la herramienta de Compute pI/Mw (Tomado de http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool).

6.3.1.2 Parámetros fisicoquímicos de la proteína

En el portal de ExPASy y la herramienta de ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) se determinó el número de aminoácidos (321). De la composición de aminoácidos, se observa que la alanina es el residuo con mayor presencia en la secuencia (12.8%). El grupo R de este aminoácido es un hidrocarburo alifático, sin embargo es el aminoácido alifático menos hidrófobo, por lo que se incluye en la clasificación tanto de aminoácidos polares como no polares, además de que su grupo metil es muy poco reactivo (Nelson y Cox, 2000). Los siguientes residuos más abundantes son la leucina (8.7%), asparagina (8.4%) y glicina (7.8%). Este último residuo es el que le otorga flexibilidad a la estructura de la enzima. Los residuos de menor presencia son metionina (2.5%), prolina (2.2%), fenilalanina (1.9%) e histidina (1.2%). No hay residuos de cisteína (la probabilidad de formación de puentes disulfuro es nula), triptófano, tirosina ni de residuos adicionales (pirrolisina o selenocisteína). Hay mayor presencia de ácido aspártico y glutámico que aportan una carga negativa, comparándolo con arginina y lisina que aportan una carga positiva. Con la composición atómica se obtiene la fórmula condensada (C₁₄₄₅H₂₃₈₇N₄₃₉O₄₉₇S₈). La secuencia que se obtuvo de la identificación por secuenciación de péptidos no contiene residuos de triptófano, tirosina o cisteína y

muy poca cantidad de fenilalanina, por lo que teóricamente es posible que la proteína no absorba en el espectro UV, por lo tanto no se reporta el coeficiente de extinción. El tiempo de vida media que se estima es mayor a 10 h, comparándolo con la información que hay en *E. coli*. Además el valor estimado de estabilidad es de 27.90, lo que quiere decir que es una proteína estable (se les considera estables con un valor menor de 40). Este dato se verificó experimentalmente, ya que el proceso de purificación tomó varios días y la actividad de la proteína se mantuvo. El índice alifático es de 89.19, lo que propone que presenta en su mayoría cadenas lineales, este parámetro se define como el volumen relativo que ocupan las cadenas laterales de los aminoácidos alifáticos (alanina, valina, leucina e isoleucina), este volumen determina a su vez la termoestabilidad de la proteína, siendo directamente proporcional. Finalmente del valor de hidropaticidad (-0.420), se observa que la proteína es hidrofílica. Este valor es la suma de los valores de hidropaticidad entre el número de aminoácidos que se encuentran en la proteína (Gasteiger *et al.*, 2005). (Figura 14).

Número de aminoácidos: 321					
Peso molecular: 34118.97					
Punto isoelectrico teórico: 4.85					
Composición de aminoácidos:			Composición atómica:		
Alanina (A)	41	12.8%	Carbon	C	1445
Arginina (R)	14	4.4%	Hydrogen	H	2387
Asparagina (N)	27	8.4%	Nitrogen	N	439
Ácido aspártico (D)	25	7.8%	Oxygen	O	497
Cisteína (C)	0	0.0%	Sulfur	S	8
Ácido glutámico (Q)	25	7.8%			
Glutamina (E)	17	5.3%			
Glicina (G)	25	7.8%			
Histidina (H)	4	1.2%			
Isoleucina (I)	23	7.2%			
Leucina (L)	28	8.7%			
Lisina (K)	16	5.0%			
Metionina (M)	8	2.5%			
Fenilalanina (F)	6	1.9%			
Prolina (P)	7	2.2%			
Serina (S)	21	6.5%			
Treonina (T)	18	5.6%			
Triptófano (W)	0	0.0%			
Tirosina (Y)	0	0.0%			
Valina (V)	16	5.0%			
Pirrolisina (O)	0	0.0%			
Selenocisteína (U)	0	0.0%			
Número total de residuos con carga negativa (Asp + Glu): 42			Fórmula: C ₁₄₄₅ H ₂₃₈₇ N ₄₃₉ O ₄₉₇ S ₈		
Número total de residuos con carga positiva (Arg + Lys): 30			Número total de átomos: 4776		
Coefficientes de extinción:					
Como no hay W, Y o C en la región considerada, su proteína no debe ser visible por espectrofotometría UV.					
Vida media estimada:					
El N-terminal de la secuencia considerada es M (metionina).					
El tiempo de vida media es: 30 horas (reticulocitos de mamíferos, <i>in vitro</i>).					
> 20 horas (levadura, <i>in vivo</i>).					
> 10 horas (<i>E. coli</i> , <i>in vivo</i>).					
Índice de inestabilidad:					
El índice de inestabilidad (II) se calcula que es de 27.90					
La proteína se considera estable.					
Índice alifático: 89.19					
Promedio de hidropaticidad: -0.420					

Figura 14. Reporte de salida del servidor ExPASy, estimado con la herramienta de ProtParam (Tomado de <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

6.3.1.3 Perfil de hidropaticidad

El siguiente análisis se realizó también con el portal ExPASy, con la herramienta de ProtScale y se seleccionó la escala de Hphob (Kyte y Doolittle, 1982). Este estima valores numéricos a los residuos de aminoácidos, conforme a sus características y a su comportamiento. Al graficar los valores (Figura 15) se observa el perfil de hidropaticidad de la proteína. Los valores asignados a cada residuo se muestran en el eje de las ordenadas, los valores negativos, son las regiones hidrofílicas y los valores positivos, las regiones hidrofóbicas. El eje de las abscisas designa la posición de los aminoácidos. Con la predicción de esta herramienta, y complementando con el punto 6.5.1.2, se estima que la proteína de interés tiende a ser hidrofílica, por lo que es altamente soluble en un medio acuoso.

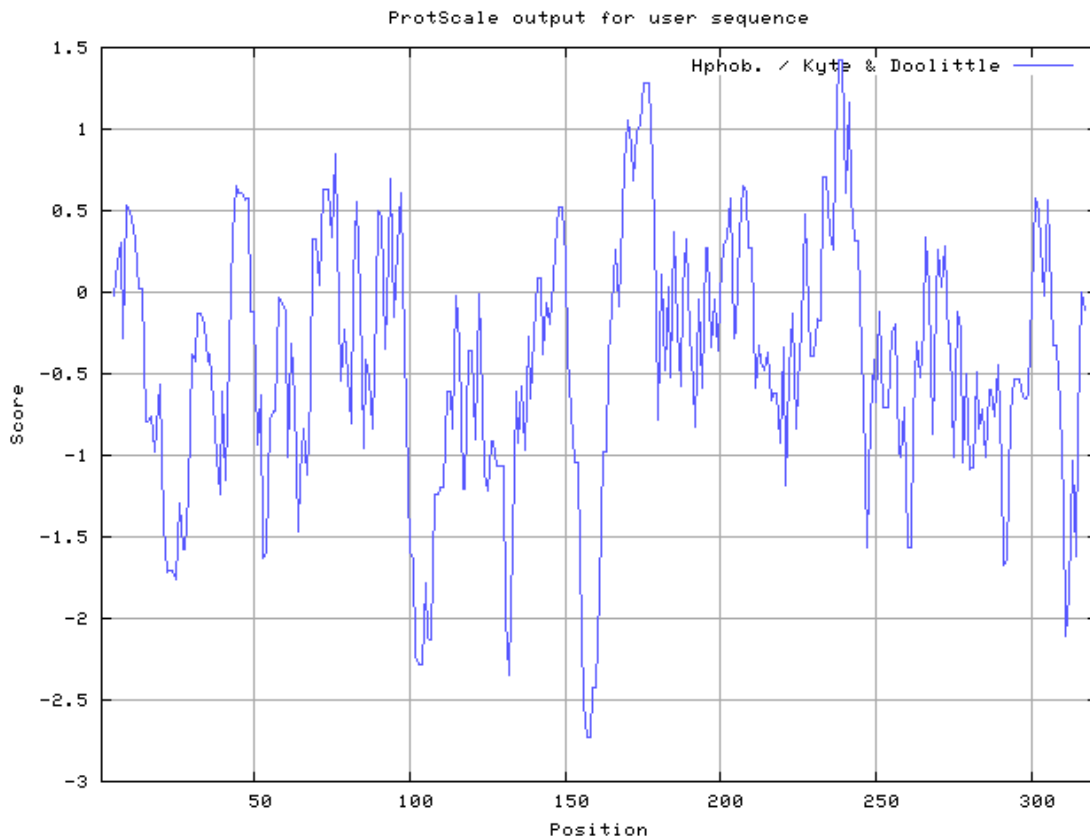


Figura 15. Distribución del perfil de hidropaticidad (Kyte y Doolittle, 1982), obtenido a través del servidor ExPASy con la herramienta de ProtScale (Tomado de <http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl?1>).

6.3.1.4 Localización celular y búsqueda de péptido señal

Posteriormente se utilizó el servidor PSORT.org (Yu *et al.*, 2010), con el que se predice la localización celular o extracelular de la proteína de interés, así como otros datos complementarios. Para la predicción se seleccionó el programa PSORTb v.3.0 que es para secuencias bacterianas. El resultado obtenido fue (Figura 16) que la enzima se localiza en el extracto citosólico, esta información coincide con la parte experimental, ya que la proteína de interés se extrajo de esta fracción celular.

Como se mencionó anteriormente, se encontró que en todas las fracciones del cultivo celular de *B. pumilus* GMA1 hay presencia de PGHs, sin embargo no se tiene la certeza de que sea la misma proteína la que se encuentre en todas las fracciones.

```
SeqID: WP_050943459.1 flagellin [Bacillus pumilus]
Analysis Report:
CMSVM+           Unknown           [No details]
CWSVM+           Unknown           [No details]
CytoSVM+         Cytoplasmic      [No details]
ECSVM+           Unknown           [No details]
ModHMM+          Unknown           [No internal helices found]
Motif+           Unknown           [No motifs found]
Profile+          Unknown           [No matches to profiles found]
SCL-BLAST+       Unknown           [No matches against database]
SCL-BLASTe+     Unknown           [No matches against database]
Signal+          Unknown           [No signal peptide detected]
Localization Scores:
Cytoplasmic      7.50
CytoplasmicMembrane 1.15
Cellwall         0.62
Extracellular    0.73
Final Prediction:
Cytoplasmic      7.50
```

Figura 16. Localización celular de la proteína de interés (Tomado de <http://psort.org/psortb/results.pl>).

Para conocer si la secuencia presenta péptido señal se utilizó el servidor SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011), del cual se eligió como grupo de organismo las bacterias Gram-positivas, en el reporte se obtiene que no hay presencia de algún péptido señal (Figura 17). Los péptidos señal dan la característica del tipo de

secreción o direccionamiento que tiene una proteína dentro de la célula o fuera de esta. Es posible que estas señalizaciones se conserven en la proteína madura, o que se remueva de la secuencia una vez que se encuentra en su destino final (Bendtsen *et al.*, 2004).

# Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	25	0.165		
max. Y	25	0.230		
max. S	17	0.456		
mean S	1-24	0.343		
D	1-24	0.274	0.450	NO
Name=WP_050943459.1 SP='NO' D=0.274 D-cutoff=0.450 Networks=SignalP-TM				

Figura 17. Reporte de salida de SignalP 4.1. (Tomado de <http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=590E819D000054B86D67DB0F&wait=20>)

6.3.1.5 Predicción de estructura tridimensional

El siguiente análisis se realizó con el servidor I-TASSER (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010 y Yang *et al.*, 2015). Este reporta la predicción de estructura y función de las proteínas. En la figura 18 se presenta la estructura terciaria que se predice a partir de la secuencia reportada en la figura 11. Se observa que sólo hay presencia de alfas hélices, ya que la formación de puentes de hidrógeno entre los residuos de aminoácidos se ve favorecida. Al complementar con el reporte de la figura 14 se puede observar que la secuencia tiene siete residuos de prolina, los cuales en la estructura terciaria, se localizan en los sitios donde las alfas hélices se rompen y sólo hay presencia de la estructura primaria, ya que este residuo de aminoácido presenta impedimento estérico y no cuenta con un hidrógeno disponible para formar un puente de hidrógeno.

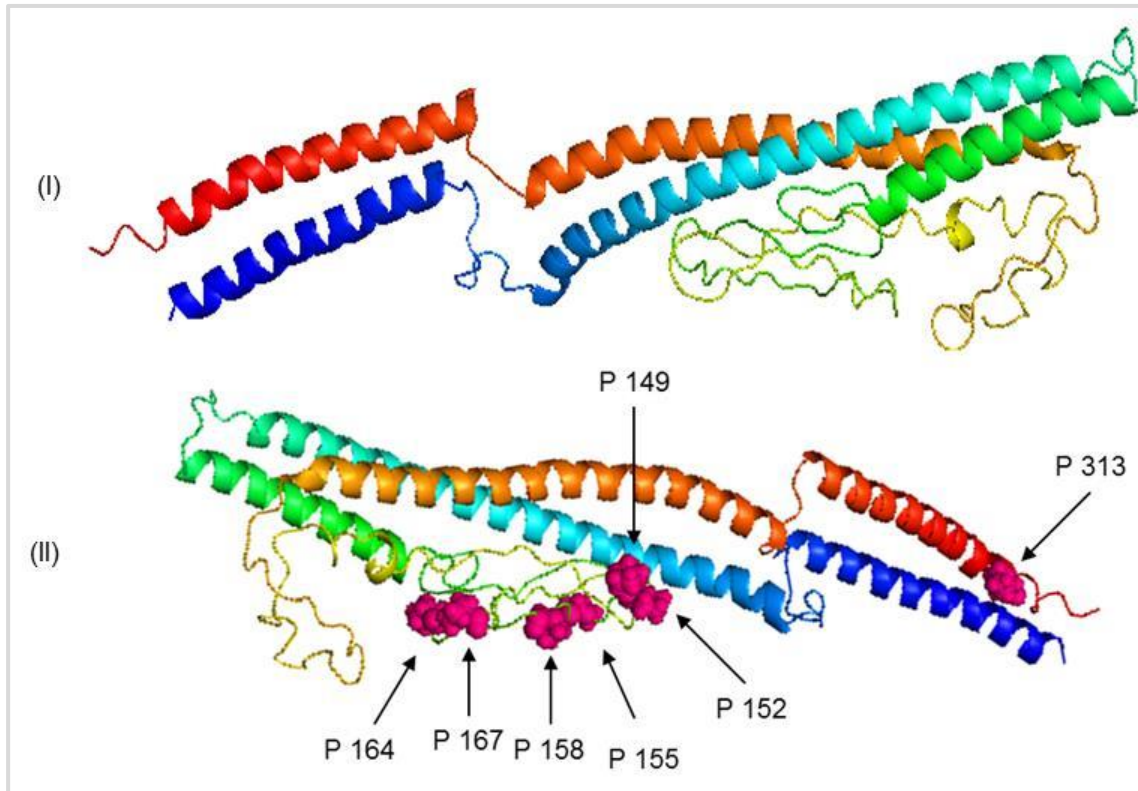


Figura 18. (I) Representación de la estructura terciaria de la flagelina de *B. pumilus*. (II) Sitios con residuos de prolina (P), los números representan la posición en la que se encuentran dentro de la secuencia de aminoácidos (Tomado de <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/output/S328906/> y modificado con PyMOL).

Si se compara la estructura que se predijo, con la que tiene la lisozima, que es una PGH con actividad de *N*-acetilmuramidasa, se encuentran similares, ya que la lisozima, tiene varias hélices alfa, una lámina beta y zonas sin estructura regular (Knubovets *et al.*, 1998).

6.3.1.6 Predicción de unión a ligandos

Como ya se mencionó anteriormente el servidor I-TASSER también reporta la función de la proteína, esta predicción se hace con la herramienta COACH (Yang *et al.*, 2013) que se basa en los reportes que ya existen del comportamiento biológico de enzimas similares y se basa en la predicción de la estructura de I-TASSER.

El reporte de la unión a ligandos incluye uno que es la unión a un ion calcio. Este resultado es de gran interés, ya que al tener un ligando específico para el ion Ca^{2+} podría ser que en ausencia de este ión la función enzimática de la proteína se vea afectada. La predicción arroja que en las posiciones 85 y 88 hay residuos de serina y glutamina que resultan ser específicos para este ligando (Figura 19).

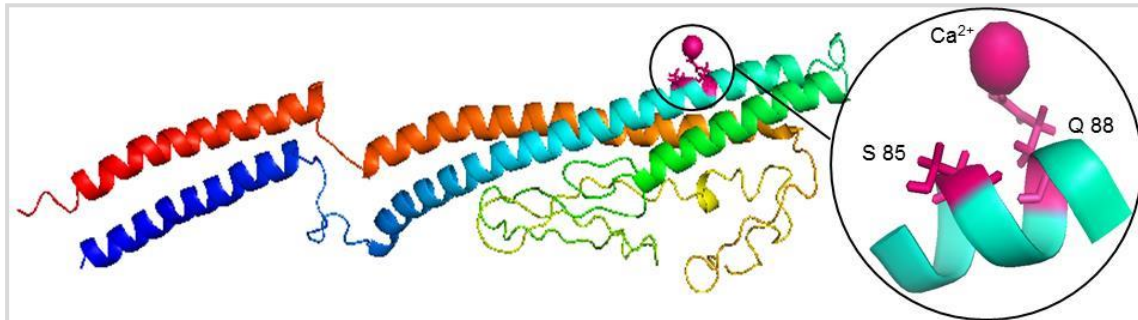


Figura 19. Predicción de unión a ligando de Ca^{2+} , en los residuos de serina (S 85) y de glutamina (Q 88). Los números representan la posición en la que se encuentran dentro de la secuencia de aminoácidos (Tomado de <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/output/S328906/> y modificado con PyMOL).

6.3.1.7 Predicción de la localización del sitio activo

El último reporte que se obtiene de I-TASSER es la predicción de la localización del sitio catalítico, y se encuentra que hay dos posibles opciones. (Figura 20). La primera opción sólo involucra a un residuo de ácido glutámico que se localiza en la posición 260, y la segunda opción involucra dos sitios en las posiciones 54 y 57, en las que se encuentran los residuos de glicina y arginina, respectivamente.

En ambos casos, se considera que estos aminoácidos se involucran en el sitio activo debido a sus características. En el primer caso, el ácido glutámico tiene un grupo carboxilo en su cadena lateral y, por lo tanto, está cargado negativamente a pH neutro. Debido a su naturaleza polar, logra formar interacciones electrostáticas con aminoácidos básicos y, por esta alta capacidad de unión, es posible que se encuentre en los sitios activos de las proteínas. En el segundo caso, se encuentra

a la glicina que es un aminoácido neutro y a la arginina que es un aminoácido básico; este último se encuentra cargado positivamente a pH neutro y tiene un rol esencial con la unión de aniones (Nelson y Cox, 2000).

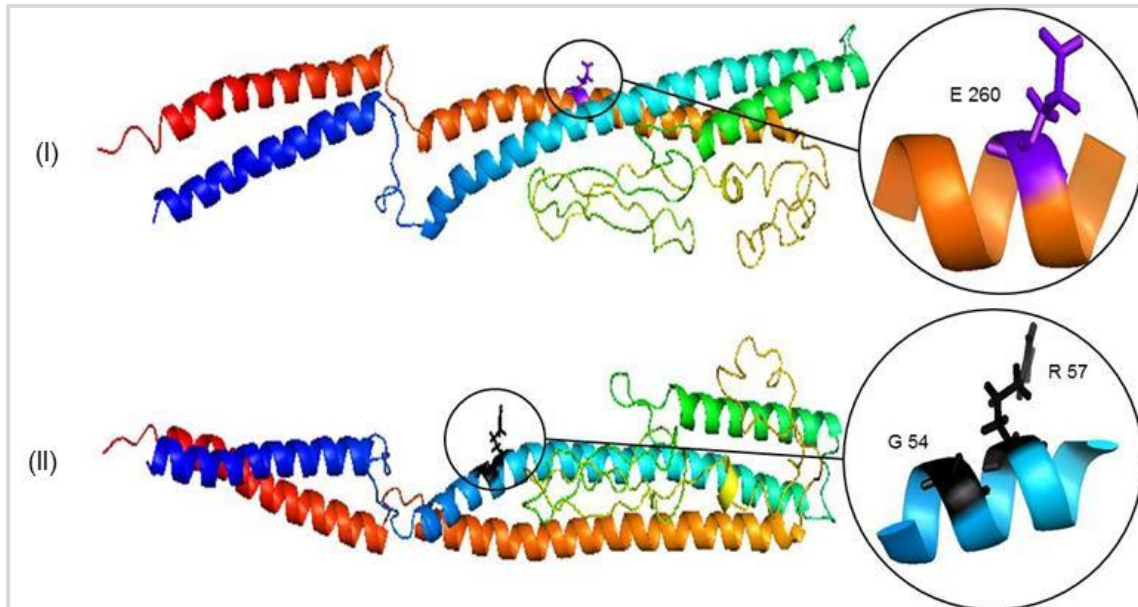


Figura 20. Predicción del sitio activo. (I) En el residuos de ácido glutámico (E 260) y (II) en los residuos de glicina (G 54) y arginina (R 57). Los números representan la posición en la que se encuentran dentro de la secuencia de aminoácidos (Tomado de <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/output/S328906/> y modificado con PyMOL).

6.4 Pruebas de especificidad de sustrato

Como se mencionó anteriormente, las PGHs se clasifican de acuerdo al enlace que hidrolizan, entonces para identificar la especificidad de sustrato y cuantificar la actividad de PGH se hizo reaccionar diferentes sustratos (Tabla 3). Se estableció que la enzima de interés presenta actividad de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, es decir que hidrolizó el enlace amida del hidrocloreuro de L-alanina 4-nitroanilina liberando *p*-nitroanilina y L-alanina. El resto de las pruebas realizadas dieron como resultado valores negativos, lo que quiere decir que en la muestra citosólica no hay enzima presente que sea capaz de hidrolizar el 4-nitrofenil *N*-

acetil- β -D-glucosaminida para liberar *p*-nitrofenol y *N*-acetil- β -D-glucosaminida, ni enzima que hidrolice el peptidoglucano por los enlaces β -1,4 que une los residuos de *N*-acetil-glucosamina y ácido *N*-acetil-murámico lo que liberaría el extremo reductor *N*-acetil-murámico.

Debido a que la técnica que resultó positiva es una técnica rápida, es la que se utilizó para el monitoreo de la actividad de PGH.

Tabla 3. Evaluación de la actividad de PGH de la muestra citosólica de *B. pumilus* GMA1 con diferentes sustratos.

Actividad	Sustrato	U/mg proteína
<i>N</i> -acetil-muramoil-L-alanina-amidasa	Hidrocloreuro de L-alanina 4-nitroanilina	1.45 \pm 0.03
<i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminidasa	4-nitrofenil <i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminida	Negativo
<i>N</i> -acetilmuramidasa	Peptidoglucano de <i>M. lysodeikticus</i>	Negativo

6.5 Purificación por columna de exclusión molecular

Para llevar a cabo el proceso de purificación, se realizaron 10 corridas en una columna de exclusión molecular y en cada una se añadieron 10 mg de proteína total. Para la calibración de la columna se inyectaron estándares de peso molecular conocido, los cuales fueron albúmina (66 kDa) y quimiotripsina (25 kDa), proteínas que eluyeron en la fracción 35 y 55, respectivamente (datos no mostrados). Por lo tanto, era de esperarse que la proteína de interés eluyera entre este número de fracciones.

En la figura 21 se muestra el gráfico creado a partir de los parámetros analizados para cada una de las fracciones que se obtuvieron de la columna.

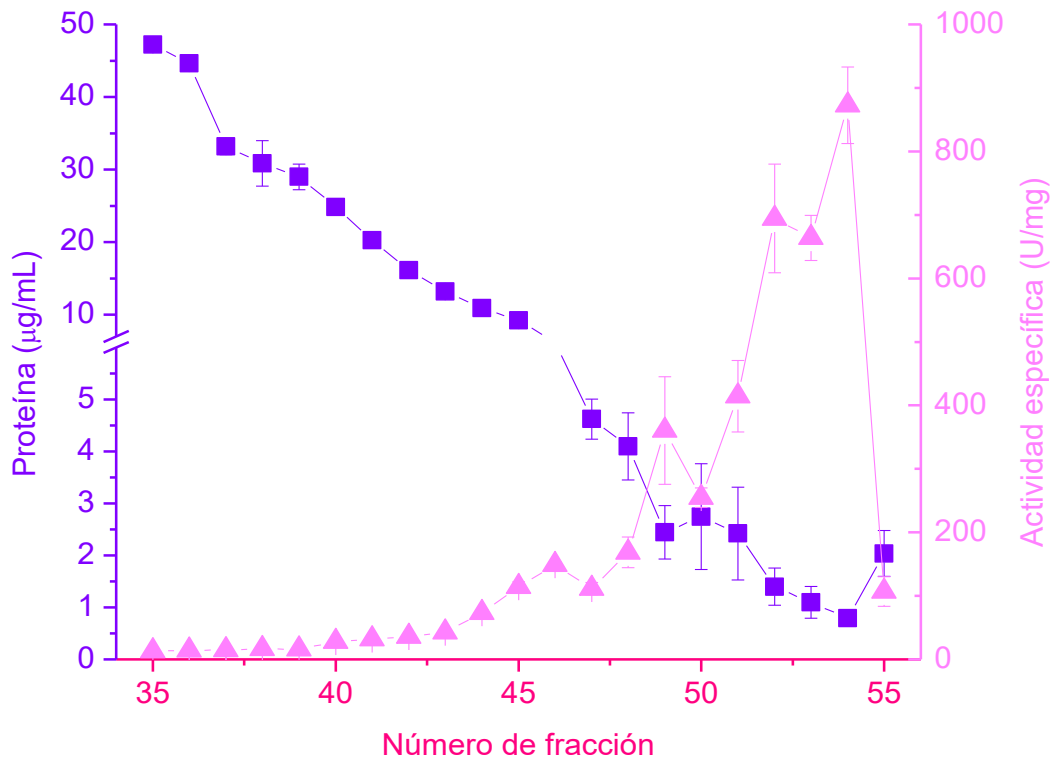


Figura 21. Gráfico de la muestra purificada con la columna Sefacril S-300. Se grafican los valores de concentración de proteína (µg/mL) vs actividad específica de *N*-acetilmuramoi-L-alanina amidasa. Las barras representan la desviación estándar de tres ensayos independientes.

Las fracciones en donde se detecta mayor actividad son 52, 53 y 54. Estas fracciones fueron las que se analizaron posteriormente, y se concentraron por ultrafiltración. Después se cargaron en SDS-PAGE y zimograma contra *M. lysodeikticus* para verificar con el perfil proteico su pureza y en el zimograma si la enzima presentaba actividad de PGH. En la figura 22 se muestran los resultados, se observa que hay una banda con actividad lítica de ~29 kDa, a parte de un

barrido de bandas, que sólo se detecta en zimografía, la presencia de este barrido de bandas de menor peso molecular y con actividad, posiblemente se debe a la degradación de la proteína de interés, y se infiere que la degradación no abarcó al sitio catalítico, ya que a pesar de que existe la pérdida de péptidos, no tuvo influencia con la actividad de PGH. La degradación de las proteínas tiene que ver con todas las condiciones en las que se llevó a cabo el proceso de purificación, puesto que los cambios de temperatura y el tiempo de análisis son uno de los factores que afectan la estabilidad de una proteína.

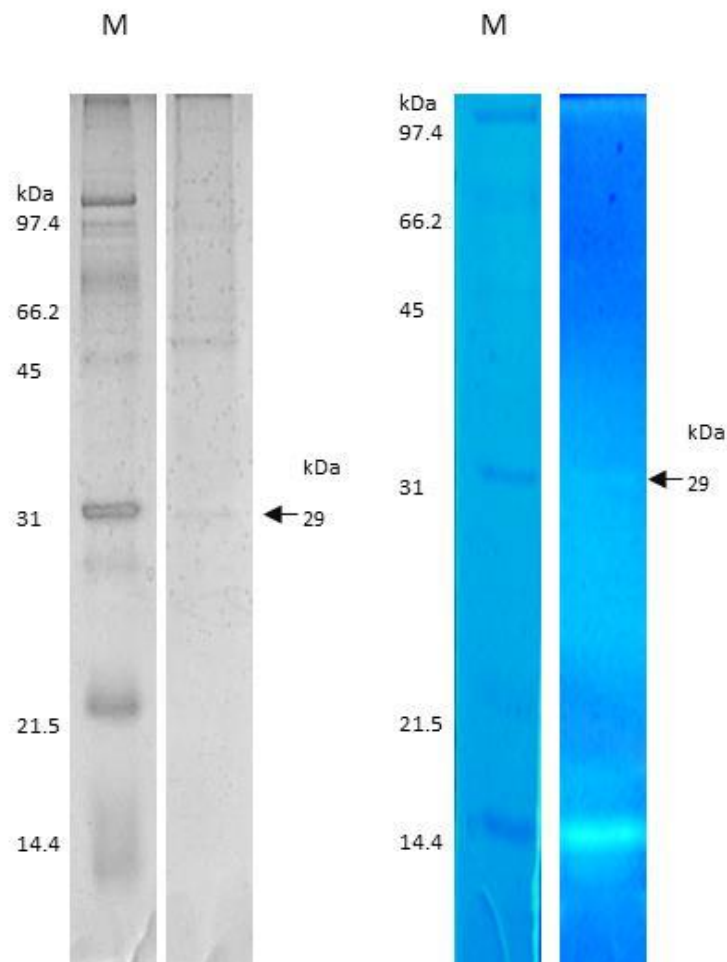


Figura 22. Perfil de proteínas (lado izquierdo) y zimograma contra *M. lysodeikticus* (lado derecho) de la fracción 53 obtenida después del proceso de purificación por la columna Sefacril S-300 y concentrada 100X. (M) Marcador de peso molecular. Se cargó 0.05 µg proteína

El proceso de purificación fue eficiente porque se obtuvo 392 veces pura a la enzima, y práctico porque sólo consistió en la ultrafiltración y el uso de la columna de exclusión molecular. Se monitoreó la cantidad de proteína y la actividad de *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa durante el proceso de purificación y los resultados se reportan en la tabla 4. Al comienzo del proceso hay 53.64 mg de proteína total y conforme se realizan los pasos de purificación este valor va disminuyendo; esto se debe a que en cada paso se van quitando proteínas contaminantes, además de que se considera que existen pérdidas de muestra por el trabajo experimental, por lo que después de concentrar la muestra se tiene 36.22 mg de proteína; mientras que la actividad específica aumentó 1.3 veces. Se puede observar que la etapa más eficiente del proceso de purificación fue el paso por la columna de exclusión molecular, ya que la actividad específica aumentó 392 veces y el porcentaje de recuperación fue del 3.4%, esto quiere decir que aunque hay una cantidad de proteína menor, lo que se obtiene es la enzima pura con actividad de PGH.

Tabla 4. Proceso de purificación de la enzima, situada en la fracción citosólica de *B. pumilus* GMA1, con actividad de PGH.

Muestra	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Recuperación (%)
Citosol	53.64 ± 0.33	90.65 ± 0.002	1.69 ± 0.34	1	100
Citosol ultrafiltrado	36.22 ± 0.29	82.22 ± 0.01	2.27 ± 0.14	1.3	90.7
Fracción 53 Sefacril S-300	0.0046 ± 0.0002	3.045 ± 0.007	662 ± 85	392	3.4

6.6 Caracterización bioquímica

Se utilizó la fracción 53 que se obtuvo de la purificación por columna de exclusión molecular, que es la que se identificó con actividad de PGH y se realizaron los siguientes experimentos.

6.6.1 Condiciones de pH para evaluar la actividad de PGH

Primero se determinó que el pH en el que se presentó la máxima actividad enzimática fue de 9 (Figura 23). Este comportamiento indica que posiblemente el sitio catalítico está involucrado con un aminoácido ionizable a pH básico; comparando este resultado con el análisis "*in silico*" que se reporta en el punto 6.5.1.5, es posible que el sitio activo se conforme de glicina y arginina localizados en la posición de la secuencia 54 y 57, respectivamente.

Los valores de actividad para pH 8 y 10 disminuyen 10%, mientras que a pH neutro la actividad disminuye más de 40%. Y para el intervalo de pH ácido comprendido entre 3 a 6 la actividad se abate más del 90%. Este resultado es útil para la aplicación de la enzima en la industria, ya que para garantizar la actividad de PGH, es necesario que esté en presencia de pH básico para que se aproveche el 100% de actividad enzimática.

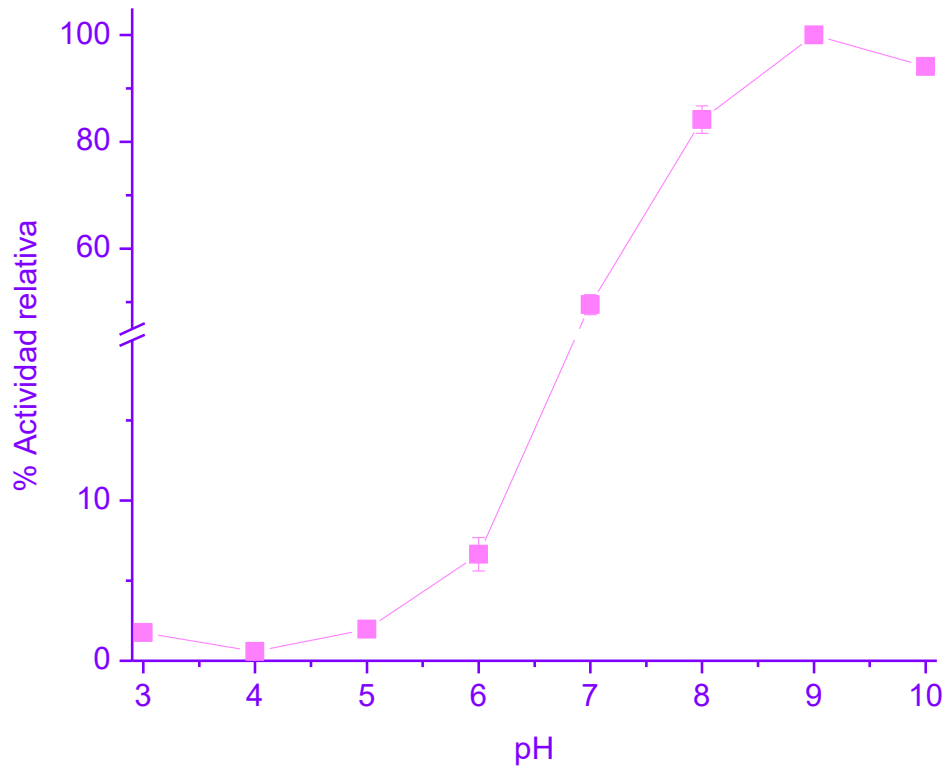


Figura 23. Determinación del mejor pH para la actividad de PGH de la enzima pura.

6.6.2 Estabilidad al pH (1 h de incubación)

El siguiente análisis fue para determinar el intervalo de pH en el que se mantiene estable la proteína, durante 1 h. Para medir la actividad de PGH, se utilizó el pH de 8, ya que este es el mejor pH que se determinó el gráfico 23. En la figura 24 se muestra que la proteína de interés, logra activarse después de ser incubada a pH 8 durante 1 hora, a pesar de haber sido expuesta durante 1 hora a otros valores de pH; ya que se observa que a cualquier pH el porcentaje de actividad es mayor al 100%. A partir de valores de 7 hasta 9 la actividad comienza a incrementar desde 17 hasta 32 veces, pero a pH 10 vuelve a observarse una ligera disminución de actividad. Para el intervalo de pH comprendido desde 3 a 6 la

actividad sólo incrementó hasta 12 veces. El valor que se utilizó como control para este análisis fue el que se obtuvo como 100% de la gráfica 23. Es de importancia conocer el efecto que tiene el incubar a la enzima por determinados periodos de tiempo a diferentes valores de pH, ya que es un criterio de selección para su aplicación en diferentes procesos industriales.

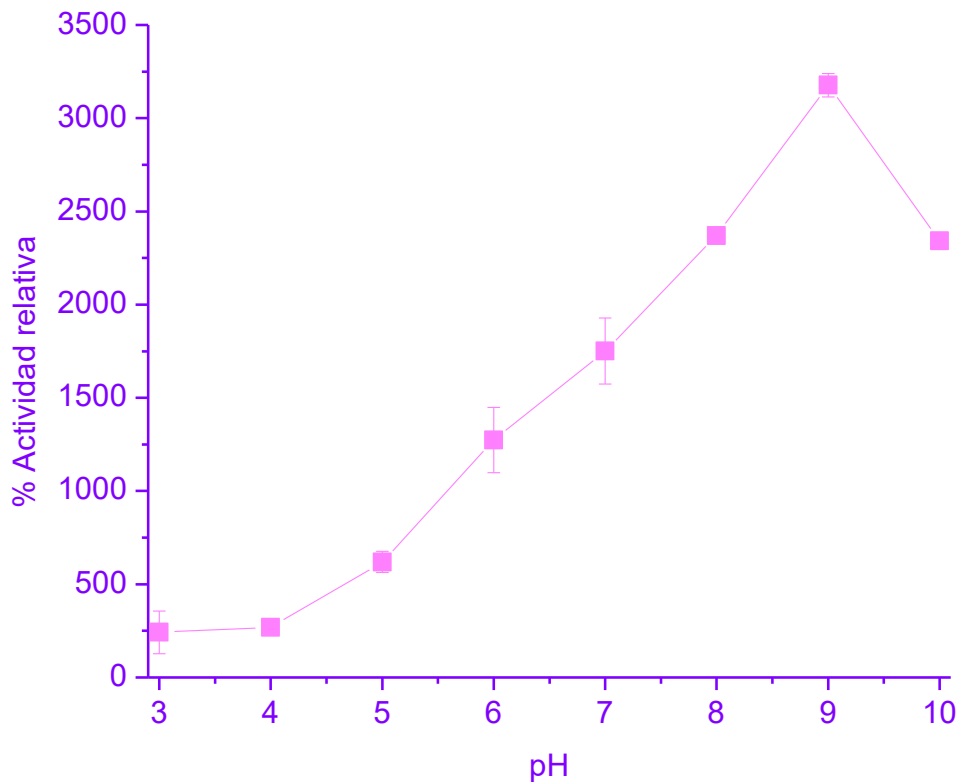


Figura 24. Comportamiento de la enzima pura incubada durante 1 h a diferentes valores de pH.

6.6.3 Condiciones de temperatura para evaluar la actividad de PGH

Cuando se aumenta la temperatura en una reacción, aumenta la energía de las moléculas, éstas se excitan y, por lo tanto, la actividad aumenta. En la figura 25 se muestra que la temperatura en la que se presenta la máxima actividad es de 37°C,

ya que se observa que aumentó casi 70% la actividad entre 24 y 37°C, mientras que a 45, 50 y 60°C la actividad va disminuyendo desde el 60% hasta el 40%, pero a temperaturas más altas como 70, 80 y 90°C la actividad ya se abatió más del 90%. El intervalo de temperatura en el cual se encuentra la máxima actividad de las enzimas es de interés para su uso potencial en la biotecnología. Se ha reportado que el intervalo de temperatura en el cual se encuentra la máxima actividad de algunas PGHs es de 37 a 60°C (Kyomuhendo et al., 2007).

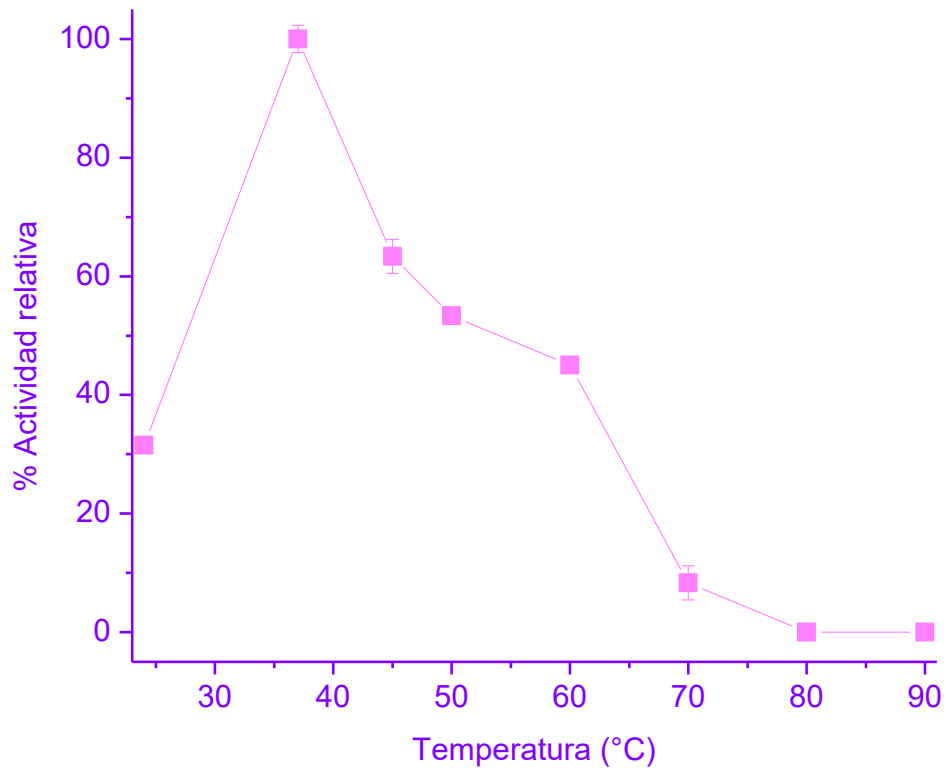


Figura 25. Comportamiento de la actividad enzimática a diferentes temperaturas de reacción. .

6.6.4 Estabilidad térmica (1 h de incubación)

Una de las características que también es importante conocer es el comportamiento de las enzimas tras periodos de incubación a diferentes valores de temperatura. Después de incubar a la enzima a diferentes temperaturas, se midió la actividad de PGH a 37°C, ya que esta es la mejor temperatura que se determinó en el gráfico 25. Se observó (Figura 26) que la enzima se activó a temperaturas de 24, 37, 45 y 50°C; durante 1 h; pero a partir de 60°C la actividad disminuyó el 10%, mientras que para 70, 80 y 90°C la actividad se abatió más del 90%. Existen enzimas que son altamente resistentes a la desnaturalización irreversible, por lo que es posible que estas logren replegarse nuevamente en cuanto la temperatura desciende, recuperando así su actividad (Briers *et al.*, 2008). En cuanto al comportamiento previamente descrito de esta proteína, se sugiere que tras estar 1 h en incubación a altas temperaturas, sólo se logra recuperar el 10% de actividad. Complementando con el análisis del punto 6.3.1.2, la termoestabilidad se ve influenciada por el valor del índice alifático de una proteína. El valor que se utilizó como control para este análisis fue el que se obtuvo como 100% de la gráfica 25.

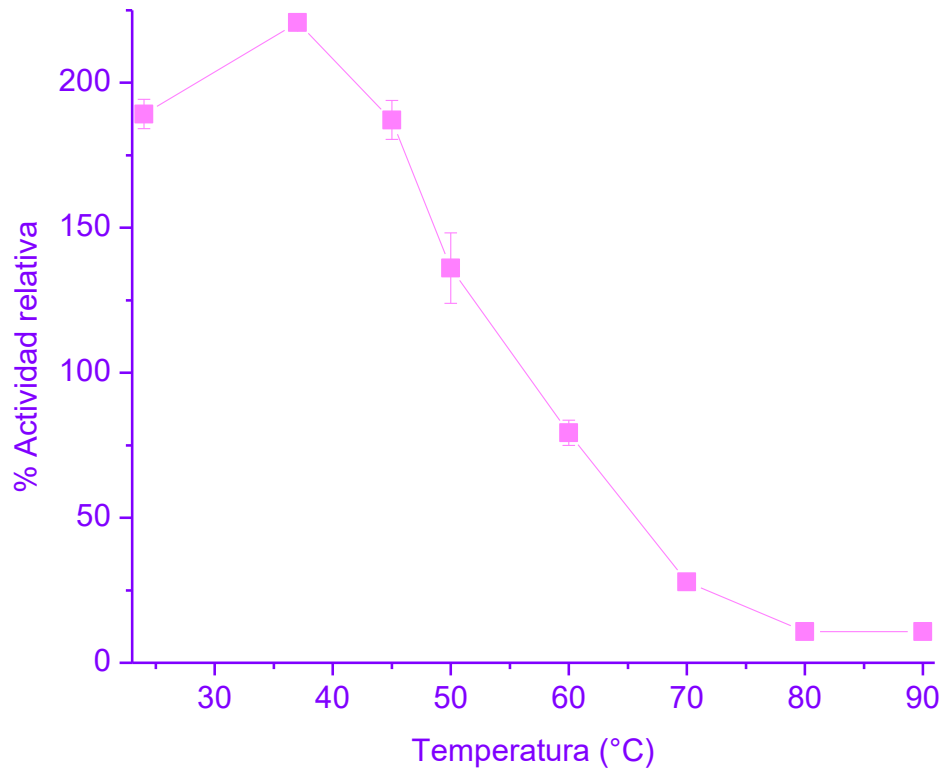


Figura 26. Efecto de incubar a la enzima pura durante 1 h a diferentes valores de temperatura.

6.6.5 Efecto de iones metálicos sobre la actividad de PGH

Se determinó el efecto de diferentes iones para saber si es esencial la presencia de alguno de ellos o si son capaces de inhibir la actividad de la enzima. En la figura 27 se observa que en presencia de todos los iones analizados, la actividad de PGH aumenta, estos iones son Zn^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . En presencia de Zn^{2+} y K^+ , en concentraciones de 1 y 10 mM, la actividad aumentó 6 veces más que la enzima tratada previamente con EDTA, con Na^+ y Ca^{2+} la actividad aumentó 4 veces en concentraciones 1 mM y 5 veces en concentraciones 10 mM. Y finalmente en presencia de Mg^{2+} la actividad sólo aumentó 40% para ambas concentraciones. Como ya se mencionó anteriormente, el control de esta prueba

fue la enzima tratada con EDTA 100 mM, el que se utilizó para secuestrar los iones metálicos que se encontraban previamente en el medio, que posiblemente se pudieran involucrar en el sitio catalítico de la proteína, y así sólo observar el efecto de un ión metálico a la vez. Por estos resultados, se puede inferir que la presencia de los distintos iones aumenta la afinidad de la enzima por el sustrato. En la literatura se encuentra que las enzimas con actividad de PGH contienen un sitio de unión a Zn^{2+} por lo que es un ión esencial para la catálisis (Schmelcher *et al.*, 2012). Aunado a esto, en el análisis del punto 6.5.1.6, se predice un sitio de unión a los iones de Ca^{2+} , lo que puede explicar que en presencia de este ión divalente la actividad aumenta.

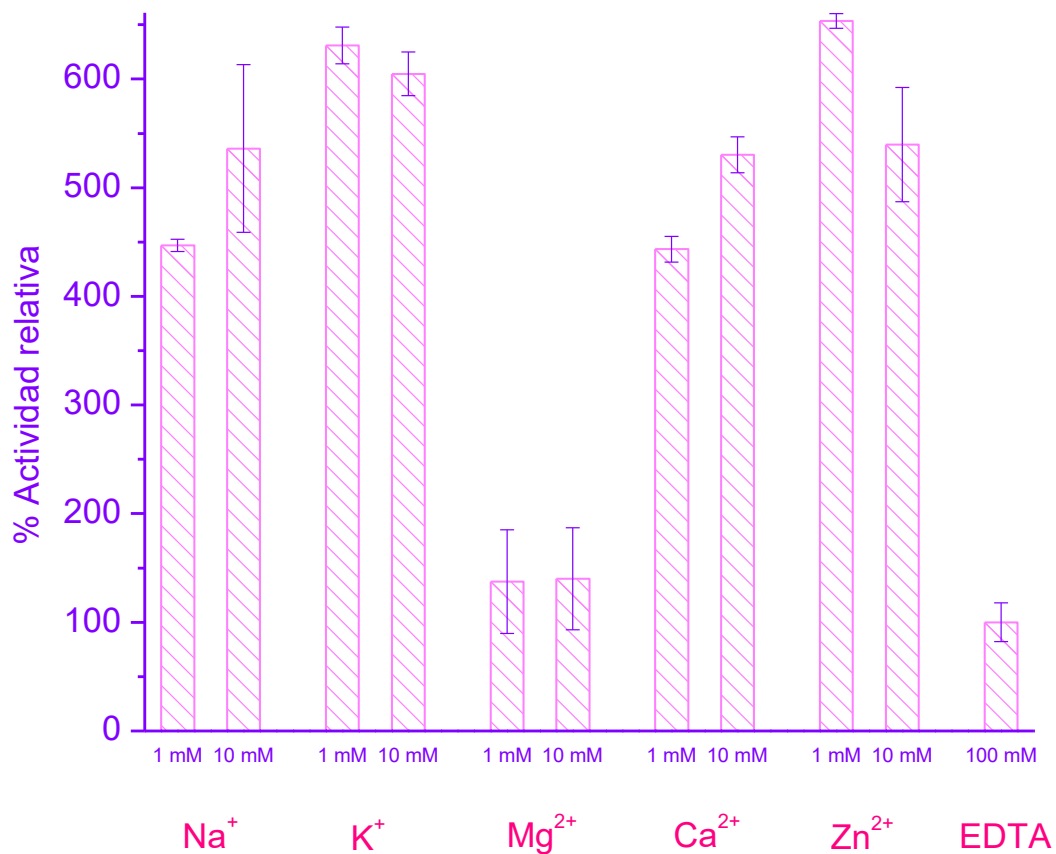


Figura 27. Efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima pura, con actividad de PGH.

6.6.6 Efecto de inhibidores sobre la actividad de PGH

El efecto que se observa en la actividad de una proteína, con el uso de diversos agentes inhibidores va directamente relacionado con el tipo de acción de cada uno, en este caso se analizó el efecto del EDTA y el PMSF (Figura 28). El primero es un agente quelante que inhibe a metaloenzimas, ya que secuestra al ión involucrado en la catálisis, que frecuentemente es el ion Zn^{2+} (Morner y Braun, 1984); y el segundo es un inhibidor de serin-proteasas ya que inhibe sitios con residuos de serina; hay reportes de PGHs que se inhiben con el PMSF y se les denominan serin-proteinasas (Stepnaya *et al.*, 2005). Para ambos casos, la actividad disminuyó respecto al control, que fue la enzima sin tratamiento. Utilizando EDTA la actividad disminuyó 60% (1 mM) y 70% (10 mM); con PMSF disminuyó 20% (1 mM) y 90% (10 mM). La inhibición por la presencia del EDTA se complementa con los resultados mostrados anteriormente, ya que se sabe que se requiere la presencia de iones para la activación de la enzima; se ha reportado que para enzimas de este tipo, la actividad lítica se reduce al ser tratado con EDTA, debido a que el agente quelante secuestra el ión involucrado en el sitio catalítico de la proteína (Schmelcher *et al.*, 2012). Por otro lado, se sabe que la inhibición por la presencia del PMSF, se debe a que posiblemente en el sitio activo de la enzima hay un residuo de serina. Comparando con los resultados del análisis bioinformático, se encuentra un residuo de serina en el sitio de unión al ion Ca^{2+} , y por lo tanto, podría ser una de las causas por la que la actividad disminuye ante la presencia del PMSF.

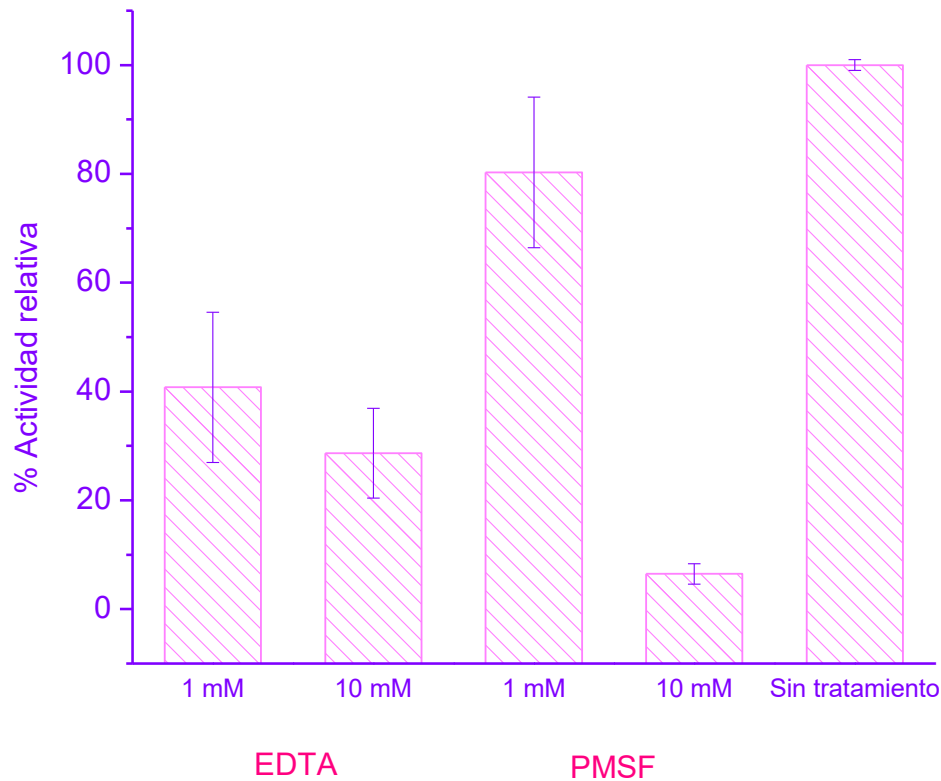


Figura 28. Efecto del EDTA y PMSF en la actividad de la enzima pura, con actividad de PGH.

6.7 Espectro de inhibición

Se realizaron pruebas de difusión en agar con una batería de 12 microorganismos, los cuales se dividieron en dos categorías, Gram-positivos y Gram-negativos, esta clasificación se realizó de esta manera, ya que la presencia y la cantidad de peptidoglucano es diferente. En la tabla 5 se reportan los resultados donde se puede observar que no hay efecto antimicrobiano contra ninguno de los microorganismos Gram-negativos. Esto se explica debido a que su pared celular posee menos cantidad de peptidoglucano, mismo que no está fácilmente disponible, lo que limita la actividad de las PGHs, en cambio para casi todos los microorganismos Gram-positivos se encontró actividad antimicrobiana, excepto con *L. monocytogenes*. Esto último se puede explicar ya que la composición del peptidoglucano para cada microorganismo es diferente y la disponibilidad y

cantidad de cada uno de sus componentes es variada, además existen reportes que indican que algunos microorganismos son capaces de realizar cambios estructurales en el peptidoglucano, lo cual implica que específicamente una PGH no logre atacar la pared celular (Rae *et al.*, 2011). Sin embargo es de gran interés el efecto antibacteriano que presenta esta enzima, ya que es capaz de inhibir el crecimiento de varios microorganismos patógenos como *S. pyogenes*, *B. cereus* y *S. aureus*.

Complementando con los resultados de la caracterización bioquímica, se determinó que la aplicación de esta PGH en la industria de alimentos se ve muy limitada, ya que la mayoría de los alimentos se encuentran en un pH ácido. Sin embargo no se descarta su posible uso en la industria farmacéutica como posible sanitizante, ya que al inhibir el crecimiento de varios microorganismos patógenos, sigue siendo de gran interés para su aplicación.

Tabla 5. Inhibición de diferentes cepas bacterianas por efecto de la enzima pura obtenida de la fracción citosólica de *B. pumilus* GMA1.

Cepas	mm/mg proteína
Gram-positivas	
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	120.99
<i>Enterococcus faecalis</i> QB	241.98
<i>Enterococcus faecium</i> QB	108.89
<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	241.98
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	0
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> CFQ-B-103	181.49
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	241.98
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	120.99
<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218	60.5
Gram-negativas	
<i>Escherichia coli</i> BL21	0.00
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	0.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14028	0.00

7. Conclusiones

Se determinó que *B. pumilus* GMA1 presenta varias proteínas con actividad de PGH, capaces de hidrolizar el peptidogluano presente en la pared celular de *M. lysodeikticus*. Se realizó el análisis de la proteína que se encuentra en la fracción citosólica, con un peso molecular experimental de ~29 kDa. Esta presenta actividad de *N*-acetil-muramoil-L-alanina-amidasa y se identificó como flagelina de *B. pumilus*, de la cual se reporta por primera vez su actividad de PGH, por lo cual es un resultado novedoso. Se purificó a la enzima mediante un proceso eficiente y práctico y se caracterizó bioquímicamente. Es una enzima cuya máxima actividad está en el pH de 9, el intervalo de pH en el que es estable la enzima durante 1 h es de 7 a 10. Su actividad más alta se encuentra a una temperatura de 37°C y que el intervalo de temperatura en que es estable durante 1 h es de 37°C a 50°C. Además se encontró que la proteína requiere la presencia de iones Zn^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} para aumentar su actividad, y que en presencia del EDTA y del PMSF, la actividad se abate, y estos resultados son muy cercanos a lo que se predijo con el análisis bioinformático. El espectro de inhibición que se obtuvo da pauta a su posible uso en la industria como sanitizante, ya que inhibe el crecimiento de varios microorganismos Gram-positivos reportados como patógenos y causantes de diferentes enfermedades.

8. Perspectivas

- Realizar la identificación de las demás proteínas con actividad antimicrobiana presentes en las diferentes fracciones celulares y en el sobrenadante.
- Realizar la clonación y expresión de la enzima con actividad lítica para obtener producción a mayor escala.
- Evaluar la aplicación industrial de la enzima.

9. Referencias

- Aunpad, R. y Na-Bangchang, K. (2007). Pumilicin 4, A Novel Bacteriocin with Anti-MRSA and Anti-VRE Activity Produced by Newly Isolated Bacteria *Bacillus pumilus* Strain WAPB4. *Current Microbiology*, 55, 308-313.
- Ayala-Esquivel, H. (2011). *Purificación e identificación de enzimas de Bacillus pumilus GMA1 con potencial en biocatálisis*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Barbosa-González P. (2015). *Diseño y validación de un método zimográfico para la caracterización de una enzima con actividad de N-acetilglucosaminidasa de Pediococcus acidilactici ATCC 8042*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- Bendtsen, J., Nielsen, H., Heijne, G. y Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340, 783-795.
- Bermudez-García E. (2010). *Modificación enzimática de flavonoides con las carboxilesterasas de Bacillus pumilus GMA1*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- Bhate, S. (1955). Pumilin, a New Antibiotic from *Bacillus pumilus*. *Nature*, 175, 816-817.
- Brack, C., Mikolasch, A., Schlueter, R., Otto, A., Becher, D., Wegner, U., Albrecht, D., Riedel, K. y Schauer, F. (2015). Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Marine Biotechnology*, 17, 290-304.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Briers, Y., Miroshnikov, K., Chertkov, O., Nekrasov, A., Mesyanzhinov, V., Volckaert, G., y Lavinge, R. (2008). The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage phiKZ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374, 747-751.
- Bustos-Jaimes I. (1995). *Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasa proveniente de un ambiente extremo*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C.W., y Lavigne, R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 164-171.
- Carrillo, W. (2013). Lisozima: actividad antibacteriana y alergenicidad. *Actualización en nutrición*, 14, 314-326.
- Departamento de Biología. (2014). *Protocolo de prácticas Microbiología Experimental*. Facultad de Química, UNAM.
- Eckert C., Lecerf M., Dubost L., Arthur M. y Mesnage S. (2006). Functional analysis of AtIA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 188, 8513-8519.
- FDA U.S. Food and Drug Administration. (2015). *GRAS Notice (GRN) No. 561*. [en línea](Actualizado al 18 de agosto de 2017). Disponible en <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=561> [Último acceso el 5 de septiembre de 2017].
- Fein, J. (1979). Possible involvement of bacterial autolytic enzyme in flagellar morphogenesis. *Journal of Bacteriology*, 137, 933-946.
- Fenton M., Ross R.P., McAuliffe O., O'Mahony J. y Coffey A. (2011). Characterization of the staphylococcal bacteriophage lysin CHAP(K). *Journal of Applied Microbiology*, 111, 1025-1035.

- Fischetti V.A. (2010). Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 357-362.
- García P., Rodríguez L., Rodríguez A. y Martínez B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 373-382.
- García-Cano I. (2013). *Peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042: detección, localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química UNAM.
- García-Cano, I., Campos-Gómez, M., Contreras-Cruz, M., Serrano-Maldonado, C., González-Canto, A., Peña-Montes, C., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez-Esquivel, S. y Farrés, A. (2015). Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 8563-8573.
- García-Cano, I., Velasco-Pérez, L., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Mendoza-Hernández, G., Llorente-Bousquets, A. y Farrés, A. (2011). Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 607-615.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R. y Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 571-607.
- Gilliver, K. (1949). The antibacterial properties of some species of aerobic spore-forming bacilli. *British Journal of Experimental Pathology*, 30, 214-220.

- Hirano, T., Minamino, T. y Macnab, R. (2001). The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella FlgJ*, a flagellum-specific muramidase. *Journal of Molecular Biology*, 312, 359-369.
- Humann, J y Lenz, L. (2009). Bacterial peptidoglycan degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection. *Journal of Innate Immunity*, 1, 88-97.
- Knubovets, T., Osterhout, J., Connolly, P. y Klibanov, A. (1999). Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol. *Biochemistry*, 96, 1262-1267.
- Kyomuhendo, P., Myrnes, B. y Nilsen, I. (2007). A cold-active salmon goose-type lysozyme with high heat tolerance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2841-2847.
- Kyte, J. y Doolittle, R. (1982). A simple method for displaying the hydrophathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132.
- Layec S., Decaris B. y Leblond-Bourget N. (2008). Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Research in Microbiology*, 159, 507-515.
- Liu, H., Zhang, R., Yao, X., Liu, M., Hu, Z. y Fan, B. (2004). Prediction of the isoelectric point of an aminoacid based on GA-PLS an SVMs. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 44, 161-167.
- Lortal S. y Chapot-Chartier M. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 15, 857-871.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., Brock, T., Rodríguez C. y Sánchez, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos* (10° ed.). Pearson Educación.
- Mathews, C., Ahem, K. y Van Holde, K. (2007). *Bioquímica*. España: Pearson.

- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A., Clifford, M., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E., y Shaecher, K. (2016). *Escherichia coli* Harboring mcr-1 and blaCTX-M on a novel IncF plasmid: first report of mcr-1 in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 4420-4421.
- Mnisi S.M., Louw M.E. & Theron J. (2005). Cloning and characterization of a carboxylesterase from *Bacillus coagulans*. *Current Microbiology*, 50, 196-201.
- Morner, S., y Braun, V. (1984). Murein hydrolase (*N*-acetyl-muramyl-L-alanine amidase) in human serum. *Archives of Microbiology*, 140, 171-177.
- Nambu, T., Minamino, T., Macnab R.M. y Kutsukake, K. (1999). Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 18, 1555-1561.
- Naruse, N., Tenmyo, O., Kobaru, S., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M. y Oki, T. (1990). Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, 43, 267-280.
- Nazina, T., Tourova, P., Poltarau, B., Novikova, E., Grigoryan, A., Ivanova, A., Lysenko, A., Petrunyaka, V., Osipov, G., Belyaev, S. e Ivanov, M. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic *Bacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 433-446.
- Nelson, D. y Cox, M. (2000). *Lehninger: principles of biochemistry*. (3° ed.). Worth publishers.
- Pellegrini, A, Schumacher, S., Sthepan, R. (2003). In-vitro activity of various antimicrobial peptides developed from the bactericidal domains of lysozyme and β -lactoglobulin with respect to *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 54, 34-36.

- Petersen, T., Brunak, S., Von-Heijne, G. y Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8, 785-786.
- Popowska, M. y Markiewicz, Z. (2004). Murein-hydrolyzind activity of flagellin FlaA of *Listeria monocytogenes*. *Polish Journal of Microbiology*, 53, 237-241.
- Prescott L., Harley J. y Klein D. (2002). *Microbiology* (5th ed.). The McGraw-Hill.
- Rae, C., Geissler, A., Adamson, P. y Portnoy D. (2011). Mutations of the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan N-Deacetylase and O-Acetylase result in enhanced lysozyme sensitivity, bacteriolysis, and hyperinduction of innate immune pathways. *Infection and Immunity*., 79, 3596-3606.
- Roy, A., Kucukural, A. y Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 12, 725-738.
- Schmelcher, M., Waldherr, F., y Loessner, M. (2012). *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 633-643.
- Shapiro, A., Viñuela, E. y Maziel, J. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28, 815-820.
- Sharma, A., Kumar, S., Harish, K., Dhakan, D., y Sharma, V. (2016). Prediction of peptidoglycan hydrolases a new class of antibacterial proteins. *BMC Genomics*, 17, 1-12.
- Stepnaya, O., Tafasman, I., Logvina, I., Ryazanova, L., Muranova, T. y Kulaev, I. (2005). Isolation and characterization of a new extracellular bacteriolytic endopeptidase of *Lysobacter* sp. XL1. *Biochemistry*, 70, 1031-1037.

- Szweda P., Schlemm M., Kotlowski R., Gorczyca G., Zalewska M. y Millewski, S. (2012). Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1157-1174.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9° ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Vollmer W., Joris B., Charlier P., y Foster S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 259-285.
- Yang, J., Roy, A. y Zhang, Y. (2013). Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics*, 29, 2588-2595.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. y Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12, 7-8.
- Yu, N., Wagner, J., Lair, M., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S., Ester, M., Foster, L. y Brinkman, F. (2010). PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26, 1608-1615.
- Yuan, Y. y Gao, M. (2015). Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy. *Scientific Reports*, 5, 1-9.
- Zhang, Z. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 1-8.