



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* ATCC 8042 DE 110-KDA”

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:  
PAOLA ANDREA BARBOSA GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA  
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL  
DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS  
Instituto de Química, UNAM

DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA  
Instituto de Biotecnología, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA. CD. MX. , enero, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* ATCC 8042 DE 110 KDA

**Reconocimientos**

**Jurado Asignado**

<b>Presidente:</b>	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	IIB, UNAM
<b>Vocal:</b>	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	FQ, UNAM
<b>Vocal:</b>	Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo	IFC, UNAM
<b>Vocal:</b>	Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja	IIB, UNAM
<b>Secretario:</b>	Dr. José Luis Puente García	IBT, UNAM

**Sitio donde se desarrolló el tema**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 312 del Conjunto E, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González-Saravia.

**Los miembros del Comité Tutoral fueron:**

Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros	IQ, UNAM
Dr. José Adelfo Escalante Lozada	IBT, UNAM

---

Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González-Saravia  
TUTOR

---

Paola Andrea Barbosa González  
SUSTENTANTE

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 312 del Conjunto E, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González-Saravia durante la realización del mismo se contó con el financiamiento del Programa PAIP (5000-9095).

La sustentante también reconoce el apoyo económico de CONACyT (Beca de Maestría CVU: 700157) y del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la UNAM para la asistencia al Séptimo Congreso de Microbiólogos Europeos (FEMS 2017) llevado a cabo en Valencia, España del 9 al 13 de julio de 2017.

## Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por la incansable labor que realiza al brindar educación pública, gratuita, laica y de calidad, por ser el principal pilar de la investigación del país y por fomentar la cultura en sus estudiantes.
- Al pueblo de México por costear la realización de este proyecto a través del Programa de Becas de Posgrado de CONACyT.
- Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la UNAM por el apoyo económico para la asistencia al Séptimo Congreso de Microbiólogos Europeos (FEMS 2017) llevado a cabo en Valencia, España del 9 al 13 de julio de 2017.
- A la Facultad de Química de la UNAM, mi segunda casa, por formarme como una profesionista integral.
- A la Dra. Amelia Farrés, un ejemplo de sencillez, tenacidad y responsabilidad, por permitirme formar parte de su equipo y ser la primera persona que confió en mí y en mi sueño de convertirme en científica.
- A los miembros de mi Comité Tutoral, el Dr. Roberto Arreguín y el Dr. Adelfo Escalante que con sus comentarios útiles y recomendaciones lograron que este proyecto llegará a buen término.
- A los miembros del Jurado por la amabilidad de revisar este proyecto y por las correcciones al mismo que optimizaron su contenido.
- Al Dr. Israel García Cano por la enorme ayuda que me brindó para la planeación de este proyecto, todas las horas de trabajo invertido en el mismo y lo más importante, por su amistad
- Al Dr. Augusto González Canto de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina quien brindó todas las facilidades para la purificación de la enzima de interés y amablemente compartió sus conocimientos.
- A la Dra. Carolina Peña, Técnico de Laboratorio durante la realización de este proyecto por su continua disposición a ayudar a los demás, su eficiencia y sabiduría que son un ejemplo a seguir

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
Bacterias Ácido Lácticas (BALs).....	5
<i>Pediococcus sp</i> .....	8
Importancia del género .....	9
BALs y su efecto bioconservador en alimentos .....	10
Bioconservadores de naturaleza no proteica .....	11
Bioconservadores de naturaleza proteica .....	12
Peptidoglucano hidrolasas (PGHs).....	12
Bacteriocinas .....	16
<b>ANTECEDENTES</b> .....	19
<i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 y su efecto antimicrobiano.....	19
Clonación del gen que codifica para la expresión de la proteína de 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.....	21
<b>JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	24
<b>HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>OBJETIVOS</b> .....	26
Objetivo general .....	26
Objetivos particulares.....	26
<b>METODOLOGÍA</b> .....	27
Análisis bioinformático .....	27
Identificación de dominios y regiones homologas en la proteína de 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> .....	27
Predicción estructural de la proteína. ....	28
Análisis de la estructura secundaria y predicción de cruces transmembranales .....	28
Modelado in silico de la proteína de interés .....	30
Cepas y medios de cultivo utilizados .....	30
Cepas utilizadas .....	30
Medios de cultivo utilizados.....	31
Clonación de la secuencia que codifica para la expresión de la proteína de 110-kDa .....	31
Extracción del ADN genómico de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 .....	31
Amplificación del gen que codifica a la proteína de 110-kDa .....	32
Construcción del plásmido TOPO 2.1-110 (Vector de clonación).....	33
Obtención de células <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con el vector TOPO2.1-110 .....	33

Construcción del plásmido pET19b-110 en <i>E. coli</i> BL21 .....	34
Evaluación de las condiciones óptimas de producción de la proteína recombinante de 110-kDa. ....	37
Determinación del perfil proteico por SDS-PAGE.....	37
Determinación de la actividad de PGH en zimograma con <i>M. lysodeikticus</i> .....	38
Detección de la actividad antibacteriana mediante pruebas de difusión en agar .....	38
Cuantificación de la cantidad de proteína por el método de Bradford.....	38
Determinación de la presencia de cuerpos de inclusión y solubilización de la proteína recombinante de 110-kDa .....	38
Inducción en frío.....	39
Solubilización de la proteína recombinante con detergentes.....	39
Optimización de la solubilización de la proteína recombinante. ....	39
Evaluación del espectro antimicrobiano de la proteína recombinante de 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.....	40
Determinación del mecanismo de acción (Especificidad por sustratos análogos del peptidoglucano).....	40
Evaluación de la actividad de N-acetilglucosaminidasa .....	40
Evaluación de la actividad de amidasa .....	41
Evaluación de la actividad de endopeptidasa .....	41
Evaluación de la actividad muramidasa .....	41
Extracción de peptidoglucano .....	42
Purificación y caracterización bioquímica de la proteína de 110-kDa recombinante. ....	42
Purificación de la proteína de 110-kDa recombinante.....	42
Caracterización bioquímica de la proteína recombinante de 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 .....	43
Influencia del pH del medio en la actividad de la enzima .....	43
Estabilidad a pH.....	44
Efecto de la temperatura de reacción en la actividad de la enzima.....	44
Estabilidad térmica .....	45
Efecto de iones metálicos.....	45
Efecto de EDTA y PMSF. ....	46
Evaluación de la actividad antimicrobiana de la enzima recombinante de 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 purificada y de la mezcla de ésta con la proteína de 99-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 .....	46
Extracción de la enzima recombinante de 99-kDa <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 .....	46
Zimograma de 4-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina.....	47
Difusión en agar.....	47
Ensayo turbidimétrico .....	47
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>48</b>

1. Generación de un modelo estructural de la proteína en la membrana y dilucidación de la funcionalidad de la misma mediante análisis bioinformático.....	48
Dominios encontrados a partir de un alineamiento de secuencias tipo local (BLAST) usando distintas bases de datos.....	48
Determinación de las regiones altamente conservadas en la proteína de 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> ...	52
Predicción estructural de la proteína.....	57
Evaluación de la posible presencia de péptidos señal.....	58
Determinación de motivos transmembranales (zippers de glicina, cinturones aromáticos, hélices reentrantes y quiebres de prolina).....	58
Modelado de la proteína de membrana de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 .....	60
2. Clonación del gen que codifica para la expresión de la proteína de 110-kDa.....	61
Obtención de la construcción TOPO 2.1-110 .....	61
Obtención de la construcción pET19b-110 en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . .....	62
Amplificación del gen de interés por PCR a partir del plásmido pET19-110 y secuenciación. ....	63
3. Evaluación de las condiciones óptimas de producción de la proteína recombinante de 110-kDa .....	66
Espectro de inhibición de la proteína recombinante de 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 expresada en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	68
Determinación de la presencia de cuerpos de inclusión por Microscopía Electrónica de Transmisión... ..	71
Evaluación de condiciones de inducción en frío.....	72
Solubilización de la proteína recombinante de 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.....	75
4. Determinación del mecanismo de acción (Especificidad por sustratos análogos del peptidoglucano) ...	79
5. Purificación y caracterización bioquímica de la proteína de 110-kDa recombinante .....	81
Purificación de la proteína de 110-kDa recombinante.....	81
Determinación del peso molecular teórico de las fracciones purificadas con actividad de muramidasa .....	82
Caracterización bioquímica de la enzima recombinante de 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 .....	85
Influencia del pH del medio en la actividad de la enzima .....	85
Estabilidad a pH de la enzima.....	86
Influencia de la temperatura del medio en la actividad de la enzima.....	86
Estabilidad a temperatura de la enzima.....	87
Efecto de iones metálicos en la enzima.....	88
Efecto del EDTA y del PMSF en la enzima.....	90
6. Evaluación de la actividad antimicrobiana del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 y de la mezcla de ésta con la proteína de 99-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.....	91
Determinación de la actividad antimicrobiana por difusión en agar .....	91

Determinación de la actividad antimicrobiana por ensayo turbidimétrico .....	93
<b>CONCLUSIONES</b> .....	101
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	102
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	103
Artículos y capítulos de libros.....	103
Manuales .....	118
Programas.....	119
Páginas de internet.....	121

## RESUMEN

Una de las graves crisis que enfrenta la sociedad de este siglo es la aparición de cepas multirresistentes que amenazan con convertirse en la primera causa de muerte en 2050. Actualmente existen varias opciones una de ellas es la aplicación de agentes antimicrobianos de carácter proteico sintetizados por bacterias.

El efecto antimicrobiano de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 ha sido reportado anteriormente por el grupo de trabajo de la Dra. Farrés. Entre las proteínas con actividad antimicrobiana producidas por esta cepa se encuentra una de 110-kDa, con función desconocida.

Los objetivos de este proyecto fueron determinar si la proteína de 110-kDa por sí sola tiene actividad antimicrobiana, qué microorganismos es capaz de inhibir y establecer su funcionalidad. Para cumplir con lo anterior el gen que codifica para la expresión de dicha proteína se clonó en un sistema de expresión heterólogo, se optimizaron las condiciones de producción de la proteína y se purificó la misma

La proteína de 110-kDa es capaz de inhibir 10 de los 12 microorganismos probados y es una muramidasa, enzima perteneciente al grupo de las peptidoglucanohidrolasas y encargada de llevar a cabo la hidrólisis de la mureína (principal componente de la pared celular bacteriana).

Durante la caracterización bioquímica se encontró que el pH al cual la enzima tiene mayor actividad de los analizados, es 6 y que presenta mejor estabilidad en condiciones cercanas a este valor; la proteína es termolábil e incrementa su estabilidad cuando ésta se almacena a 4°C.

El Na<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> no parecen tener efecto en la enzima cuando se les usa en bajas concentraciones (1 mM), no obstante a 10 mM inhiben su acción. El K<sup>+</sup> aumenta la actividad conforme se adiciona al medio, mientras que el Ca<sup>2+</sup> la cuadruplica a 1mM. El Zn<sup>2+</sup> afecta drásticamente este parámetro aún a 1 mM. Como era de

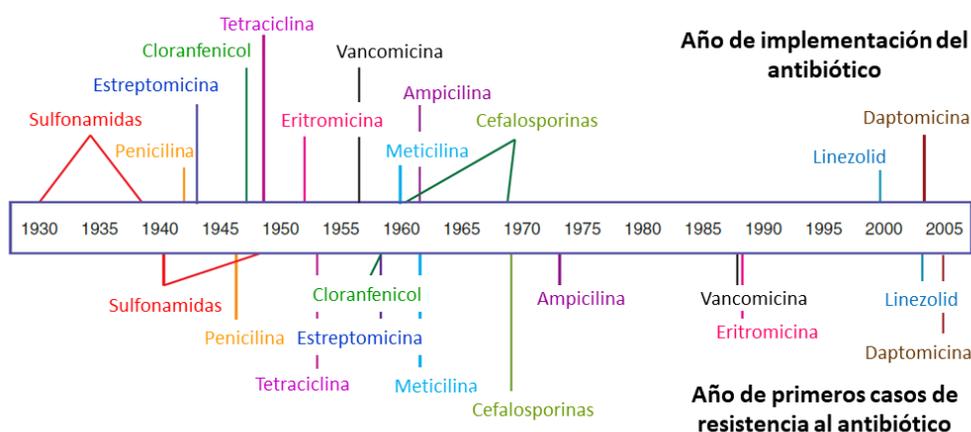
esperarse el EDTA disminuye la actividad quelando un metal necesario para la actividad

A partir del análisis bioinformático se determinó que la proteína de 110-kDa no presenta similitud con otras proteínas cristalizadas, sin embargo, comparando su secuencia con distintas bases de datos se encontró homología con la proteína YhgE de *Lactococcus lactis* necesaria para el anclaje y formación del pili en dicho organismo, por lo que no se descarta que en la cepa de estudio esté involucrada en una función similar.

## INTRODUCCIÓN

Desde el surgimiento de los primeros homínidos, la relación del género humano con las bacterias ha sido estrecha, ya que son los principales componentes de su microbiota, y se han utilizado ampliamente como cultivos iniciadores para la preservación de los alimentos. En términos negativos han sido responsables de la pérdida de cosechas (principalmente de frutos) y reservas de alimentos, así como de pandemias que han diezmando a la población humana en diferentes épocas.

A principios del siglo XX, la esperanza de vida promedio en los Estados Unidos era de 48 años (Hacker *et al.*, 2010). La baja expectativa de supervivencia se debía a la proliferación de enfermedades que actualmente se encuentran erradicadas en muchos países o de las que se presentan sólo unos cuantos casos anualmente, como la viruela, la polio, el sarampión, el cólera, la tuberculosis, la tifoidea, el paludismo y la difteria, lo que ha permitido incrementar hasta los 78.8 años la esperanza de vida en Estados Unidos y en México hasta los 74-80 años (CDC, 2017; WHO, 2015). El gran avance en el bienestar social se debió a las constantes campañas de vacunación y al desarrollo de nuevos antibióticos, considerándose la década de los 50's la Edad de Oro en la investigación de éstos (Davies y Davies, 2010). Sin embargo, a partir de 1960 la aparición de cepas resistentes a antibióticos comenzó a aumentar (Figura 1).



**Figura 1.** Desarrollo de antibióticos y evolución de la resistencia a los mismos. (Clatworthy *et al.*, 2007)

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un fenómeno ocasionado cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios a nivel genómico al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos, etc.) que les confieren una ventaja adaptativa. Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, incrementando el riesgo de propagación a otras personas (OMS, 2016). Las principales causas de la RAM son el sobreconsumo de antibióticos por prescripción inadecuada, el incorrecto desecho de los mismos, generalmente vertidos al drenaje doméstico; el uso extensivo de antimicrobianos en actividades agrícolas, ganaderas y acuícolas, el mal control de enfermedades nosocomiales y el tratamiento con antibióticos inconcluso por parte de algunos pacientes (Ventola, 2015; OMS, 2016). Los eventos de RAM en bacterias han incrementado y a continuación se presentan algunos ejemplos (Ventola, 2015; OMS, 2016):

-Cepas de *Kleibsellla pneumoniae* resistentes a antibióticos de tipo carbapenémicos

-Cepas de *Escherichia coli* resistentes a fluoroquinolonas.

-10 países (Australia, Austria, Canadá, Eslovenia, Francia, Japón, Noruega, Sudáfrica, Suecia y Reino Unido) han comunicado casos en los que ha fracasado el tratamiento de la gonorrea con el último recurso frente a esta enfermedad: las cefalosporinas de tercera generación.

- Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. Los infectados con estos microorganismos tienen un 64% más de probabilidad de morir que los pacientes con infecciones no resistentes.

-Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de aislados nosocomiales en Estados Unidos resistentes a aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y carbapenémicos

-En 105 países se ha identificado la existencia de tuberculosis ultrarresistente, es decir, resistente al menos a cuatro de los principales fármacos antituberculosos.

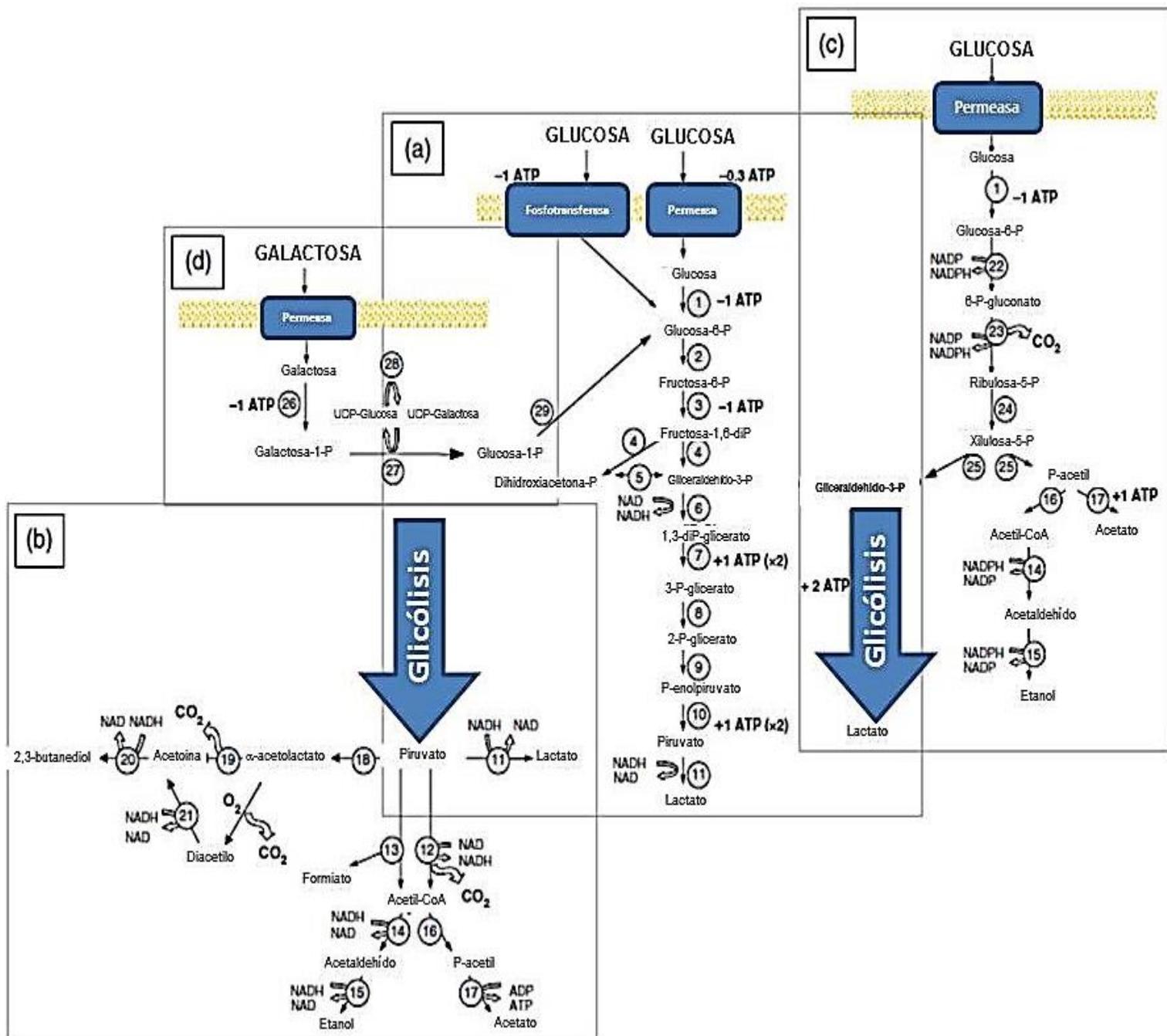
-1300 muertes al año por cepas de *Enterococcus* sp. resistentes a vancomicina en los Estados Unidos

El reto actual de la comunidad científica no es solamente diseñar nuevos antibióticos que eviten la proliferación de estos patógenos superresistentes, sino también buscar nuevos antimicrobianos que puedan ser utilizados por sí solos o mezclados con otras sustancias, como es el caso de la lisozima, una enzima del grupo de las peptidoglucanohidrolasas (PGHs) capaz de inhibir a *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes* por sí sola (Hughey y Johnson, 1987), a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. enterica* serovar Typhimurium, en presencia de EDTA (Repaske *et al.*, 1957 Samuelson *et al.*, 1984) y a *E. coli* y *Kleibsellia pneumoniae* en presencia del lipopéptido C100Oc12O (Jammal *et al.*, 2017). Otras enzimas de este grupo como la lisostafina, una PGH de *Staphylococcus simulans* y las de *Lactobacillus acidophilus* han mostrado actividad inhibitoria contra cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y *Helicobacter pylori* respectivamente (Dajcs *et al.*, 2000 y Lorca *et al.*, 2000).

Como una opción para la extracción y purificación de sustancias con posible actividad antimicrobiana encontramos a las bacterias ácido lácticas (BALs) que han convivido con los seres humanos desde su origen siendo la mayoría de ellas no patógenas e incluso explotadas para la producción de alimentos fermentados

### BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BALs)

Las Bacterias Ácido Lácticas (BALs) son un grupo de microorganismos Gram-positivos, microaerofílicos, no esporulados, en forma de cocos o bacilos que son capaces de producir ácido láctico como principal metabolito ya sea por homofermentación o heterofermentación (Figura 2) (De Vuyst y Van Damme, 1994; Klaenhamer *et al.*, 2002).

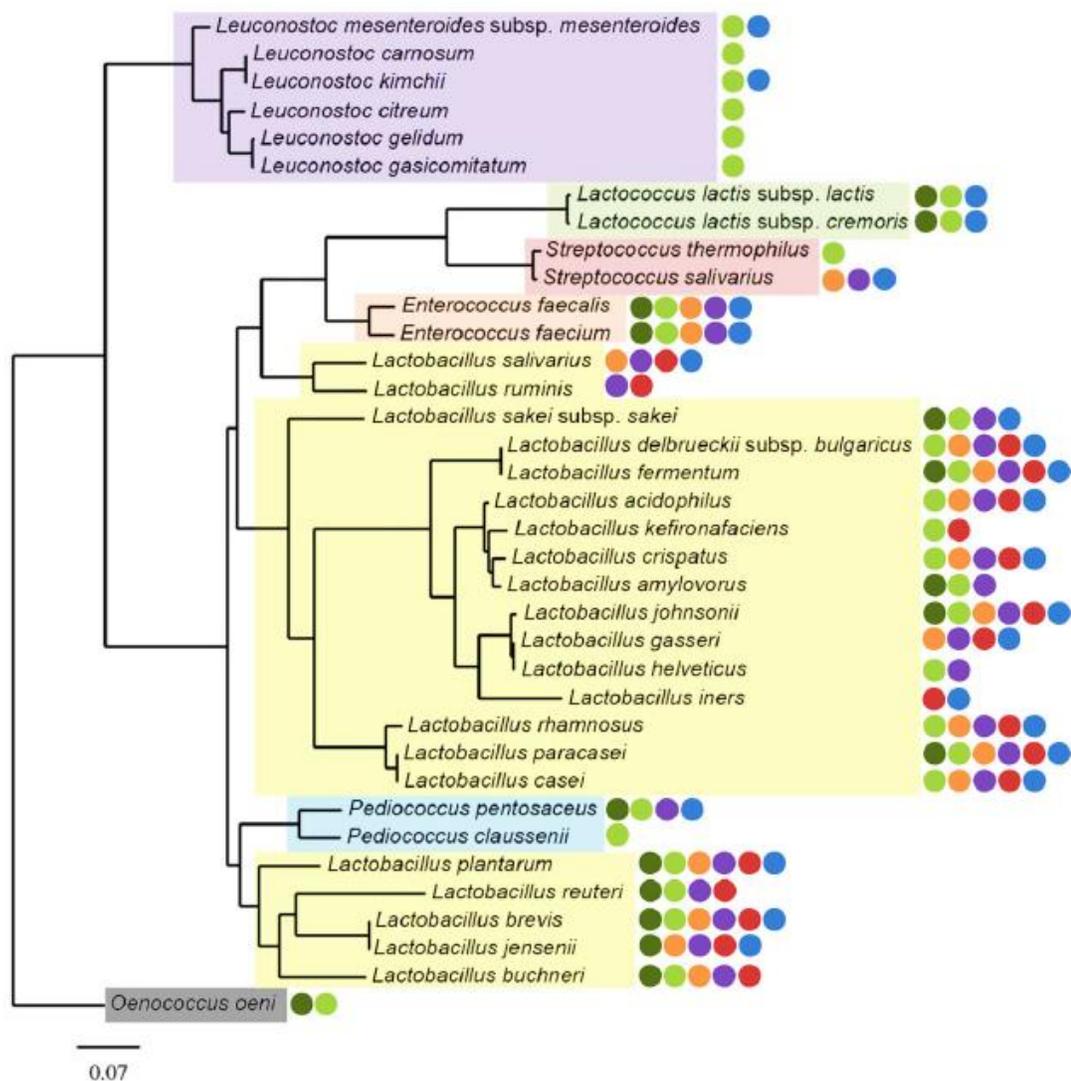


**Figura 2.** Principales vías metabólicas en la fermentación de hexosas por BALs. a) Ruta homofermentativa. b) Metabolismo ácido-mixto. c) Ruta heterofermentativa. d) Ruta de Leloir. Las reacciones son catalizadas por las siguientes enzimas: **1**, glucocinasa; **2**, glucofosfato isomerasa; **3**, fosfofructocinasa; **4**, fructosa-bifosfato aldolasa; **5**, triosa-fosfato isomerasa; **6**, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa; **7**, fosfoglicerato cinasa; **8**, fosfoglicerato mutasa; **9**, enolasa; **10**, piruvato, cinasa; **11**, lactato deshidrogenasa; **12**, piruvato deshidrogenasa; **13**, piruvato formiato liasa; **14**, acetaldehído deshidrogenasa; **15**, alcohol deshidrogenasa; **16**, fosfotranscetilasa; **17**, acetato cinasa; **18**,  $\alpha$ -acetolactato sintasa; **19**,  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa; **20**, 2,3-butanediol deshidrogenasa; **21**, diacetil reductasa; **22**, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; **23**, 6-P-gluconato deshidrogenasa; **24**, ribulosa-5-P-3 epimerasa; **25**, D-xilulosa-5P-fosfocetolasa; **26**, galactocinasa; **27**, galactosa-1-uridiltransferasa; **28**, UDP-galactosa-1-epimerasa; **29**, fosfoglucomutasa. (Tomado y modificado de Kowalczyk *et al.*, 2016).

Alrededor de 500 especies, divididas en seis subfamilias, enlistadas a continuación, forman parte de las BALs (Felis *et al.*, 2016):

1. Subfamilia Aerococcaceae conformada por los géneros *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Fackalamia*, *Globicatella* y *Ignavigranum*.
2. Subfamilia Carnobacteriaceae conformada por los géneros *Alikalibacterium*, *Allofustis*, *Alloicoccus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Lacticigenium*, *Marinilactibacillus*, *Pisciglobus* y *Trichococcus*.
3. Subfamilia Enterococcaceae conformada por los géneros *Bavariicoccus*, *Catelicoccus*, *Enterococcus*, *Melisococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*.
4. Subfamilia Lactobacillaceae conformada por los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*.
5. Subfamilia Leuconostocaceae conformada por los géneros *Leuconostoc*, *Fructobacillus*, *Oenococcus* y *Weisella*.
6. Subfamilia Streptococcaceae conformada por los géneros *Lactococcus*, *Lactovum* y *Streptococcus*.

Este grupo de microorganismos se considera altamente relacionado con los humanos ya que se encuentra presente en las mucosas, principalmente en el tracto gastrointestinal, y forma parte de la microbiota autóctona de muchos alimentos (Makarova y Koonin , 2007) (Figura 3). Las BAL y en especial los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* han sido tradicionalmente usados como cultivos iniciadores para la producción de una gran cantidad de alimentos y bebidas fermentados pues contribuyen a la producción de aromas, sabores y a la preservación de los mismos (De Vuyst y Van Damme, 1994).



**Figura 3.** Árbol filogenético de algunas BALs basado en la secuencia de siete genes constitutivos (*recA*, *rpoD*, *dnaK*, *infC*, *rplA*, *rpsB* y *rpmA*). Las especies fueron coloreadas de acuerdo a su género (púrpura, *Leuconostoc* spp.; amarillo, *Lactobacillus* spp.; azul, *Pediococcus* spp.; verde, *Lactococcus* spp.; rosa, *Streptococcus* spp.; naranja, *Enterococcus* spp.; gris, *Oenococcus* spp.). La presencia de cada uno de los microorganismos aislados en diferentes nichos es representada a partir de puntos de colores (verde oscuro, plantas; verde claro, productos alimenticios; naranja, cavidad oral; púrpura, tracto gastrointestinal; magenta, cavidad vaginal y azul, otras zonas del cuerpo (Douillard y de Vos, 2014).

### *PEDIOCOCCUS* SP.

El género *Pediococcus* está conformado por BALs, con morfología cocoide y metabolismo homofermentativo, aerobio facultativo o microaerófilico, catalasa negativos, no móviles, que son conocidas por su capacidad de crecer a pH cercano a 5 y su resistencia a vancomicina (Stiles y Holzappel, 1997; Holland *et al.*, 2011, Franz *et al.*, 2012).

Hasta el momento se encuentran descritas 12 especies para este género: *P. acidilactici*, *P. argentinicus*, *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. lolii*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. siamensis* y *P. stilesii*, las cuales son generalmente usadas como cultivos iniciadores en la fermentación de vegetales, ensilados, quesos, productos cárnicos y de panadería (Raccach, 2014).

#### IMPORTANCIA DEL GÉNERO

Ecología y Ecosistemas: El género *Pediococcus* comparte hábitat con muchas otras BALs y no es sorprendente aislarlo de material vegetal, bebidas fermentadas, carne, productos lácteos, animales y humanos. *P. acidilactici*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. stilesii* y *P. pentosaceus* son habitantes comunes de plantas, frutas y vegetales (Wilderdyke *et al.*, 2004). *P. damnosus*, *P. cellicola* y *P. inopinatus* han sido aislados de cervezas y otras bebidas alcohólicas (Back, 1978; Zhang *et al.*, 2005). *Pediococcus sp.* también se localiza en la saliva (Sims, 1986), en el tracto gastrointestinal humano, de algunos mamíferos (Walter *et al.*, 2001; Heilig *et al.*, 2002) y en aves (Juven *et al.*, 1991; Kurzak *et al.*, 1998).

En muchos productos fermentados derivados de cereales *Pediococcus sp.* se encuentra estrechamente relacionado con el desarrollo de diversos hongos filamentosos como *Amylomyces sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.* y *Antimucor sp.*, y de las levaduras *Saccharomyces sp.*, *Pichia sp.* y *Hansenula sp.* (Franz *et al.*, 2012).

Importancia Económica e Industrial: *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus* y *P. inopinatus* forman parte de cultivos iniciadores para la producción de ensilados (Cai *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000), sauerkarut (Back, 1978), frijoles fermentados y pepinillos (Stamer, 1983), aceitunas y derivados de cereales (Lin *et al.*, 1992; Wilderdyke *et al.*, 2004). *Pediococcus pentosaceus* tiene un rol prominente en la producción de diferentes alimentos fermentados de origen africano como el koko (Lei y Jakobsen, 2004), la togwa (Mugula *et al.*, 2003), el khamir y la hussuwa (Yousif *et al.*, 2010).

*Pediococcus sp.*, también ha sido aislado de productos fermentados tradicionales asiáticos como la mucha, proveniente de la región cercana al Himalaya; el ragi,

de Indonesia; el nuru, de Corea; el bubo, de Filipinas; el chin-yueh, de China; el loogpang, de Tailandia, el bahn men, de Vietnam; el burong dalag, la dosa y el idli, de la India (De Vuyst y Van Damme, 1994; Stiles y Holzapfel, 1997; Lee y Fujio, 1999).

*Pediococcus sp.*, puede estar presente también en carne cruda y fermentada (Gevers *et al.*, 2000), en productos de pescado crudos y marinados (Paludan-Muller *et al.*, 2002; Tanasupawat y Daengsubha, 2007).

*P. pentosaceus* está estrechamente relacionado con la maduración y fermentación de quesos (Callon *et al.*, 2004), especialmente en la producción de aromas y sabores característicos de estos productos (Ogier *et al.*, 2002); cepas de *P. pentosaceus* con alta actividad de  $\beta$ -caseína hidrolasas, proteasas, aminopeptidasas y dipeptidil aminopeptidasas han sido aisladas de los quesos Comté (Boutón *et al.*, 1998), Salers (Callon *et al.*, 2004) y Parmigiano Reggiano (Coppola *et al.*, 1997).

#### BALS Y SU EFECTO BIOCONSERVADOR EN ALIMENTOS

La bioconservación de los alimentos se refiere al uso de la microbiota de un producto alimenticio o de los metabolitos generados por la misma con el propósito de incrementar la vida de anaquel y garantizar su inocuidad (Stiles, 1996).

Las Bacterias Ácido Lácticas son el grupo de microorganismos con mayor potencial para ser utilizadas con este fin ya que durante siglos han sido empleadas como cultivos iniciadores para la elaboración de productos fermentados y forman parte de los microorganismos que naturalmente podemos encontrar en las materias primas utilizadas en la industria alimentaria (Stiles, 1996).

Las BALs tienen la capacidad de producir sustancias con capacidad antimicrobiana que evitan el desarrollo de microorganismos capaces de alterar la calidad y propiedades de los alimentos, así como de algunos de los principales patógenos que podemos encontrar en estas matrices. A continuación se enlistan los bioconservadores más importantes producidos por este grupo:

BIOCONSERVADORES DE NATURALEZA NO PROTEICA (Ouwenhand y Vesterslund *et al.*, 2004)

Ácidos orgánicos: El resultado de la fermentación de las hexosas por la vía heterofermentativa es la producción de una gran gama de moléculas orgánicas que tienen actividad antibacteriana, siendo los más comunes los ácidos orgánicos, entre los que destacan el propiónico, el acético y el láctico.

Los ácidos orgánicos permeabilizan las células potenciando la actividad de otros compuestos antimicrobianos, como es el caso del ácido láctico que disminuye el pH del medio y genera la disociación de las cadenas de ácidos grasos presentes en la membrana. Por otro lado, el ácido acético ha mostrado tener un amplio rango de inhibición; siendo capaz de actuar contra levaduras, hongos y bacterias; mientras que el ácido propiónico sólo es eficaz contra los primeros dos microorganismos enlistados.

Peróxido de hidrógeno: En presencia de oxígeno, las BALs son capaces de producir  $H_2O_2$  a partir de la acción de las flavoproteinoxidasas, la NADH oxidasa y la superóxido dismutasa; dicho compuesto genera un ambiente altamente oxidante produciendo la oxidación de los grupos sulfhidrilo de las proteínas y de los lípidos de membrana. La producción de peróxido de hidrógeno es llevada a cabo a partir del consumo de  $O_2$ , lo que conlleva a la formación de un ambiente anóxico poco favorable para microorganismos aerófilos.

Dióxido de carbono: El  $CO_2$  presenta un efecto antimicrobiano dual; crea un ambiente anaeróbico y, al mismo tiempo, es por sí mismo un bioconservador. El mecanismo de inhibición aún se desconoce, sin embargo, se sospecha que se encuentra relacionado con la inhibición de la descarboxilación enzimática y la acumulación de este gas en la bicapa lipídica, lo que produce alteraciones de la permeabilidad de la membrana.

Diacetilo (2,3- butanodiona): inhibe la acción de las proteínas de unión a arginina en las bacterias Gram-negativas interfiriendo en la utilización de dicho aminoácido.

Reuterina: producido por *Lactobacillus reuteri*, es un antimicrobiano de amplio espectro, capaz de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos, levaduras y protozoos; su mecanismo de acción consiste en la interacción de dicha molécula con sulfhidril enzimas, entre ellas la ribonucleótido sintasa ocasionando la inhibición de la síntesis del ADN.

Ácido piroglutámico: sintetizado por *Lactobacillus casei ssp. casei*, *Lactobacillus casei ssp. pseudoplatarum* y *Streptococcus bovis*; presenta efecto contra *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*; su mecanismo de acción es similar al de los ácidos orgánicos.

#### BIOCONSERVADORES DE NATURALEZA PROTEICA

##### PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS (PGHS)

El peptidoglucano es uno de los principales componentes en la pared celular de las bacterias y el mayoritario en bacterias Gram-positivas. Es un heteropolímero formado por cadenas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, que a su vez se asocian transversalmente por cadenas de aminoácidos, dichas cadenas interpeptídicas tienen típicamente L-alanina y D-glutamina en los primeros dos residuos y en el último, D-alanina (Humann y Lenz, 2009). Se conocen más de 100 tipos diferentes de peptidoglucanos, cuya principal diferencia es la cadena de aminoácidos que lo conforman (Madigan *et al.*, 2003).

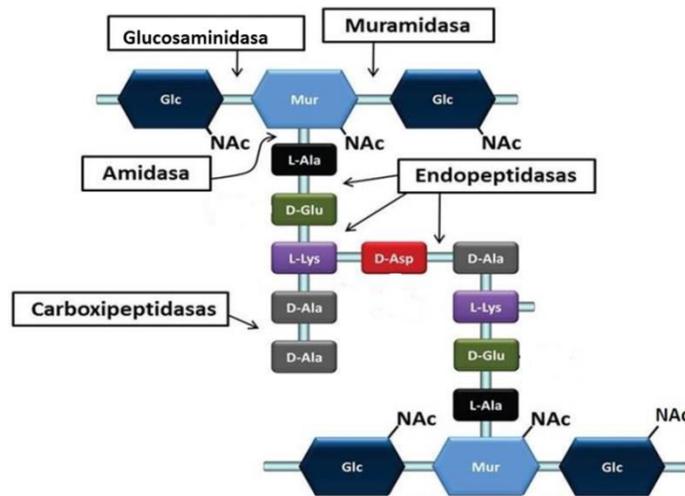
Las peptidoglucano hidrolasas (PGHS) son un grupo amplio de enzimas que han sido encontrados en bacterias, animales y virus, cuya función principal es llevar a cabo la hidrólisis del peptidoglucano o mureína en fragmentos solubles (Vollmer, 2008).

##### CLASIFICACIÓN DE PGHS

Estas enzimas se pueden clasificar de acuerdo al enlace que hidrolizan en:

- N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasas (glucosaminidasa): hidrolizan el enlace glucosídico  $\beta$ -1,4 de la cadena de glicanos dejando un extremo N-acetilglucosamina reductor.

- N-acetil-muramoil-L-alanina-amidasa (amidasa): hidrolizan el enlace amídico entre el N-acetil-ácido murámico y el N-terminal de la L-alanina.
- Endopeptidasas y carboxipeptidasas: hidrolizan los enlaces peptídicos formados por los aminoácidos que unen transversalmente a las cadenas formadas por el N-acetil-ácido murámico y la N-acetil-β-D-glucosamina.
- N-acetil-β-D-muramidasa (N-acetilmuramidasa o muramidasa): hidrolizan en el enlace β-1,4 entre el N-acetil-ácido murámico y la N-acetil-β-D-glucosamina dejando un extremo de ácido N-acetilmurámico libre.



**Figura 4.** Representación esquemática del peptidoglucano de *Lactococcus lactis*, en donde se observan las enzimas responsables de la hidrólisis del mismo. (Tomado y modificado de Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014).

**Tabla 1.** Algunas PGHs provenientes de Bacterias Ácido Lácticas

Tipo de PGH/Nombre	Microorganismo que la produce	Referencia
N-acetilglucosaminidasas / Acm A, Acm B, Acm C y Acm D (hipotética)	<i>Lactococcus lactis</i>	Huard <i>et al.</i> , 2004
N-acetilglucosaminidasa y muramidasa /Mur 1	<i>Leuconostoc citreum</i>	Cibik <i>et al.</i> , 2001
N-acetilglucosaminidasas	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	García Cano <i>et al.</i> ,2014
N-acetilglucosaminidasa y amidasa/AtIL	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Bourgeois <i>et al.</i> ,2008
Endopeptidasas/Msp1 y Lc-p75	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Claes <i>et al.</i> , 2012
Muramidasa	<i>Streptococcus faecium</i>	Kawamura y Shockman, 1983
Muramidasa y endopeptidasa	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Pitchard <i>et al.</i> , 2004

FUNCIÓN DE LAS PGHS EN LOS MICROORGANISMOS QUE LAS SINTETIZAN

En las bacterias, las PGHs son también conocidas como endolisinas, y se encuentran involucradas en múltiples procesos fisiológicos llevados a cabo por las mismas, como el ensamblaje y desensamblaje de la pared celular, para el crecimiento bacteriano, la división celular, esporulación, germinación, formación de biopelículas, fijación de organelos en la superficie celular, etc. (Firdich y Gaynor, 2013). En la siguiente tabla se describen detalladamente estas funciones.

**Tabla 2.** Función de las PGHs en las bacterias (Vollmer *et al.*, 2008; Firdich y Gaynor, 2013, Farrand *et al.*, 2015)

Función	Descripción
<b>Funciones en la fisiología celular bacteriana</b>	
Regulación del crecimiento celular	Remoción del exceso de pentapéptidos en el peptidoglucano recién formado
Elongación del sáculo de peptidoglucano	Ruptura de enlaces en el peptidoglucano para permitir la elongación del sáculo
Recambio del peptidoglucano	Liberación de fragmentos solubles de peptidoglucano que pueden ser reutilizados
Señalización	Inducción de la $\beta$ -lactamasa por productos de recambio
Separación celular	Ruptura del septum durante la división celular en bacterias Gram-negativas
Esporulación y germinación	Maduración del córtex de la espora y digestión del peptidoglucano de la célula madre para la liberación de la endospora
Adquisición de nutrientes	Facilitación de la adquisición de hierro en <i>S. lugdunensis</i>
Ensamblaje de pili	Ensamblaje mediante PGHs especializadas en esta función
Ensamblaje del flagelo	

(Continuación de la Tabla 2)

Funciones en poblaciones bacterianas	
Autólisis durante la transformación genética	Fratricidio de células no competentes en <i>S. pneumoniae</i>
Lisis durante el desarrollo	Formación de cuerpos fructíferos en <i>M. xhantus</i>
Formación de biopelículas	Adhesión inicial de células a soporte hidrofóbicos
Interacción patógeno-hospedero	Modificación de la estructura del peptidoglucano del patógeno para evitar la acción en el hospedero sobre el mismo, incremento o disminución de la patogénesis

#### IMPORTANCIA DE LAS PGHS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Desde el descubrimiento de la lisozima (muramidasa), en 1922 por Alexander Fleming, las PGHs han atraído el interés de los investigadores, debido a su posible aplicación como antibacterianos en productos alimenticios, ya que poseen una alta especificidad y acción bactericida comprobada contra microorganismos patógenos que pueden estar presentes en éstos.

La lisozima de huevo de gallina (HEWL por sus siglas en inglés) es la PGH más ampliamente estudiada y la única de este grupo aprobada para su uso en alimentos como aditivo alimentario, siendo su mayor campo de aplicación la prevención del abombamiento en quesos maduros y semi-maduros causado por *Clostridium tyrobutiricum* y el control de la actividad bacteriana en vinos (Callewaert *et al.*, 2011).

Se ha evaluado también el uso de lisozimas de otras fuentes contra microorganismos patógenos, por ejemplo: la lisozima de ostra inmovilizada en alginato de calcio suprime el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella anatum* en muestras de salmón ahumado (Callewaert *et al.*, 2011) mientras que la lisozima de ganso tiene efecto antimicrobiano contra *Salmonella enteritidis* (Naknukool *et al.*, 2009).

La lisostafina, endopeptidasa sintetizada por algunas especies del género *Staphylococcus*, es la segunda PGH más estudiada, principalmente por su efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus* (Szweda *et al.*, 2007). Sin embargo, no se permite aún su uso como aditivo alimentario debido a que la enzima proviene de un género de bacterias consideradas como patógenas.

El efecto antimicrobiano de las PGHs ha sido principalmente probado contra bacterias Gram-positivas, debido a que en éstas el peptidoglucano es el compuesto mayoritario de la pared celular. No obstante, muchos patógenos causantes de infecciones e intoxicaciones alimentarias son Gram-negativos, por lo que para la inhibición de éstos se ha probado el uso de estas enzimas en sinergia con EDTA y lipopéptidos (Repaske *et al.*, 1957, Samuelson *et al.*, 1984, Briers *et al.*, 2007 y Jammal *et al.*, 2017).

#### BACTERIOCINAS

Este grupo de moléculas comprende a una amplia familia de péptidos sintetizados ribosomalmente por bacterias, que son capaces de inhibir el crecimiento de especies cercanas evolutivamente al microorganismo que las produce. En la década pasada, el interés por las bacteriocinas como bioconservadores en alimentos cobró auge principalmente en aquéllas que eran sintetizadas por BALs.

Entre las ventajas que poseen estos conservadores están la capacidad de resistir un amplio rango de temperaturas y pH, su facilidad de hidrólisis por las proteasas del tracto gastrointestinal, lo que evita su interacción con la microbiota intestinal y, a diferencia de los antibióticos, no hay reportes de actividad alérgica en eucariontes (Pérez *et al.*, 2014). En la siguiente tabla se resumen algunas de las principales diferencias entre los antibióticos y las bacteriocinas.

**Tabla 3.** Principales diferencias entre las bacteriocinas y los antibióticos (Pérez *et al.*, 2014).

Característica	Bacteriocina	Antibióticos
Aplicación	Alimentos/Clínica	Clínica
Biosíntesis	Ribosomal	Metabolito secundario
Espectro de actividad	Estrecho	Amplio
Degradación proteolítica	Alta	Moderada o nula
Estabilidad térmica	Alta	Baja
Actividad a diferentes pH	Amplio rango	Rango estrecho
Modo de acción	Formación de poros en la membrana, inhibición de la síntesis de la pared celular	Acción contra diferentes blancos en la membrana o intercelulares (ribosomas)
Alérgeno	No	Sí

#### CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS DE MICROORGANISMOS GRAM-POSITIVOS

Las bacteriocinas se dividen comúnmente en tres grupos (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996, Cleveland *et al.*, 2001; Beristain-Bauza *et al.*, 2012):

Clase 1: corresponde a las moléculas que se conocen como lantibióticos, se caracterizan por ser péptidos de 19 a 50 aminoácidos y poseer en su estructura aminoácidos poco comunes como lo son la lantionina, la metil-lantionina, el dehidrobutirano y la dehidroalanina. Este grupo se subdivide en la clase Ia y Ib; la primera formada por péptidos elongados, flexibles con carga neta positiva, cuya actividad se debe a la destrucción de la célula por la despolarización de la membrana. Las bacteriocinas Ib son péptidos globulares hidrófobos con carga neta negativa o sin carga, cuya actividad inhibitoria se relaciona con inhibición enzimática principalmente.

Clase 2: está formada por péptidos termoestables que no poseen lantionina ni otro aminoácido poco común; este grupo se subdivide en la clase IIa, cuyos miembros presentan una secuencia conservada en su extremo N-terminal Tyr-Gly-Asn-Gly-

Val, dos cisteínas formando un puente de disulfuro y poseen actividad inhibitoria principalmente contra *Listeria* spp.; y la clase IIb, grupo de bacteriocinas formadas por dos péptidos que se necesitan unir en proporciones similares para llevar a cabo la actividad antimicrobiana que consiste en la formación de poros en la membrana.

Clase 3: son péptidos de pesos moleculares mayores a 30 kDa termolábiles. Este tipo de bacteriocinas sólo han sido aisladas en especies del género *Lactobacillus*.

**Tabla 4.** Bacteriocinas provenientes de Bacterias Ácido Lácticas (Ouwenhand y Vesterslund *et al.*,2004).

Clase	Nombre	Microorganismo productor	Microorganismo contra el que ejerce su actividad antibacteriana
I	Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp.
	Salivaricina A	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
	Citolisina	<i>Enterococcus faecalis</i>	Diversas BALs <i>Clostridium tyrobutyricum</i>
II	Bavaricina A	<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Listeria</i> spp.
	Leuconcina A	<i>Leuconostoc gellidum</i>	<i>Listeria</i> spp.
	Pediocina PA-1	<i>Pediococcus parvulus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
III	Helveticina	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
	Lactacina A	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>lactis</i>
	Caseicina	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>

## ANTECEDENTES

### *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042 Y SU EFECTO ANTIMICROBIANO

*P. acidilactici* ATCC 8042 es una bacteria no patógena que se ha utilizado como cultivo iniciador de productos cárnicos madurados en los que ha presentado efecto bioconservador e inhibidor del crecimiento de *S. aureus* y de mesófilos aerobios (Rivera, 2004), dicho fenómeno no se atribuye a la producción de pediocinas ya que esta cepa carece de los genes para la producción de las principales bacteriocinas (PA-1 y ACh) sintetizadas por ésta generó (Mora *et al.*, 2000; Mora *et al.*, 2003).

En investigaciones realizadas anteriormente por el grupo de trabajo se reportó la producción de dos proteínas por parte de *P. acidilactici* ATCC 8042 localizadas mayoritariamente en la fracción correspondiente a las proteínas unidas a membrana capaces de hidrolizar células de *M. lysodeikticus*. En zimograma se observan con pesos moleculares de 99-kDa y 110-kDa. La actividad antimicrobiana de dichas enzimas en conjunto se determinó con pruebas de difusión en agar contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus paracasei*, *S. enterica* serovar Typhimurium y *E. coli*; por turbidometría, contra *M. lysodeikticus* y por zimograma, contra *Staphylococcus aureus* y *E. coli* con resultados positivos (García-Cano *et al.*, 2011; Velasco-Pérez, 2010; García-Cano, 2013). Ambas proteínas también fueron secuenciadas y se determinó utilizando el programa BLAST que aquella con peso molecular de 99-kDa presentaba dos dominios conservados: uno de N-acetilglucosaminidasa y otro de amidasa, típicos en las peptidoglucano hidrolasas; mientras que la proteína de 110-kDa tenía regiones características de un transportador ABC con un 47% de cobertura y un 100% de identidad (figura 5).

1 MVRKEWKFIR NNNKLILISVL AIIFIPFLYS IFFLKSVDWP YGDTKNLPVA  
51 VVNLDPVVKY QGQRLAVGDE MVDNLKHNHQ LGWHFVSAKK AKEGMKDKKY  
101 YTVVTIPKDF SANAATVTDK NPKKMQLKYS TNASLNYIGK VISDVGTEKL  
151 NSEVREQVTK SYATAMFDQV KTAGKGFQQA SDGAKKLDG AVQLNDGTTK  
201 YTAGVSQLHD GIATMAVSVK PLQAGVAQLA DGSSQLTNGL DQLNGKTGAL  
251 SSGVSQLANG SGQVTTGAVA LSKGLNELQQ KSGALVTGVS QLNNGALQLK  
301 VKVPQYVNGV YQLNDGIQEL NAKTGQLVGG IKQLSSGAGA LSAGVKQYTD  
351 GVSAGAGQLQ GGVAKLANDT KDMPSINAL HNGIADIAKS SKQLADANGK  
401 ISTGLGQVAD QVSANDISKQ AAALKQQMAS IQTQLVALNK ATAGQTNGGN  
451 AAQSINNQLS EIKSEVGSLA NSSKTTTSTS GGVSQATINS KIDGAGLSAE  
501 DAAKAKSALA GVANGSQNKT TSQTVDTNKI ASIQQKITDV QGQVTKLNDL  
551 ANKQAEINKQ VTSLTASFQK LAAGANELTG NSDDMKQLAA TLKKLAAGSQ  
601 EVTTNLQALS SGSNTVAGKV GEFAGSASEL TDGVAQLDSG AKSLASQTNK  
651 NSKDVKKLVS GSQELSSSLA MLDKQTPTLQ SKIGQLAAGS NQISAGTGAL  
701 AGGINQLSNG ISAASSQMPT LVSGVSLLAN GGNQLAAGSS QVTGGLNTLN  
751 GQVPALVSGV AQLDNGGHQL NTGIQTLNSS TGTLLINGVNQ LNTGAAELDA  
801 NSGALLDATK QISDGNGELS SKLADGAKQV NSVPLTDKTA NMFAAPTCLK  
851 HTNYSYVPTY GHALAPYVLS LALYVGAIVF NFAYPIRKVS ERGGTPTQWF  
901 LSKVSVGTVV ALGMALVETT IMMIAGIHVD HVGQFYMTAI MISLASYIV  
951 MFLSMAFDNP GRFVAMILLM LQLGGSGGTF PMEVTNHFYN VIHPFLPLTY  
1001 SILSFRQAIT SGLGDGTFEQ AMGALLLFAV IALALLWFSM NQLQKHLEN  
1051 KSQLDDNQLQ QEVER

**Figura 5.** Secuencia de aminoácidos de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 (Número de acceso: gi|270289973/NCBI). Los aminoácidos en negritas fueron aquellos identificados por LC-MS/MS (Tomado de Matamoras, 2013).

Con el fin de determinar cuál era el espectro de inhibición de cada una de las dos proteínas señaladas anteriormente Valenzuela-Rosas (2012) evaluó diversas técnicas cromatográficas para purificarlas por separado. Debido a que los pesos moleculares y el punto isoeléctrico de ambas (9.27 para la de 99-kDa y 9.18 para la de 110-kDa) son muy similares, dichas proteínas únicamente se lograron copurificar con un 94.5% de pureza.

Al no ser posible la purificación de estas proteínas por separado, García-Cano (2013) clonó el gen que codifica para la expresión de la proteína de 99-kDa en un sistema heterólogo, observando al comparar el espectro de inhibición de dicha proteína recombinante con la mezcla de las proteínas nativas de *P. acidilactici* ATCC 8042 de 99 y 110-kDa que existía una reducción del espectro de inhibición en todos los casos, una pérdida total de la actividad antimicrobiana contra Gram-negativos y *Bacillus* sp. (Tabla 5).

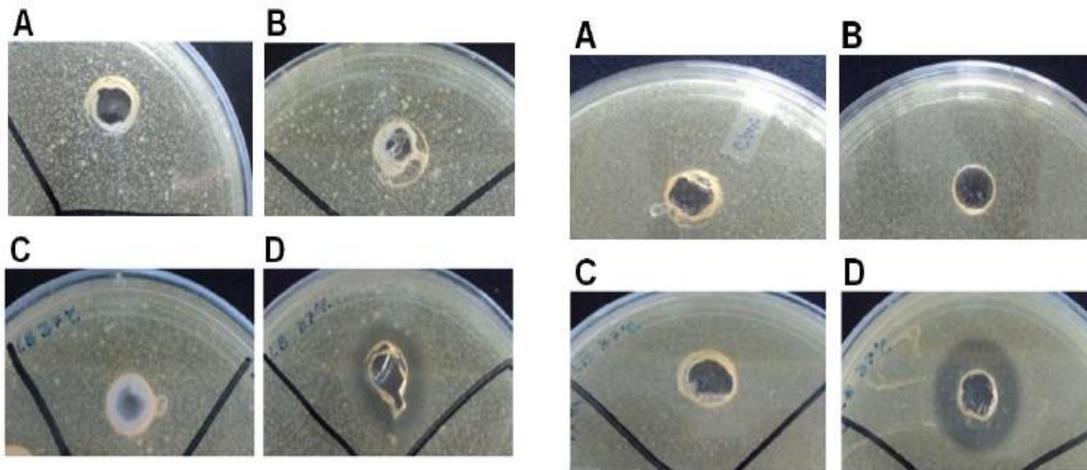
**Tabla 5.** Espectro de inhibición de las proteínas nativas de 99 y 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 copurificadas vs el espectro de inhibición de la proteína recombinante de 99-kDa purificada (García-Cano, 2013; García-Cano *et al.*, 2015)

Extracto de proteínas de 99 y 110-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042		Extracto de proteína recombinante de 99-kDa	
Cepas		Cepas	
Gram-positivas	mm/mg proteína	Gram-positivas	mm/mg proteína
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B230	206.4	<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B230	0.0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	127.2	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.0
<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218	188.9	<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218	40.8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	180.2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	11.4
<i>Enterococcus faecium</i> QB	99.4	<i>Enterococcus faecium</i> QB	25.8
<i>Enterococcus faecalis</i> QB	88.9	<i>Enterococcus faecalis</i> QB	19.9
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	77.8	<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	23.6
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	89.6	<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	22.1
<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	79.2	<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	24.7
Gram-negativas		Gram-negativas	
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	200.6	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	0.0
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	76.6	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	0.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.0

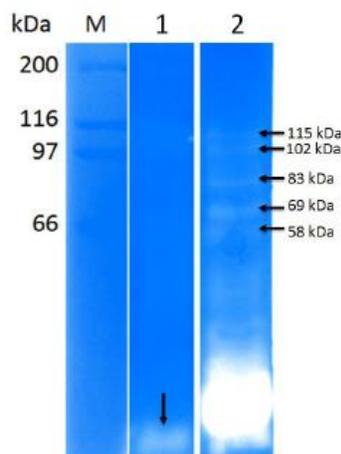
#### CLONACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE 110-KDA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de la proteína de 110 kDa, Matamoros (2013) clonó el gen que codifica para la expresión de dicha proteína utilizando los vectores pCR®-XL-TOPO (vector de clonación) y pET22 (vector de expresión) y

las cepas hospederas *E. coli* BL21 y *E. coli* BL21 pLysS. La proteína mantuvo su actividad en pruebas de difusión en agar contra *M. lysodeikticus* y *S. aureus* (figura 6). En zimograma contra *S. aureus* se observó la degradación de la proteína recombinante en varias bandas con actividad lítica. En el caso de los zimogramas realizados con *M. lysodeikticus* únicamente se presentó actividad lítica en la parte inferior del carril en un muy inferior a los 66-kDa (figura 7).

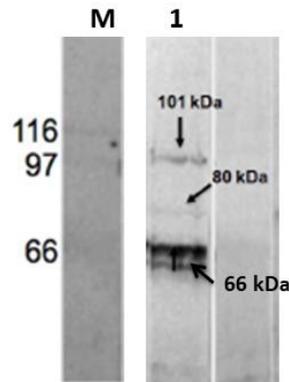


**Figura 6.** Halos de inhibición usando como microorganismo indicador *M. lysodeikticus* (izquierda) y *S. aureus* (derecha). **A**, sobrenadante concentrado de *E. coli* BL21 con el vector pET22b(+) vacío; **B**, sobrenadante de *E. coli* BL21 pLysS con el vector pET22b(+) vacío **C**, sobrenadante concentrado de *E. coli* BL21 con el vector pET22b(+) y el gen que codifica para la producción de la proteína de 110-kDa; **D**, sobrenadante de *E. coli* BL21 pLysS con el vector pET22b(+) y el gen que codifica para la producción de la proteína de 110-kDa (Tomado de Matamoros, 2013).



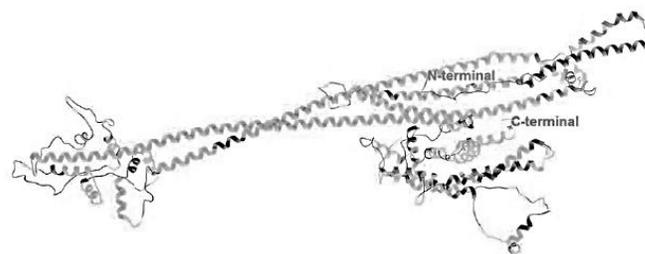
**Figura 7.** Actividad lítica en zimograma sobre *M. lysodeikticus* y *S. aureus* de la proteína recombinante producida en *E. coli* BL21 pLysS a 37°C/ 24 h con 1 mM de IPTG. Carril **M**: marcador de peso molecular. Carril 1: sobrenadante concentrado vs células de *M. lysodeikticus*. Carril 2: sobrenadante concentrado vs células de *S. aureus* (Tomado de Matamoros, 2013).

La expresión de la proteína se corroboró con Western Blot utilizando el anticuerpo Anti-His (C-term)/AP, sin embargo, también se observó la degradación de la proteína en esta etapa en un fragmento de 101, 80 y 66-kDa (Figura 8).



**Figura 8.** Western Blot utilizando el anticuerpo Anti-His (C-term)/AP de la proteína recombinante producida en *E. coli* BL21 pLysS a 37°C/ 24 h con 1 mM de IPTG. Carril M: marcador de peso molecular. Carril 1: sobrenadante concentrado

Con el fin de determinar cuál era la estructura tridimensional de la proteína de 110-kDa y buscar si ésta tenía similitud con alguna de las reportadas en las bases de datos; Matamoros (2013) realizó un modelado por homología de la misma utilizando el programa YASARA, obteniendo que los residuos ubicados en la posición a 523 a 1065, presentaban una estructura similar a una colicina la (bacteriocina secretada por cepas de *E. coli* al medio extracelular que es capaz de formar poros en la membrana) con un 14.7 % de similitud (Figura 9).



**Figura 9.** Modelado de la proteína de 110-kDa utilizando el programa YASARA (Matamoros, 2013).

La proteína recombinante generada durante la investigación anteriormente descrita no fue purificada ni caracterizada bioquímicamente debido a la inestabilidad de la proteína que ocasionaba su ruptura en varios fragmentos de distinto peso molecular.

## JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cada día las industrias alimentaria y farmacéutica buscan nuevas herramientas que garanticen que los productos ofertados sean inocuos y no representan riesgo alguno para los consumidores. En las últimas décadas la investigación acerca de la aplicación de bioconservadores ha cobrado auge pues dichos productos, además de prolongar la vida de anaquel y disminuir la cuenta microbiana de algunos de los principales patógenos, presentan una baja toxicidad para los humanos y son degradados fácilmente por los mismos.

Las BALs, así como los productos con actividad antimicrobiana provenientes de ellas, han estado en contacto continuo con la humanidad ya que forman parte de la microbiota de nuestro organismo y de los alimentos que consumimos. Este grupo es el más explotado para la producción de bioconservadores.

Hasta el momento conocemos la naturaleza y el mecanismo de acción de algunos de los principales bioconservadores producidos por BALs, sin embargo, aún no hemos descifrado todas las estrategias de inhibición utilizadas por dicho grupo.

La proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 y su efecto antimicrobiano representan un enigma, pues su secuencia no es similar a la de ninguna PGH, bacteriocina o antibacteriano conocido. Previamente se llevó a cabo su clonación con el objeto de analizarla, aunque éstos resultados muestran la capacidad antimicrobiana de la misma contra *S. aureus* y *M. lysodeikticus* la hidrólisis de la misma que se pone de manifiesto en la figura 7 y 8 no permitieron su purificación y caracterización. Esta investigación se orientará a la resolución de algunas de las principales interrogantes sobre el mecanismo de acción de dicha proteína, como son: ¿cuál es la estrategia de inhibición de la proteína de 110-kDa?, ¿es posible clonar el gen que codifica para la expresión de la proteína y que ésta se exprese completa y funcional?, ¿cuál es sitio de la proteína que lleva a cabo la actividad lítica?, ¿cuál es la especificidad y espectro de inhibición de dicha proteína? ¿es necesaria la presencia de la proteína de 99-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 para que la de 110-kDa tenga actividad? para lograrlo se planteó el uso de un nuevo sistema de expresión con un vector que no exporte la proteína al sobrenadante

para evitar su hidrólisis durante el proceso como es el vector pET19b, esperando que la proteína mantuviera su integridad y principalmente su funcionalidad durante el proceso, adicionalmente se realizó una etapa de optimización del proceso de inducción con el fin de incrementar la cantidad de proteína con actividad generada.

## HIPÓTESIS

La proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante presentará actividad antimicrobiana contra patógenos aislados comúnmente en alimentos.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar si la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 expresada por *E. coli* presenta actividad antimicrobiana.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar un modelo estructural de la proteína en la membrana e identificar sus dominios funcionales.
2. Construir un nuevo sistema de expresión utilizando la cepa *E. coli* BL 21 (DE3) y el vector pET19b con el fin de obtener una proteína recombinante funcional.
3. Evaluar las condiciones óptimas de producción de la proteína recombinante de 110-kDa
4. Determinar el mecanismo de acción (Especificidad por sustratos análogos del peptidoglucano).
5. Purificar y caracterizar bioquímicamente la proteína de 110-kDa recombinante.
6. Caracterizar la actividad antimicrobiana de la enzima recombinante de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 purificada y de la mezcla de ésta con la proteína de 99-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042

## METODOLOGÍA

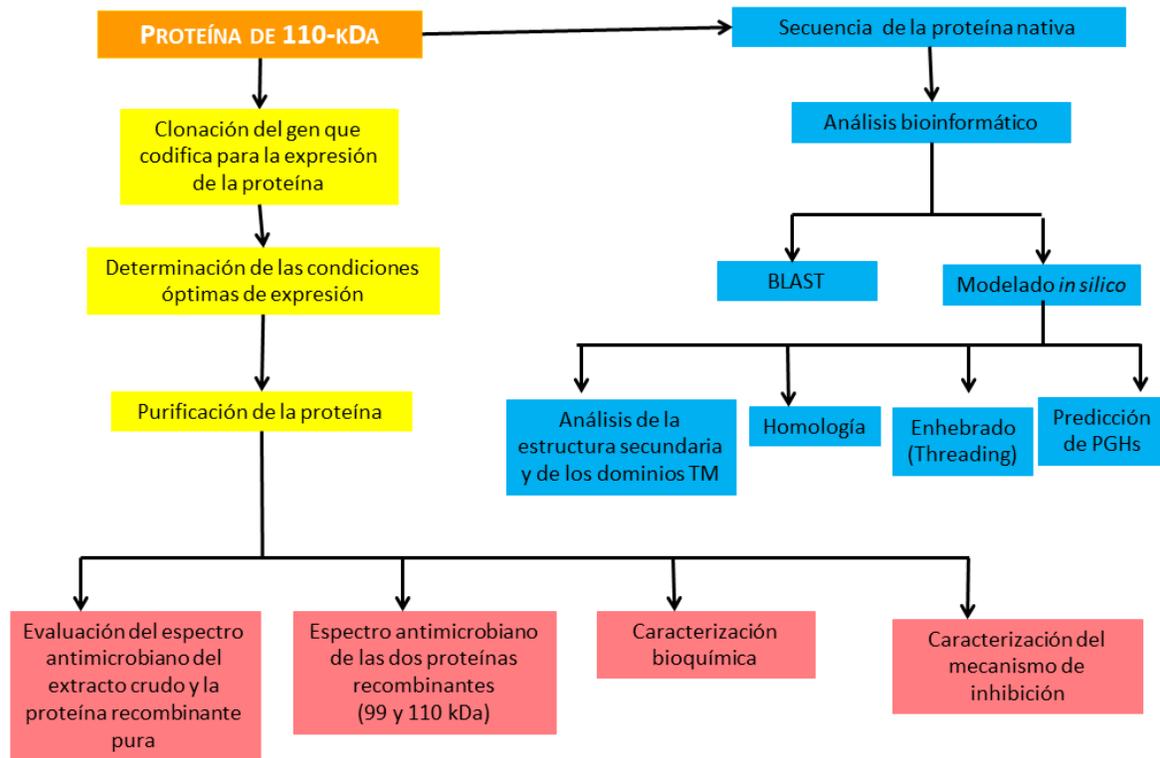


Figura 10. Diagrama experimental

### ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

#### IDENTIFICACIÓN DE DOMINIOS Y REGIONES HOMÓLOGAS EN LA PROTEÍNA DE 110-KDA DE *P. ACIDILACTICI*

Con el fin de evaluar la presencia de secuencias similares reportadas a la de la proteína de 110-kDa y determinar la identidad de la misma, se llevó a cabo un alineamiento de secuencia tipo local mediante el programa BLAST en dos bases de datos diferentes (NCBI y UNIPROT-KB) utilizando la secuencia que codifica para dicha proteína en *P. acidilactici* 7\_4 (Clave de acceso en NCBI= WP\_023440859.1). Los dominios conservados en la proteína de estudio se determinaron alineando proteínas homólogas putativas de distintos géneros y especies bacterianos, de BALs y otros Firmicutes incluidos algunos de los géneros y especies contra los que se realizó posteriormente el espectro antibacteriano como *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *S. parasinguinis* (género *Streptococcus*) usando la herramienta T-COFFE

PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA.

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA Y PREDICCIÓN DE CRUCES TRANSMEMBRANALES

Con el fin de establecer una estructura secundaria consenso se utilizaron 11 programas: CFSSP (Chou y Fasman, 1974), GOR (Garnier *et al.*, 1978), Jpred (Cuff y Barton, 1999), Jufo9D (Koehler-Leman *et al.*, 2012), Porter (Pollastri y McLysaght, 2005), SOPMA (Geourjon y Deleage, 1995), Scratch Protein 3 Class (Cheng *et al.*, 2005), Scratch Protein 8 Class (Cheng *et al.*, 2005), SPIDER 2 (Heffernan *et al.*, 2015), PSIPRED (Jones *et al.*, 1999) y YASPIN (Simossis *et al.*, 2005). Los parámetros fisicoquímicos utilizados por los programas para la predicción de estructuras secundarias son los siguientes (Tabla 6):

**Tabla 6.** Parámetros considerados por cada uno de los programas utilizados para la predicción de la estructura secundaria de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici*

Programa	Parámetro										
	Anfipaticidad	Propensión de aás. a formar giros en héptadss	Propensión a formar puentes de hidrógeno	Accesibilidad a solventes	Homología con otras proteínas cristalizadas	Propensión a formar puentes de disulfuro	Contacto promedio de los átomos de un mismo residuo	Contacto promedio de los átomos de diferentes residuos	Efecto de la mutación de cada aá en la estabilidad	Ángulos locales de los aás.	Probabilidad empírica de un aá de estar en un $\alpha$ -hélice u hoja $\beta$
CFSSP											✓
GOR											✓
Jpred	✓	✓	✓		✓						
Porter				✓							
Jufo 9D											
SOPMA					✓						
SCRATCH Protein 3 CLASS		✓		✓		✓	✓	✓	✓		
SCRATCH Protein 8 CLASS		✓		✓		✓	✓	✓	✓		
SPIDER 2				✓						✓	
PSIPRED					✓						
YASPIN					✓						

ESTABLECIMIENTO DE LOS CRUCES TRANSMEMBRANALES

Para determinar la región de la proteína en la que se ubicaban cruces transmembranales se utilizaron 9 programas: DAS (considera como un cruce transmembranal putativo 15-30 aminoácidos hidrofóbicos seguidos), HMMTOP (utiliza la regla de Markov para calcular de acuerdo a la composición de

aminoácidos cuales estarían dentro, fuera y en la membrana), Predict Protein (considera la accesibilidad a solventes, probabilidad de formar puentes disulfuro y contacto inter-residuos en los cruces transmembranales), SOSUI (evalúa la hidrofobicidad de los aminoácidos y si hay el largo de cadena suficiente para formar el cruce transmembranal), TMHMM ( usa el modelo de Markov), TMPRED (busca homología con secuencias reportadas para cruces transmembranales en la base de datos Swiss Prot 22), TopPred( utiliza la hidrofobicidad de la proteína y la regla del positivo adentro), MEMSAT (considera homología con la topología de otras proteínas de su base de datos) y PHOBIUS Quick 2D (evalúa la posible topología en la membrana y descarta los cruces transmembranales que pudieran ser péptidos señal).

Se corroboró la presencia de estos cruces transmembranales predichos obteniendo el perfil de hidropaticidad de la proteína de interés utilizando la escala de Kyte y Doolittle (1982) con una ventana experimental de 19 aminoácidos (longitud típica de un cruce transmembranal) y por la existencia de buscando secuencias típicas en ellos como los quiebres de prolina y los cinturones aromáticos.

#### EVALUACIÓN DE LA POSIBLE PRESENCIA DE PÉPTIDOS SEÑAL

La presencia de péptidos señal que pudieran haber sido confundidos con cruces transmembranales fue descartada utilizando los programas Signal IP 4.1 Server, Phobius, PRED-TAT, TATP 1.0, Sig-Pep, Predisi y SOSUisignal para garantizar los resultados la comparación se realizó contra péptidos señal de microorganismo Gram-positivos y Gram-negativos

#### ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RESPECTO A LOS CRUCES TRANSMEMBRANALES

La orientación de la proteína de interés se determinó utilizando la Regla del Positivo Adentro (Von Heijne, 1992), Para esta etapa se utilizaron los programas OCTOPUS, TMHMM, PHOBIUS, TOPCONS, PHILIUS, POLY-PHOBIUS, SCAMPI, SPOCTOPUS.

#### MODELADO IN SILICO DE LA PROTEÍNA DE INTERÉS

Con el fin de determinar la estructura *in silico* de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici*, de la cual no existen homólogos cristalizados se utilizaron los programas SWISS-MODEL, Phyre HHPRED (modelado por homología), RAPTOR X (modelado por homología-enhebrado), MUSTER y PHYRE INTENSIVE (enhebrado).

#### CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

##### CEPAS UTILIZADAS

Las cepas usadas durante esta investigación, la procedencia y el medio de cultivo de preservación se describen en la siguiente tabla (Tabla 7). Todas las cepas se encontraban almacenadas a -70°C.

**Tabla 7.** Descripción de las cepas usadas

Cepa	Procedencia	Medio de almacenamiento
<i>B. cereus</i> CFQ-B230	Facultad de Química UNAM	BHI /glicerol (80/20)
<i>E. faecalis</i> QB	Dra. Maricarmen Quirasco	MRS /glicerol (80/20)
<i>E. faecium</i> QB	Dra. Maricarmen Quirasco	MRS /glicerol (80/20)
<i>E. coli</i> BL21	INVITROGEN®	LB/glicerol (80/20)
<i>E.coli</i> DH5α	INVITROGEN®	LB/glicerol (80/20)
<i>E. coli</i> BL21 pET19-99	Dr. Israel García-Cano	LB+ampicilina/glicerol (80/20)
<i>L. paracasei</i> CFQ-B-90	Facultad de Química UNAM	MRS /glicerol (80/20)
<i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103	Facultad de Química UNAM	BHI /glicerol (80/20)
<i>M. lysodeikticus</i>	Sigma-Aldrich®	Producto liofilizado
<i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	CINVESTAV, IPN	MRS modificado/glicerol (80/20)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Facultad de Química UNAM	BHI /glicerol (80/20)
<i>Salmonella</i> entérica serovar Typhimurium ATCC 14028	Facultad de Química UNAM	BHI /glicerol (80/20)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Posgrado FESC-UNAM	BHI /glicerol (80/20)
<i>S. pyogenes</i> CFQ-B-218	Facultad de Química UNAM	BHI /glicerol (80/20)

## MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

### Medio LB

Todos los componentes de este medio (Tabla 8) se mezclan y esterilizan juntos a 121°C, 10 libras, 15 minutos.

**Tabla 8.** Medio LB (Luria-Bertani)

Componente	g/L
Bacto triptona (DIFCO)	10
Cloruro de sodio (J.T. Baker)	10
Extracto de levadura (DIFCO)	5
pH=7.0±0.2	

### Medio MRS modificado

Todos los componentes de este medio (Tabla 9) se esterilizan juntos a 121°C, 10 libras, 15 minutos, con excepción del ácido ascórbico y la sacarosa, los cuales deben prepararse y esterilizarse por separado en las condiciones anteriormente descritas.

**Tabla 9.** Medio MRS modificado

Componente	g/L
Peptona proteosa	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Sacarosa	10
Tween 80	1 mL/L
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.25
Fosfato de potasio dibásico	2
Ácido ascórbico	1.5
pH=7±0.2	

## CLONACIÓN DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA PARA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE 110-kDA

### EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042

Siguiendo la metodología descrita por Matamoros (2013), se tomaron 200 µL de la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 conservada a -70°C en MRS modificado (80%)/glicerol (20%) y con ellos se inocularon 10 mL de medio MRS, que se

cultivaron a 29°C por 8 horas. Este cultivo se centrifugó a 8500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó y las células se utilizaron para la extracción de ADN. La extracción de ADN genómico se realizó con el sistema de extracción Genomic DNA Extraction Kit (FAST ID, N° de catálogo K1-0001-0050).

#### AMPLIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA A LA PROTEÍNA DE 110-KDA

A partir de la secuencia del gen que codifica para la proteína hipotética de 110-kDa reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7\_4 (Clave de acceso en NCBI= WP\_023440859.1) se diseñaron los cebadores (Tabla 10) para la amplificación de dicho gen a partir del ADN extraído como anteriormente se indicó de la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042, se utilizó la enzima Taq polimerasa de acuerdo a las recomendaciones del proveedor del sistema TOPO 2.1 Cloning Kit (Tabla 11.)

**Tabla 10.** Cebadores utilizados para la amplificación del gen de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042

Cebadores	Tm (°C)	Secuencia
ExNco-110 (Forward)	64.4	GCG CCA TGG GAG TTC GCA AAG AGT GGA AAT T
E110RXho (Reverse)	58.9	TGA CTC GAG TCT TTC AAC TTC TTG AAG CTT

**Tabla 11.** Condiciones de amplificación del gen de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 utilizando Taq polimerasa

Etapa	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Ciclo
Desnaturalización inicial	2	94	1X
Desnaturalización	1	94	25X
Alineamiento	1	55	
Extensión	1	72	
Extensión final	7	72	1X

El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % (m/v) utilizando amortiguador TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) (Fermentas®). Las muestras obtenidas de la PCR se mezclaron con amortiguador de carga 6x (Loading Dye 6x, Fermentas®). La electroforesis se corrió a 90 V durante 1 hora, el gel se reveló con bromuro de etidio al 0.01 % sobre un transiluminador de luz UV, el producto de PCR se purificó utilizando el kit GeneJet Gel Extraction de Thermo Fisher®

#### CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO TOPO 2.1-110 (VECTOR DE CLONACIÓN)

A partir del gen para la expresión de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 amplificado por PCR y utilizando las condiciones indicadas en el protocolo del Kit de clonación del vector pCR™2.1-TOPO® se llevó a cabo la construcción del plásmido TOPO 2.1-110.

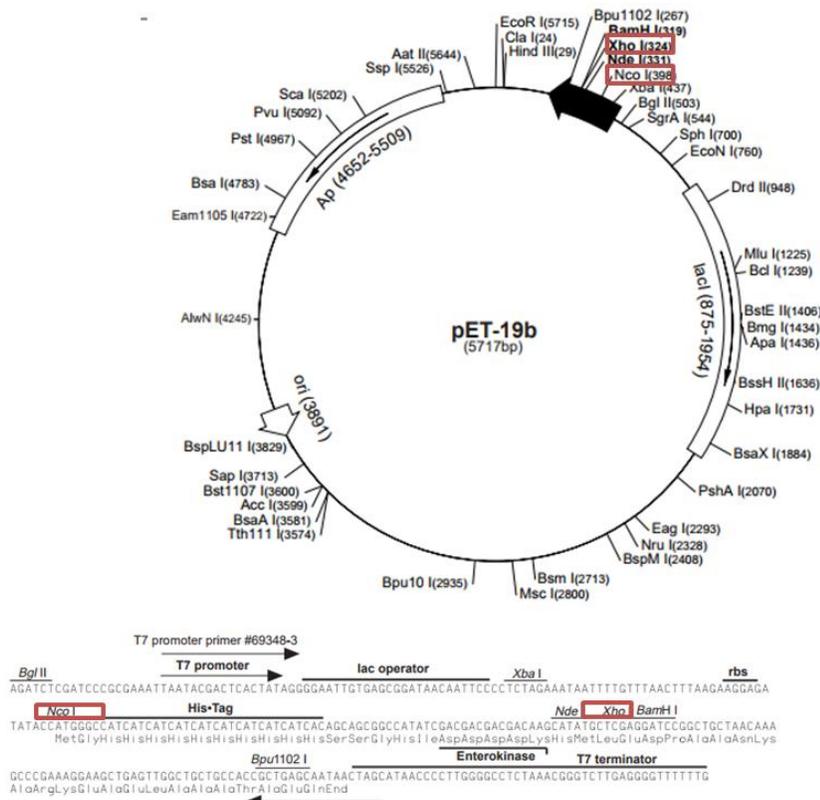
#### OBTENCIÓN DE CÉLULAS *E. COLI* DH5α CON EL VECTOR TOPO2.1-110

Se realizó un preinóculo con 200 µL de células de *E. coli* DH5α que se adicionó a un tubo con 5 mL de medio LB, el cual se incubó por 12 horas a 37 °C, 200 rpm. Posteriormente, se efectuó una resiembra del 1 % del preinóculo en 50 mL de medio fresco y se incubó en las mismas condiciones anteriormente descritas, hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.2. Una vez alcanzada esa densidad óptica todo el volumen se centrifugó a 8500 rpm por 15 minutos a 4 °C. La pastilla celular se resuspendió en 15 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y se incubó en hielo durante 30 min, una vez transcurrido este lapso de tiempo se centrifugó bajo las mismas condiciones, se resuspendió en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se incubó en hielo por 2 horas para generar células competentes.

La transformación consistió en realizar una mezcla de 50 µL de células competentes con 5 µL de la construcción que se dejó incubar 30 minutos en hielo. Después se le aplicó un choque térmico, elevando la temperatura a 42 °C durante 2 minutos y posteriormente incubando en hielo durante 5 minutos. La mezcla de transformación se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se le adicionó 1 mL de medio LB para recuperar las células, el cual se incubó a 37 °C, 250 rpm por 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, el tubo se centrifugó a 12,500 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 µL de medio LB. Se plaqueó sobre cajas de agar LB con ampicilina (100 µg/mL concentración final) y se incubó durante toda la noche a 37 °C; una asada de cada una de las colonias positivas se inoculó en tubos de 5 mL de medio LB con ampicilina para su conservación y la evaluación de la presencia de la construcción de interés, mediante PCR utilizando los cebadores indicados en la Tabla 10 y los primers universales T7.

CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PET19B-110 EN *E. COLI* BL21

Para generar la construcción del vector de expresión (pET19b) con el gen de interés insertado; la construcción TOPO 2.1-110 y el vector pET19 se sometieron a una doble digestión con las enzimas de restricción pertinentes (Nco I y Xho I) según las especificaciones del proveedor (Fermentas®), el producto de ambas digestiones se sometió a electroforesis para su purificación en las condiciones señaladas anteriormente (Figura 11). Las bandas correspondientes al gen para la expresión de la proteína de 110-kDa y la del vector digerido se purificaron con el Kit GeneJet Gel Extraction de Thermo Fisher®. El vector pET19, doblemente digerido y purificado de banda, se sometió a desfosforilación para evitar su recircularización utilizando fosfatasa alcalina termosensible (Fast AP, Thermo Fisher®).



**Figura 11.** Mapa del vector de expresión pET19 dónde se indican los sitios de corte para la inserción del gen de interés, como se observa en la imagen la sección que codifica para la cola de histidinas fue escindida.

La ligación del inserto con el vector pET19 se efectuó utilizando la ligasa T4 (Promega®); para saber la cantidad de inserto que se necesitaba, se ocupó la siguiente ecuación con una relación molar de 3:1 y 5:1 (inserto: vector)

$$ng \text{ inserto} = \left( \frac{ng \text{ vector} (\text{tamaño del inserto} (kb))}{(\text{tamaño del vector} (kb))} \right) * \text{relac molar} \left( \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} \right)$$

La ligación se probó a 22°C por 3 horas y 4°C por 12 horas.

Células competentes de *E. coli* DH5α se transformaron con cada uno de los productos de las condiciones de ligación probadas siguiendo el protocolo antes mencionado. Las clonas positivas se sembraron en medio LB con ampicilina y se incubaron a 37°C por 12 horas a 250 rpm. Para cada una de ellas se hizo una extracción de plásmido y una amplificación del gen para la producción de la proteína de 110-kDa por PCR utilizando los cebadores universales T7 y los específicos para el mismo; se empleó enzima Long PCR de Thermo Scientific® y las siguientes condiciones (Tabla 12).

**Tabla 12.** Condiciones de amplificación del gen de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 utilizando Long PCR de Thermo Scientific®

Proceso	T (°C)	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2 minutos	1
Desnaturalización	94	20 segundos	10
Alineamiento	50 y 55	30 segundos	
Extensión	68	3 minutos y 20 segundos	
Desnaturalización	94	20 segundos	25
Alineamiento	50 y 55	30 segundos	
Extensión	68	3 minutos y 30 segundos	
Extensión final	68	10 minutos	1

Utilizando el plásmido extraído de las clonas positivas de *E. coli* DH5α pET19-110 se realizó la transformación de la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3) por el método antes descrito. Las clonas positivas se sembraron en medio LB con ampicilina y se incubaron a 37°C por 12 horas a 250 rpm, para cada una de ellas se hizo una extracción de plásmido y la amplificación del gen de interés por PCR (Tabla 14) utilizando los cebadores para la amplificación del gen completo, así como cebadores intragénicos (Tabla 13 y Figura 12).

**Tabla 13.** Cebadores utilizados para la amplificación de la construcción pET19-110

Cebadores	Tm (°C)	Secuencia	Tamaño del producto
ExNco-110 (Forward)	64.4	GCGCCATGGGAGTTCGCAAAGAGTGGAAATT	~800
R1-110	53	CCGGTGGTTACTTGACCAG	
F2-110	50	CGCTCTGGTCAAGTAACC	~790
R2-110	47	TACAGTTTGCGAAGTAGTC	
F3-110	55	CCGACTTCGAAACTGTAGATAC	~800
R3-110	52	ACGCCGTTGATTAACGTTCC	
F4-110	52	CGCACTGGAACGTTAATCAAC	~850
E110RXho (Reverse)	58.9	TGACTCGAGTCTTTCAACTTCTTGAAGCTT	



**Figura 12.** Regiones amplificadas del gen de interés con cada uno de los pares de cebadores indicados en la Tabla 12.

**Tabla 14.** Condiciones de amplificación para los cebadores intragénicos del gen que codifica para la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 utilizando Long PCR de Thermo Scientific®

Proceso	T (°C)	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2 minutos	1
Desnaturalización	94	20 segundos	10
Alineamiento	49	30 segundos	
Extensión	68	1 minuto	
Desnaturalización	94	20 segundos	25
Alineamiento	49	30 segundos	
Extensión	68	1 minuto y 10 segundos	
Extensión final	68	10 minutos	1

Los productos de la amplificación del gen de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 de los cebadores de la tabla 10 y los amplicones generados utilizando cebadores intragénicos se secuenciaron para corroborar que

no existieran mutaciones o cambios en el marco de lectura (Macrogen Inc, Corea del Sur).

#### EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE 110-KDA.

Se preparó un preinóculo de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con la construcción pET19-110 conservada a -70 °C, en medio LB más ampicilina (100 µg/mL), el cual se incubó a 37°C, 250 rpm, durante 12 horas. Este preinóculo se resembró tomando una alícuota del 1% en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del mismo medio de cultivo y siguiendo las mismas condiciones de incubación hasta llegar a una  $DO_{600nm}$  entre 0.6-0.8. Posteriormente se adicionó IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) como inductor en diferentes concentraciones (0.1, 0.4 y 1 mM). Una vez adicionado el IPTG, la fermentación se siguió a diferentes tiempos (4, 8, 12 y 16 horas) a 37°C y 250 rpm. Concluido este período, se cosecharon las células centrifugando el medio a 8500 rpm, 15 minutos a 4°C, de este tratamiento se obtuvieron dos fracciones: el sobrenadante, el cual se ultrafiltró para concentrarlo con una membrana de tamaño de corte de 10-kDa hasta alcanzar el 1% del volumen inicial. Las células enteras se resuspendieron en Tris-HCl pH 8.0 100 mM y se sonicaron a una amplitud de 30 Hz con 20 ciclos de 20 segundos cada uno e intervalos de descanso de 20 segundos a 4°C.

El sonicado se centrifugó a 14,000 rpm por 30 minutos a 4°C, para obtener dos fracciones: el citosol (sobrenadante) y los restos celulares (pastilla) que se resuspendieron en el mismo amortiguador. El citosol se concentró por ultrafiltración con membrana de tamaño de corte de 10-kDa hasta el 1% del volumen inicial.

Cada una de las fracciones se analizó mediante SDS-PAGE y zimograma de actividad lítica contra *M. lysodeikticus* utilizando la técnica de Leclerc y Asselin (1989).

#### DETERMINACIÓN DEL PERFIL PROTEICO POR SDS-PAGE

El perfil proteico de cada muestra se conoció mediante SDS-PAGE según la metodología descrita por Laemmli (1970) y el Manual MINI-PROTEAN 3. Los geles se prepararon con los siguientes reactivos (Bis-acrilamida 30%, Tris-HCl 2

mM, pH 8.8, SDS 10%, H<sub>2</sub>O destilada, TEMED y APS 10%). El gel se corrió a 120 V para teñirse posteriormente con azul de Coomassie o con tinción de plata según se requiriera.

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PGH EN ZIMOGRAMA CON *M. LYSODEIKTICUS*

Se realizaron con la misma metodología utilizada para los SDS-PAGE adicionando 0.2 % de *M. lysodeikticus* (Leclerc y Asselin 1989). Una vez terminada la electroforesis, el gel se incubó con solución renaturalizante (Tris-HCl 100mM, pH 8.0 con Tritón X-100, 1% v/v) por 12 horas a 37°C y 70 rpm. Posteriormente se tiñó el gel con azul de metileno al 0.1% y KOH 0.01% por media hora y se destiñó con agua hasta la observación de bandas de actividad lítica.

#### DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE PRUEBAS DE DIFUSIÓN EN AGAR

Para determinar el efecto antibacteriano *in vitro* se efectuaron pruebas de difusión en agar (García Cano, 2013) utilizando como microorganismos indicadores *M. lysodeikticus* y *S. aureus*. En cada caja de Petri se colocaron 15 mL de agar BHI al 1 %, que se dejaron solidificar, posteriormente a la caja se adicionaron 10 mL de agar BHI al 0.6 % inoculados con el microorganismo a evaluar (en una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/mL); con un penicilindro se hicieron pozos sobre la doble capa de agar, a los cuales se agregó cada una de las fracciones de los distintos tiempos de fermentación.

#### CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD

La concentración de proteína en cada una de las muestras se mensuró por microensayo usando el método de Bradford (Bradford, 1976) con un kit comercial (Bradford Protein Assay Bio-Rad®).

#### DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN Y SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE 110-KDA

Debido a que las fracciones que presentaron actividad lítica en zimograma y en pruebas en difusión en agar para todas las condiciones de producción de la proteína recombinante analizadas inicialmente fueron los restos celulares, se sospechaba la formación de cuerpos de inclusión (agregados proteicos de proteína recombinante parcialmente plegada o no plegada). Su presencia se confirmó mediante Microscopía Electrónica de Transmisión empleando tinción

negativa en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular usando las células cosechadas de la inducción que generó los mejores halos de inhibición (8 horas de inducción con 0.1 mM de IPTG).

#### INDUCCIÓN EN FRÍO

Una estrategia indicada en la literatura (pET System Manual) para evitar la formación de cuerpos de inclusión es inducir la producción de la proteína a bajas temperaturas por tiempos prolongados. En esta investigación se evaluó la inducción a 4°C por 16 horas, adicionando al medio glicerol, sustancia descrita como coadyuvante del correcto plegamiento de proteínas y de su solubilización (Burguess, 2009; Sahdev *et al.*, 2008), en diferentes concentraciones (1 y 2%). Se extrajeron tres fracciones, sobrenadante, citosol y restos celulares, de cada una de las condiciones probadas.

#### SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE CON DETERGENTES.

Debido a que la cantidad de proteína recombinante solubilizada con la inducción en frío fue baja, se probó la solubilización de la misma a partir de los restos celulares que era la fracción que seguía presentando más actividad en zimograma empleando los tres detergentes más comúnmente usados para la purificación de proteínas de membrana (Smith, 2011): Tritón X-100 (detergente no-iónico) al 0.02 y 1 %, desoxicolato de sodio (detergente iónico) al 0.14 y 2 % y CHAPS (detergente zwitteriónico) al 0.429%. La solubilización se llevó a cabo por una hora a 4°C y 150 rpm.

Una vez transcurrido el proceso anteriormente descrito se separaron la fracción solubilizada y la insoluble por centrifugación a 17000 rpm por dos horas y se midió la actividad de ambas en zimograma de *M. lysodeikticus*.

Cabe destacar que para la determinación de la concentración de proteína en cada fracción se utilizó la absorbancia de la misma a 280 nm, pues los detergentes utilizados interfieren si se mensura este parámetro con el método de Bradford.

#### OPTIMIZACIÓN DE LA SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

Una vez que se estableció el mejor detergente y la concentración óptima del mismo para la solubilización de la proteína recombinante, que resultó ser el

desoxicolato de sodio al 2%, se evaluó la recuperación de la misma de acuerdo al tiempo de solubilización probándose 1, 6 y 24 horas. La actividad de las fracciones soluble e insoluble de cada condición se determinó en zimograma de *M. lysodeikticus*

EVALUACIÓN DEL ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE 110-KDA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042.

Para valorar la actividad antimicrobiana de la proteína recombinante se realizaron pruebas de difusión en agar de los restos celulares de la inducción en frío solubilizados en desoxicolato de sodio al 2% contra 12 microorganismos *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *L. paracasei*, *L. monocytogenes*, *M. lysodeikticus*, *P. acidilactici*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. aureus* y *S. pyogenes*, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente.

DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN (ESPECIFICIDAD POR SUSTRATOS ANÁLOGOS DEL PEPTIDOGLUCANO).

Con el fin de identificar si la proteína recombinante era una PGH se evaluó la especificidad de la misma contra análogos de los enlaces presentes en el peptidoglucano, técnicas que se describen a continuación. .

En cada prueba se utilizaron controles positivos de cada una de los cuatro posibles tipos de PGH:

- Control positivo de N-acetilglucosaminidasa: N-acetilglucosaminidasa de *Canavalia ensiformis*.
- Control positivo de amidasa: pilina con actividad de amidasa de *Bacillus pumilus* (Hernández-Maldonado, 2017).
- Control positivo de endopeptidasa: lisostafina de *Staphylococcus simulans*.
- Control positivo de muramidasa: lisozima de huevo de gallina.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE N-ACETILGLUCOSAMINIDASA

Se determinó la actividad de N-acetilglucosaminidasa a la proteína recombinante solubilizada en desoxicolato de sodio al 2% así como a los controles negativos y positivo siguiendo el protocolo descrito por Sigma Aldrich® para la detección de enzimas con actividad de N-acetilglucoamidasa y modificado por García Cano (2013). Se utilizó una microplaca de 96 micropozos. Para cada prueba se

adicionaron 80  $\mu\text{L}$  de amortiguador de Citrato de Sodio pH 4.8 100 mM, 10  $\mu\text{L}$  de una solución de 4-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (1 mg/mL) y 10  $\mu\text{L}$  de la muestra; la reacción se incubó a 37°C por 30 minutos y se detuvo adicionando 100  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio 140 mM. La actividad enzimática de la muestra y de los controles se cuantificó en un lector de placas a 405 nm (EPOCH Biotek).

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AMIDASA

Se determinó la actividad de amidasa a la proteína recombinante solubilizada en desoxicolato de sodio al 2% así como a los controles negativos y positivo siguiendo el protocolo descrito por Sigma Aldrich® y por García Cano *et al.* (2015) para la detección de enzimas con dicha actividad. Se utilizó una microplaca de 96 micropozos. Para cada prueba se adicionaron 70  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, 10  $\mu\text{L}$  de una solución de hidrocloreuro de L-alanin-p-nitroanilina (1 mg/mL) y 20  $\mu\text{L}$  de la muestra y la reacción se incubó a 37°C por 40 minutos. La actividad enzimática de la muestra y la de los controles se midió con un lector de placas a 350 nm (EPOCH Biotek).

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENDOPEPTIDASA

La actividad de endopeptidasa se determinó mediante el método de Cd-ninhidrina (Doi *et al.*, 1981; Valenzuela, 2012). En un tubo se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de la muestra de enzima y 15  $\mu\text{L}$  de soluciones preparadas de Leu-Gly-Gly (5 mM) y Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (5 mM) en HEPES 20 mM pH 7.0. La mezcla de reacción se llevó a un volumen de reacción de 150  $\mu\text{L}$  con amortiguador de trabajo y se incubó a 37°C por una hora. Posteriormente se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de reactivo Cd-ninhidrina (0.8 g de ninhidrina, 80 mL de etanol al 99.5%, 10 mL de ácido acético glacial y 1g de  $\text{CdCl}_2$ ) y nuevamente se incubó la mezcla a 85°C por 5 minutos. Después de este tiempo se centrifugó cada tubo para evitar la turbidez pudiera interferir en la medición. El ensayo se elaboró transfiriendo 200  $\mu\text{L}$  de cada tubo a una microplaca de 96 pozos, se utilizó un lector de placas Epoch Biotek y las lecturas se realizaron a 507 nm.

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MURAMIDASA

La actividad de muramidasa se determinó siguiendo el protocolo de Taylor (1996). 250  $\mu\text{L}$  de una solución de peptidoglucano de *M. lysodeikticus* (4mg/mL) mezclada con 150  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y llevada a un volumen final de 600

$\mu\text{L}$  con agua desionizada se incubó por 24 horas; transcurrido este tiempo la mezcla se centrifugó para eliminar el peptidoglucano no solubilizado. 500  $\mu\text{L}$  de reacción se mezclaron con 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y esta solución se calentó en agua a ebullición por diez minutos, para posteriormente adicionar 50  $\mu\text{L}$  a cada muestra de  $\text{CuSO}_4$  al 4% y 100  $\mu\text{L}$  de pPP (p-fenilfenol) al 1% en etanol al 96%. Cada ensayo se incubó a temperatura ambiente por treinta minutos, y se evaluó midiendo la absorbancia del mismo a 570 nm.

EXTRACCIÓN DE PEPTIDOGLUCANO (TOMADO Y MODIFICADO DE TIAN *ET AL.*, 2015)

Un cultivo *M. lysodeikticus* en medio BHI incubado por 24 horas a 37°C y 250 rpm se centrifugó a 8500 rpm por 15 minutos a 4°C para cosechar las células. La pastilla generada se lavó con agua desionizada estéril (relación masa celular (g)/ volumen agua (ml)=1/10) hasta obtener un precipitado blanco, el cual posteriormente se resuspendió en TCA al 10% (relación masa celular (g)/ volumen TCA 10% (ml)=1/10) y se colocó a ebullición por 60 minutos. Una vez transcurrido este tiempo la solución se enfrió y se centrifugó a 8500 rpm por 20 minutos a 4°C. La pastilla resultante del tratamiento con TCA se resuspendió e incubó en una mezcla de amortiguador de acetatos (0.5 M de ácido acético y 0.2 M de acetato de sodio pH 4.5), cloroformo y metanol (4:5:10) pH 4.6 toda la noche y después se centrifugó a 8500 rpm por 10 minutos a 4°C.

El precipitado se solubilizó en TRIS-HCl 100 mM pH 7.5 con 2000 unidades de pronasa y se incubó a 37°C por 12 horas y 140 rpm en baño de agua; una vez concluida esta etapa la solución se centrifugó por veinte minutos a 4°C. El sedimento se lavó cuatro veces con agua desionizada, se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA DE 110-KDA RECOMBINANTE.

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE 110-KDA RECOMBINANTE

A partir del extracto soluble de la proteína recombinante de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 obtenido después de tratar los restos celulares con desoxicolato de sodio al 2% por 24 horas se realizó una purificación de la proteína de interés en la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM. Se utilizó una columna Superdex 200 (Pharmacia Biotech) conectada al

equipo Biologic LP (Bio-Rad); la muestra se hizo pasar con un flujo de 1mL/minuto utilizando como amortiguador de corrida Tris-HCl pH 8.0 100 mM; en total se obtuvieron ocho corridas, cada una de las cuales estaba formada por 80 fracciones de 5 mL; la cantidad de proteína en las mismas se monitoreo por absorbancia a 280 nm.

Para calcular el peso molecular teórico de la proteína recombinante de 110-kDa se utilizaron cinco proteínas de referencia: ferritina (440 kDa), inmunoglobulina G (160 kDa), albúmina (66 kDa), quimiotripsinógeno A (25 kDa) y ribonucleasa (13 kDa) que se inyectaron en las condiciones anteriormente descritas en la columna, dicho valor se determinó a partir del coeficiente de partición ( $K_{av}$ ) y se comparó con el observado experimentalmente mediante SDS-PAGE.

La actividad enzimática de las fracciones se analizó mediante zimograma y ensayo espectrofotométrico para actividad de muramidasa, mientras que la concentración de proteína se cuantificó utilizando el método de Bradford. Aquellas que presentaron mayor actividad espectrofotométrica se utilizaron para la caracterización bioquímica.

#### CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE 110-KDA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042

Durante el rastreo de la actividad enzimática en las fracciones purificadas se encontraron dos grupos de las mismas con alta actividad de muramidasa, uno comprendida entre las fracciones 51 a 59 (con un pico máximo alrededor de 54) y el otro entre las fracciones 63 a 72 (con un pico máximo alrededor de 68). Sin embargo, al observar en SDS-PAGE el perfil proteico de las muestras, la primera región presentaba dos bandas (debidas posiblemente a la degradación de la enzima de interés) y la segunda una, por lo que se decidió trabajar con ésta última donde la proteína estuviera en un sólo nivel de degradación.

La caracterización bioquímica se llevó a cabo como se describe a continuación:

#### INFLUENCIA DEL PH DEL MEDIO EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

Se utilizó una mezcla de amortiguadores: ácido cítrico 20 mM (intervalo de amortiguamiento: 2.1-4.1), ácido acético 20 mM (3.8-5.8), MES 20 mM (5.5-6.7),

HEPES 20 mM (6.8-8.2), CHES 20 mM (8.6-10) ajustado a cada pH evaluado 4,5,6,7,8,9 y 10.

Para cada ensayo se tomaron 350  $\mu$ L de una solución de peptidoglucano (4 mg/mL) solubilizado en las soluciones de la mezcla de amortiguadores ajustadas a los distintos valores de pH a los cuales se les 27.5  $\mu$ g de la proteína total obtenida de la purificación, la reacción se incubó a 37°C por 24 horas con una agitación de 100 rpm. Transcurrido este tiempo cada tubo se centrifugó por un minuto para decantar el peptidoglucano no hidrolizado y de cada reacción se tomaron 500  $\mu$ L que se analizaron de acuerdo al protocolo señalado para la prueba espectrofotométrica de detección de muramidasa. Cada ensayo se evaluó por cuadruplicado y se hicieron blancos para descartar el efecto del pH en el sustrato.

#### ESTABILIDAD A PH

Este parámetro se determinó colocando 43  $\mu$ g de la proteína total obtenida de la purificación para cada condición a analizar que se incubaron con 375  $\mu$ L de la mezcla de amortiguadores ajustadas a pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, por una hora a 37°C y 100 rpm de agitación. De esta mezcla se tomaron 250  $\mu$ L que se incubaron con 350  $\mu$ L de una solución de peptidoglucano (4 mg/mL) preparada al pH en el que se observó una mayor degradación del sustrato (pH=6). La reacción se incubó 28 horas a 37°C con una agitación de 100 rpm; transcurrido este tiempo cada tubo se centrifugó por un minuto para decantar el peptidoglucano no hidrolizado. De cada reacción se tomaron 500  $\mu$ L que se trataron de acuerdo al protocolo señalado anteriormente. Cada ensayo se llevó a cabo por cuadruplicado y se hicieron blancos para descartar el efecto del pH en el sustrato.

#### EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE REACCIÓN EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

Para conocer la influencia de este parámetro en la enzima se llevó a cabo la incubación de la reacción de hidrólisis de peptidoglucano a diferentes temperaturas (4°C, 23°C, 38°C, 45°C y 65°C). Cada reacción consistió en 15.75  $\mu$ g de la proteína purificada a los que se les adicionaron 350  $\mu$ L de una solución de peptidoglucano (4 mg/mL) ajustada a pH 6. La reacción se incubó por 23 horas y 3 minutos a cada uno de las temperaturas probadas con una agitación de 100 rpm,

transcurrido esta etapa cada una de las muestras se centrifugó por un minuto para decantar el peptidoglucano no hidrolizado; de cada reacción se tomaron 500  $\mu\text{L}$  que se procesaron de acuerdo al protocolo señalado para cuantificar la actividad de muramidasa. Cada ensayo se evaluó por cuadruplicado y se hicieron blancos para descartar el efecto de la temperatura en el sustrato.

#### ESTABILIDAD TÉRMICA

Esta propiedad de la enzima se estimó incubando a la misma a 4°C, 25°C, 38°C, 45°C y 65°C por 1 hora. Cada ensayo consistió en 15.75  $\mu\text{g}$  de la proteína purificada. Transcurrido este tiempo la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le adicionaron 350  $\mu\text{L}$  de una solución de peptidoglucano (4 mg/mL, pH=6). Las muestras se incubaron por 23 horas a 100 rpm y 23 °C , que resultó ser la temperatura de mayor actividad. Concluido este tiempo cada una de las muestras se centrifugó por un minuto para decantar el peptidoglucano no hidrolizado; de cada reacción se tomaron 500  $\mu\text{L}$  que se analizaron siguiendo el protocolo para la detección de la actividad de muramidasa. Cada ensayo se efectuó por cuadruplicado y se hicieron blancos para descartar el efecto de la temperatura en el sustrato.

#### EFFECTO DE IONES METÁLICOS

Se determinó el efecto de cinco iones metálicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ) en la actividad enzimática de la proteína de 110-kDa recombinante en dos concentraciones diferentes, 1 y 10 mM. El primer paso consistió en el secuestro de los iones que pudiesen estar en las fracciones de la proteína purificada adicionando EDTA hasta alcanzar una concentración final 100 mM e incubando estas fracciones durante 1h en presencia de este quelante. Posteriormente a 9.75  $\mu\text{g}$  de la enzima purificada y sometida al tratamiento con EDTA se le adicionaron 450  $\mu\text{L}$  de una solución de peptidoglucano (4 mg/mL) ajustada a pH 6 que contenía el ion a analizar, la concentración final del ion en la mezcla de reacción era 1 y 10 mM. La reacción se incubó por 20 horas a 23°C, transcurrido este tiempo cada una de las muestras se centrifugó por un minuto para decantar el peptidoglucano no hidrolizado; de cada reacción se tomaron 500  $\mu\text{L}$  que fueron

tratados de acuerdo al protocolo señalado anteriormente. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado y se hicieron blancos para descartar el efecto de cada metal en las dos concentraciones probadas en el peptidoglucano.

#### EFFECTO DE EDTA Y PMSF.

El efecto del EDTA (agente quelante) y del PMSF (inhibidor de serin proteasas y de otras enzimas que contienen serina en sus sitios activos) (Genckal y Tari, 2006) se probó utilizando dos concentraciones de estos compuestos 1 y 10 mM.

Se tomaron 7.25 µg de la enzima purificada a los que se le adicionaron 450 µL de una solución de peptidoglucano (4 mg/mL) a pH 6 que contenían el EDTA o PMSF, la concentración final de los mismos era 1 y 10 mM. La reacción se incubó por 20 horas a 23°C, concluido este tiempo cada una de las muestras se centrifugó por un minuto para decantar el peptidoglucano no hidrolizado. De cada reacción se tomó una muestra de 500 µL, que se analizó de acuerdo al protocolo indicado para la determinación de la actividad de muramidasa. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado y se hicieron blancos para descartar el efecto del EDTA y PMSF sobre el peptidoglucano

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA ENZIMA RECOMBINANTE DE 110-KDA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042 PURIFICADA Y DE LA MEZCLA DE ÉSTA CON LA PROTEÍNA DE 99-KDA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042

##### EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE DE 99-KDA *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042

A partir de la cepa de *E. coli* BL21 pET19-99 (Garcia-Cano, 2013) almacenada a -70°C, se realizó un preinóculo en medio LB+ampicilina (100µg/mL) que se incubó a 37°C por 12 horas con una agitación a 250 rpm, posteriormente se resembró (1% del preinóculo) en un matraz con 50 mL del mismo medio y se incubó en las condiciones anteriormente descritas hasta llegar a una D.O.<sub>600nm</sub> 0.6-0.8, momento en el cual se adicionó IPTG (0.1 mM concentración final) para inducir la expresión del gen que se encarga de sintetizar la proteína de interés, la fermentación continuó en las mismas condiciones por 4 horas.

Las células se cosecharon centrifugando el medio a 8500 rpm, 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se ultrafiltró con una membrana de tamaño de corte de 30-kDa

hasta reducir su volumen al 1% del volumen inicial. Para corroborar la expresión de la proteína recombinante se determinó espectrofotométricamente la actividad de glucosaminidasa y en zimograma de 4-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina.

#### ZIMOGRAMA DE 4-NITROFENIL-N-ACETIL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINA

Se realizó con la misma metodología utilizada para los SDS-PAGE adicionando 3 mg de 4-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (Barbosa-González, 2015). Una vez terminada la electroforesis, el gel se incubó en MOPS 20 mM pH 6 por 30 minutos a 50°C y 60 rpm o hasta la observación de bandas amarillas características de la hidrólisis del sustrato y de la formación del ion nitrofenolato

#### DIFUSIÓN EN AGAR

Para evaluar la actividad antimicrobiana de la proteína recombinante de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 y de ésta en presencia de la de proteína recombinante de 99-kDa del mismo microorganismo se hicieron pruebas de difusión en agar contra 12 microorganismos *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *L. paracasei*, *L. monocytogenes*, *M. lysodeikticus*, *P. acidilactici*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. aureus* y *S. pyogenes* de acuerdo con la metodología descrita anteriormente utilizando para cada ensayo 5 $\mu$ g de cada una de las proteínas analizadas

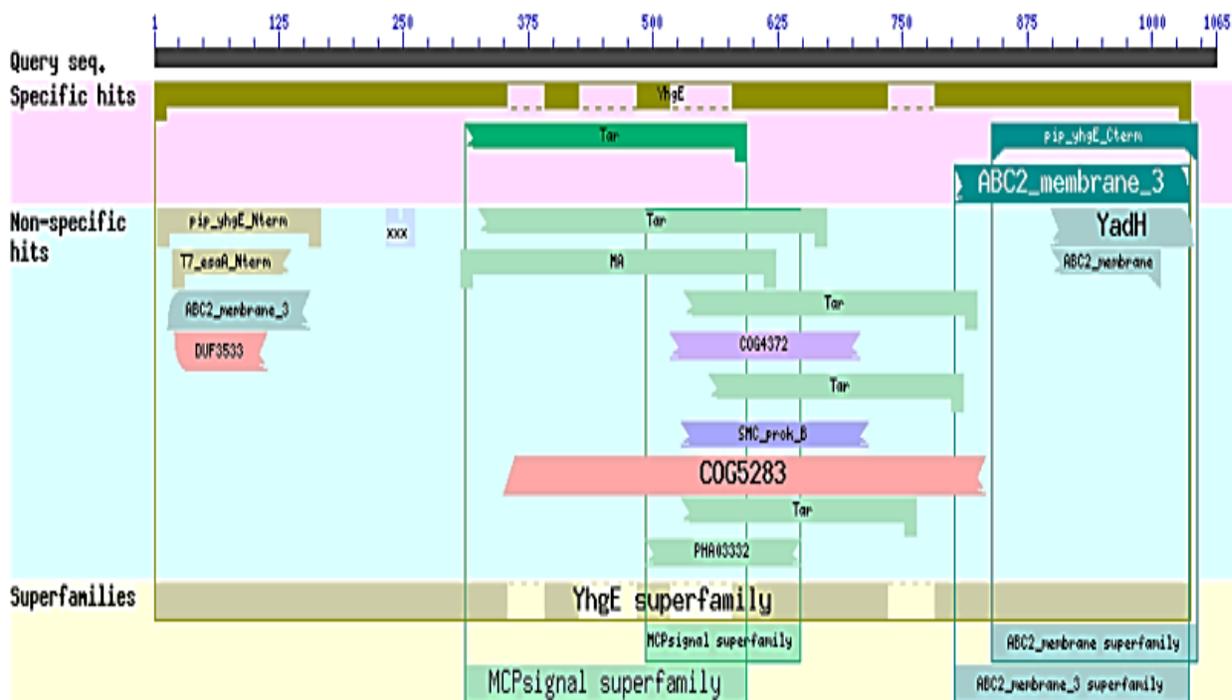
#### ENSAYO TURBIDIMÉTRICO

Se realizó en una microplaca de 96 pozos. Para cada experimento se tomaron 250  $\mu$ L de un cultivo en BHI de cada uno de los 12 microorganismos probados en el ensayo de difusión en agar en fase logarítmica, a los cuales se les adicionaron 50  $\mu$ L (0.032 mg/mL) de la proteína recombinante de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 y de ésta en presencia de la de proteína recombinante de 99-kDa del mismo microorganismo (0.016 mg/mL de cada proteína en el medio). La absorbancia de cada pozo se leyó a 600 nm en un lector de placas Epoch Biotek cada hora. Las muestras se evaluaron por triplicado y se hicieron blancos del medio de cultivo (BHI), del amortiguador de solubilización de las enzimas (Tris-HCl pH 8.0 100 mM) y se utilizó como control positivo ampicilina (100 mg/100 mL).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. GENERACIÓN DE UN MODELO ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA EN LA MEMBRANA Y DILUCIDACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LA MISMA MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

DOMINIOS ENCONTRADOS A PARTIR DE UN ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS TIPO LOCAL (BLAST) USANDO DISTINTAS BASES DE DATOS.



**Figura 13.** Dominios conservados encontrados en la secuencia de la proteína de 110-kDa con la base de datos NCBI

**Tabla 15.** Descripción de los dominios encontrados en la secuencia de la proteína de 110-kDa

Región	Dominio	Descripción	Expectancia
840-1045	C-terminal de YhgE/Pip (pip_yhgE_Cterm)	Este dominio forma parte de un grupo múltiple de proteínas de membrana características de bacterias Gram- positivas; uno de los miembros ha demostrado ser esencial para la infección por fagos, por lo que también son conocidas como " proteínas de fago de infección" (Pip; por sus siglas en inglés)	$2.02 \times 10^{-85}$
4-167	N-terminal de YhgE/Pip (pip_yhgE_Nterm)		$1.50 \times 10^{-71}$
1-1038	YhgE		$1.35 \times 10^{-109}$
802-1037	Transportador ABC (ABC2_membrane_3)		Sistema de transporte dependiente de ATP

Continuación de la Tabla 15

900-1008	Transportador ABC tipo 2 (ABC2_membrane)		$4.11 \times 10^{-4}$
14-156	Transportador ABC tipo 2 (ABC2_membrane_3)		$7.35 \times 10^{-9}$
19-136	Proteína de secreción EsaA (T7_esaA_Nterm)	Proteína de secreción tipo VII de la familia WXG100, comunes en los Firmicutes	$1.02 \times 10^{-16}$
233-260	Héptadas repetitivas tipo XXXLXXG (xxxLxxG_by_4)	Región característica que sugiere la presencia de dos giros $\alpha$ -hélice	$7.23 \times 10^{-3}$
899-1041	Transportador YadH (YadH)	Transportador ABC, involucrado en mecanismo de resistencia a diversos fármacos	$1.20 \times 10^{-6}$
326-674	Aceptor quimiotáctico de metilos (Tar)	Lleva a cabo metilaciones reversibles en respuesta a atrayentes o repelentes durante la quimiotaxis bacteriana	$1.07 \times 10^{-8}$
532-824			$3.87 \times 10^{-5}$
556-811			$7.95 \times 10^{-5}$
312-593			$3.94 \times 10^{-4}$
528-763			$2.57 \times 10^{-3}$
308-623	Aceptor quimiotáctico de metilos (MA)		$2.76 \times 10^{-5}$
517-707	Dominio COG4372 (COG4372)	No tiene función conocida; contiene un dominio DUF30084	$4.11 \times 10^{-5}$
20-113	DUF 3533	Proteína transmembranal con función desconocida presente en bacterias y eucariotas	$9.03 \times 10^{-5}$
528-715	Proteína de segregación cromosómica bacteriana (SMC_prok_B)	Esta proteína se encuentra unida al ADN y se encarga de organizar y segregar a los cromosomas durante el proceso de partición. Está presente en los tres dominios y es la más común en bacterias	$2.41 \times 10^{-4}$
350-832	Dominio COG5283 (COG5283)	Proteína del flagelo relacionada con fagos	$5.54 \times 10^{-4}$
493-648	Glicoproteína de membrana (PHA03332)	(Clasificación provisional)	$6.62 \times 10^{-3}$

**Tabla 16.** Secuencias con mayor homología obtenida mediante un alineamiento de secuencias tipo local (BLAST) utilizando la base de datos del NCBI

Descripción	Score	%Cobertura (respecto a la proteína completa)	Valor E	%Positivos	%Identidad	% Gaps
Proteína de membrana de <i>P. acidilactici</i> 7_4 (Aceptor quimiotáctico de metilos)	2123	100	0.0	100	100	0.0
Proteína de membrana hipotética de <i>P. acidilactici</i> MA18/5M	2114	100	0.0	99	99	0.0
Proteína de membrana hipotética ATO21_05370 de <i>P. acidilactici</i>	2114	100	0.0	99	99	0.0
Proteína integral de membrana de <i>P. acidilactici</i> DSM 20284	2113	100	0.0	99	99	0.0
Proteína de membrana hipotética AV543_05745 de <i>P. acidilactici</i>	2112	100	0.0	99	99	0.0

**Tabla 17.** Secuencias con mayor homología obtenidas mediante un alineamiento de secuencias tipo local (BLAST) utilizando la base de datos del Uniprot KB

Descripción	Score	%Cobertura (respecto a la proteína completa)	Valor E	%Positivos	%Identidad
Proteína de membrana de <i>P. acidilactici</i> 7-4 (Aceptor quimiotáctico de metilos)	5275	100	0.0	100	100
Proteína integral de membrana de <i>P. acidilactici</i> DSM 20284 (Aceptor quimiotáctico de metilos)	5258	100	0.0	99.6	99.6
Proteína no caracterizada de <i>P. acidilactici</i>	5226	100	0.0	99.6	99.8
Dominio C-terminal de proteína hipotética tipo YhgE/pip de <i>P. acidilactici</i> D3	5222	100	0.0	99.5	98.9
Proteína no caracterizada de <i>P. acidilactici</i>	5222	100	0.0	98.9	99.6

La secuencia de la proteína de 110-kDa tiene regiones características de múltiples dominios siendo los más notables por su alta similitud aquellos que corresponden a un transportador ABC, un aceptor quimiotáctico de metilos y una proteína requerida para infección por fagos (YhgE), de estos dominios así como del resto de los mostrados en la Figura 13 y Tabla 15 no existe hasta el momento alguno que tenga reportes como antimicrobiano, bacteriostático, bacteriocida o bacteriolítico, cabe destacar que las proteínas que presentan una mayor similitud

con la proteína de interés (Tabla 16 y 17) son hipotéticas y aún no hay informes donde alguna de éstas haya sido purificada, aislada o cristalizada, debido principalmente a la complejidad que conlleva la extracción y análisis de las proteínas de membrana.

Las regiones similares a secuencias de transportadores ABC (proteínas localizadas en las membranas celulares de múltiples organismos involucradas en la importación y exportación de aminoácidos, azúcares, minerales, fármacos, etc. a la célula (Biemans *et al.*, 2006), se ubican en la región N-terminal y C-terminal y se sobrelapan con los dominios N-terminal y C-terminal para la proteína de fago de infección tipo YhgE, que poseen expectancias inferiores. Probablemente los transportadores ABC y esta región de la proteína de 110-kDa son estructuralmente similares pero funcionalmente diferentes pues, como se verá más adelante, están involucradas en el anclaje de la proteína de 110-kDa a la membrana (son cruces transmembranales) de *P. acidilactici* ATCC 8042 y no poseen la longitud suficiente para formar la estructura de un transportador. Es importante destacar que los transportadores ABC también han sido señalados como reguladores y exportadores de péptidos antimicrobianos (Dintner., 2011), sin embargo, hasta el momento no existe reporte de proteínas de esta familia que presenten algún tipo de actividad antimicrobiana por sí sola.

La señalización de algunas proteínas de la tabla 16 y 17 como aceptores quimiotácticos de metilos es ocasionada por la similitud entre la secuencia de aminoácidos de la proteína de 110-kDa y proteínas que si tienen esta función en organismos alejados evolutivamente de *P. acidilactici* como *E. coli* y *Thermotoga* marina (Alexander y Shulin,2006). Dicho grupo de proteínas se encuentran en la membrana y son capaces de unirse a sustancias que actúan como atrayentes o repelentes orgánicos que envían información al interior de la célula y regulan la quimiotaxis de la misma, sin embargo, hasta el momento no se conoce información de actividad antimicrobiana de estas proteínas además de que el género *Pediococcus* spp. carece de flagelos que le permitan llevar a cabo quimiotaxis.

El dominio YhgE, que es el que presenta un menor valor de expectancia, es el único que puede estar relacionado con la actividad antibacteriana observada para la proteína de 110-kDa, ya que según lo señalado en la literatura (Dieye *et al.*, 2010 Oxaran *et al.*,2012; Johnson *et al.*, 2014; Golomb *et al.*,2015 Koberiecka *et al.*, 2016, Castelain *et al.*,2016) dicha proteína forma parte del operón involucrado en la síntesis y ensamblaje del pili en *Lactococcus lactis* (integrante de las BALs); la delección del gen que codifica para la expresión de la proteína YhgE trae como consecuencia la pérdida en la bacteria de la capacidad de formar biopelículas, de autoagregarse y de anclarse a superficies por medio del pili (Oxaran *et al.*, 2012; Castelain *et al.*, 2016) actividad que también pueden llevar a cabo algunos miembros de la familia de las PGHs (Vollmer *et al.*, 2008), por lo que no se descarta que dicha proteína tenga esta actividad.

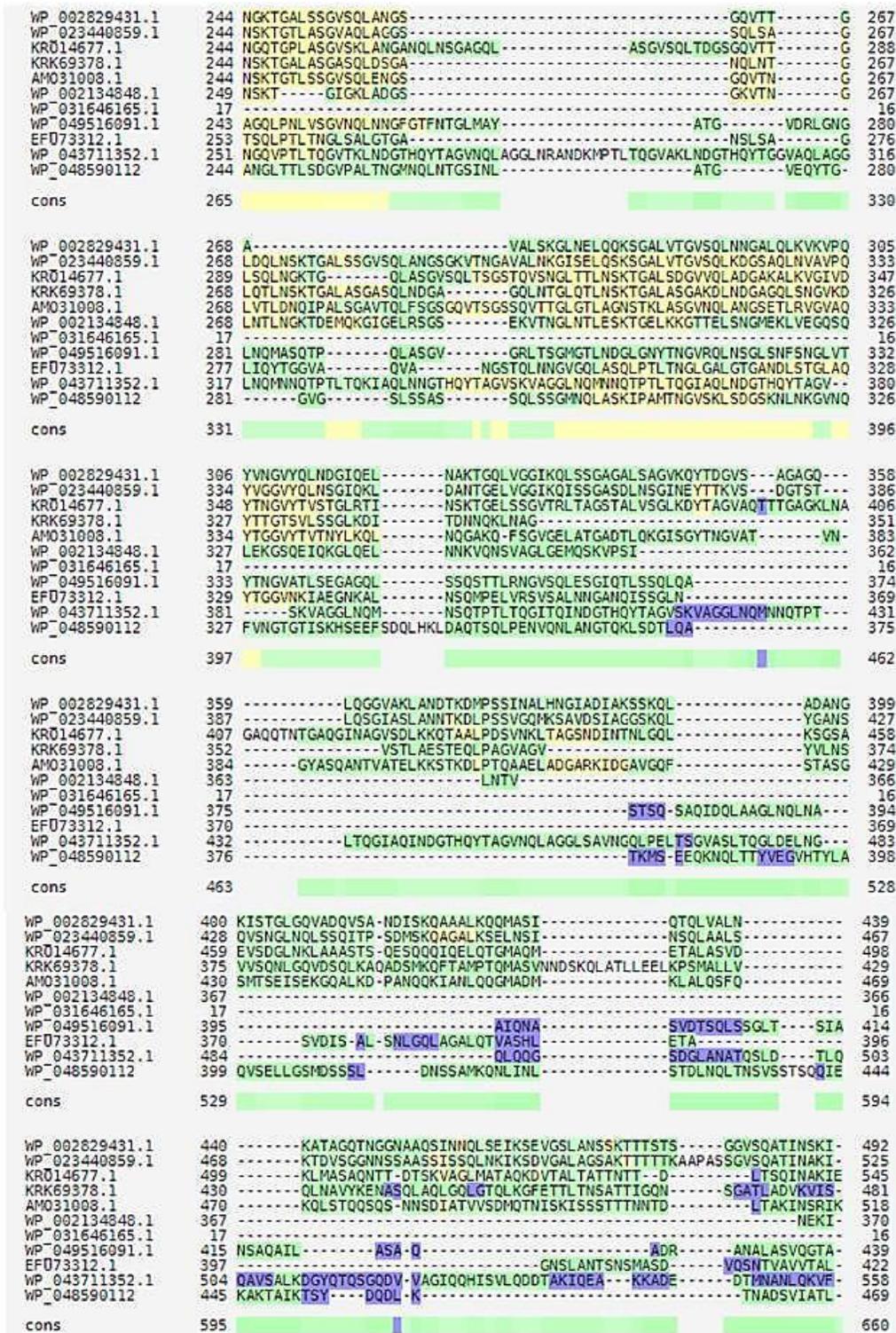
#### DETERMINACIÓN DE LAS REGIONES ALTAMENTE CONSERVADAS EN LA PROTEÍNA DE 110-KDA DE *P. ACIDIDLACTICI*

Los dominios conservados de la proteína de estudio se determinaron alineando ésta con proteína homólogas de distintos géneros y especies usando la herramienta T-COFFE. Las proteínas seleccionadas para esta esta etapa fueron: la proteína que contiene el dominio Yhge/Pip de *P.pentosaceus* de 116-kDa (Secuencia de referencia en NCBI: WP\_023440859.1), la proteína integral de membrana de *Lactobacillus xiangfangensis* de 119-kDa (Secuencia de referencia en NCBI: KRO14677.1), la proteína hipotética de *Lactobacillus sakei* subsp *sakei* DSM 20017 de 112-kDa (Secuencia de referencia en NCBI: KRK69378.1), la proteína de membrana de *Lactobacillus plantarum* de 115-kDa (Secuencia de referencia NCBI: AMO31008.1), la proteína que contiene el dominio Yhge/Pip de *Bacillus cereus* de 92-kDa (Secuencia de referencia en NCBI: WP\_002134848.1), la proteína que contiene el dominio Yhge/Pip de *L. monocytogenes* de 77-kDa (Secuencia de referencia en NCBI: WP\_031646165.1), la proteína que contiene el dominio Yhge/Pip de *S. parasanguinis* de 96-kDa (Secuencia de referencia en NCBI: WP\_049516091.1), la proteína que contiene el dominio Yhge/Pip de *Enterococcus italicus* DSM 15952 de 98-kDa (Secuencia de referencia en NCBI: EFU73312.1), la proteína que contiene el dominio DUF 3533 de *Weisella cibaria*

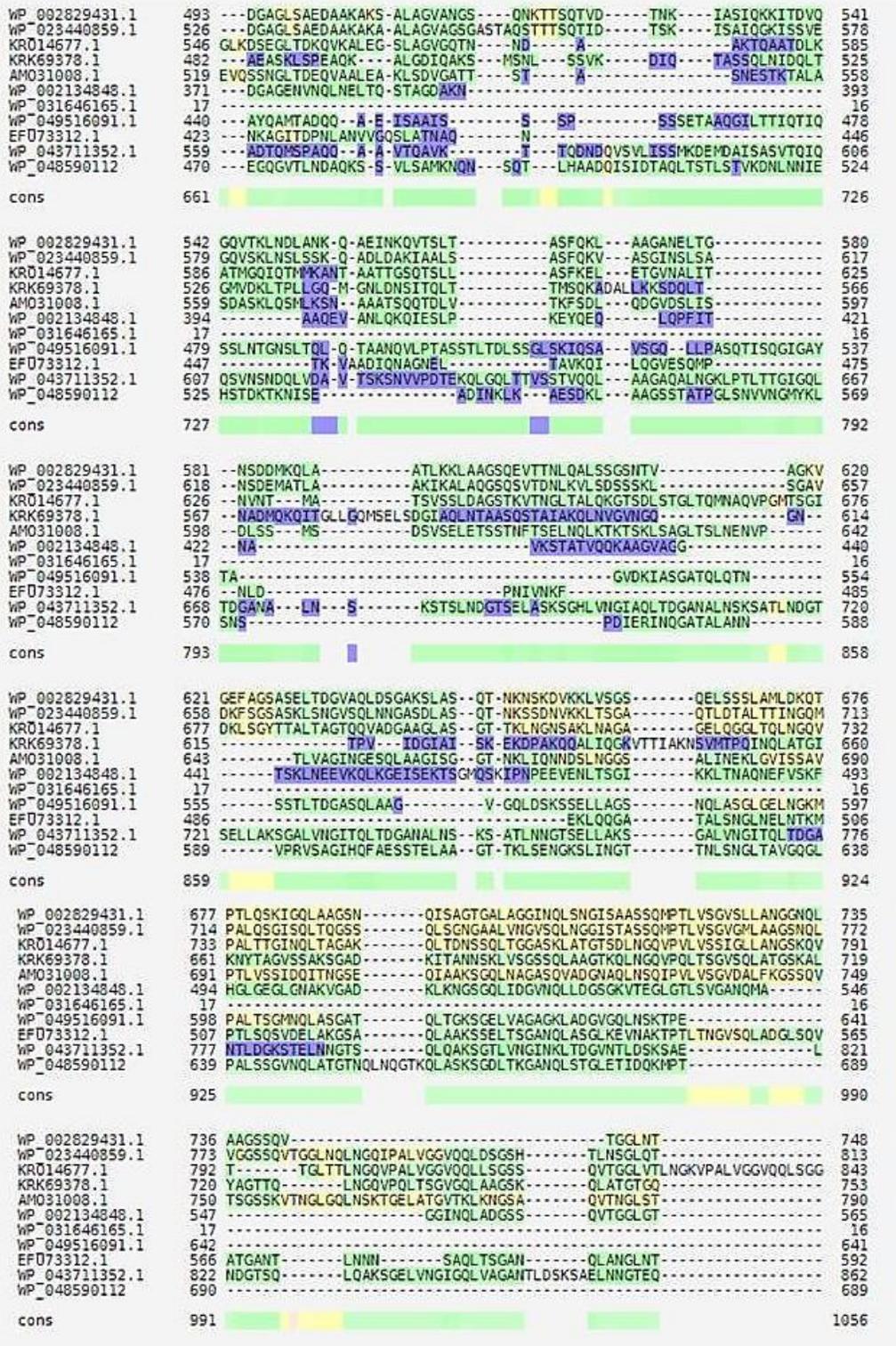
de 122-kDa (Secuencia de referencia en NCBI: WP\_043711352.1) y la proteína que contiene el dominio DUF 3533 de *Melisococcus plutonius* de 105-kDa (Secuencia de referencia en NCBI: WP\_048590112). El criterio para selección de las proteínas a comparar fue comparar las secuencias que eran múltiplos de 100 hasta el 1000 obtenidas durante el alineamiento contra la base de datos NCBI usando el algoritmo BLAST.



**Figura 14.** Alineamiento de secuencias homólogas putativas a la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* (WP\_002829431.1) de *Pediococcus pentosaceus* (WP\_023440859.1), *Lactobacillus xiangfangensis* (KRO14677.1), *Lactobacillus sakei* subsp *sakei* DSM 20017 (KRK69378.1), *Lactobacillus plantarum* (AMO31008.1), *Bacillus cereus* (WP\_002134848.1), *L. monocytogenes* (NCBI: WP\_031646165.1), *S. parasanguinis* (WP\_049516091.1), *Enterococcus italicus* DSM 15952 (EFU73312.1), *Weissella cibaria* de 122-kDa (WP\_043711352.1) y *Melisococcus plutonius* (WP\_048590112). Las regiones rojas son las más conservadas, las amarillas las medianamente conservadas y las verdes son las poco conservadas. Panel A: Residuos 1 a 243



**Figura 15.** Alineamiento de secuencias homólogas putativas a la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* (WP\_002829431.1) de *Pediococcus pentosaceus* (WP\_023440859.1), *Lactobacillus xiangfangensis* (KRO14677.1), *Lactobacillus sakei* subsp *sakei* DSM 20017 (KRK69378.1), *Lactobacillus plantarum* (AMO31008.1), *Bacillus cereus* (WP\_002134848.1), *L. monocytogenes* (NCBI: WP\_031646165.1), *S. parasanguinis* (WP\_049516091.1), *Enterococcus italicus* DSM 15952 (EFU73312.1), *Weisella cibaria* de 122-kDa (WP\_043711352.1) y *Melicoccoccus plutonium* (WP\_048590112). Panel B: Residuos 244 a 492.



**Figura 16.** Alineamiento de secuencias homólogas putativas a la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* (WP\_002829431.1) de *Pediococcus pentosaceus* (WP\_023440859.1), *Lactobacillus xiangfangensis* (KRO14677.1), *Lactobacillus sakei* subsp *sakei* DSM 20017 (KRK69378.1), *Lactobacillus plantarum* (AMO31008.1), *Bacillus cereus* (WP\_002134848.1), *L. monocytogenes* (NCBI: WP\_031646165.1), *S. parasanguinis* (WP\_049516091.1), *Enterococcus italicus* DSM 15952 (EFU73312.1), *Weisella cibaria* de 122-kDa (WP\_043711352.1) y *Melisococcus plutonius* (WP\_048590112). Panel C: Residuos 493 a 748.



**Figura 17.** Alineamiento de secuencias homólogas putativas a la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* (WP\_002829431.1) de *Pediococcus pentosaceus* (WP\_023440859.1), *Lactobacillus xiangfangensis* (KRO14677.1), *Lactobacillus sakei* subsp *sakei* DSM 20017 (KRK69378.1), *Lactobacillus plantarum* (AMO31008.1), *Bacillus cereus* (WP\_002134848.1), *L. monocytogenes* (NCBI: WP\_031646165.1), *S. parasanguinis* (WP\_049516091.1), *Enterococcus italicus* DSM 15952 (EFU73312.1), *Weisella cibaria* de 122-kDa (WP\_043711352.1) y *Melicoccoccus plutonius* (WP\_048590112). Panel D: Residuos 749 a 1065.

En esta etapa se evaluó qué regiones de la proteína de 110-kDa y otras análogas a ellas producidas por distintos Firmicutes (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus xiangfangensis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus parasanguinis*, *Enterococcus italicus*, *Weisella cibaria* y *Melisococcus plutonis*) se encuentran altamente conservadas. Como se muestra en las figuras 14-17, la región declarada como análoga a un aceptor quimiotáctico de metilos es la región más variable en las proteínas homólogas a la de 110-kDa habiendo cambios notables en esta zona incluso en la proteína de *P. pentosaceus*, microorganismo del mismo género que *P. acidilactici* lo que supone un indicio de que la proteína de estudio no pertenece a esta familia

#### PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA.

A pesar del uso de parámetros diversos y de ecuaciones donde les dan distinta ponderancia a cada uno de ellos, los programas Jpred, Porter, SOPMA, SCRATCH Protein 3 CLASS, SCRATCH Protein 8 CLASS, SPIDER 2, PSIPRED, YASPIN generaron predicciones similares para más del 90% de la proteína, mientras que CFSSP y GOR realizaron predicciones similares entre ellos pero diferentes a los demás, probablemente porque en el caso de los señalados primeramente se utilizan valores experimentales medidos a partir de proteínas que ya han sido cristalizadas y analizadas fisicoquímicamente, mientras que para CFSSP y GOR se emplean resultados empíricos producidos a partir de las primeras proteínas que fueron cristalizadas, la gran mayoría de estas de carácter globular, y de la preferencia de los aminoácidos de dicho tipo de proteínas a formar  $\alpha$ -hélices u hojas- $\beta$ , sin embargo, si se considera la fracción de la cual es extraída la proteína de interés es poco probable que se comporte como proteína globular.

El predictor de estructuras secundarias de proteínas de membrana Jufo 9D tampoco fue de utilidad pues pronosticó grandes secciones de espirales al azar y de hojas- $\beta$  en regiones señaladas por el resto de los programas como  $\alpha$ -hélices. Su algoritmo se basa en la evaluación de la probabilidad de encontrar a un

aminoácido en el centro o en la superficie de la proteína o en contacto con la membrana a partir de comparaciones de la secuencia de interés con otras proteínas de membrana previamente cristalizadas. Cabe señalar que de todas las estructuras de proteínas cristalizadas y almacenadas en la base de datos PDB (Protein Data Bank) menos del 1% corresponden a proteínas de membrana. Probablemente con el paso del tiempo y con la alimentación de dicha base de datos con más proteínas de este tipo este programa hará una predicción más eficaz.

#### EVALUACIÓN DE LA POSIBLE PRESENCIA DE PÉPTIDOS SEÑAL

De los programas utilizados solamente uno pronosticó la presencia de un péptido señal en la proteína analizada y tras compararla contra secuencias típicas de bacterias Gram-negativas. Considerando los resultados de todos los predictores se concluyó la ausencia de péptido señal en la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042

#### DETERMINACIÓN DE MOTIVOS TRANSMEMBRANALES (ZIPPERS DE GLICINA, CINTURONES AROMÁTICOS, HÉLICES REENTRANTES Y QUIEBRES DE PROLINA)

Una vez localizados los cruces transmembranales se buscaron dominios típicos de este tipo de estructuras que se señalan a continuación

Zippers de glicina: Con el fin de determinar un posible empaquetamiento entre cruces transmembranales se buscó la presencia de secuencias típicas de zippers de glicina (comunes también en algunos transportadores ABC)

Ninguno de ellos se encontró en las regiones transmembranales, lo que permitió descartar un posible empaquetamiento entre las hélices de esta región y también reducir la probabilidad de que la proteína de 110-kDa sea un transportador ABC.

Cinturones aromáticos: en los dominios transmembranales, la presencia de aminoácidos con anillos aromáticos (triptófanos y tirosinas, principalmente) en los extremos es típica y reciben el nombre de cinturones aromáticos pues delimitan donde inicia y donde termina un cruce transmembranal. En la proteína analizada en este proyecto se encontraron aminoácidos aromáticos en cuatro de los seis cruces transmembranales, cuya ubicación se indica a continuación

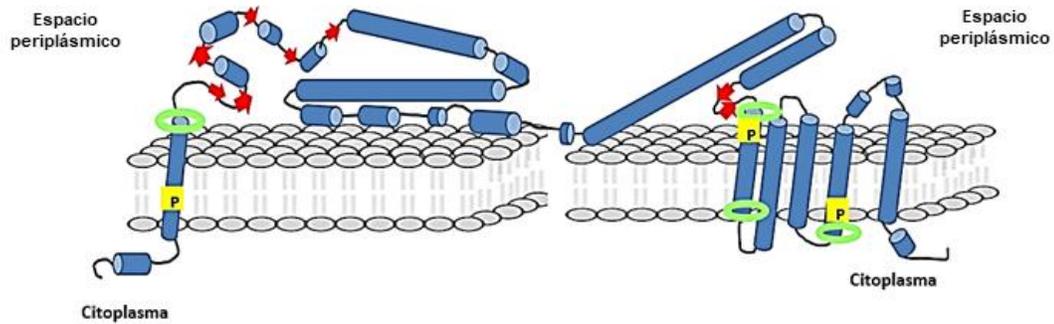
En todas las hélices transmembranales, con excepción de la TM3 se encontró fenilalanina en los extremos, el cual también es un aminoácido aromático y, por lo tanto, podría formar parte de este tipo de estructuras. Los cinturones aromáticos localizados en la proteína estudiada se encuentran altamente conservados, la tirosina en la posición 29 se encuentra en todas las proteínas homólogas a la proteína de 110-kDa señaladas en las figuras 14-17 con excepción de la de *L. monocytogenes*. La tirosina en la posición 884 está en *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *L. xiangfangensis*, *L. plantarum*, *B. cereus* y *E. italicus*, mientras que en el caso de *L. monocytogenes* y *S. parasanguinis* ha sido cambiada por un aminoácido muy similar como es la prolina. La tirosina en la posición 936 se conserva en *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *L. sakei* y *E. italicus*, y en otras especies es cambiado por fenilalanina. Por último el triptófano en el sitio 1037 está presente en las proteínas homólogas de *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *L. xiangfangensis*, *L. sakei*, *L. plantarum*, y *S. parasanguinis*.

Hélices reentrantes: se utilizó el programa MEMSAT3 & MEMSAT-SVM (Membrane Helix Prediction) para predecir la presencia de hélices reentrantes, es decir  $\alpha$ -hélices que no atraviesan la membrana celular, los resultados fueron negativos para todos los cruces transmembranales pronosticados.

Quiebres de prolina:

Todas las prolinas encontradas en cruces transmembranales se encuentran altamente conservadas (Figuras 14 a 17) y son responsables de los quiebres en los mismos. Durante el alineamiento también se observó que la región transmembranal es altamente conservada mientras que la región globular es variable. Por lo tanto, se propone que el sitio catalítico de la proteína de 110-kDa está en la región transmembranal.

Considerando los quiebres de prolina y los cinturones aromáticos, la estructura de la proteína de *P. acidilactici* es la siguiente (Figura 18):



**Figura 18.** Topología de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042  
 — Random coil, ■ α-hélices, ➔ hojas-β, ○ Cinturón aromático P quiebre de prolina

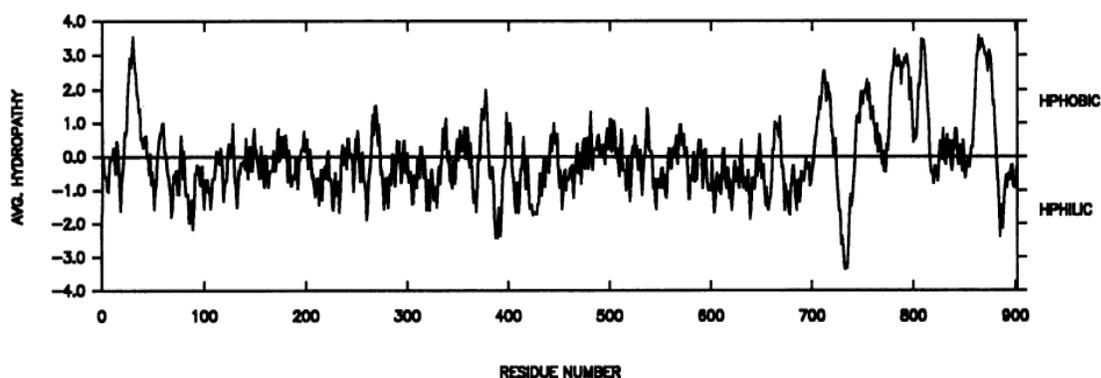
#### MODELADO DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042

Con el fin de determinar la estructura *in silico* de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici*, de la cual no existen homólogos cristalizados se utilizaron los programas descritos en la sección de Metodología; sin embargo, ninguno de ellos arrojó un modelo que cubriera a toda la proteína o que tuviera un porcentaje aceptable de identidad (superior al 60%).

Los resultados del modelado por homología y por enhebrado no aportan información útil acerca de la actividad lítica o antimicrobiana de la proteína de 110-kDa. Las proteínas con mayor similitud estructural en el modelado por homología son de organismos lejanos evolutivamente a *Pediococcus sp.*, como *T. maritima* y *E. coli*. Entre las proteínas que tienen homología, la única con efecto antimicrobiano es la colicina Ia, la cual es una bacteriocina de *E. coli*, sin embargo, el porcentaje de identidad es bajo (10%) y no cubre toda la secuencia de aminoácidos. El problema más grave en este tipo de análisis es la baja cantidad de moldes de proteínas de membrana que se encuentran anotados en las bases de datos y que no permiten hacer una predicción certera de la funcionalidad e identidad de la proteína de interés.

Los resultados obtenidos por modelado por enhebrado tampoco arrojan estructuras similares entre sí, probablemente, porque usan modelos matemáticos diferentes para la creación de una estructura terciaria.

En la literatura (Geller *et al.*, 1993) describen una proteína de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 reportada como proteína putativa requerida para una infección por fagos de 99-kDa muy similar estructuralmente a lo encontrado para la de 110-kDa pues presenta 6 cruces transmembranales, uno al inicio, en los aminoácidos 23-44 y los otros cinco al final de la estructura 703-720, 744-768, 774-799, 800-816 y 857 a 881, un perfil de hidropaticidad (Figura 19) y topología similar a la estudiada por este grupo. Dicha proteína aún no ha sido purificada ni caracterizada aunque, como ya se señaló anteriormente, se sospecha de su relación con la formación del pilus bacteriano (Oxaran *et al.*, 2012; Castelain *et al.*, 2016).

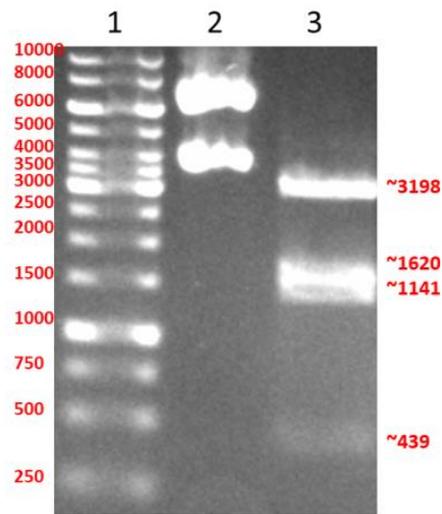


**Figura 19.** Perfil de hidropaticidad de la proteína requerida para infección por fagos YhgE de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2

## 2. CLONACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE 110-KDA

### OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN TOPO 2.1-110

Una vez que se extrajo el ADN de *P. acidilactici* ATCC 8042 y que a partir de éste se amplificó el gen que codifica para la proteína de 110-kDa, se obtuvo la construcción TOPO 2.1-110 en *E. coli* DH5 $\alpha$  siguiendo la metodología descrita por el proveedor del vector usado. Se llevó a cabo una digestión de la misma para corroborar que se había logrado la inserción del gen que codifica para la producción de la proteína de 110-kDa (banda de 3198 pb en la figura 20) y a continuación se muestran los resultados de dicha digestión.

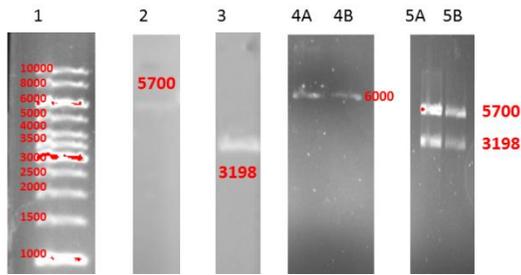


**Figura 20.** Gel de agarosa con la construcción TOPO 2.1-110 completa y digerida. Carril 1: Marcador 1kb (Thermo-Fisher®). Carril 2: TOPO 2.1-110 sin digerir. Carril 3: TOPO 2.1-110 digerido con las enzimas de restricción con Xho1 y Nco1

En la figura 20 se observa en el carril 2 el plásmido TOPO 2.1-110 sin digerir extraído de *E. coli* DH5 $\alpha$ , en dos bandas con diferentes tamaños, ya que probablemente el plásmido se encontraba en la célula hospedera en dos grados diferentes de súper enrollamiento; para corroborar la correcta inserción del plásmido ambas bandas se sometieron a una doble digestión usando las enzimas Xho1 y Nco1 generándose 4 fragmentos, los cuales se habían predicho con el programa Serial Cloner, el de mayor tamaño (3198 pb) corresponde al gen que codifica para la proteína de 110-kDa, mientras que el resto corresponde a la hidrólisis del vector (Carril 3).

#### OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN PET19B-110 EN *E. COLI* DH5 $\alpha$ .

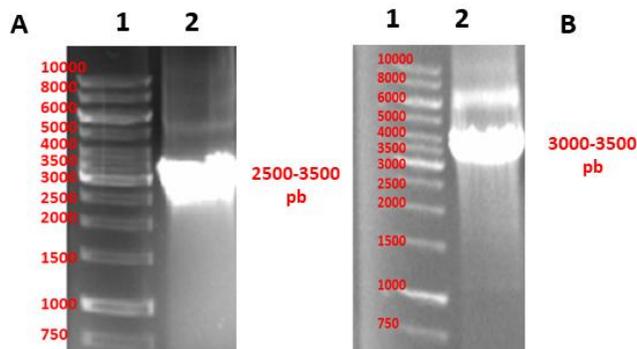
El fragmento de 3198 pb obtenido durante la digestión del vector TOPO2.1-110 que corresponde al gen que codifica para la producción de la proteína de 110-kDa se ligó al vector pET19 digerido previamente con las enzimas de restricción Xho1 y Nco1, purificado y desfosforilado. La ligación con resultados positivos fue aquella que se llevó a cabo a 22°C por tres horas con una relación 3:1 (inserto: vector); el producto de la misma se introdujo en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes con una transformación por choque térmico (Figura 21).



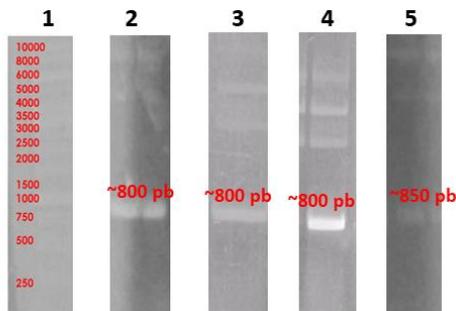
**Figura 21** Construcción pET19-110. Carril 1: Marcador 1kb (Thermo-Fisher®). Carril 2: pET19 digerido por NcoI y XhoI. Carril 3: gen que codifica para la proteína de 110-kDa digerido por NcoI y XhoI. Carriles 4A y 4B: construcción pET19-110 sin digerir extraídos de las colonias positivas. Carril 5A y 5B, construcción pET 19-110 digerida con XhoI y NcoI de las colonias positivas.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE INTERÉS POR PCR A PARTIR DEL PLÁSMIDO PET19-110 Y SECUENCIACIÓN.

Para corroborar la correcta inserción del gen de interés y la ausencia de cambios en el marco de lectura o de codones de paro en el plásmido pET19, se llevó a cabo la amplificación del mismo por PCR utilizando los cebadores indicados en la Tabla 10 y los universales T7 (Figura 22), así como los iniciadores intragénicos señalados en la Tabla 13 que amplifican las cuatro regiones del gen señaladas en la Figura 12 (Figura 23).



**Figura 22. A)** Producto de amplificación con los cebadores específicos para la proteína de 110-kDa. **B)** Producto de amplificación con los cebadores T7. Carril 1: Marcador 1kb (Thermo-Fisher®). Carril 2: Producto de la amplificación  $T_{\text{alin}}=50^{\circ}\text{C}$



**Figura 23** Productos de amplificación de las regiones intragénicas obtenidos usando los juegos de primers de la Figura 13. Carril 1: Marcador 1kb (Thermo-Fisher®). Carril 2: Producto de ExNco-110 y R1-110, Carril 3: Producto de F2-110 y R2-110, Carril 4: Producto de F3-110 y R3-110 y Carril 5: Producto de F4-110 y E110RXho

Inicio

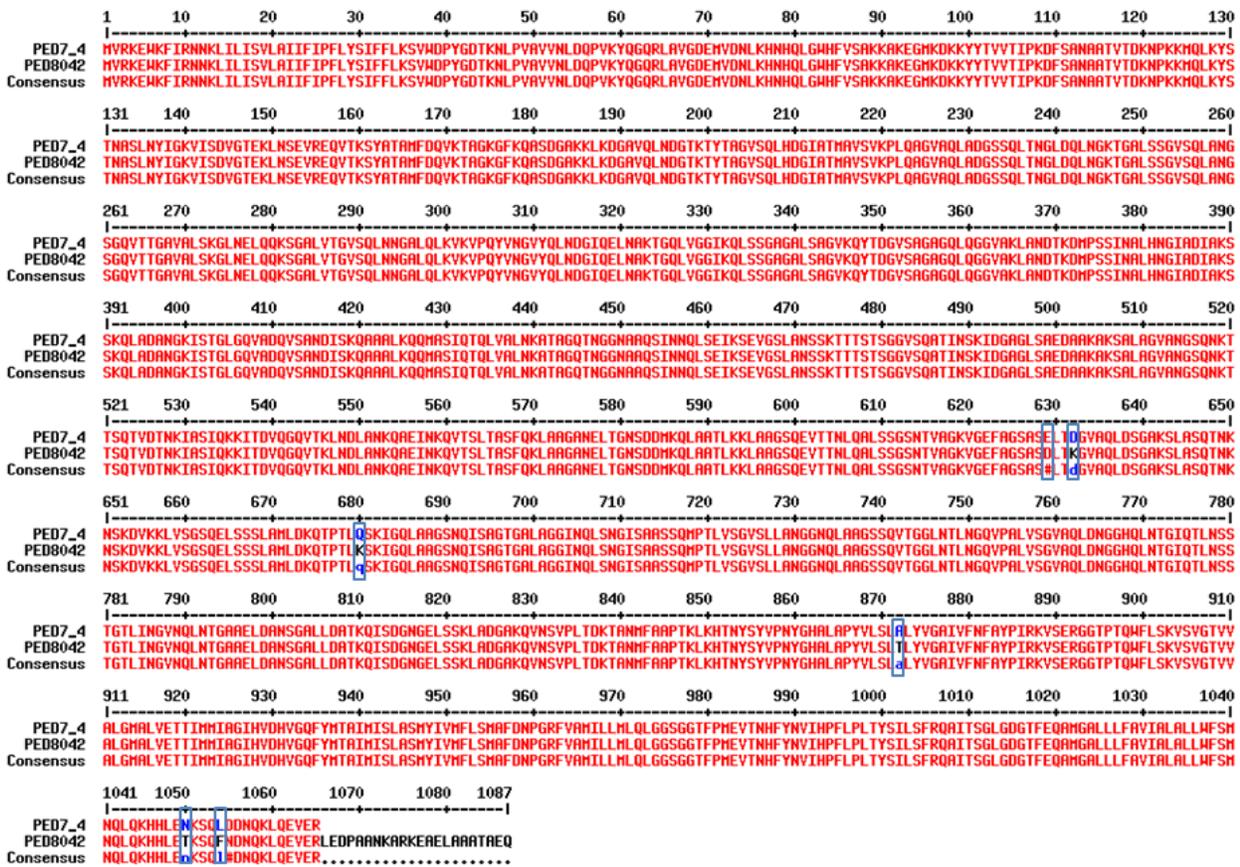
```

GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAATATG 3
ATTTCGCAAGAGAGTGGAAATTTATTAGAAATAAAGTTAATTTTAACTCTCCGTGCTGGCAATTTATTTTCATTC 76
CTTTCCTATATAGTATTTTCTTCTTGAATTCGGTATGGGATCCATATGGGGATACGAAAAATTTACCAGTCCG 149
AGTCGTTAACTTAGATCAACCCGTTAAGTACCAAGGCCACGACTTGCGGTGCGTGATGAATGGTCGATAAC 222
TTAAAGCATAACCATCAGTTGGGATGGCATTGTATCCGGCTAAAAAGGCTAAAGAAGGAATGAAGGATAAAA 295
AGTACTACACGGTAGTTACGATCCCAAAGGACTTCTCAGCTAACGCCGCAACGGTTACGGATAAAAAATCCTAA 368
GAAGATGCAGTTGAAGTATTCAACGAACGCTTCGTTGAACTATATTGGTAAAGTTATCAGTGACGTGGGTACT 441
GAAAAGCTTAATTCGGAAGTTCGGGAACAAGTTACGAAGTCTATGCTACGGCAATGTTTGACCAAGTTAAGA 514
CTGCCGGAAGGTTTCAAGCAAGCTTCTGACGGAGCTAAGAACTTAAGGATGGTGGGTTCAATTAATGA 587
CGGTACCAAGACTTACACGGCAGGAGTTTCTCACTACACGACGGGATTGCTACATGGCCGTTTCAGTTAAA 660
CCATTGCAAGCGGGCGTTGCTCAATTAGCAGATGGTTCTAGCCAATTGACCAATGGTTTAGATCAATTGAACG 733
GAAAAGCTGGGGCATTGTCTTCAGGAGTTTCCCAATTGGCAAAATGGTCTGGTCAAGTAACCACCGGTGCGGT 806
TGCCTTGAGTAAGGATTAAGCAGTTGCAACAAAAGAGCGGTGCGCTCGTTACCAGGAGTTTCACTAAAC 879
AACGGTGCCTTACAGTTGAAGGTTAAGGTTCCCAATACGTTAACGGTGTTTACCACTTAACGATGGTATAC 952
AAGAACTTAACGCAAAAAGCTGGTCAATTAGTTGGCGGCTCAAGCAATTGTCAAGTGGTGGCGGTGCTTAAAG 1025
TGCTGGAGTTAAGCATAACAGACGGTGTATCCGGTGTGTCAGGCCAATTAAGGTTGGCGTAGCTAAATTA 1098
GCTAACGACACTAAGGATATGCCAAGTAGTATCAATGCTTGCACAAAGGAAATGCAGACATTGCGAAGAGCT 1171
CAAAACAATTAGCAGATGCAAAACGGCAAGATTTCAACCGGCCTTGGCCAGGTTGCTGATCAAGTAAGTCAAAA 1244
CGATATTAGTAAGCAAGCGGCTGCTTTGAAGCAACAATGGCTTCTATTCAAACACAATTAGTTGCGTTGAAT 1317
AAGGCAACTGCTGGACAAACAATGGTGGCAATGCCGCACAATCCATCAATAATCAACTTTCAGAGATTAAGT 1390
CTGAAGTAGGAAGCTTGGCAAACTCAAGTAAACTACGACAAGCACTAGCGGTGGCGTTTCTCAAGCAACCAT 1463
TAATTTCAAATTTGACGGTGCAGGATTAAGTGCAGAAGATGCAGCTAAAGCGAAGAGTGCCTTAGCTGGCGTT 1536
GCTAACGGTAGCCAAAATAAGACTACTTCCGAACTGTAGATACAAAATAAGATTGCATCAATTCAAAAGAAGA 1609
TTACTGACGTTCAAGGTCAAGTAACGAAGTTGAATGATTAGCTAACAAACAAGCTGAAATCAATAAGCAAGT 1682
GACGTCGTTAACAGCTTCCTTCCAGAAGTTGGCAGCGGCGCAATGAATTAAGTGGCAACAGTGACGACATG 1755
AAGCAGTTGGCAGCAACTTTGAAAAAATTAGCTGCTGGTTCCACAAGAGTCACTAACTTACAGCTCTTT 1828
CATCTGGTTCAACACCGGTAGCTGGTAAAGTCCGCGAATTTGCCGGTTCAGCTTCTGATTGACTAAGGAGT 1901
TGCTCAATTAGACAGTGGTGTCAAGAGCTTGCAGCAACTCAACAAGAAATTCGAAGGACGTTAAGAAAGTTA 1974
GTTAGCGGTTCTCAAGAATTGAGCTCAAGCTTGGCAATGCTAGACAAAGCAACTCCAACTCTTAAATCCAAGA 2047
TTGGTCAGTTAGCTGCTGGTAGCAACCAAACTCAGTGTGGTACGGGTGCTTTAGCTGGTGGAAATTAACCAATT 2120
AAGCAACGGTATTAGCGCCGCAAGTTCAAAAATGCCAACCTTAGTAAGCGGCGTTAGCCTACTTGCTAACGGT 2193
GGTAATCAATTGGCAGCCGGTCTTCTCAAGTTACTGGCGGGTTGAACACCTTGAATGGTCAAGTACCAGCGT 2266
TAGTTTCTGGCGTTGCGCAACTTGATAATGGTGGTCCACCAATTGAACACTGGCATCCAACTCTTAACAGCAG 2339
TACTGGAACTTAATCAACGGCGTTAACCAAGTTGAATACTGGAGCTGCTGAATTAGACGCTAACTCAGGTGCC 2412
TTGTTAGACGCTACTAAGCAAAATAGCGACGGCAATGGCGAATTATCAAGTAAGTTAGCTGACGGTGCAAAAC 2485
AAGTTAACAGCGTGCCGCTTACCACAAGACGGCTAACATGTTTGGCCACCAACTAAATGAAACACACTAA 2558
TTACAGTTACGTACCAAACTACGGACATGCGTTAGCACCATAACGTGCTTTCACTAACACTTTACGTTGGAGCA 2631
ATCGTCTTTAACTTTGCTTACCCAAATTCGGAAGGTTTCCGAACGGGTTGGTACTCCAACCTCAATGGTCTTGA 2704
GTAAGGTTTCCGTTGGTACGGTAGTAGCTCTAGGAATGGCGTTGGTTGAAACCACAATCATGATGATTGCTGG 2777
TATTCACGTAGATCAGTTGGTCAATTCTACATGACCGCGATTATGATCTCGTTAGCGTCCGATGTACATCGTC 2850
ATGTTCTTGTGATGGCTTCGACAAACCCAGGACGGTTGTAGCGATGATTCTCCTGATGCTTCAATTAGGTG 2923
GATCAGGTGGTACCTTCCCAATGGAAGTAACCACTTCTACAACGTAATTCATCCGTTCTTGGCATTGAC 2996
TTACTCAATCCATCGTTCCGTCAGGCAATTACGTTCTGGTCTCGGTGACGGTACCTTTGAACAAGCAATGGGC 3069
GCGTTGCTCTTGTTCAGTGATTGCTTTGGCATTGCTATGGTTTCAATGCAAAAGCATCATT 3142
TGAAAACCAAGTCCGCAATTTAATGATAACCAAAAGCTTCAAGAAGTTGAAGAATCCAGGATCCGGCTGCTAA
CAAGCCCGAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATTAGCATACCCCTTGGGGCC

```

Paro

**Figura 24.** Resultados de la secuenciación de los productos de amplificación obtenidos con los cebadores T7, los específicos para el gen que codifica para la expresión de la proteína de 110-kDa y para las regiones intragénicas del mismo. Los codones de inicio y paro se indican enmarcados en naranja y las flechas en azul son los sitios donde se realizó la digestión con las enzimas NcoI (nucleótidos reconocidos por la enzima en rosa) y XhoI (nucleótidos reconocidos por la enzima en verde). Los nucleótidos que difieren de la secuencia de *P. acidilactici* 7\_4 están subrayados en rojo, los tripletes de nucleótidos que cambian pero codifican para un mismo aminoácido se señalan en azul y los que codifican para uno diferente en amarillo.



**Figura 25.** Residuos variables en la secuencia de aminoácidos predicha a partir de la secuencia del gen que codifica para la expresión proteína recombinante de *P. acidilactici* ATCC 8042 (señalado como PED8042) respecto a la secuencia de *P. acidilactici* 7\_4 (señalado como PED7\_4).

A partir de los resultados obtenidos en esta etapa se corroboró que el gen que codifica para la proteína de 110-kDa estuviera en un marco de lectura correcto. Al comparar la secuencia de dicha proteína de *P. acidilactici* 7\_4 (secuencia molde utilizada para el diseño de los cebadores) con la obtenida de la traducción de los resultados de la secuenciación del gen en *P. acidilactici* ATCC 8042 se observa que el 99.5% de los aminoácidos se conservan en ambas secuencias y que aquellos que cambian se encuentran en las regiones poco conservadas de la proteína, cabe destacar que la variación que existe entre las cepas se ha hecho por aminoácidos estructuralmente similares como un ácido glutámico por un aspártico en la posición 629 o una lisina por una glutamina en las posiciones 632 y 680.

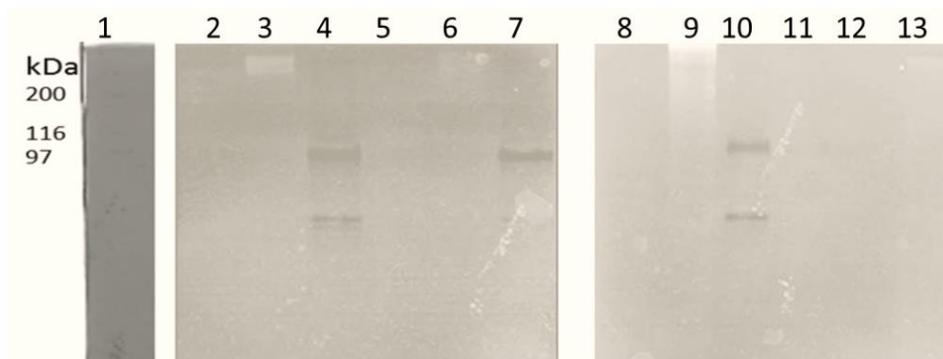
### 3. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE 110-KDA

Para evaluar las condiciones óptimas de inducción de la proteína recombinante de 110-kDa, se probaron diferentes concentraciones de inductor y tiempos de inducción manteniendo constantes la velocidad de agitación (250 rpm) y la temperatura de incubación (37°C) (Tabla 18).

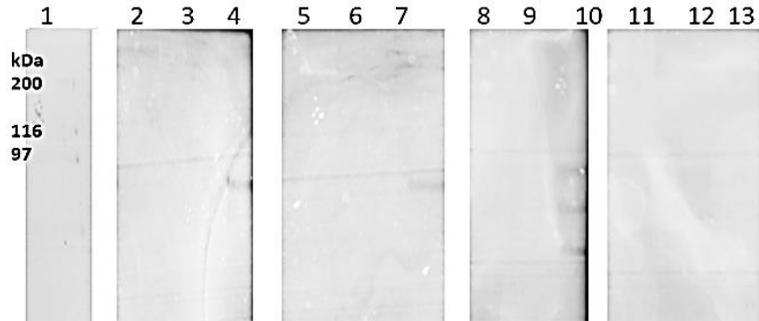
**Tabla 18.** Condiciones de inducción probadas

IPTG [mM]	Tiempo de inducción (horas)			
0.1	4	8	12	16
0.4	4	8	12	16
1.0	4	8	12	16

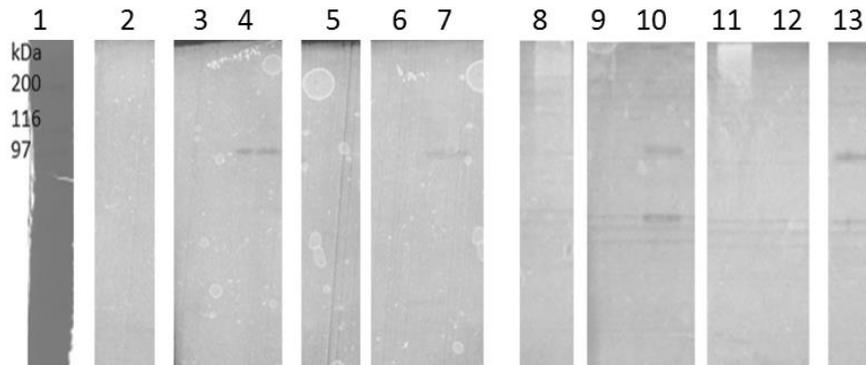
De cada una de las condiciones se extrajeron tres fracciones, sobrenadante y citosol (ultrafiltrados con membrana de corte de 10 kDa) y restos celulares de acuerdo a lo indicado en la sección de Metodología. De cada una de las fracciones se cargó la misma cantidad de proteína (medido con la técnica de Bradford (Bradford, 1976) en un zimograma de *M. lysodeikticus*. A continuación se muestran los resultados de cada condición y fracción.



**Figura 26.** Zimograma de *M. lysodeikticus* de las fracciones obtenidas con **0.1 mM de IPTG** con diferentes condiciones de fermentación. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: sobrenadante de 4 h de inducción. Carril 3: citosol de 4 h de inducción. Carril 4: restos celulares de 4 h de inducción. Carril 5: sobrenadante de 8 h de inducción. Carril 6: citosol de 8 h de inducción. Carril 7: restos celulares 8 h de inducción. Carril 8: sobrenadante de 12 h de inducción. Carril 9: citosol de 12 h de inducción. Carril 10: restos celulares de 12 h de inducción. Carril 11: sobrenadante de 16 h de inducción. Carril 12: citosol de 16h de inducción. Carril 13, restos celulares de 16 h de inducción.



**Figura 27.** Zimograma de *M. lysodeikticus* de las fracciones obtenidas con **0.4 mM de IPTG** con diferentes condiciones de fermentación. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: sobrenadante de 4 h de inducción. Carril 3: citosol de 4 h de inducción. Carril 4: restos celulares de 4 h de inducción. Carril 5: sobrenadante de 8 h de inducción. Carril 6: citosol de 8 h de inducción. Carril 7: restos celulares 8 h de inducción. Carril 8: sobrenadante de 12 h de inducción. Carril 9: citosol de 12 h de inducción. Carril 10: restos celulares de 12 h de inducción. Carril 11: sobrenadante de 16 h de inducción. Carril 12: citosol de 16h de inducción. Carril 13, restos celulares de 16 h de inducción.



**Figura 28.** Zimograma de *M. lysodeikticus* de las fracciones obtenidas con **1 mM de IPTG** con diferentes condiciones de fermentación. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: sobrenadante de 4 h de inducción. Carril 3: citosol de 4 h de inducción. Carril 4: restos celulares de 4 h de inducción. Carril 5: sobrenadante de 8 h de inducción. Carril 6: citosol de 8 h de inducción. Carril 7: restos celulares 8 h de inducción. Carril 8: sobrenadante de 12 h de inducción. Carril 9: citosol de 12 h de inducción. Carril 10: restos celulares de 12 h de inducción. Carril 11: sobrenadante de 16 h de inducción. Carril 12: citosol de 16h de inducción. Carril 13, restos celulares de 16 h de inducción.

En los zimogramas de las Figuras 26, 27 y 28 se muestra que en todas las condiciones de inducción probadas en esta etapa, la única fracción celular donde se observa actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus* es la correspondiente a los restos celulares (carriles 4, 7, 10 y 13 de los geles presentados), resultado esperado pues el vector de expresión utilizado carece de un péptido señal que direcciona la proteína recombinante al exterior de la célula y permita recuperarla del sobrenadante.

La degradación de la proteína recombinante en dos o hasta tres bandas (para la inducción de 12 horas con 0.4 mM de IPTG), una alrededor del peso esperado y la otra, entre los 45-60 kDa se trata de un problema que se presenta comúnmente en la expresión de proteínas recombinantes de membrana ya sea por autodegradación debido a la baja estabilidad de las mismas al ser expresadas en medio acuoso o por proteasas del hospedero, pues a pesar de que *E. coli* BL21 (DE3) se señala por parte del fabricante como deficiente en proteasas tiene más de 40 enzimas de este tipo en su genoma.

La presencia de la proteína con baja actividad y en los restos celulares fue un indicativo de la existencia de cuerpos de inclusión, lo que posteriormente se corroboró por Microscopía Electrónica de Transmisión, como se describe más adelante.

#### ESPECTRO DE INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE 110-kDa DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042 EXPRESADA EN *E. COLI* BL21 (DE3)

Con el fin de determinar si el comportamiento lítico observado en cada una de las condiciones de inducción anteriormente señaladas se repetía en pruebas de difusión en agar, se realizaron ensayos de esta técnica contra *S. aureus* (Tabla 19) y *M. lysodeikticus* (Tabla 20). Sólo se muestran las cajas de Petri con los resultados para las fracciones con 4 y 8 horas de inducción, que fueron las más representativas.

**Tabla 19.** Actividad inhibitoria de los extractos crudos de la cepa *E. coli* BL21 pET19-110 vs *S. aureus* de las pruebas de difusión en agar.

Sobrenadante (0.1 mM de IPTG)		Citosol (0.1 mM de IPTG)		Restos celulares (0.1 mM de IPTG)	
Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína
4	0±0	4	0±0	4	84.78±12.26
8	0±0	8	0±0	8	264.71±28.8
12	0±0	12	82.05±14.5	12	98.66±1.35
16	0±0	16	0±0	16	0±0

Sobrenadante (0.4 mM de IPTG)		Citosol (0.4 mM de IPTG)		Restos celulares (0.4 mM de IPTG)	
Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína
4	0±0	4	0±0	4	109.17±0
8	0±0	8	0±0	8	0±0
12	0±0	12	0±0	12	0±0
16	0±0	16	400.45±64.3	16	0±0

Sobrenadante (1 mM de IPTG)		Citosol (1 mM de IPTG)		Restos celulares (1 mM de IPTG)	
Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína
4	0±0	4	0±0	4	56.32±3.1
8	0±0	8	0±0	8	198.25±0
12	0±0	12	0±0	12	0±0
16	0±0	16	0±0	16	0±0

**Tabla 20.** Actividad inhibitoria de los extractos crudos de la cepa *E. coli* BL21 pET19-110 vs *M. lysodeikticus* de las pruebas de difusión en agar.

Sobrenadante (0.1 mM de IPTG)		Citosol (0.1 mM de IPTG)		Restos celulares (0.1 mM de IPTG)	
Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína
4	0±0	4	0±0	4	0±0
8	0±0	8	0±0	8	0±0
12	0±0	12	0±0	12	0±0
16	0±0	16	0±0	16	0±0

Sobrenadante (0.4 mM de IPTG)		Citosol (0.4 mM de IPTG)		Restos celulares (0.4 mM de IPTG)	
Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína
4	0±0	4	0±0	4	0
8	0±0	8	0±0	8	94.65±5.8
12	0±0	12	0±0	12	130.43±12.3
16	0±0	16	0±0	16	389.83±47.3

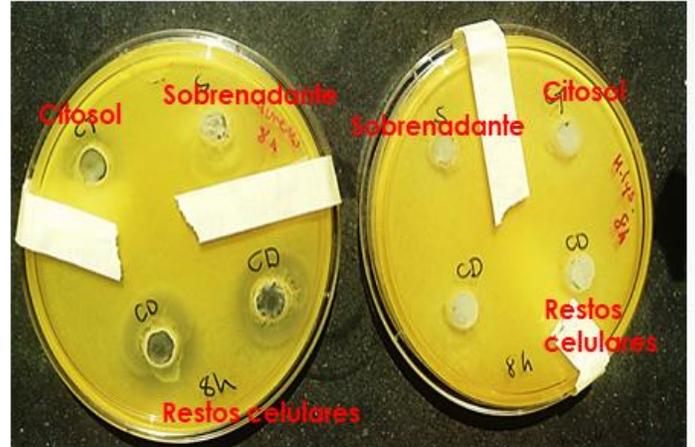
  

Sobrenadante (1 mM de IPTG)		Citosol (1 mM de IPTG)		Restos celulares (1 mM de IPTG)	
Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína	Tiempo de inducción (h)	mm/mg proteína
4	0±0	4	0±0	4	0±0
8	0±0	8	0±0	8	0±0
12	0±0	12	0±0	12	0±0
16	0±0	16	0±0	16	0±0

#### 4 horas de inducción



#### 8 horas de inducción



**Figura 29.** Pruebas de difusión en agar para las fracciones obtenidas con 4 y 8 horas de inducción con 0.1 mM de inductor. Caja izquierda, *S. aureus* y caja derecha, *M. lysodeikticus*

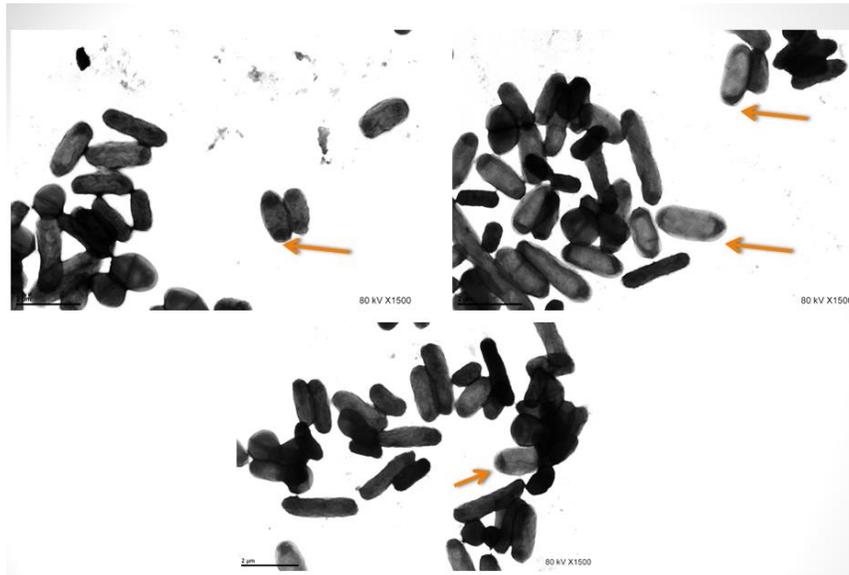
Los resultados mostrados en las Tablas 19 y 20, y en la figura 29, corroboran la ausencia de actividad antimicrobiana en las fracciones extracelulares (sobrenadante) contra los microorganismos evaluados. El citosol no presentó actividad contra *M. lysodeikticus* y sólo en dos condiciones contra *S. aureus* (12 h y 0.1 mM de IPTG, y 16 h y 0.4 mM de IPTG), seis de nueve fracciones de restos celulares tuvieron actividad contra *S. aureus* y tres contra *M. lysodeikticus* y ninguna de las muestras tuvo actividad contra los dos microorganismos. La explicación de este efecto, posiblemente sea que se necesite una mayor cantidad de proteína para la inhibición de *M. lysodeikticus* en comparación con *S. aureus*, que exista un antimicrobiano generado por la cepa hospedera que logre inhibir a alguno de los microorganismos evaluados o que alguno de los productos de degradación de la proteína recombinante tenga una mayor especificidad por la pared celular bacteriana de las cepas probadas. La actividad antimicrobiana se consideró para ambos microorganismos bacteriostática, pues se observa poca turbidez cerca del pozo, pero no ausencia completa del crecimiento (Jaramillo-Giraldo *et al.*, 2010)

Los resultados de la zimografía y difusión en agar fueron parecidos (los restos celulares tuvieron mayor actividad) e indican que la proteína a pesar de estar degradándose mantiene actividad antimicrobiana no sólo contra *M. lysodeikticus*

sino también contra uno de los patógenos Gram-positivos más importantes como es *S. aureus*.

#### DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La presencia de cuerpos de inclusión en las células de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector de expresión para la producción de la proteína recombinante de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 se corroboró por Microscopía Electrónica de Transmisión (realizada en la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM). Las células se tiñeron negativamente con acetato de uranilo y los agregados proteicos pueden visualizarse en las regiones apicales de las células más oscuros o electrodensos (Figura 30).



**Figura 30.** Confirmación de la existencia de cuerpos de inclusión en las células de *E. coli* BL21 (DE3) con la construcción pET19-110 (Unidad de Imagenología del IFC, UNAM).

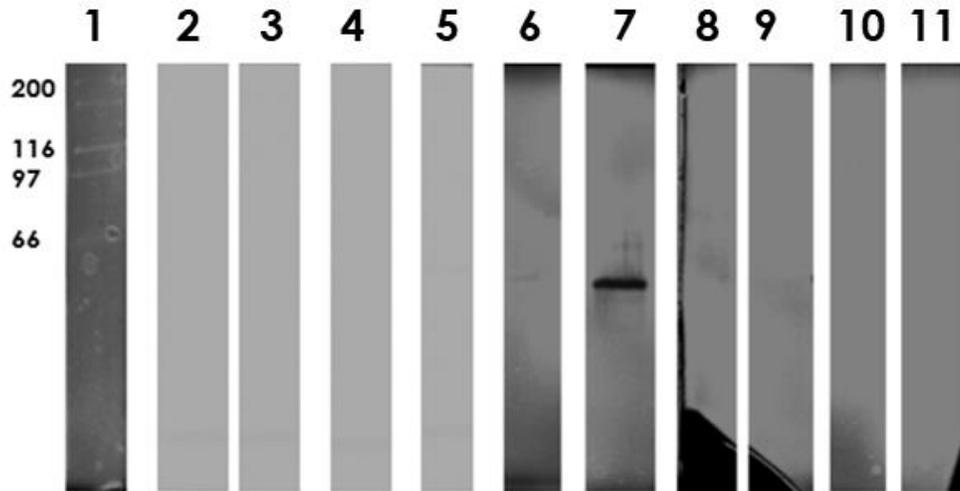
Debido a la hidrólisis de la proteína de 110-kDa durante su expresión a 37°C que no fue posible remediar con la adición de inhibidores de proteasas como Complete<sup>TM</sup> y EDTA 10 mM durante la fermentación y la disminución de la D.O. en las inducciones de 8, 12 y 16 h (datos no mostrados) que posiblemente se deba a la muerte del microorganismo hospedero por la toxicidad de la proteína, se decidió evaluar condiciones de inducción en frío, las cuales se refieren en la literatura como una opción para disminuir la hidrólisis de proteínas recombinantes

y aumentar la cantidad de éstas correctamente plegadas aun cuando sean tóxicas para la cepa productora

#### EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE INDUCCIÓN EN FRÍO

Para la extracción de cuerpos de inclusión la mayoría de los autores recomiendan el uso de agentes caotrópicos como la urea y el hidrocloreuro de guanidinio (Tsumoto *et al.*,2003; Palmer y Wingfield, 2004; Smith, 2011; Singh *et al.*, 2015) con el fin de obtener a la proteína recombinante soluble pero desnaturalizada; la renaturalización de la misma se puede llevar a cabo en con alrededor de treinta agentes entre los que se incluyen azúcares, detergentes, aminoácidos y sales; sin embargo, debido a la complejidad de recuperar un proteína activa (en la mayoría de la enzimas recuperadas de cuerpos de inclusión sólo se recupera un 8-10% de la actividad específica inicial) y que además en el caso de la de 110-kDa ya está sufriendo lisis desde su expresión se decidió optar por condiciones suaves de inducción que mejoraran el plegamiento y la solubilidad de la misma *in vivo*.

Se evaluaron distintas condiciones de inducción en frío (4°C) con el fin de incrementar la cantidad de proteína recombinante soluble y correctamente plegada. Se mantuvieron constantes la velocidad de agitación (250 rpm), la cantidad de IPTG en el medio (0.1 mM), el tiempo de inducción (16 horas) y se modificó la cantidad de glicerol adicionado al medio (0, 1 y 2%). Para evaluar si la solubilidad y la cantidad de la proteína recombinante con actividad lítica había incrementado en la fracción intracelular (puesto que, como se indicó anteriormente, el vector usado no tiene un péptido señal que oriente a la proteína al sobrenadante) se determinó la actividad la actividad lítica de los mismos contra *M. lysodeikticus* por zimograma. Los resultados se presentan en la figura 31



**Figura 31** Actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus* y (B) perfil proteico de la proteína recombinante de *P. acidilactici* ATCC 8042. Carril 1: Marcador de Peso Molecular. Carril 2: Citosol de LB s/glicerol. Carril 3: Restos celulares de LB s/glicerol. Carril 4: Citosol de LB+ 1% glicerol. Carril 5: Restos celulares de LB+1% glicerol. Carril 6: Citosol LB+ 2% de glicerol. Carril 7: Restos celulares LB+2% glicerol. Carril 8: Citosol de *E. coli* BL21 en LB 2% glicerol. Carril 9: Restos celulares de *E. coli* BL21 en LB 2% glicerol. Carril 10: Citosol de *E. coli* BL21 pET19 (vector vacío) en LB 2% glicerol. Carril 11: Restos celulares de *E. coli* BL21 pET19 (vector vacío) en LB 2% glicerol.

Como se observa en la figura 31, la inducción en frío por sí sola y la adición de glicerol al 1% tienen bajo impacto en el aumento de la actividad de la proteína recombinante y en la solubilización de la misma. En el zimograma contra *M. lysodeikticus* es apenas perceptible actividad en las bandas provenientes de las fracciones citosólicas y de los restos celulares. Esto se puede deber a que todavía hay presencia de cuerpos de inclusión, en los que la proteína está mayoritariamente mal plegada y, por lo tanto, inactiva. Al enriquecer el medio de inducción con 2% de glicerol, la solubilización de la proteína recombinante es notable, aunque aún baja (carril 7), mientras que la actividad en los restos celulares incrementa drásticamente, probablemente porque todavía hay cuerpos de inclusión, pero la proteína logró plegarse correctamente dentro de los mismos gracias a la ayuda del coadyuvante (glicerol) y se encuentra activa.

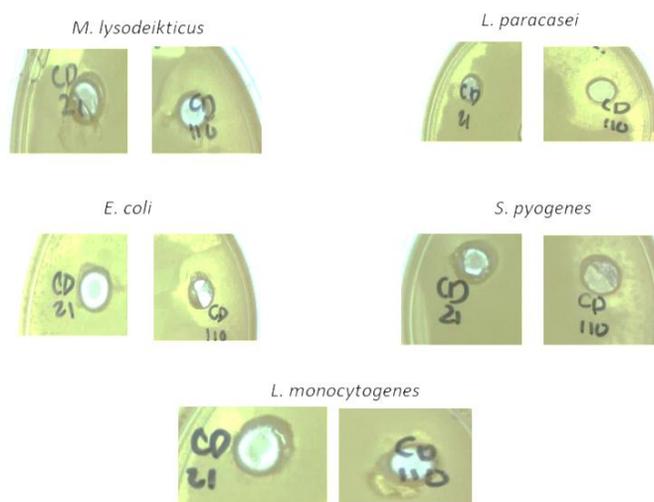
Para corroborar que la proteína con actividad lítica en las inducciones en frío no era nativa del hospedero se realizaron controles negativos para cada condición, también se evaluó si era conveniente continuar el resto de los experimentos con la proteína recombinante de la fracción citosólica o de los restos celulares de la

inducción con glicerol al 2% midiendo la actividad de estas fracciones y de sus controles negativos en difusión en agar contra 11 distintos microorganismos (Tabla 21 y Figura 32).

**Tabla 21.** Espectro de inhibición del citosol y los restos celulares de *E. coli* BL21 pET19-110 (en los casos donde el hospedero tuvo actividad lítica, ésta se restó).

Microorganismo	Citosol <i>E. coli</i> BL21 pET19-110 (mm de halo/mg proteína)	Restos celulares <i>E. coli</i> BL21 pET19-110 (mm de halo/mg proteína)
<i>B. cereus</i>	0.0	0.0
<i>S. aureus</i>	0.0	0.0
<i>P. aeuroginosa</i>	0.0	12.73
<i>E. faecalis</i>	0.0	0.0
<i>L. monocytogenes</i>	0.0	15.92
<i>E. coli</i>	0.0	85.98
<i>M. lysodeikticus</i> *	0.0	2.68
<i>L. paracasei</i>	0.0	82.74
<i>P. acidilactici</i>	0.0	0.0
<i>S. pyogenes</i>	0.0	12.73
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	0.0	0.0

\*Microorganismo sensible al extracto del hospedero  
En todos los casos la actividad observada fue bacteriostática



**Figura 32.** Difusión en agar del extracto de restos celulares de *E. coli* BL21 (CD 21) (control negativo) vs *E. coli* BL21 pET19-110 (CD110)

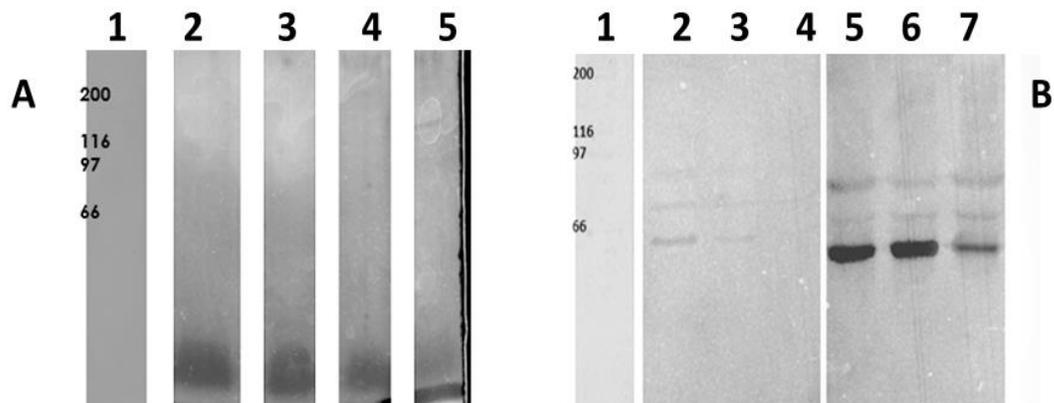
La fracción citosólica obtenida mediante inducción en frío con glicerol al 2% de la cepa *E. coli* BL21 pET19-110, a pesar de presentar actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus* carece de actividad antimicrobiana contra los

microorganismos probados en la prueba de difusión en agar. Esto puede deberse a que dicha técnica es menos sensible y se requiere una mayor cantidad del agente antimicrobiano a probar para observar halos de inhibición. Los restos celulares de estas mismas condiciones de producción no sólo tuvieron actividad contra *M. lysodeikticus* en zimograma, sino también en caja contra éste y otros cinco microorganismos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos, Por lo tanto, a partir de esta fracción se procedió a purificar la proteína de interés.

#### SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE 110-KDA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042

##### SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CON DETERGENTES

Para solubilizar las proteínas de los cuerpos de inclusión se utilizó una purificación en condiciones suaves (en ausencia de Urea y de GdHCl, agentes desnaturalizantes comúnmente recomendados para la ruptura de estas estructuras subcelulares) por lo que se probó sólo la acción de los tres detergentes más comúnmente usados para la purificación de proteínas de membrana y cuerpos de inclusión (Smith, 2011): Tritón X-100 (detergente no iónico) al 0.02 y 1 %, desoxicolato de sodio (DOC) (detergente iónico) al 0.14 y 2 % y CHAPS (detergente zwitteriónico) al 0.429%. La solubilización se llevó a cabo por una hora a 4°C y 150 rpm (Figura 33).

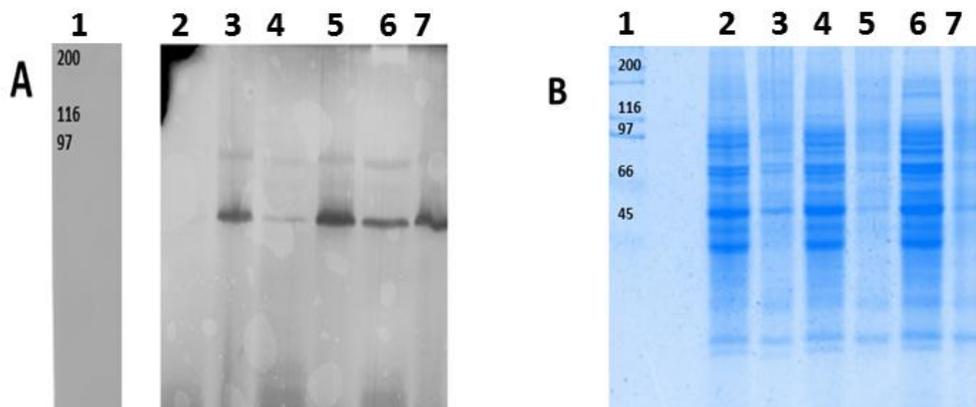


**Figura 33.** Actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus* de los restos celulares de la cepa *E. coli* BL21 pET19-110 solubilizados con distintos detergentes. **A)** Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: TRITÓN 0.02% (fracción soluble). Carril 3: DOC 0.14% (fracción soluble) Carril 4: TRITÓN 0.02% (fracción insoluble). Carril 5: DOC 0.14%(fracción insoluble) **B)** Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: DOC 2% (fracción soluble). Carril 3: TRITÓN 1% (fracción soluble). Carril 4: CHAPS 0.429% (fracción soluble). Carril 5: DOC 2% (fracción insoluble). Carril 6: TRITÓN 1% (fracción insoluble) Carril 7: CHAPS 0.429% (fracción insoluble).

Como se pone de manifiesto en la figura 33 en todas las condiciones de solubilización probadas, el uso de detergentes promueve la autólisis (en el panel A, la actividad se ve muy por debajo de los 66-kDa), efecto anteriormente reportado por Pitt-Rivers (1963) para la tiroglobulina en presencia de TRITÓN, SDS y CTAB aún en concentraciones cercanas a la CMC (Concentración Micelar Crítica) de los detergentes ensayados como lo son TRITÓN al 0.02%, desoxicolato de sodio al 0.14% y CHAPS al 0.429%. A partir de estos resultados se utilizó una solubilización con DOC 2% pues se observó una mayor recuperación de la proteína recombinante y una menor pérdida de peso molecular.

#### OPTIMIZACIÓN DE LA SOLUBILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA EN FRÍO

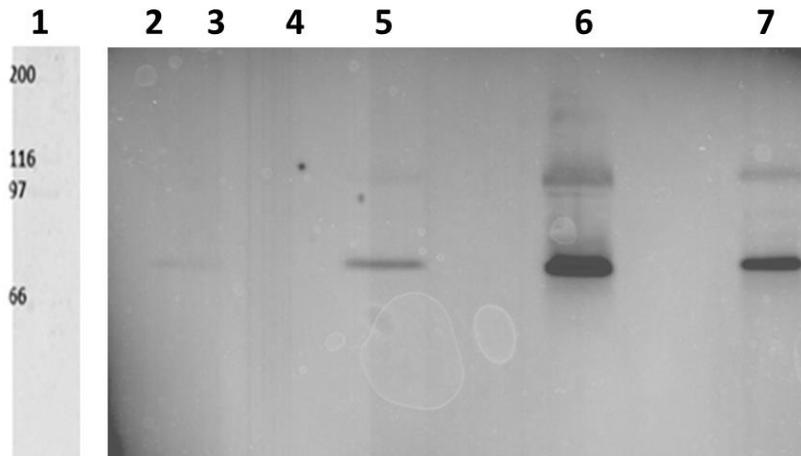
Para incrementar la cantidad de proteína solubilizada se probaron distintos tiempos de solubilización (1, 6 y 24 h), se realizaron geles de SDS-PAGE y zimogramas para evaluar la recuperación y la degradación de la misma, los resultados que se presentan en la figura 34



**Figura 34.** (A) Actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus* y (B) perfil proteico de los restos celulares de la cepa *E.coli* BL 21 pET19-110 solubilizados por distintos periodos de tiempo con DOC 2%. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: fracción soluble de 1h. Carril 3: fracción insoluble de 1h. Carril 4: fracción soluble de 6 h. Carril 5: fracción insoluble de 6h. Carril 6: fracción soluble de 24 h. Carril 7: fracción insoluble de 24 h.

Un incremento en el tiempo de solubilización generó una mayor recuperación de la proteína recombinante de interés ya que con una hora de interés se recupera de los restos celulares una vigésimo novena parte de la proteína inicial en la fracción, con 6 horas una veinteva parte y con 24 horas una séptima parte, por lo que se decidió trabajar con esta condición para incrementar la proteína recuperada.

El control negativo (*E. coli* BL 21 con el vector pET19 vacío) de la solubilización a 24 horas se presenta a continuación



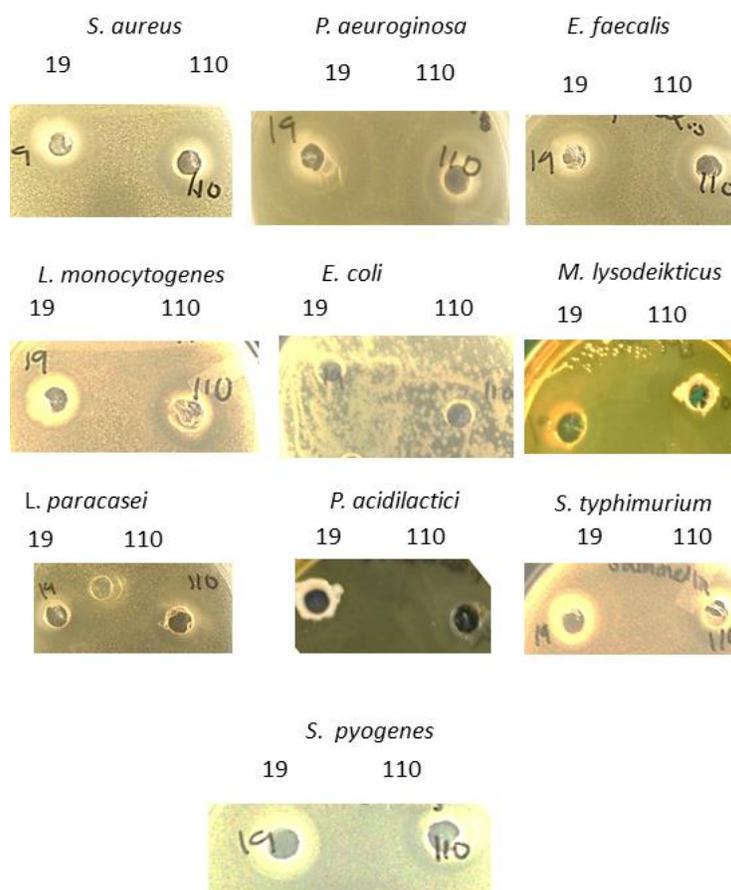
**Figura 35.** Actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus* de los restos celulares de la cepa *E. coli* BL21 pET19 (control negativo) y *E. coli* BL21 pET19-110 solubilizados con DOC 2% por 24 h. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: Fracción soluble de los restos celulares de *E. coli* BL21 pET19. Carril 3: Restos celulares de *E. coli* BL21 pET19. Carril 4: Fracción insoluble de los restos celulares de *E. coli* BL21 pET19. Carril 5: Fracción soluble de los restos celulares de *E. coli* BL21 pET19-110. Carril 6: Restos celulares de *E. coli* BL21 pET19-110. Carril 7: Fracción insoluble de los restos celulares de *E. coli* BL21 pET19-110.

EVALUACIÓN DEL ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE 110-KDA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042 SOLUBILIZADA CON DOC 2%.

Al igual que con la restos celulares sin solubilizar se evaluó la actividad de la proteína tratada con DOC al 2% por pruebas de difusión en agar contra 11 microorganismos para descartar la actividad antimicrobiana del detergente, de la cepa hospedera o del vector usado, se hizo un control negativo con *E. coli* BL21 pET19 que se procesó de forma idéntica a la cepa productora de la proteína recombinante. La tabla 22 y la figura 36 indican los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana que en todos los casos, con excepción de *L. monocytogenes*, fue bacteriostática.

**Tabla 22.** Espectro de inhibición de los restos celulares de *E. coli* BL21 pET19-110 solubilizados con DOC 2% (en todos los casos se considera la resta del control negativo)

Microorganismo	Restos celulares de <i>E. coli</i> BL21 pET19-110 solubilizado con DOC 2% (mm de halo/mg prot)
<i>B. cereus</i>	ND=DOC inhibe el crecimiento del microorganismo
<i>S. aureus</i>	176.41
<i>P. aeruginosa</i>	3.85
<i>E. faecalis</i>	94.87
<i>L. monocytogenes</i>	138.46
<i>E. coli</i>	109.74
<i>M. lysodeikticus</i>	208.97
<i>L. paracasei</i>	34.62
<i>P. acidilactici</i>	63.85
<i>S. pyogenes</i>	150.77
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	98.72



**Figura 36.** Difusión en agar del extracto de restos celulares de *E. coli* BL21 pET19-110 solubilizados con DOC 2% **19.** Restos celulares de *E. coli* BL21 pET19 **110.** Restos celulares de *E. coli* BL21 pET19-110. En todos los casos el efecto fue bacteriostático

El detergente utilizado en la solubilización puede tener un efecto per se que se consideró al restar el control negativo. A pesar de esto, se observa actividad lítica contra todas las cepas probadas, aunque en menor medida contra *Pseudomonas aeruginosa* (a la cual la mezcla de enzimas nativas no logró inhibir) por lo que se esperaba lo mismo si sólo tenemos presente la proteína de 110-kDa en el medio.

Bacterias Gram-positivas de importancia sanitaria como *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *S. pyogenes*, y las Gram-negativas *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium se inhibieron, mientras que las BALs *E. faecalis*, *L. paracasei* y *P. acidilactici* son poco afectadas, lo que resulta importante si se desea aplicar esta proteína al control de microorganismos patógenos en fermentaciones.

Aun cuando es baja la cantidad de proteína recuperada en la solubilización (sólo se recobra la séptima parte de la proteína inicial) y de la degradación de la misma durante este proceso, la fracción generada contiene menos contaminantes y más proteína correctamente plegada que interfieran en la técnica de difusión en agar y por eso fue posible observar un espectro de inhibición más amplio.

#### 4. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN (ESPECIFICIDAD POR SUSTRATOS ANÁLOGOS DEL PEPTIDOGUCANO)

Para conocer si el mecanismo de acción de la proteína recombinante es análogo a una PGH se evaluó la actividad de la misma ya solubilizada con DOC al 2% para las cuatro pruebas discriminativas para esta familia de enzimas. (Tabla 23)

**Tabla 23.** Especificidad de la proteína de 110-kDa por diversos enlaces de peptidoglucano.

Tipo de actividad	Controles positivos				Control negativo	
	GlcNAc-amidasa	Amidasa	Endopeptidasa	Muramidasa	<i>E.coli</i> BL21 pET19	<i>E.coli</i> BL21 pET 19-110
GlcNAc-amidasa	+	-	-	-	-	-
Amidasa	-	+	-	-	-	-
Endopeptidasa	-	-	+	-	+	+
Muramidasa	-	-	-	+	+	+

Como se muestra en los Tabla 23, en las pruebas para la detección de glucosaminidasas y amidasas sólo se exhibió actividad para los controles positivos de cada una de éstas por lo que se descartó que la proteína de 110-kDa formara parte de estas familias de enzimas; mientras que en el ensayo para endopeptidasas, la cepa usada como control negativo *E. coli* BL21 pET19 (1.21±0.17 Uabs 507 nm/mg proteína para Leu-Gly-Gly y 0.57±0.07 Uabs 507 nm/mg proteína para Gly-Gly-Gly-GLy-Gly) presento más actividad que la que contiene el gen para la expresión de proteínas de interés(0.8±0.1 Uabs 507 nm/mg proteína para Leu-Gly-Gly y 0.1±0.03 Uabs 507 nm/mg proteína para Gly-Gly-Gly-GLy-Gly), esto se debe a que a pesar de que dicha cepa está indicada como carente de proteasas (Manual pET System), en la base de datos del NCBI hay anotadas al menos 40 peptidasas y proteasas necesarias para los múltiples procesos celulares de este microorganismo que pudiesen llevar a cabo la hidrólisis de los sustratos utilizados en esta etapa.

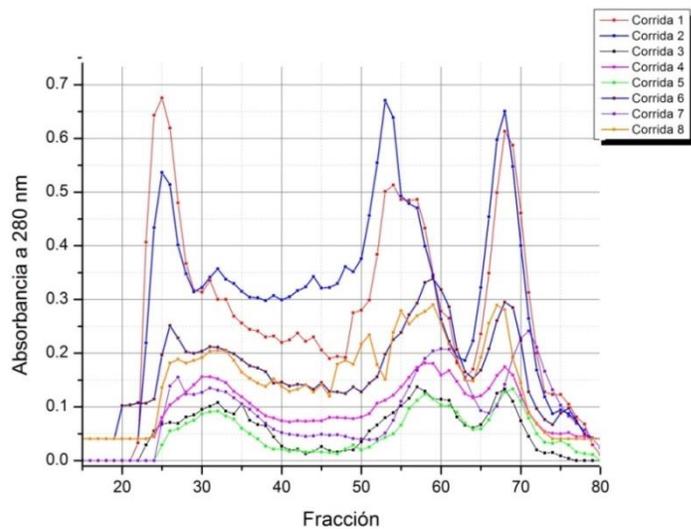
En el caso de las pruebas para la detección de muramididasas, entre los controles positivos, sólo la lisozima (control positivo) presentó actividad (37.5±4.2 nmol ácido murámico/mg proteína\*min), sin embargo, las cepas *E. coli* BL21 pET19 y *E. coli* BL21 pET19-110 (106±12 y 106±14 nmol ácido murámico/mg proteína\*min) también dieron señal, aunque en el caso de la cepa que expresa la proteína analizada en esta investigación su valor es 2.5 veces más alto. La actividad mostrada en *E. coli* BL21 pET19 posiblemente sea debida a las dos enzimas nativas de este organismo con actividad de muramidasa reportadas en la base de datos del NCBI.

A pesar de que la proteína no tiene los dos dominios típicos de lisozimas COG3926 y COG5526 (Pei y Grishin, 2005) no se descarta que sea una muramidasa putativa, ya que aún no se han hecho muchas investigaciones de enzimas de este grupo en bacterias.

## 5. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA DE 110-kDa RECOMBINANTE.

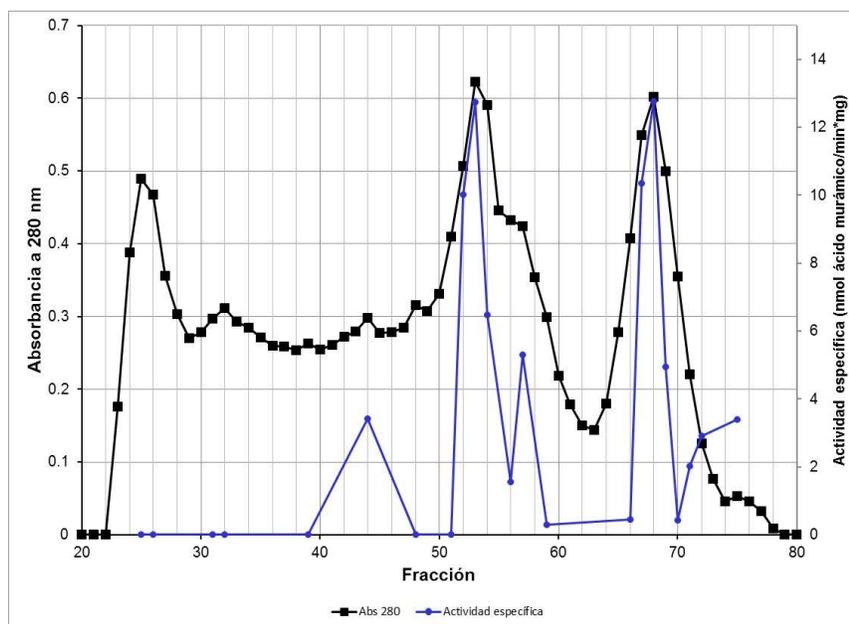
### PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE 110-kDa RECOMBINANTE.

La proteína recombinante de 110-kDa, se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una Columna Superdex 200, en total se realizaron ocho corridas, cada una de las cuales estaba formada por 80 fracciones de 5 mL cada una, la cantidad de proteína en cada fracción se monitoreó midiendo su absorbancia a 280 nm. Los resultados de este parámetro para cada una de las muestras se exhiben a continuación (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Proteína presente ( $A_{280}$ ) en las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante. Se muestran los resultados de ocho corridas.

Las ocho corridas obtenidas durante la purificación de la proteína de interés tienen comportamientos similares, a pesar de tener diferentes concentraciones de proteína total. Se observan tres picos en todas: uno alrededor de la fracción 25 a 30, otro desde la fracción 50 a la 60 y otro entre 65 a 75. Para determinar en qué región de estos gráficos se presentaba la mayor actividad de muramidasa se realizó la evaluación de la misma en distintas muestras de la corrida 1 y 2, dado que eran las que mostraban una mayor cantidad de proteína y, por lo tanto, se esperaba que generaran una señal más potente en el ensayo enzimático (Gráfico 2).



**Gráfico 2.** Actividad específica de muramidasa y absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante.

Los resultados del gráfico anterior indican tres zonas con alta actividad muramidasa: una entre las fracciones 42 a 45, otra entre las 52 a 60 y una última entre 65 a 75. Probablemente la proteína recombinante aparece en estas tres zonas ya que se degrada antes, durante y después de su purificación, como se mostrará más adelante. Cabe señalar que en el caso de las fracciones 42 a 45, que contienen a proteínas cercanas al peso esperado, la actividad se perdió totalmente después de dos semanas de almacenamiento, lo que imposibilitó su caracterización. Para los otros dos conjuntos de fracciones señaladas la actividad enzimática se mantuvo después de cuatro meses de almacenamiento

#### DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR TEÓRICO DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS CON ACTIVIDAD DE MURAMIDASA

A partir de seis proteínas con pesos moleculares conocidos: ferritina (440 kDa), inmunoglobulina G (160 kDa), albúmina (66 kDa), quimiotripsinógeno A (25 kDa) y ribonucleasa (13 kDa) se inyectaron en la columna de cromatografía de exclusión molecular en las mismas condiciones en que se procesó la muestra, se

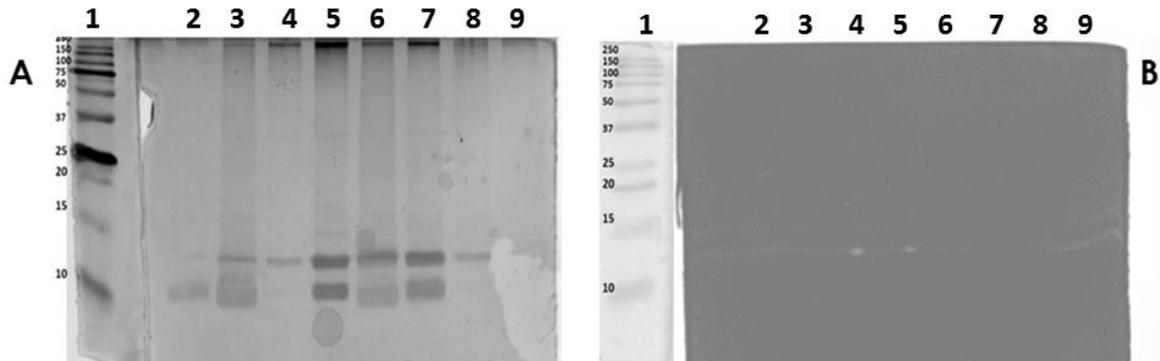
determinó el peso molecular calculando el coeficiente de distribución, también conocido como  $K_{av}$

El peso molecular teórico de cada corrida y fracción analizada se resume a continuación

**Tabla 23.** Peso molecular teórico de las regiones de las corridas de purificación con actividad de muramidasa

Fracción	Corrida 1		Corrida 2	
	$K_{av}$	Peso molecular (kDa)	$K_{av}$	Peso molecular (kDa)
42-45	2.02	105	1.88	77.3
52-60	1.22	16.7	1.29	19.5
65-75	0.29	1.97	0.29	1.97

Las fracciones 42-45 poseen probablemente a la proteína recombinante de 110-kDa en su forma íntegra, sin embargo, como ya se señaló anteriormente, ésta es inestable desde el inicio de su extracción y purificación lo que ocasiono que la actividad se perdiera después de un corto periodo de tiempo de almacenamiento e imposibilitando la caracterización. En los otros dos picos de actividad la proteína prácticamente está degradada pero aún mantiene su actividad de muramidasa. Este resultado es un indicio de que la mayoría de la proteína tiene funciones no catalíticas que permiten la hidrólisis de la misma sin perder la actividad enzimática. Para corroborar que el peso molecular teórico correspondiera al experimental se realizaron SDS-PAGE y zimogramas de *M. lysodeikticus* que se muestran a continuación (Figura 36).



**Figura 36.** (A) Perfil proteico y (B) Actividad lítica en zimograma de distintas fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína de 110-kDa recombinante. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: Fracción 59 de la Corrida 1. Carril 3: Fracción 56 de la Corrida 1. Carril 4: Fracción 65 de la Corrida 1. Carril 5: Fracción 56 de la Corrida 2. Carril 6: Fracción 58 de la Corrida 2. Carril 7: Fracción 59 de la Corrida 2. Carril 8: Fracción 68 de la Corrida 2.

En la Figura 36 se pueden diferenciar en el gel de SDS-PAGE la presencia de dos bandas en las fracciones purificadas pertenecientes al conjunto de fracciones entre 52-60 de la corrida 1 y de la corrida 2, de 10 y 12 kDa, mientras que en el caso de las fracciones entre 65-75, sólo se tiene la banda de 12 kDa, los resultados corroboran el peso molecular esperado para las proteínas entre los tubos 52-60, sin embargo, en el caso de los tubos entre 65-75, se esperaban un péptido de 1 a 2 kDa; las variaciones en los cálculos de peso molecular teórico y experimental pueden deberse a la presencia de desoxicolato de sodio (detergente catiónico) en la fase móvil durante la purificación que puede incrementar la solubilización de la proteína según las indicaciones del fabricante (General Electric,2016)

En el caso del zimograma, sólo se aprecia una sola banda alrededor de 14 kDa que puede ser la misma que aparece en los SDS-PAGE a 12 kDa, pues está presente en todos los carriles. Es probable que si la proteína se degrada hasta 10 kDa la actividad lítica se pierda y la enzima deja de ser funcional.

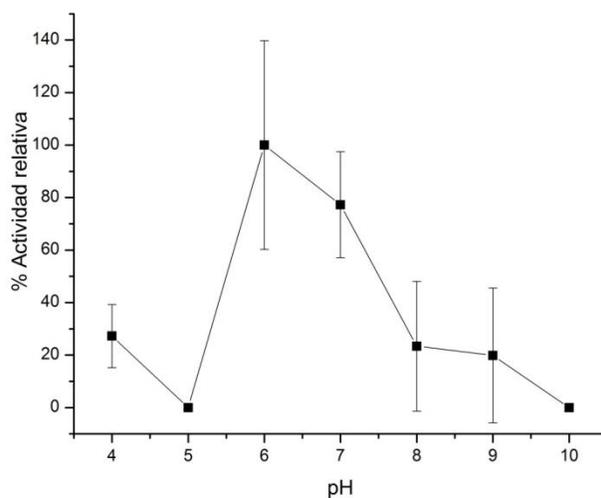
Como se observa en la figura 36, la muestra perteneciente a las fracciones entre 65-75 exhibe una sola banda en el SDS-PAGE y en el zimograma de *M. lysodeikticus*, por lo que se decidió trabajar con este conjunto para la caracterización de la proteína recombinante de 110-kDa.

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA RECOMBINANTE DE 110-kDa DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042

Con los restos de la proteína de 110-kDa obtenidos de la purificación que dieron como resultado un fragmento de 12-kDa aproximadamente se realizó la caracterización en función del pH, la temperatura; la presencia de iones, EDTA y PMSF utilizando la técnica descrita para la determinación de la actividad de muramidasa, los resultados para cada parámetro se describen a continuación

### INFLUENCIA DEL PH DEL MEDIO EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

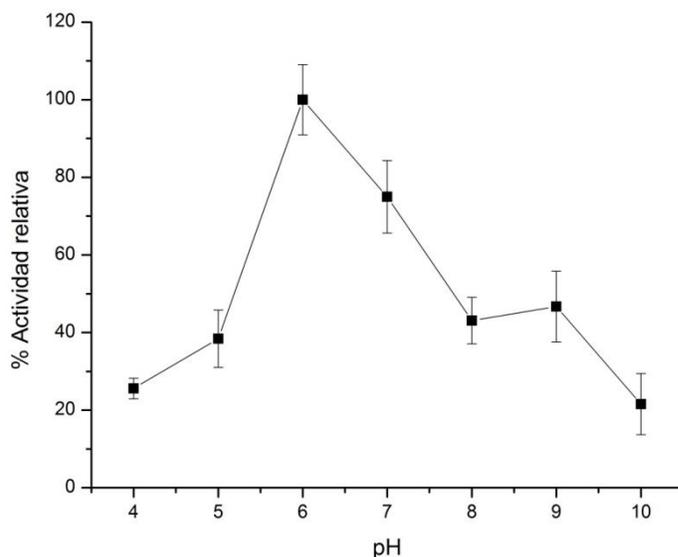
En el Gráfico 3 se muestra que la enzima es activa entre un pH>5 y un pH<9. Considerando que dicha enzima proviene de una BAL que generalmente crece y se desarrolla en estas condiciones, y no de un microorganismo extremófilo, el comportamiento parece corresponder con lo esperado. Al comparar el pH óptimo de la enzima (pH=6) con lo reportado en la base de datos BRENDA (Braunschweig Enzyme Database) para otras muramidasa. Se observa que la mayoría de las analizadas independientemente de su origen son más activas en condiciones cercanas a la neutralidad. Esto puede deberse a que se han encontrado aminoácidos altamente sensibles a los cambios de pH, como el ácido glutámico (Li *et al.*, 2012) o histidina (Toshima *et al.*, 2003) cerca o en el sitio catalítico de esta enzima, los que, al sufrir protonación o desprotonación a los distintos pHs probados, provocan que la enzima pierda actividad.



**Gráfico 3.** Determinación del pH óptimo del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante. (El 100% es valor de la condición que generó los mejores resultados)

#### ESTABILIDAD A PH DE LA ENZIMA

En esta etapa se probó el efecto de distintos pHs en la enzima después de someter a la misma a una hora en cada uno de estos tratamientos, en el Gráfico 10 se hace patente que el efecto de la incubación en todos los casos fue reversible y la enzima presentó actividad después de transcurrida esta operación teniendo en el caso de las condiciones extremas, pH 4 y 10, un 25.6% y un 21.54% de actividad relativa que concuerda con el comportamiento exhibido en el anterior apartado.

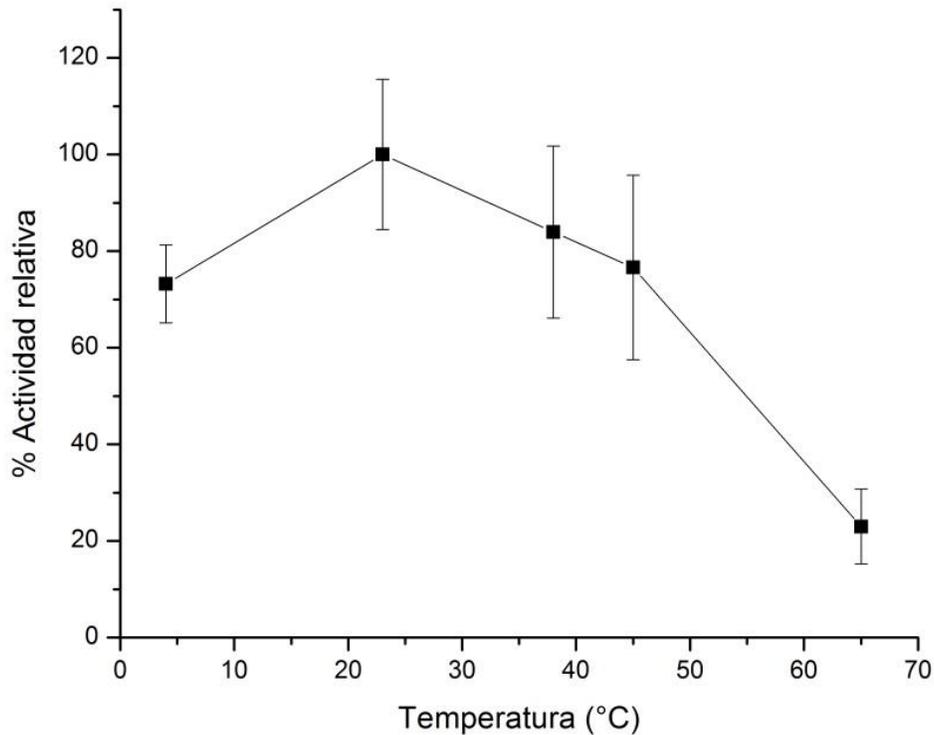


**Gráfico 4.** Determinación de la estabilidad a pH del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante. (El 100% es valor de la condición que generó los mejores resultados).

#### INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DEL MEDIO EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

Como se había observado en el resto de la investigación, la enzima de 110-kDa se degrada fácilmente aun cuando durante toda su extracción se mantiene la cadena de frío; al final de la extracción con detergentes ya se encuentra presente la degradación de la misma en al menos tres bandas, al aumentar la temperatura la enzima incrementa su velocidad de degradación, efecto que ya se había visto experimentalmente en zimograma al almacenar la enzima en diferentes condiciones (datos no mostrados). La temperatura de mayor actividad determinada en esta etapa fue 37°C, valor que era de esperarse si se considera que el microorganismo productor de la enzima nativa es un mesófilo, además de que existen pocos reportes de enzimas muramidasa con alta resistencia térmica

estando en la mayoría de los casos la temperatura óptima entre 25°C y 60°C (sólo la enzima de *Ruditapes philippinarum* tienen una temperatura óptima de 75°C y la *Gallus gallus* de 65°C).

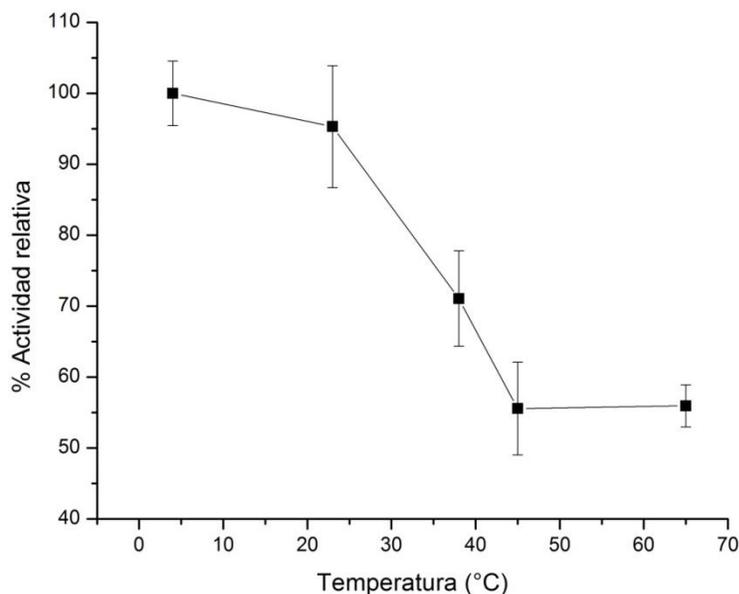


**Gráfico 5.** Determinación de la temperatura óptima del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante (El 100% es valor de la condición que generó los mejores resultados).

#### ESTABILIDAD A TEMPERATURA DE LA ENZIMA

Los resultados indicaron que la enzima de 110-kDa es sumamente afectada por la temperatura de almacenamiento ya que al incrementar la temperatura a 65°C por tan sólo una hora, la actividad disminuye al 23% siendo la mejor condición de almacenamiento de las probadas la de refrigeración (4°C).

En el gráfico 4 se muestra que la temperatura óptima es 37°C, aunque no se descarta la aplicación de esta enzima en productos refrigerados pues si bien en estas condiciones la enzima tendría una actividad baja sería más estable y se podría evitar la proliferación de psicrófilos con actividad patogénica o involucrados en la descomposición del producto.



**Gráfico 6.** Determinación de la estabilidad térmica del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante. (El 100% es valor de la condición que generó los mejores resultados)

#### EFEECTO DE IONES METÁLICOS EN LA ENZIMA

Para determinar si la enzima requería de algún ion metálico como cofactor para llevar a cabo su actividad lítica se llevó a cabo esta etapa que consistió en un primer tratamiento con EDTA 100 mM para eliminar los iones presentes en el medio que pudieran estar incrementando o disminuyendo la actividad de la enzima. Posteriormente cada uno de los iones probados se añadió a concentraciones finales de 1 y 10 mM.

Durante la caracterización, el ion  $\text{Na}^+$  mostró no tener efecto significativo en la actividad de la enzima a una concentración 1 mM, sin embargo, a 10 mM la actividad de la misma se ve reducida hasta un 14.52%. Este efecto ya ha sido observado en enzimas de esta familia incluso de organismos de ambientes marinos donde la concentración de este ion sería superior, como es el caso de la muramidasa de *Ruditapes philippinarum* la cual se inactiva proporcionalmente al aumentar la concentración de  $\text{Na}^+$  de 0 a 70 mM (Kim *et al.*, 2012) y la de *Crassostrea virginica* que a una concentración superior a 100 mM reduce drásticamente su actividad (Xue *et al.*, 2004), mismo comportamiento reportado a

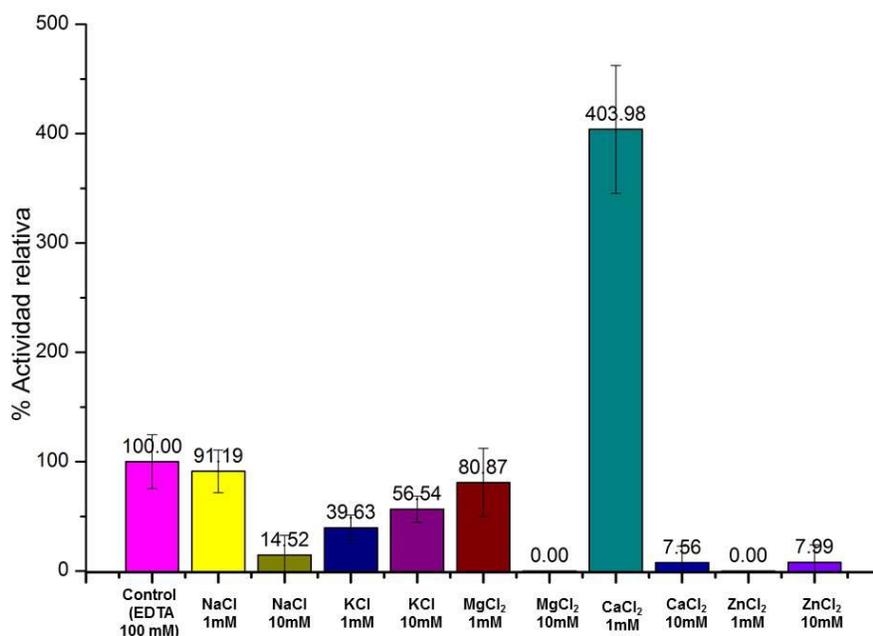
esta concentración para lisozimas de *Meretrix lusoria* y de huevo de gallina (Kuwano *et al.*, 2013).

En el caso de las lisozimas bacterianas el efecto del  $\text{Na}^+$  es más marcado aún a bajas concentraciones como se observa en las dos lisozimas de *P. aeruginosa* que con una concentración de 1 mM de NaCl se logra inhibir la actividad de una de ellas en 50% y la otra en un 76% (Wang y Chang, 1996) y en la lisozima del fago P22 de *S. enterica* serovar Typhimurium que reduce su actividad con NaCl a 17 mM a 77% y con 100 mM a 10% (Koteswara y Burma, 1971).

El  $\text{K}^+$  parece incrementar la actividad de la enzima analizada al aumentar su concentración en el medio pasando de 39.63% cuando está a una concentración de 1 mM a un 56.54% cuando está 10 mM. Hasta el momento existen pocos informes del efecto de este ion en el comportamiento de las muramidasa, éstos indican existe un bajo efecto inhibitorio a bajas concentraciones. En el fago P22 de *S. enterica* serovar Typhimurium reduce su actividad a 17 mM a un 93% (Koteswara y Burma, 1971) y en el caso de *R. philippinarum* la actividad se mantiene sin cambios cuando éste se encuentra entre 10 y 50 mM (Kim *et al.*, 2012) por lo que es probable que un incremento de  $[\text{K}^+]$  en el medio recupere el 100% de la actividad relativa

El  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  resultaron ser inhibidores de la enzima caracterizada aun a una concentración de 1 mM, este efecto ya fue reportado para varias muramidasa de diversos orígenes como es el caso de la enzima de esta familia del fago P22 de *S. enterica* serovar Typhimurium que se inhibe totalmente con 10 mM de  $\text{Mg}^{2+}$  (Koteswara y Burma, 1971) y en el caso de las lisozimas de *P. aeruginosa* cuya actividad se ve reducida a un 65% y 13% con  $\text{Mg}^{2+}$  y a un 81 y 30% con  $\text{Zn}^{2+}$  (Wang y Chang, 1996). Lisozimas de origen no bacteriano también se ven afectadas por estos iones divalentes un ejemplo es el caso *Ruditapes philippinarum*, totalmente inhibida con 2 mM de  $\text{Zn}^{2+}$  y con una reducción de su actividad al 80% con  $\text{Mg}^{2+}$  20 mM y de *Triticum aestivum* (Audy *et al.*, 1988) inhibida completamente con 1mM de  $\text{Zn}^{2+}$ .

La activación por  $\text{Ca}^{2+}$  a bajas concentración que se hizo manifiesta en este experimento ya ha sido indicada anteriormente para muramidasa de *S. aureus* (Hawiger, 1977) y *Salmo salar* (Myrnes *et al.*, 2013), en este último con una activación del 180% a 10 mM en la enzima nativa y de un 280% en la enzima recombinante a 5 mM, el efecto activador de este ion probablemente se deba a que posee sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  como se ha reportado en lisozimas de mamíferos (Kuroki y Yutane, 1998; Koshiba *et al.*, 1990; Permyakov *et al.*, 2010)

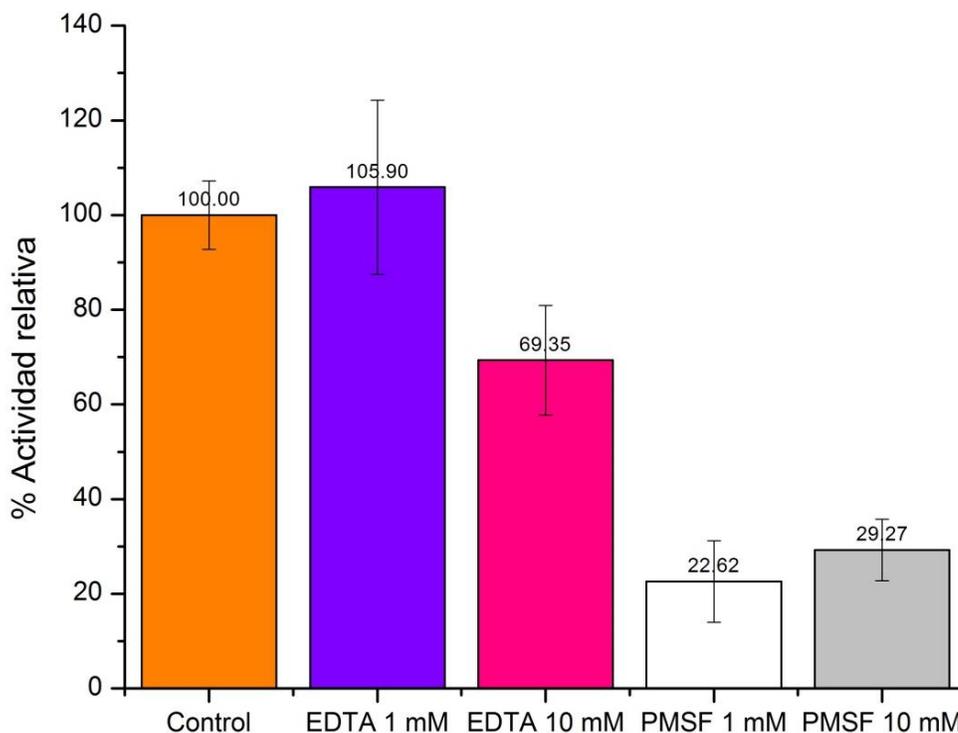


**Gráfico 7.** Determinación del efecto de los iones metálicos en el fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante. (El 100% es valor de la condición control)

#### EFFECTO DEL EDTA Y DEL PMSF EN LA ENZIMA

El efecto del EDTA y del PMSF (un inhibidor de serin proteasas y de otras enzimas con este aminoácido en su sitio catalítico) también se evaluó, como se muestra en el gráfico 14, observándose que el EDTA a 10 mM disminuye la actividad de la enzima en un 30%, posiblemente por el secuestro de un ión necesario para la actividad de la enzima como los arriba analizados, en el caso del PMSF, aún no hay investigaciones publicadas de este grupo de enzimas caracterizadas en presencia de esta sustancia pero tampoco de muramidasa con serina en su sitio catalítico, sin embargo, el efecto activador de esta sustancia no

se descarta, pues ya ha sido observado en xilanasas (Turkiewicz et al,2000),  $\beta$ -glucosidasas (Wolosowska et al.,2000), nitrilasas (Ma et al.,2014) y lipasas (Uttatree et al.,2010)



**Gráfico 8.** Determinación del efecto del EDTA y PMSF en el fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante (El 100% es valor de la condición que Control)

## 6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL FRAGMENTO CON ACTIVIDAD DE MURAMIDASA OBTENIDO DURANTE LA PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA DE 110-KDA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042 Y DE LA MEZCLA DE ÉSTA CON LA PROTEÍNA DE 99-KDA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR

La actividad antimicrobiana medida mediante ensayos de difusión en agar del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante y la proteína de 99-kDa recombinante del mismo microorganismo por separado y mezcladas en cantidades iguales fue la siguiente (Tabla 24).

**Tabla 24.** Resultados de la prueba de difusión en agar del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante y de la proteína de 99-kDa recombinante de *P. acidilactici* ATCC 8042 contra 12 microorganismos por separado y mezcladas en una relación masa:masa (1:1)

Microorganismo	Actividad antimicrobiana de la proteína de 110-kDa purificada (mm/mg proteína)	Actividad antimicrobiana de la proteína de 99-kDa purificada (mm/mg proteína)	Actividad antimicrobiana de la proteína de 99 y 110-kDa purificadas (mm/mg proteína)
<b>Microorganismos Gram-positivos</b>			
<i>B. cereus</i>	1034.6±145.6	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>E. faecalis</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>E. faecium</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>L. paracasei</i>	175.0±17.6	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>L. monocytogenes</i>	132.4±49.4	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>M. lysodeikticus</i>	652.6±118.3	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>P. acidilactici</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>S. aureus</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>S. pyogenes</i>	0.0±0.0	91.7±39.5	0.0±0.0
<b>Microorganismos Gram-negativos</b>			
<i>E. coli</i>	0.0±0.0	0.0±0.0	200±28.3
<i>P. aeruginosa</i>	261.5±94.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

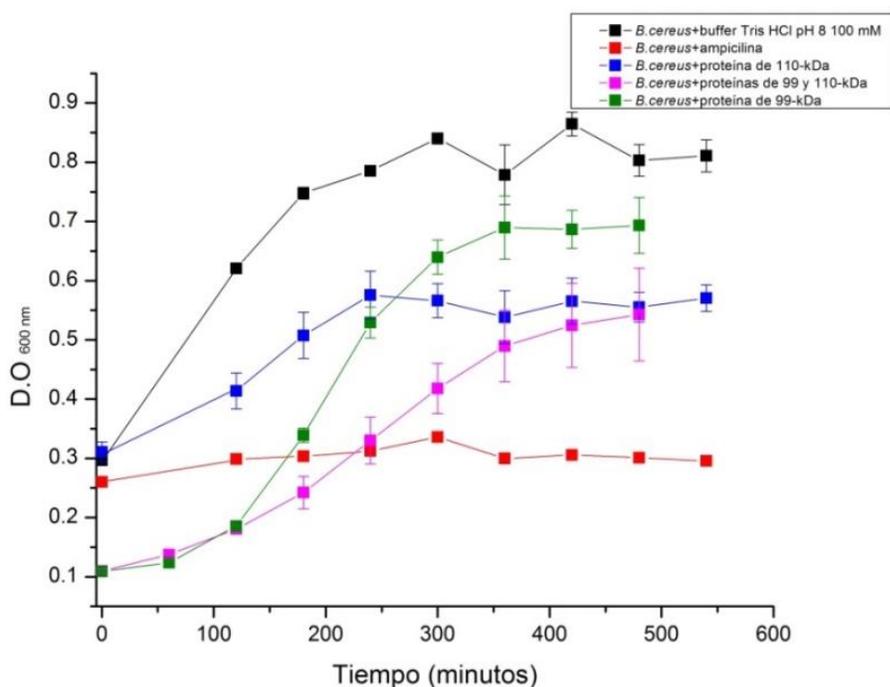
La enzima de 110-kDa presentó actividad antimicrobiana contra cinco de los doce microorganismos evaluados, sin embargo, al ser una técnica con baja sensibilidad y que es afectada por factores intrínsecos y extrínsecos al experimento como son la diferentes velocidades de crecimiento de los microorganismos (que genera que la densidad microbiana cubra en algunas ocasiones el halo de inhibición), la dificultad de determinar el tamaño del halo ya sea por su irregularidad o baja perceptibilidad y el hecho de que por este método no es posible conocer si el antimicrobiano es un bacteriostático o un bacteriolítico con certeza (siendo *B. cereus* el único con un halo de inhibición totalmente traslúcido y el cual puede ser inhibido bacteriolíticamente) se decidió medir la actividad utilizando el método turbimétrico con el fin de corroborar los resultados.

Al colocar las dos enzimas recombinantes en el medio, la actividad disminuyó posiblemente porque la enzima de 99-kDa es una glucosaminidasa y la de 110-kDa una muramidasa, es decir, ambas son capaz de hidrolizar el mismo enlace en

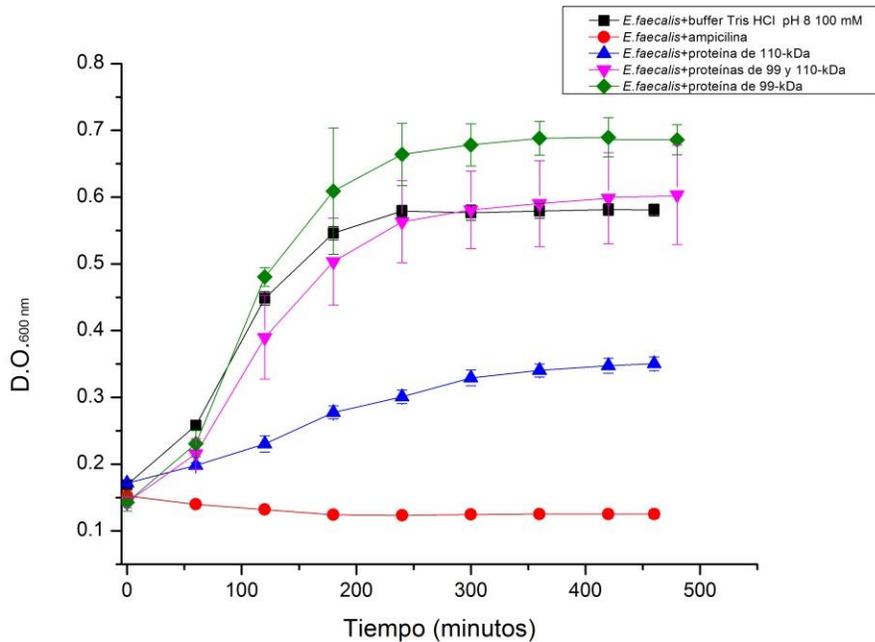
el peptidoglucano y puede existir competencia por la unión a dicho sustrato, otra posible razón explicación de la diferencia en los resultados entre proteínas nativas y recombinantes es que se desconoce la proporción en que las proteínas se están expresando en *P. acidilactici* ATCC 8042 y en esta etapa únicamente se utilizaron en una relación masa:masa de 1:1, sin embargo, en investigaciones futuras no se descarta probar en otras proporciones

Por otro lado, es destacable, como se ilustra en la Tabla 24, que se logró la inhibición de uno de los patógenos Gram-negativos más importantes, *E. coli*, cuando ambas enzimas están presentes en el medio. Los resultados de este experimento también fueron evaluados por turbidimetría, como se exhibe a continuación.

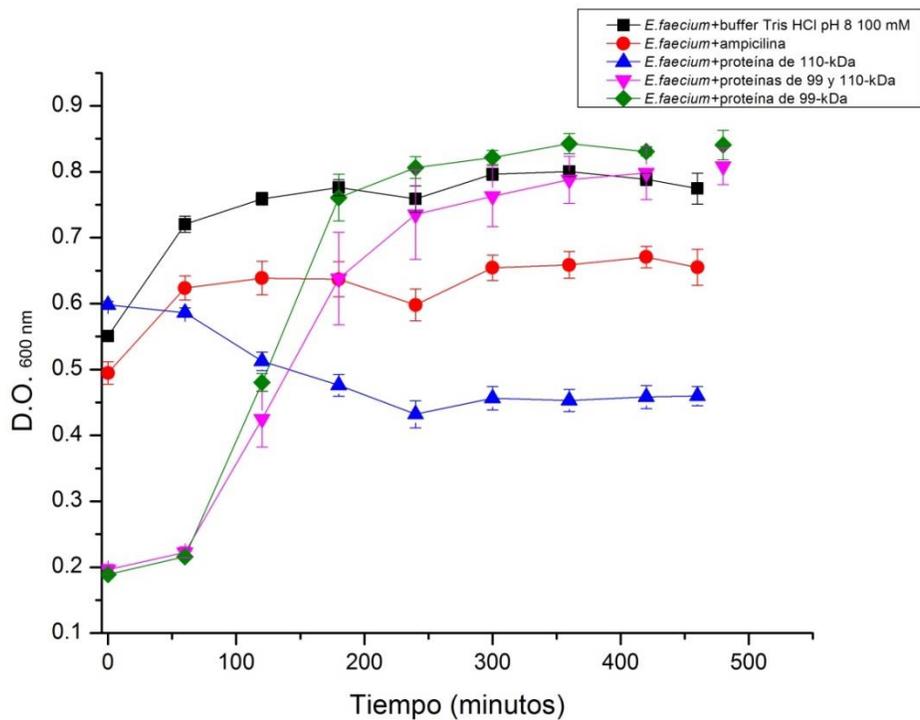
#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR ENSAYO TURBIDIMÉTRICO



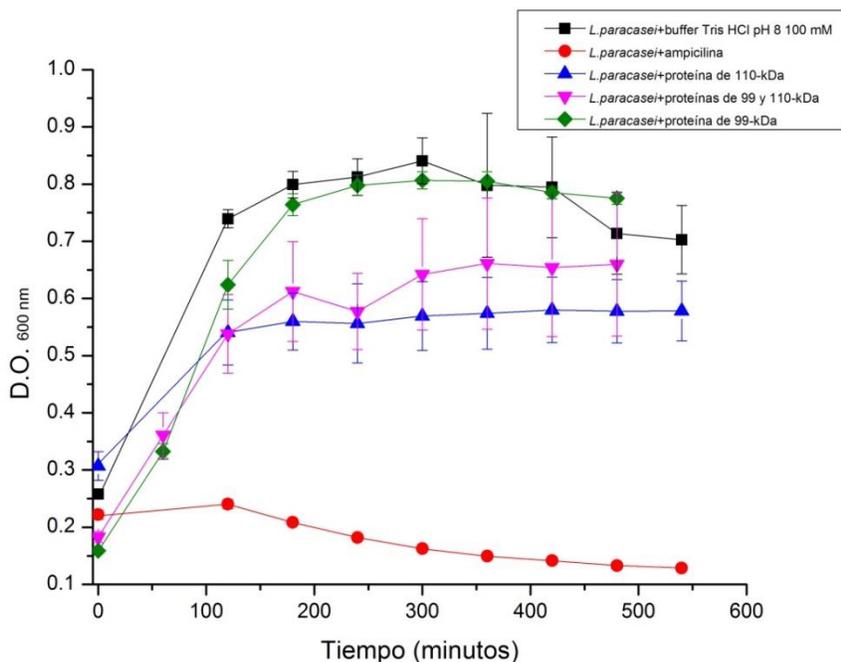
**Gráfico 9** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *B. cereus* determinado por densidad óptica.



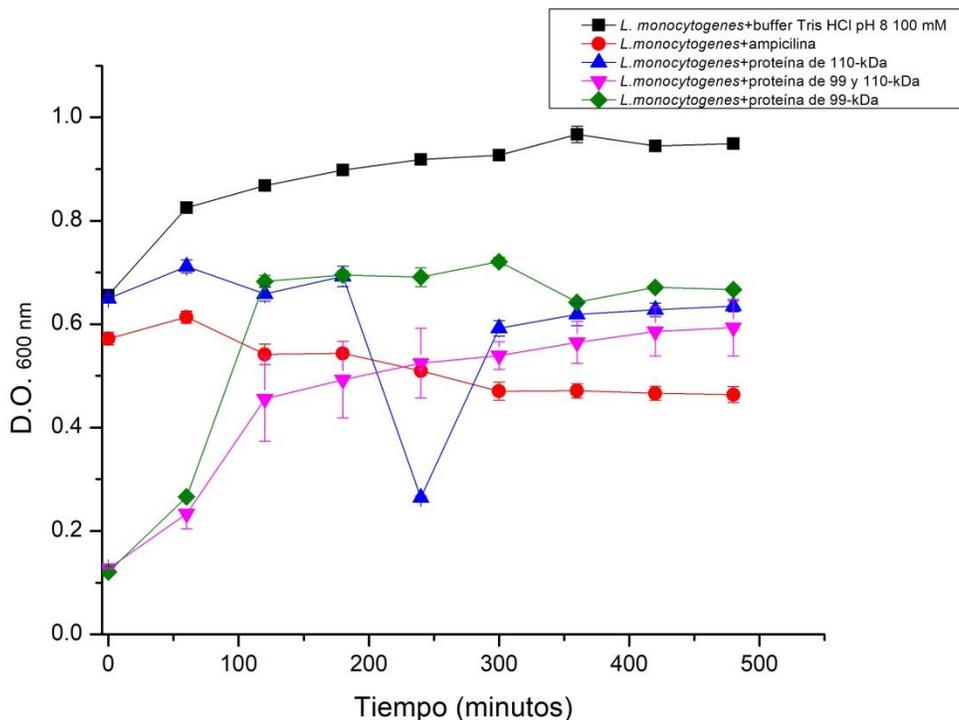
**Gráfico 10.** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *E. faecalis* determinado por densidad óptica.



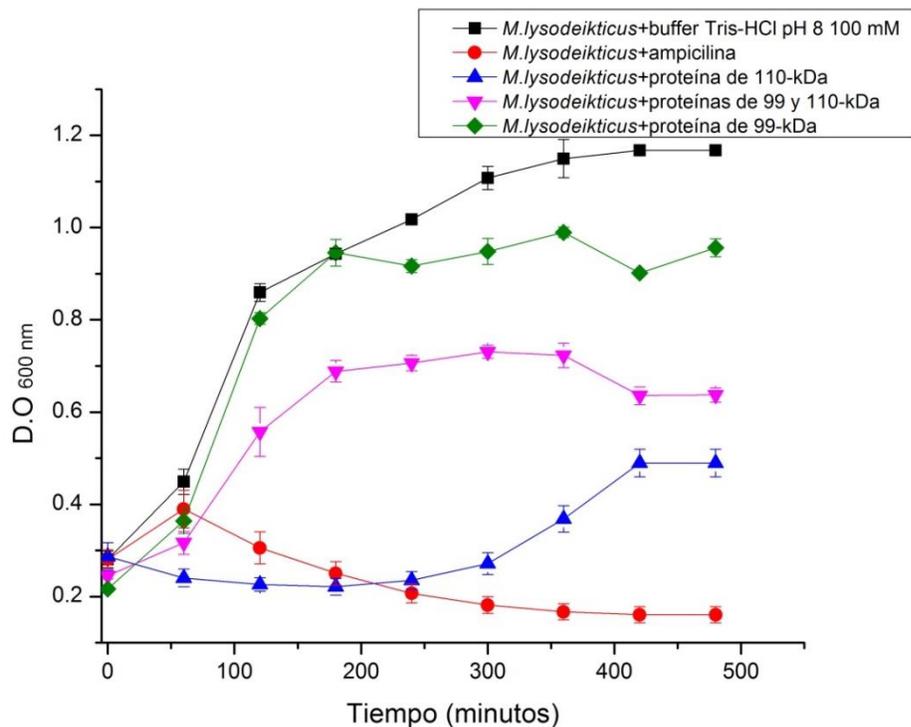
**Gráfico 11.** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *E. faecium* determinado por densidad óptica.



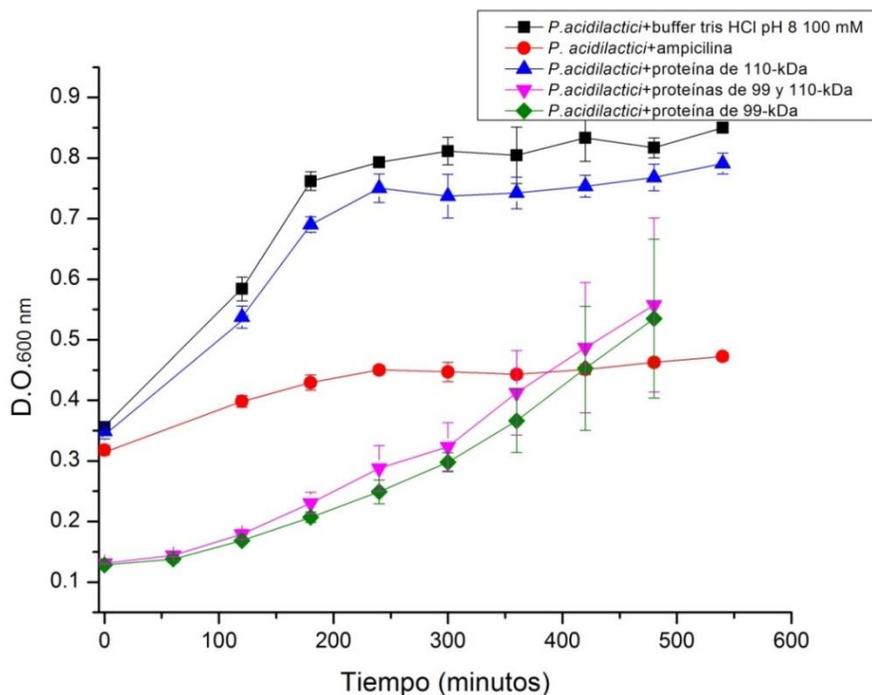
**Gráfico 12.** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *L. paracasei* determinado por densidad óptica.



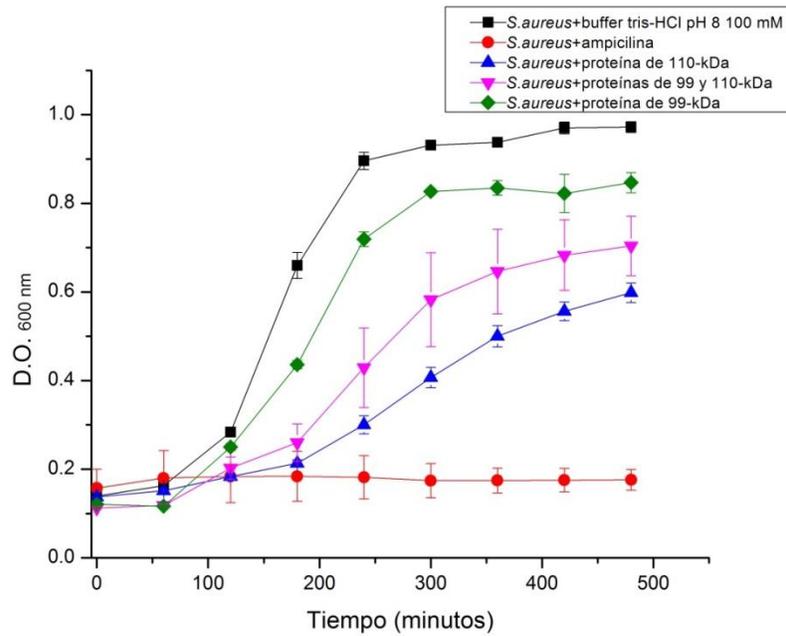
**Gráfico 13** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *L. monocytogenes* determinado por densidad óptica.



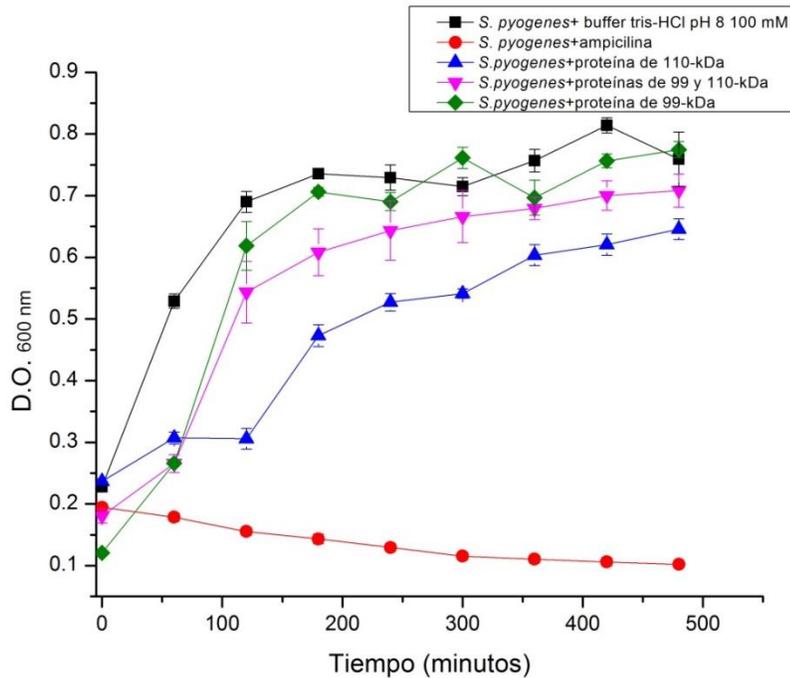
**Gráfico 14.** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *M. lysodeikticus* determinado por densidad óptica.



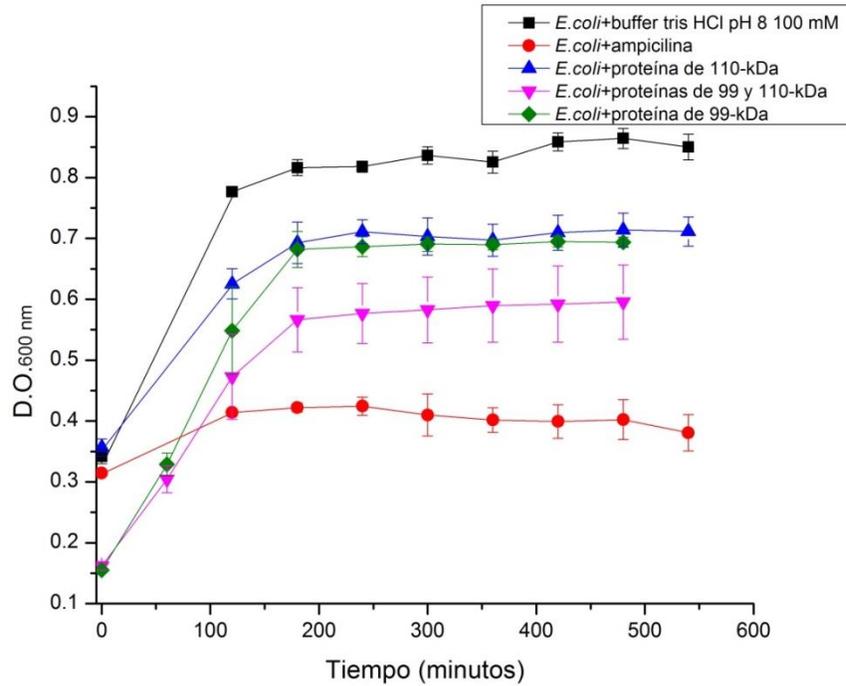
**Gráfico 15.** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *P. acidilactici* determinado por densidad óptica.



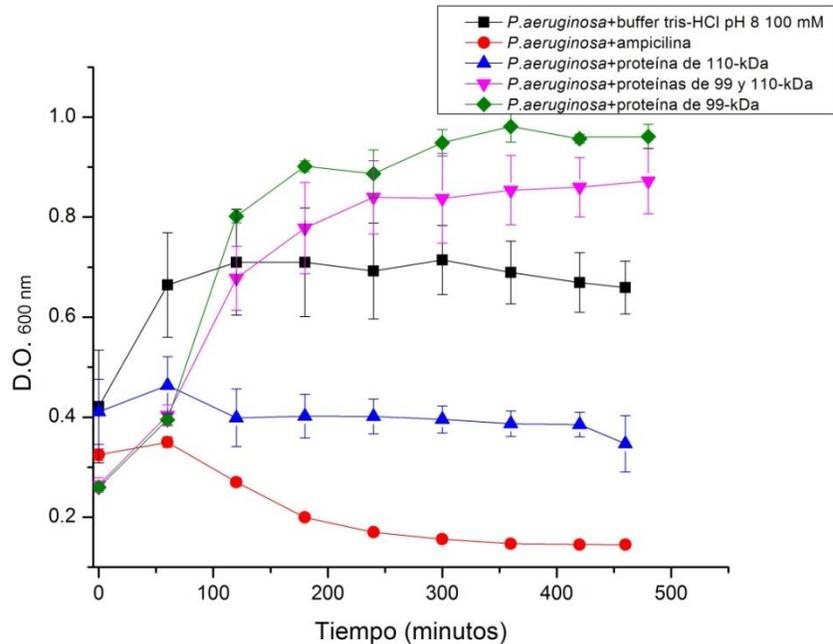
**Gráfico 16.** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *S. aureus* determinado por densidad óptica.



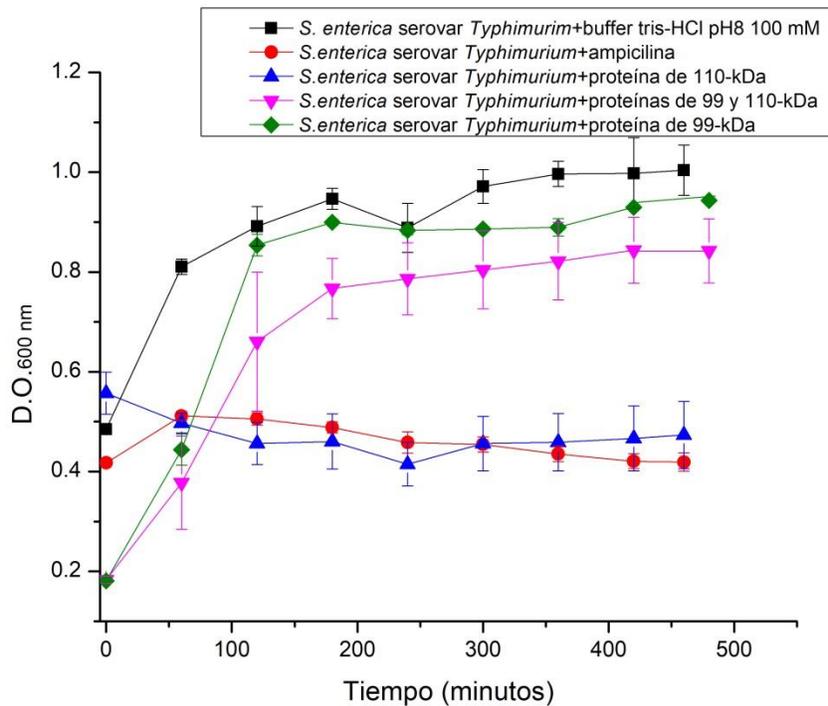
**Gráfico 17.** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *S. pyogenes* determinado por densidad óptica.



**Gráfico 18.** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *E. coli* determinado por densidad óptica.



**Gráfico 19.** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *P. aeruginosa* determinado por densidad óptica



**Gráfico 20.** Efecto de la proteína recombinante de 99-kDa y del fragmento con actividad de muramidasa obtenido durante la purificación de la enzima de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 así como de la mezcla de la mismas sobre el crecimiento microbiano de *S. enterica* serovar Typhimurium determinado por densidad óptica

Los resultados arriba mostrados (Gráficos 9-20) señalan que la proteína de 110-kDa por sí sola posee actividad antimicrobiana (bacteriostática) contra diez de los doce microorganismos analizados, siendo *E. coli* y *P. acidilactici* las dos especies no afectadas, en el caso de la primera bacteria, la resistencia a éste antimicrobiano probablemente se deba a la presencia de ácido 1,6-anhidro murámico en su peptidoglucano (Vollmer, 2008), que evite la formación del complejo enzima-sustrato. En el caso de *P. acidilactici* la muramidasa recombinante tal vez no logre la lisis pues se necesita una mayor concentración mínima inhibitoria o el resto de la enzima que se hidrolizo durante el proceso de purificación para llevar a cabo la actividad inhibitoria. Es importante destacar que para *S. enterica* serovar Typhimurium y *E. faecium* la muramidasa de 110-kDa es una opción al uso de antibióticos pues mostró el mismo efecto inhibitorio en el primer caso y mejores en el segundo que el antibiótico usado como control positivo.

La actividad sinérgica de las proteínas de 99 y 110-kDa se observó para tres patógenos importantes como *B. cereus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*. Las dos primeras especies con estructuras de peptidoglucano similares con ácido 1,6-anhidro murámico (Vollmer, 2008) y la otra con O-acetilaciones y N-deacetilaciones (Boneca *et al.*, 2007) que parecen no haber afectado el efecto antimicrobiano de la mezcla de enzimas, el cual podría ser más eficiente si se prueba en futuras investigaciones el efecto de diferentes proporciones de las PGHs recombinantes

En el caso *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. paracasei*, *M. lysodeikticus*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* y *S. enterica* serovar *Typhimurium* el efecto del producto de degradación de la proteína de 110-kDa fue parecido. Quizás esto se debe a que existe similitud entre estos peptidoglucanos, ya que su principal diferencia radica en la cadena interpeptídica del mismo que no es sustrato de la enzima (Schleiffer y Kandler; 1972; Billot-Klein *et al.*, 1996; Quintela *et al.*, 1997; Sharif *et al.*, 2009).

## CONCLUSIONES

- Se predijo una estructura secundaria para la proteína de interés rica en  $\alpha$ -hélices y con una orientación mayoritaria hacia el exterior de la célula y en contacto con la pared celular de *P. acidilactici*.
- A pesar de la dificultad que conlleva clonar una proteína tan grande como la estudiada, aunado al hecho de que se trata de una proteína de membrana se obtuvo una enzima recombinante activa que actúa como muramidasa y que tiene efecto contra diversos patógenos.
- El fragmento de 12-kDa generado de la degradación de la proteína recombinante de 110-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 es una muramidasa putativa con un pH óptimo de 6 y estable en un intervalo de pH entre 4 y 10 si se somete al mismo una hora, altamente termolábil y con una temperatura óptima de 23°C, la cual incrementa su actividad con  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ ; mientras que en presencia de  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  o PMSF se inhibe.
- Se observó actividad antimicrobiana de la proteína recombinante del fragmento de 12-kDa generado por la degradación de la proteína de 110-kDa por sí sola contra *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. paracasei*, *L. monocytogenes*, *M. lysodeikticus*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* y *S. enterica* serovar *Typhimurium* y sinérgica con la de 99-kDa contra *B. cereus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*.
- La proteína de 110-kDa es una opción ante la escalada de casos de cepas multirresistentes a antibióticos pues a pesar de la existencia de peptidoglucanos modificados en su cadena de glucósidos, los genes responsables de estos cambios se encuentran en el ADN cromosomal el cual es más difícil de compartir o modificar si se compara con el ADN plasmídico (principal responsable de la transferencia de genes de multirresistencia).

## **PERSPECTIVAS**

- Secuenciar el fragmento de la proteína de 110-kDa caracterizado bioquímicamente y cuya actividad antimicrobiana se observó en esta investigación
- Clonar la secuencia que codifica para el fragmento de la proteína de 110-kDa caracterizado y analizar su espectro antimicrobiano y sus propiedades bioquímicas
- Probar distintas proporciones de las proteínas de 99 y 110-kDa recombinantes para determinar si es posible igualar el espectro de inhibición de las nativas
- Evaluar la actividad antimicrobiana de la proteína de 110-kDa recombinante contra patógenos de aislados clínicos o de alimentos
- Determinar la vida de anaquel de la proteína recombinante de 110-kDa para evaluar su potencial como agente antimicrobiano comercial.

## BIBLIOGRAFÍA

### ARTÍCULOS Y CAPÍTULOS DE LIBROS

- Alexander, R. P., y Zhulin, I. B. (2007). Evolutionary genomics reveals conserved structural determinants of signaling and adaptation in microbial chemoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(8), 2885–2890.
- Audy, P., Trudel, J., y Asselin, A. (1988). Purification and characterization of a lysozyme from wheat germ. *Plant Science* 56, 43–50.
- Back, W. (1978) Elevation of *Pediococcus cerevisiae* subsp. dextrinicus Coster and White to species status *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28: 523–7.
- Back, W. (1978) Zur Taxonomie der Gattung *Pediococcus*. Phänotypische und genotypische Abgrenzung der bisher bekannten Arten sowie Beschreibung einer neuen bierschädlichen Art: *Pediococcus inopinatus*. *Brauwissenschaft*, 31: 237–50, 312–20, 336–43.
- Barbosa González P.A. (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.
- Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M. K., y Poolman, B. (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Letters*, 580(4), 1023–1035.
- Billot-Klein, D., Shlaes, D., Bryant, D., Bell, D., van Heijenoort, J., y Gutmann, L. (1996). Peptidoglycan structure of *Enterococcus faecium* expressing vancomycin resistance of the VanB type. *The Biochemical Journal*, 313 Pt 3, 711–5.
- Boneca, I. G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M. A., Sousa, S., Lecuit, M., y Girardin, S. E. (2007). A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3): 997–1002.

- Beristain-Bauza, S., Palou, E., y Lopez-Malo, A. (2012). Bacteriocinas : antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 64–78.
- Bourgeois, I., Camiade, E., Biswas, R., Courtin, P., Gibert, L., Götz, F. y Pestel-Caron, M. (2009). Characterization of AtIL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activities. *FEMS Microbiology Letters*, 290(1), 105–113.
- Boutón, Y., Guyot, P. y Grappin, R. (1998) Preliminary characterization of microflora of Comté cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 123–31.
- Burgess, R. R. (2009). *Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463). Elsevier Inc.
- 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., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C. W., Hertveldt, K., y Lavigne, R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages  $\phi$ KZ and EL. *Molecular Microbiology*, 65(5), 1334–1344.
- Cai, Y., Kumai, S., Ogawa, M., Benno, Y. y Nakase, T. (1999) Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2901–6.
- 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.
- Callon, C., Millet, C. y Montel, M.C. (2004) Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research*. 71:231–44.

- Castelain, M., Duviau, M. P., Canette, A., Schmitz, P., Loubière, P., Cocaïgn-Bousquet, M., y Mercier-Bonin, M. (2016). The nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* pili are conditioned by the polymerized backbone pilin. *PLoS ONE*, 11(3): 1–18.
- Chapot-Chartier, M.P., y Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(Supp 1): S9.
- Cheng, J., Randall, a. Z., Sweredoski, M. J., y Baldi, P. (2005). SCRATCH: A protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), 72–76.
- Chou, P. Y., y Fasman, G. D. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry*, 13(2), 222–245.
- Cibik, R., Tailliez, P., Langella, P., y Chapot-Chartier, M. P. (2001). Identification of Mur, an atypical peptidoglycan hydrolase derived from *Leuconostoc citreum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 858–864.
- Claes, I.J., Schoofs, G., Regulski, K., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.P., Rolain, T., Hols, P., von Ossowski, I., Reunanen, J. y de Vos, W.M. (2012). Genetic and biochemical characterization of cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PLoS One*, 7e31588
- Clatworthy, A. E., Pierson, E., y Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3(9): 541–548.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., y Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1): 1–20.
- Collins, M. D., Williams, A. M., y Wallbanks, S. (1990). The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiology Letters*, 70(3): 255–262.
- Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino E. y Grazia, L. (1997). Survey of lactic acid bacteria isolated during the advanced stages of

the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *Journal of Dairy Research*, 64: 305–10.

- Cuff, J. A. y Barton, G. J. (1999). Evaluation and improvement of multiple sequence methods for protein secondary structure prediction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 34, 508-519.
- Dajcs, J. J., Hume, E. B. H., Moreau, J. M., Caballero, A. R., Cannon, B. M., & O’Callaghan, R. J. (2000). Lysostaphin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in the rabbit. *American Journal of Ophthalmology*, 130(6), 544.
- Davies, J., y Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3): 417–433.
- De Vuyst, L., y E. J. Vandamme. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, p. 91–142. En L. de Vuyst and E. J. Vandamme (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology*.
- Dieye, Y., Oxaran, V., Ledue-Clier, F., Alkhalaf, W., Buist, G., Juillard, V., Lee, C.W., y Piard, J. C. (2010). Functionality of sortase a in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7332–7337.
- Dintner, S., Staroń, A., Berchtold, E., Petri, T., Mascher, T., y Gebhard, S. (2011). Coevolution of ABC transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in Firmicutes bacteria. *Journal of Bacteriology*, 193(15): 3851–3862.
- Doi, E., Shibata, D. and Matoba, T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Analytical Biochemistry*, 118:173–184.
- Douillard, F.P., y de Vos, W.M. (2014). Functional genomics of lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13 (Supp1):S8
- Farrand, A. J., Haley, K. P., Lareau, N. M., Heilbronner, S., McLean, J. A., Foster, T., y Skaar, E. P. (2015). An iron-regulated autolysin remodels the cell wall to facilitate heme acquisition in *Staphylococcus lugdunensis*. *Infection and Immunity*, 83(9), 3578–3589.

- Franz C.M.A.P., Akito, E., Abriouel, H., Van Reenen, C.A., Gálvez, A., y Dicks, L.M., (2012). The Genus *Pediococcus*, p. 360-376. En Holzapfel, W.H., y Wood, B.J.B, Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy.
- Felis, G., Salvetti, E., y Torriani, S. (2016). Systematics of Lactic Acid Bacteria: Current Status, p 1-18. En Mozzi, F, Raya, R, y Vignolo, G.M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria
- Frirdich, E., y Gaynor, E.C. (2013). Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 16,767-779
- 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.E., González-Canto, A., Peña-Montes, C., Rodríguez-Sanoja, R., Sanchez, S., Farrés, A. (2015). Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(20), 8563-8573.
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C. E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., y Quirasco, M. (2014). Antibacterial activity produced by Enterococcus spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 26–34.
- 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.
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J., y Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, 120(1), 97–120.

- Geller, B. L., Ivey, R. G., Trempy, J. E., y Hettinger-smith, B. (1993). Cloning of a chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* C2. *Journal of Bacteriology*, 175(17), 5510–5519.
- Geourjon, C., y Deleage, G. (1995). Significant improvements in protein secondary structure prediction by prediction from multiple alignments. *Computation Applied Bioinformatics, in press* (6), 681–684.
- Gevers, D., Huys, G., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Debevere, J. y Swings, J. (2000) Isolation and identification of tetracycline resistant lactic acid bacteria from pre-packed sliced meat products. *Systematic and Applied Microbiology* 23: 279–84.
- Golomb, B. L., y Marco, M. L. (2015). *Lactococcus lactis* metabolism and gene expression during growth on plant tissues. *Journal of Bacteriology*, 197(2), 371–381.
- Hacker, J.D. (2010). Decennial Life Tables for the White Population of the United States, 1790–1900. *Historical Methods*. 43(2): 45-79.
- Hawiger, J. (1968). Purification and properties of lysozyme produced by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 95(2): 376–384.
- Heffernan, R., Paliwal, K., Lyons, J., Dehzangi, A., Sharma, A., Wang, J., y Zhou, Y. (2015). Improving prediction of secondary structure, local backbone angles and solvent accessible surface area of proteins by iterative deep learning. *Scientific Reports*, 5(1); 11476.
- Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D. y de Vos, W.M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S rDNA. *Applied Environment Microbiology*. 68: 114–23.
- Hernández-Maldonado, M. (2017) *Caracterización de enzimas con actividad antimicrobiana de Bacillus pumilus GMA1*. Facultad de Química UNAM
- Holland. R., Crow, V., y Curry B. (2011). *Pediococcus* spp. En Fuquay, J.W. (Ed), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 149-152). London: Academic Press.
- Huard, C., Miranda, G., Redko, Y., y Foster, S. J. (2004). Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase Complement of *Lactococcus lactis* : Identification of a

Third N- Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase Complement of *Lactococcus lactis*: Identification of a Third N- Acetylglucosaminidase , AcmC. *Applied Environmental and Microbiology*.70(6), 3493–3499.

- Hughey, V. L., y Johnson, E. A. (1987). Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease . Antimicrobial Activity of Lysozyme against Bacteria Involved in Food Spoilage and Food-Borne Disease. *Microbiology*, 53(9), 2165–2170.
- Humann, J. y Lenz, L. (2009). Bacterial peptidoglycan degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection. *Journal of Innate Immunity*, 1, 88-97.
- Jammal, J., Zaknoon, F., Kaneti, G., Hershkovits, A. S., & Mor, A. (2017). Sensitization of Gram-Negative Bacilli to Host Antibacterial Proteins. *Journal of Infectious Diseases*, 215(10), 1599–1607.
- Jaramillo-Giraldo, D., Mélenlez, A.P., y Sánchez-Medina, O.F. (2010). Evaluacion de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, (1)2:193-209
- Johnson, C.M. y Grossman, A.D. (2014). Identification of host genes that affect acquisition of an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 93 (6),1284-1301.
- Jones, D. T. (1999). GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *Journal of Molecular Biology*, 287(4), 797–815.
- Juven, B.J., Meinersmann, R.J. y Stern, N.J. (1991) Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 95–103.
- Kawamura, T., y Shockman, G.D. (1983). Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium*, a bacterial glycoenzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 9514-9521.

- Kim, M., Park, M., y Jeong, Y. (2012). Purification and characterization of lysozyme from filipino venus, *Ruditapes philippinarum*. *Food Science and Biotechnology*, 21(5), 1463–1468.
- Klaenhammer, T.R. (1993). *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39–85.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., y Siezen, R. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1-4), 29–58.
- Kobierecka, P. a., Olech, B., Ksiazek, M., Derlatka, K., Adamska, I., Majewski, P. M., y Wyszynska, A. K. (2016). Cell wall anchoring of the Campylobacter antigens to Lactococcus lactis. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–18.
- Koehler-Leman, J., Mueller, R., Karakas, M., Woetzel, N., y Meiler, J. (2013). Simultaneous prediction of protein secondary structure and transmembrane spans. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 81(7), 1127–1140.
- Koshiha, T., Hayashi, T., Miwako, I., Kumagai, I., Ikura, T., Kawano, K., y Kuwajima, K. (1999). Expression of a synthetic gene encoding canine milk lysozyme in Escherichia coli and characterization of the expressed protein. *Protein Engineering*, 12(5); 429–435.
- Kotesawa, G.R. y Burma, D.P.(1971). Purification and Properties of Phage P-22 Lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 246(21); 6474-6479
- Koth, C. M. M., y Payandeh, J. (2009). *Strategies for the cloning and expression of membrane proteins*. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (First edition, Vol. 76). Elsevier.
- Kowalczyk, M, Mayo, B., Fernández, M., y Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2016). Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of “Omic” Technologies, p 1-18. En Mozzi,F, Raya, R, y Vignolo, G.M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*
- Kurzak, P., Ehrmann, M.A. y Vogel, R.F. (1998) Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. *Systematic and Applied Microbiology* 21:588–92.

- Kuroki, R., y Yutani, K. (1998). Structural and thermodynamic responses of mutations at a Ca<sup>2+</sup> binding site engineered into human lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(51): 34310–34315.
- Kuwano, Y., Yoneda, K., Kawaguchi, Y., Araki, N., y Araki, T. (2013). The Complete Amino Acid Sequence and Enzymatic Properties of an i-Type Lysozyme Isolated from the Common Orient Clam (*Meretrix lusoria* ). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77(11): 2269–2277.
- Kyte, J., y Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Leclerc, D., y Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrilamide gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 749-753.
- Lee, A.C. y Fujio, Y. (1999). Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15: 57–62.
- Lei, V. y Jakobsen, M. (2004). Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 384–97.
- Li, Y., Jin, K., Setlow, B., Setlow, P., y Hao, B. (2012). Crystal structure of the catalytic domain of the *Bacillus cereus* SleB protein, important in cortex peptidoglycan degradation during spore germination. *Journal of Bacteriology*, 194(17), 4537–4545. <http://doi.org/10.1128/JB.00877-12>
- Lin, C. L., Bolsen, K.K. y Fung, D.Y.C. (1992) Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling periods of alfalfa and maize. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 375–87.
- Lunin, V. V., Dobrovetsky, E., Khutoreskaya, G., Zhang, R., Joachimiak, A., Doyle, D. A., Bochkarev, A., Maguire, M. E., Edwards, A. M., y Koth, C. M. (2006). Crystal structure of the CorA Mg<sup>2+</sup> transporter. *Nature* 440, 833–837.

- Lorca, G. L., Wadström, T., Font de Valdez, G., & Ljungh, Å. (2001). Lactobacillus acidophilus autolysins inhibit Helicobacter pylori in vitro. *Current Microbiology*, 42(1), 39–44.
- Ma, Y., Xu, W., Zhang, J., Zhang, S., Hong, K., Deng, Z., & Sun, Y. (2014). Nitrilase superfamily aryl acylamidase from the halotolerant mangrove Streptomyces sp. 211726. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(20), 8583–8590.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. y Clark D.P.(2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid. Addison-Wesley.
- Makarova, K.S., y Koonin, E.V. (2007). Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 189(4), 1199-1208
- Matamoros Ortega, S.C. (2013). Identificación de la actividad lítica de la proteína similar a transportador ABC en *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. (Tesis de Maestría), Facultad de Química UNAM.
- Mora, D., Fortina, M.G., Parini, C., Daffonchio, D., y Manachini, P.L. (2000). Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin AcH-PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiology*, 146, 2027-2038.
- Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M.G., Senini, L., y Manachini, P.L. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 561-570.
- Mugula, J.K., Nannko, S.A., Narvhus, J.A. y Sorhaug, T. (2003) Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. 80: 187–99.
- Myrnes, B., Seppola, M., Johansen, A., Øverbø, K., Callewaert, L., Vanderkelen, L.,y Nilsen, I. W. (2013). Enzyme characterisation and gene expression profiling of Atlantic salmon chicken- and goose-type lysozymes. *Developmental and Comparative Immunology*, 40(1):11–19.

- Naknukool, S., Hayakawa, S., Uno, T., y Ogawa, M. (2009). Antimicrobial Activity of Duck Egg Lysozyme Against *Salmonella enteritidis*. *Global Issues in Food Science and Technology* (First Edition). Elsevier Inc.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 113–128.
- Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P. y Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied Environment Microbiology* 68: 3691–701.
- OMS (WHO) (2016). Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. Disponible en :  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf)
- Ouwenhand, A.C, y Vesterslund S.(2004). *Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria*, p.375-396. En Salminen, S., Von Wright, A., y Ouwenhand, A.C. (ed.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. Marcel Dekker, New York, USA
- Oxaran, V., Ledue-Clier, F., Dieye, Y., Herry, J. M., Pechoux, C., Meylheuc, T., y Piard, J. C. (2012). Pilus biogenesis in *Lactococcus lactis*: molecular characterization and role in aggregation and biofilm formation. *PLoS.One.*, 7(12), e50989
- Palmer, I., y Wingfield, P. T. (2004). Preparation and extraction of insoluble (Inclusion body) proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols Protein Science*, (8 M), 1–25.
- Paludan-Muller, C., Madsen, M., Sophanodora, P., Gram, L. y Moller, P.L. (2002) Fermentation and microflora of plaasom, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. *International Journal of Food Microbiology*. 73: 61–70.
- Pei, J., y Grishin, N. V. (2005). COG3926 and COG5526: a tale of two new lysozyme-like protein families. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 14(10): 2574–81.

- Pérez, R.H., Zendo, T., y Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13 (Suppl 1):S3
- Permyakov, S. E., Khokhlova, T. I., Uversky, V. N., y Permyakov, E. A. (2010). Analysis of Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> selectivity in alpha-lactalbumin and Ca(2+)-binding lysozyme reveals a distinct Mg(2+)-specific site in lysozyme. *Proteins*, 78, 2609–2624.
- Pitchard, D.G., Dong, S., Baker, J.R., y Engler, J.A. (2004). The bifunctional of peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*, 150 (Pt 7), 2079-2087.
- Pitt-Rivers, R. (1963). The Effects of Detergents on Autolysis of <sup>131</sup>I-Labelled Rat Thyroid Homogenates. *Biochemistry Journal*, 90, 629-632
- Pollastri, G., y McLysaght, A. (2005). Porter: A new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*, 21(8), 1719–1720.
- Quintela, J. C., de Pedro, M. A., Zollner, P., Allmaier, G., y Garcia-del Portillo, F. (1997). Peptidoglycan structure of *Salmonella typhimurium* growing within cultured mammalian cells. *Molecular Microbiology*, 23(4), 693–704.
- Raccach, M. (2014). *Pediococcus*. En C.A. Batt y M.L. Tortorello (Eds), *Encyclopedia of Food Microbiology* (3) pp. 1-6. London: Academic Press.
- Repaske, R. (1956). Lysis of gram-negative bacteria by lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 22(1), 189–191.
- Rivera Quiroz, J. (2004). Evaluación del efecto de bioconservación al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo iniciador. (Tesis de Maestría). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.
- Samuelson, K. J., Rupnow, J. H., & Froning, G. W. (1985). The effect of lysozyme and ethylenediaminetetraacetic acid on *Salmonella* on broiler parts. *Poultry Science*, 64(8), 1488–1490.
- Sahdev, S, Khattar, S.K. y Saini, K.S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistr*, 307:249–264.

- Schleifer, K. H., y Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36(4); 407–477.
- Sharif, S., Singh, M., Kim, S. J., y Schaefer, J. (2009). *Staphylococcus aureus* peptidoglycan tertiary structure from carbon-13 spin diffusion. *Journal of the American Chemical Society*, 131(20): 7023–7030.
- Sharma, A. K., Kumar, S., K., H., Dhakan, D. B., y Sharma, V. K. (2016). Prediction of peptidoglycan hydrolases- a new class of antibacterial proteins. *BMC Genomics*, 17(1), 411.
- Sims, W. (1986) The isolation of pediococci from human saliva. *Archives of Oral Biology*. 11: 967–72.
- Simossis, V. A, Taylor, W. R., y Heringa, J. (2005). A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(2), 152–159.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 41.
- Smith, S.M. (2011). Strategies for the Purification of Membranes Proteins, p 485-495. En Walls, D., y Loughran S.T. Protein Chromatography: Methods and Protocols
- Stamer, J.R. (1983) *Lactic acid fermentation of cabbage and cucumbers*. In: Reed, G. (ed.), Biotechnology, Vol. 5. Weinheim: Verlag Chemie, pp. 365–78.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70, 331-345.
- Stiles, M. E., y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29.
- Szweda, P., Kotłowski, R., ŁąCka, I., y Synowiecki, J. (2007). Protective effect of lysostaphin from *Staphylococcus simulans* against growth of *Staphylococcus aureus* in milk and some other food products. *Journal of Food Safety*, 27(3), 265–274.

- Tanasupawat, S., Pakdeeto, A., Thawai, C., Yukphan, P. y Okada, S. (2007) Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp. nov. *Journal of General and Applied microbiology*. 53: 7–15.
- Taylor, K. A C. C. (1996). A Simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid, 56(4).
- Tian, P. J., Li, B. L., Shan, Y. J., Zhang, J. N., Chen, J. Y., Yu, M., y Zhang, L. W. (2015). Extraction of Peptidoglycan from *L. aracasei* subsp. *Paracasei* X12 and Its Preliminary Mechanisms of Inducing Immunogenic cell Death in HT-29 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 20033–20049.
- Toshima, G., Kawamura, S., Araki, T., Torikata, T. (2003). Histidine-114 at Substitutes E and F can explain the characteristics enzymatic activity of guinea hen egg-white lysozyme. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(3), 540-546
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., y Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 28(1):1–8.
- Turkiewicz, M., Kalinowska, H., Zielńska, M., y Bielecki, S. (2000). Purification and characterization of two endo-1,4-beta-xylanases from Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 127(3), 325–35.
- Uttatree, S., Winayanuwattikun, P., y Charoenpanich, J. (2010). Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(5), 1362–1376.
- Valenzuela Rosas, A. (2012). *Caracterización de las peptidoglucano hidrolasas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química UNAM

- Velasco Pérez, L.Y. (2010). *Caracterización y espectro antibacteriano de la Peptidoglucano Hidrolasa de Pediococcus acidilactici ATCC*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química UNAM.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* (2015), 40(4), 277–83.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., y Foster, S., (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 259-286.
- Von Heijne, G. (1992). Membrane Protein Structure Prediction. *Journal of Molecular Biology*, 225, 487–494
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K. y Hammes, W.P. (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Environment Microbiology*. 67: 2578–85.
- Wang, S., y Chang, W. (1997). Purification and characterization of two bifunctional chitinases / lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2): 380–386.
- Wilderdyke, M.R., Smith, D.A. y Brashears, M.M. (2004) Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria from alfalfa sprouts for competitive inhibition of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 67: 947–51.
- Wołosowska, S., & Synowiecki, J. (2004). Thermostable  $\beta$ -glucosidase with a broad substrate specificity suitable for processing of lactose-containing products. *Food Chemistry*, 85(2), 181–187.
- Wu, S., y Zhang, Y. (2008). MUSTER: Improving protein sequence profile-profile alignments by using multiple sources of structure information. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 72(2), 547–556.
- Xue, Q.-G., Schey, K. L., Volety, A. K., Chu, F.-L. E., y La Peyre, J. F. (2004). Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(1): 11–25.

- Yousif, N.M.K., Huch, M., Schuster, T. *et al.* (2010) Diversity of lactic acid bacteria from Hussuwa, a traditional African fermented sorghum food. *Food Microbiology*. 27: 757–68.
- Zhang, B., Tong, H. y Dong, X. (2005) *Pediococcus cellicola* sp. nov., a novel lactic acid coccus from a distilled-spirit fermenting cellar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 2167–70.
- Zhang, J.G., Cai, Y., Kobayashi, R. y Mukai, S. (2000) Characteristics of lactic acid bacteria isolated from forage crops and their effects on silage fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 1455–60.

## MANUALES

- Amidase.Enzymatic Assay (Sigma- Aldrich®) Disponible en :  
[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General\\_Information/2/amidase.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/2/amidase.pdf)
- Bio-Rad Protein Assay Disponible en: [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_9004.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf)
- $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase Assay Kit. Technical Bulletin. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/cs0780bul.pdf>
- Fas tAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase Protocol. Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012878\\_FastAP\\_Thermo\\_Alkaline\\_Phosphatase\\_ef0654\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012878_FastAP_Thermo_Alkaline_Phosphatase_ef0654_UG.pdf)
- Genomic Extaction Kit Fast ID Protocol. Disponible en: [http://www.fastidkit.com/Products/Genomic\\_DNA\\_Extraction\\_Kit/Protocol](http://www.fastidkit.com/Products/Genomic_DNA_Extraction_Kit/Protocol)
- GeneJET Gel Extraction Kit - Thermo Fisher Scientific® Protocol. Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012661\\_GeneJET\\_Gel\\_Extraction\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_UG.pdf)
- Ligase T4 Promega® Protocol. Disponible en: <https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Product%20Information%20Sheets/G/T4%20DNA%20Ligase%20Blue%20White%20Cloning%20Qualified%20Protocol.pdf>

- Long PCR Enzyme Mix Manual Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012920\\_Long\\_PCR\\_Enzyme\\_k0181\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012920_Long_PCR_Enzyme_k0181_UG.pdf)
- Mini-PROTEAN® 3 Cell Instruction Manual. Disponible en: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006157B.pdf>
- Novagen® pET System Manual. Disponible en: <http://richsingiser.com/4402/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>
- Protein characterization using size exclusion chromatography Webinar General Electric. Disponible en: [https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjOj\\_3tkdnYAhUszoMKHYp6AdAQFgg0MAE&url=http%3A%2F%2Fproteins.gelifsciences.com%2F~%2Fmedia%2Fimages%2Fprotein-blog-and-news%2Fprotein-skills-blog%2Fqanda-sec-webinarproteincharacterization.pdf%3Fla%3Den&usg=AOvVaw19YPakOI6ynDIQMkdkxDvm](https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjOj_3tkdnYAhUszoMKHYp6AdAQFgg0MAE&url=http%3A%2F%2Fproteins.gelifsciences.com%2F~%2Fmedia%2Fimages%2Fprotein-blog-and-news%2Fprotein-skills-blog%2Fqanda-sec-webinarproteincharacterization.pdf%3Fla%3Den&usg=AOvVaw19YPakOI6ynDIQMkdkxDvm)
- Thermo Scientific NcoI Enzyme Disponible en: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012148\\_NcoI\\_10\\_UuL\\_1000U\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012148_NcoI_10_UuL_1000U_UG.pdf)
- Thermo Scientific XhoI Enzyme Disponible en: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012148\\_NcoI\\_10\\_UuL\\_1000U\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012148_NcoI_10_UuL_1000U_UG.pdf)
- Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012655\\_GeneJET\\_Plasmid\\_Miniprep\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012655_GeneJET_Plasmid_Miniprep_UG.pdf)
- TOPO® TA Cloning Kit, Invitrogen™. Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf)

#### PROGRAMAS

- BLAST (NCBI). Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- BLAST (UNIPROT-KB). Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- CFSSP. Disponible en : <http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>
- DAS. Disponible en : <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>
- GOR. Disponible en : [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_gor4.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html)

- HH-PRED. Disponible en: <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>
- HMMTOP. Disponible en: <http://www.enzim.hu/hmmtop/>
- JPRED. Disponible en: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>
- Jufo9D. Disponible en:  
[http://www.meilerlab.org/index.php/bclcommons/show/b\\_apps\\_id/2](http://www.meilerlab.org/index.php/bclcommons/show/b_apps_id/2)
- MEMSAT 3. Disponible en :  
[http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/software\\_downloads/memsat/](http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/software_downloads/memsat/)
- MEMSAT SVM. Disponible en.  
<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?memsatsvm=1>
- MUSTER. Disponible en: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/MUSTER/>
- OCTOPUS. Disponible en: <http://octopus.cbr.su.se/>
- PHILIUS. Disponible en: <https://noble.gs.washington.edu/proj/philius/>
- PORTER. Disponible en : <http://distillf.ucd.ie/porterpaleale/>
- Predictor Protein. Disponible en: <https://www.predictprotein.org/>
- PSIPRED. Disponible en: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>
- PHOBIUS. Disponible en <http://phobius.sbc.su.se/>
- PHOBIUS Quick 2D. Disponible en :  
[https://toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2\\_d](https://toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2_d)
- Poly-PHOBIUS. Disponible en : <http://phobius.sbc.su.se/poly.html>
- PHYRE. Disponible en:  
<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>
- PRED-TAT. Disponible en: <http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/>
- Predisi. Disponible en : <http://www.predisi.de/>
- RAPTOR X. Disponible en: <http://raptorx.uchicago.edu/>
- SCAMPI Disponible en :<http://scampi.bioinfo.se/>
- SOPMA. Disponible en: [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)
- SCRATCH Protein 3 Class y SCRATCH Protein 8 Class. Disponible en :  
<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>
- SignallP4.1Server. Disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

- Sig-Pep . Disponible en  
<http://sigpep.services.came.sbg.ac.at/signalblast.html>
- SPIDER2. Disponible en : <http://sparks-lab.org/yueyang/server/SPIDER2/>
- SOSUI. Disponible en: <http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>
- SOSUI Signal. Disponible en: [http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal\\_submit.html](http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html)
- SPOCTOPUS. Disponible en:  
<http://octopus.cbr.su.se/index.php?about=SPOCTOPUS>
- SWISS-MODEL. Disponible en: <http://swissmodel.expasy.org/interactive>
- TatP1.0. Disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>
- TMHMM. Disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>
- TMPRED. Disponible en :  
[http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)
- TOPCONS/SCAMPI. Disponible en : <http://topcons.cbr.su.se/>
- TOP-Pred. Disponible en : <https://omictools.com/toppred-tool>
- T-COFFEE. Disponible en: <http://tcoffee.crg.cat/>
- YASPIN. Disponible en : <http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>

#### PAGINAS DE INTERNET

- Esperanza de vida en Estados Unidos de América  
<https://www.cdc.gov/nchs/fastats/life-expectancy.htm> (Revisado el 13 de octubre de 2017).
- Esperanza de vida en México <http://www.who.int/countries/mex/en/>  
(Revisado el 13 de octubre de 2017).
- Reporte de la ONU y OMS sobre bacterias multirresistentes:  
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/> (Revisado el 13 de octubre de 2017).
- Base de datos BRENDA. Enzima EC 3.2.1.17 (Lisozima).  
<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.17> (Revisado por ultima vez el 13 de octubre de 2017)