



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR(A) EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ADRIANA DE NUESTRA SEÑORA DEL SAGRADO
CORAZÓN LLORENTE BOUSQUETS

DIRECTOR(A) DE TESIS: DRA. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE
FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

MÉXICO, D. F.

JUNIO 2008



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.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR TENER UN CAMINO PARA MI

UN PROFUNDO AGRADECIMIENTO AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR PERMITIRME REALIZAR ESTE PROYECTO DE DOCTORADO

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) POR LA BECA 23428 OTORGADA PARA ESTUDIOS DE DOCTORADO

Y TAMBIÉN POR EL APOYO AL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA CLAVE 35428-B QUE DIO LUZ VERDE AL INICIO DE ESTE PROYECTO DOCTORAL

UN AGRADECIMIENTO A LA DIRECCIÓN DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA) DE LA UNAM POR EL APOYO A LOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA CON CLAVES:

- IN209100
- IN210103
- IN210606

Y POR EL APOYO COMO BECARIA DEL PROGRAMA DE SUPERACIÓN AL PERSONAL ACADÉMICO (PASPA) DE LA FES-CUAUTITLÁN

A LA DRA. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ SARAVIA TUTORA PRINCIPAL, POR EL GRAN APOYO E INTERÉS EN ESTE PROYECTO DOCTORAL Y POR HABERME PERMITIDO EXPLORAR LOS CAMINOS DE LA BIOCONSERVACIÓN DE ALIMENTOS PARA BUSCAR ALTERNATIVAS MÁS INOCUAS

AGRADEZCO DE MANERA MUY ESPECIAL A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
DRA. ROMINA MARÍA DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA
DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

POR EL CONTINUO APOYO AL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DOCTORAL Y EL ENRIQUECIMIENTO QUE CADA UNO EN SU EXPERTIZ COMPARTIÓ INCONDICIONALMENTE

A LA M. EN C. SANDRA PÉREZ MUNGUÍA POR SU APOYO EN LA CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEINASAS

A LOS PROFESORES Y COMPAÑEROS DE LOS LABORATORIOS 312, 324 Y 105 POR SU CONSTANTE APOYO

INDICE GENERAL

	Pág.
INDICE GENERAL	1
INDICE DE TABLAS	5
INDICE DE FIGURAS	6
RESUMEN	10
SUMMARY	11
Introducción	12
1. Marco Teórico	15
1. Bioconservación	15
2. Bacterias acidolácticas (BAL)	15
2.1 Metabolitos con actividad antibacteriana producidos por BAL	16
2.2 Actividad antibacteriana de sobrenadantes de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	16
2.3. Aplicación de la cepa <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 en la elaboración de salamis	17
2.3.1. Calidad sanitaria de salamis bioconservados	19
2.4. Bacteriocinas	20
2.4.1. Clasificación de bacteriocinas	21
2.4.2. Modo de acción de las bacteriocinas	23
2.5. Clasificación de proteasas	25
2.5.1. Proteasas y antagonismo	26
2.6. Peptidoglicano hidrolasas	27
2.6.1. Función de peptidoglicano hidrolasas	28
2.6.2. Técnicas turbidimétricas y zimográficas en la detección de actividad lítica	30
2.6.3. Sitios de reconocimiento de PGH en bacterias Gram positivas	31
2.7. Proteasas bacterianas con capacidad bacteriolítica	34
2.7.1. Bacteriolisinas de Gram positivas	36
OBJETIVOS DEL TRABAJO	
General	37
Particulares	37
HIPÓTESIS	38
2. MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Caracterización de la cepa de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	39
1.1. Cepas bacterianas	39
1.1.1. Preparación de esferas de vidrio	39
2. Medios de cultivo y condiciones de producción	40
2.1. MRS modificado	40
2.1.1. Preparación de la sacarosa	41
2.1.2. Preparación del ácido ascórbico	41
2.2. Preparación de inóculos y fermentación	41

2.2.1.	Preparación de sobrenadantes	41
2.3.	Caldo de Soya Tripticaseína Extracto de Levadura Sacarosa (CSTES)	42
2.3.1.	Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i>	42
3.	Perfil de fermentación de carbohidratos con el sistema API CH50	43
4.	Amplificación y detección por PCR de los genes 16S y <i>ldh</i> de cepas de <i>Pediococcus</i>	43
4.1.	Extracción del ADN total de <i>P. acidilactici</i> (Anderson y McKay 1993, modificado por Llorente)	43
4.2.	Síntesis de primers y PCR	44
4.2.1.	Análisis de productos de PCR	46
4.3.	Identificación de la presencia de plásmidos	47
4.4.	Detección de la presencia del gen <i>pedB</i> por PCR	47
4.4.1.	Síntesis de primers y PCR	47
4.4.2.	Análisis de productos de PCR	49
5.	Evaluación del daño a microorganismos susceptibles	49
5.1.	Pruebas microbiológicas	50
5.1.1.	Prueba de difusión en agar	50
5.1.1.1.	Preparación de los microorganismos susceptibles	50
5.1.1.2.	Producción de la actividad antibacteriana en las distintas fases de crecimiento bacteriano	51
5.1.2.	Espectro de actividad antibacteriana	52
5.1.3.	Viabilidad de microorganismos	52
5.1.3.1.	Curvas “time-kill” (UFC mL ⁻¹) (NCCLS, 1991)	52
5.1.3.2.	Prueba de dilución en caldo (NCCLS, 1991)	52
5.1.3.3.	Características coloniales	53
5.1.4.	Observación de cambios morfológicos al microscopio óptico	53
5.2.	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	53
5.2.1.	Preparación de células para su observación al MEB	53
5.3.	Búsqueda de otras sustancias con actividad antibacteriana producidas por la cepa 8042 diferentes a las pediocinas	55
5.3.1	Ácido láctico-lactato de sodio	55
5.3.1.1.	Ácido láctico-lactato de sodio en la inhibición de <i>S. aureus</i> y <i>L. innocua</i>	55
5.3.2.	Determinación cualitativa de la producción de reuterina	55
6.	Detección primaria de actividad enzimática extracelular	56
6.1.	Preparación del stock de sobrenadante de cultivo en fase logarítmica en MRS	57
6.2.	Determinación de proteína soluble por el método de Bradford (Volumen Reducido)	57
6.3.	Determinación del perfil electroforético por SDS-PAGE (Tris Glicina) de los sobrenadantes de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i>	58
6.4.	Determinación de actividad de proteínasa por métodos espectrofotométricos	58
6.4.1.	Curva patrón de tirosina	59
6.4.2.	Curva patrón de tripsina	59
6.4.3.	Reacción de hidrólisis enzimática	60
6.4.4.	Sustratos proteínicos	60
6.4.4.1.	Azocaseína	61

6.4.4.2.	Elastina	61
6.4.4.3.	Colágeno	62
6.5.	Detección de actividad de proteinasa por técnicas zimográficas	62
6.5.1.	Efecto de inhibidores de metaloproteasas	63
6.5.2.	Termosensibilidad	63
6.6.	Detección de actividad peptidoglicano hidrolasa por técnicas zimográficas	64
6.6.1.	Actividad peptidoglicano hidrolasa intracelular	64
6.6.1.1.	Inhibidores de proteasas	66
6.6.2.	Actividad peptidoglicano hidrolasa extracelular	66
6.6.2.1.	Termosensibilidad	66
6.7.	Detección de actividad peptidoglicano hidrolasa extracelular por Espectrofotometría	67
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
1.	Caracterización de la cepa de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	68
1.1.	Perfil de fermentación de carbohidratos	68
1.2.	Análisis de los productos de la amplificación por PCR del gen 16S ARNr	69
1.3.	Análisis de los productos de la amplificación del gen <i>ldh</i> por PCR	70
1.4.	Verificación de la presencia de plásmidos	71
1.5.	Búsqueda del gen <i>pedB</i> mediante amplificación por PCR	72
2.	Evaluación del daño de microorganismos susceptibles mediante pruebas de actividad antibacteriana	74
2.1.	Efecto del medio de cultivo y condiciones de producción en la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de la cepa 8042	74
3.	Cuantificación de Ácido Láctico producido por la cepa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.	77
4.	Determinación cualitativa de la producción de reuterina	78
5.	Actividad antibacteriana similar a la producida por bacteriocinas	79
6.	Producción de la actividad antibacteriana de <i>P. acidilactici</i>	81
6.1.	Sobrenadantes de cultivo en distintas fases de crecimiento en pruebas de difusión en agar	81
6.2.	Identificación del espectro de actividad antibacteriana producido por los sobrenadantes de cultivo de la cepa 8042 sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos	82
6.3.	Viabilidad de microorganismos	84
6.4.	Cambios morfológicos	85
6.5.	Observación al MEB del efecto antibacteriano de los sobrenadantes de <i>P. acidilactici</i> sobre <i>S. aureus</i> y <i>L. innocua</i>	87
6.6.	Curvas “time-kill” (UFC mL ⁻¹) (NCCLS, 1991)	88
6.7.	Identificación de la fracción de sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i> con actividad inhibitoria	89
7.	Determinación de actividad de proteinasa	92
7.1.	Determinación del perfil electroforético por SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo	93
7.2.	Determinación de actividad proteolítica en dispersión	95
7.3.	Detección de proteinasas por técnicas zimográficas	98
7.3.1.	Actividad sobre diferentes sustratos proteínicos	99

7.3.2.	Efecto de inhibidores de proteasas	101
7.3.3.	Termosensibilidad	103
7.3.4.	Influencia de la presencia de iones en el perfil de actividad gelatinasa	105
8.	Actividad peptidoglicano hidrolasa	108
8.1.	Detección de actividad extracelular por técnicas zimográficas	108
8.2.	Detección de actividad extracelular por técnicas espectrofotométricas	109
8.3.	Detección de actividad intracelular por técnicas zimográficas	113
	CONCLUSIONES	117
	LITERATURA CITADA	121
	ANEXOS	131

	ÍNDICE DE TABLAS	Pág.
1.	Metabolitos con actividad antibacteriana producidos por bacterias acidolácticas	16
2.	Espectro de actividad antibacteriana de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i>	17
3.	Bacteriocinas Clase IIa (familia de las pediocinas) producidas por diferentes especies de BAL	21
4.	Cepas bacteriocinogénicas del Género <i>Pediococcus</i>	21
5.	Producción de pediocinas PA-1/AcH y PD-1 por diferentes especies de <i>Pediococcus</i>	22
6.	Clasificación de peptidasas según el Sistema EC	26
7.	Tipos catalíticos de enzimas peptidasas	26
8.	Proteasas bacterianas con capacidad bacteriolítica	35
9.	Bacteriolisinas de bacterias Gram positivas	36
10.	Medio MRS modificado por Llorente (1998)	41
11.	Medio Caldo de soya tripticaseína-extracto de levadura-sacarosa	42
12.	Secuencia y posición de los primers usados en la PCR	45
13.	Mezcla de reacción para la identificación de cepas de <i>Pediococcus</i> por PCR	45
14.	Combinación de primers para la identificación de cepas de <i>Pediococcus</i> por PCR	45
15.	Condiciones de reacción empleadas para la amplificación por PCR	46
16.	Secuencia de los primers usados en la detección del gen <i>pedB</i> por PCR	47
17.	Mezcla de reacción para PCR para la detección del gen <i>pedB</i>	48
18.	Reacciones para la detección del gen <i>pedB</i>	49
19.	Condiciones de PCR para la detección del gen <i>pedB</i>	49
20.	Soluciones de fosfatos de sodio para preparar la solución de Sorenson's	54
21.	Reacción enzimática con azocaseína	61
22.	Reacción enzimática (Continuación)	61
23.	Perfil de fermentación de carbohidratos de <i>P. acidilactici</i>	69
24.	Ácido Láctico (%) producido por <i>Pediococcus acidilactici</i> en medio MRS y CSTES	77
25.	Resultados de las pruebas de inhibición de <i>S. aureus</i> en BHI al adicionar lactato de sodio	78
26.	Resultados de la prueba de difusión en agar con sobrenadantes de cultivo de la cepa 8042 en diferentes fases de crecimiento con <i>S. aureus</i> o <i>L. innocua</i> como microorganismos susceptibles	82
27.	Efecto de la dosis de sobrenadante de <i>P. acidilactici</i> en MRS en la inhibición de <i>S. aureus</i> (UFC mL ⁻¹)	89
28.	Efecto de la dosis de fracciones de sobrenadante de <i>P. acidilactici</i> en MRS en la inhibición de <i>S. aureus</i> (UFC mL ⁻¹)	89
29.	Características de las pediocinas PA-1/AcH, PD-1 y de la actividad antibacteriana observada en sobrenadantes de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	91
30.	Resultados de la actividad proteolítica de sobrenadante de cultivo de <i>P.</i>	95

	<i>acidilactici</i>	
31.	Efecto del tratamiento térmico e inhibidores de proteasas en la actividad elastasa de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> con Elastina rojo Congo	106
32.	Resultados de actividad lítica de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i>	109
33.	Cuadro resumen de los resultados de actividad proteolítica y lítica de los sobrenadantes de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	116
34.	Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Bradford (Volumen reducido)	133
35.	Curva patrón de tirosina	134
36.	Curva patrón de tripsina	135

	ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
1.	Árbol filogenético de las bacterias acidolácticas	15
2.	Embutidos tipo salami de 24 h de elaboración	18
3.	Embutidos tipo salami de 96 h de elaboración	18
4.	Evolución de pH y microbiota en salamis	19
5.	Esquema “Universal” de clasificación de bacteriocinas	23
6.	Modo de acción de Bacteriocinas	24
7.	Definiciones aceptables para la mayoría de enzimas proteolíticas	25
8.	Estructura de la pared celular bacteriana	27
9.	Composición del peptidoglicano de bacterias Gram positivas	28
10.	Sitios de reconocimiento de las peptidoglicano hidrolasas bacterianas	29
11.	Sitio de reconocimiento de PGH en los inter péptidos del PG	32
12.	Estructura de PG de <i>S. aureus</i> y sitios de reconocimiento de PGH	32
13.	Interacción propuesta de la unión de lisozima y peptidoglicano de <i>S. aureus</i>	33
14.	Estructura de ácidos lipoteicoicos en pared celular de bacterias Gram positivas	34
15.	Operón de la pediocina	48
16.	Siembra en placa de serie de diluciones decimales	51
17.	Caracterización de la actividad enzimática extracelular del sobrenadante de cultivo de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	56
18.	Producto de PCR del gen ARNr 16S	70
19.	Gel de Agarosa con los fragmentos de PCR esperados de los genes 16S ARNr y <i>ldh</i> para <i>P. acidilactici</i> y <i>P. pentosaceus</i>	71
20.	Plásmidos identificados de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	72
21.	Fragmentos de PCR obtenidos con los primers específicos para el gen de la pediocina pedB con ADN genómico y plasmídico de <i>P. acidilactici</i>	73
22.	Comparación de la inhibición obtenida con sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i> en MRS modificado y CSTES	76
23.	Cinética de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> en MRS modificado	77
24.	Vía oxidativa de la degradación de glicerol de BAL homofermentativas	78
25.	Resultados de la prueba de difusión en agar con sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> sobre <i>S. aureus</i>	80
26.	Resultados de la prueba de difusión en agar con sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> sobre <i>L. innocua</i>	80
27.	Resultados de la prueba de difusión en agar con los sobrenadante de cultivo de la cepa 8042 en medio MRS modificado obtenidos en diferentes fases de crecimiento.	80
28.	Gráficas de inhibición de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 sobre diferentes micoorganismos susceptibles	84
29.	Cambios morfológicos y coloniales de células de <i>S. aureus</i> tratadas con diferentes sobrenadantes de cultivo de 8 h de <i>P. acidilactici</i>	86
30.	Micrografías de MEB de células de <i>S. aureus</i> y <i>L. innocua</i>	88
31.	Resultados de la prueba de difusión en agar sobre <i>S. aureus</i> con	90

	sobrenadante completo y sus fracciones de cultivo de <i>Pediococcus</i>	
32.	Sensibilidad de los sobrenadantes a proteasas	91
33.	Perfil electroforético de sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i>	94
34.	Perfil electroforético de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> bajo diferentes tratamientos	95
35.	Resultados de actividad de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> en dispersiones de diferentes sustratos proteínicos	96
36.	Efecto del tratamiento térmico e inhibidores de proteasas en la actividad elastasa de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> con Elastina rojo Congo	98
37.	Actividad proteolítica de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> sobre zimogramas con diferentes sustratos	100
38.	Efecto del EDTA sobre la actividad gelatinasa y caseinolítica de los sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i>	101
39.	Efecto de PMSF sobre la actividad gelatinasa de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i>	102
40.	Efecto de inhibidores de proteasas adicionados después de la electroforesis sobre la actividad gelatinasa de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i>	102
41.	Comparación del efecto de PMSF sobre la actividad gelatinasa de sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> y de tripsina adicionados después de la electroforesis	103
42.	Efecto de las condiciones de manejo de las muestras de sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i> en su actividad gelatinasa	104
43.	Efecto del manejo de la muestra de sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i> y de la tripsina (control) en la actividad gelatinasa	104
44.	Efecto del pH y los iones metálicos en la actividad gelatinasa del sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i> bajo diferentes condiciones de reacción	105
45.	Zimogramas de actividad PGH de sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 con <i>Micrococcus lysodeikticus</i> como sustrato (Llorente, <i>et al.</i> , 2007).	110
46.	Zimogramas de actividad PGH de sobrenadante de cultivo de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 con <i>Staphylococcus aureus</i> como sustrato	110
47.	Producción de lisis celular de <i>S. aureus</i> por lisostafina de <i>S. simulans</i>	112
48.	Esquema del puente interpeptídico de PG de <i>S. aureus</i> que muestra los sitios de acción de la lisostafina	112
49.	Extractos celulares de <i>P. acidilactici</i> sobre <i>S. aureus</i> y sobre <i>L. innocua</i>	113
50.	Actividad lítica de extractos celulares de cepas productoras de pediocinas y 8042 sobre <i>M. lysodeikticus</i> .	114
51.	Perfil de actividad PGH de cepas productoras de pediocinas y 8042 sobre <i>M. lysodeikticus</i>	115
52.	Zimograma de actividad lítica de las cepas PAC1.0 y 8042 sobre <i>S. aureus</i> ATCC 13565 enterotoxigénica	115
53.	Secuencia del gen 16S de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	132
54.	Curva patrón de albúmina	132
55.	Barrido espectral de la tirosina (10-100 µg mL ⁻¹)	134

56.	Curva patrón de tripsina	135
57.	Curva de hidrólisis de caseína	136
58.	Barrido espectral de la curva de hidrólisis de Elastina rojo Congo	137
59.	Determinación turbidimétrica de actividad lítica de lisozima en células de <i>M. lysodeikticus</i>	138

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitros
μm	micras
μM	micromolar
aa	aminoácido
ACS	American Chemical Society
AOAC	American Official Analytical Chemists
APT	All purpose tween
ATCC	American Type Culture Collection
A_w	Actividad de agua
BAL	Bacterias acidolácticas
BHI	Infusión cerebro corazón
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLIS	Substancias similares a las bacteriocinas
CBB	Azul brillante de Commassie
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio-2-hydroxy-1-propane-sulfonate
CSTES	Caldo de Soya Trypticaseína Extracto de Levadura Sacarosa
DTT	1,4-Ditiotreitol
dNTP's	deoxirribonucleosidos 5'-trifosfato
D.O.	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Eh	Potencial óxido-reducción
<i>et al.</i>	y colaboradores
g	gramo
h	hora
GRAS	Generalmente reconocidos como seguros
HPA	hide powder azure
IBT	Instituto de Biotecnología
IFC	Instituto de Fisiología Celular
kDa	kilodaltones
L	litro
<i>ldh</i>	lactato deshidrogenasa
M	molar
MEB	Microscopio electrónico de barrido
MES	Bacterias Mesofílicas
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MPMBR	Marcadores de Peso Molecular de Amplio Rango
MPMHR	Marcadores de Peso Molecular Alto Rango
MPMLR	Marcadores de Peso Molecular Bajo Rango
Mur	Ácido N-acetilmurámico
MW	Peso molecular
MWCO	Corte de peso molecular
NAG	N-acetilglucosamina

NaOH	Hidróxido de sodio
NCCLS	National Committee Clinical Laboratory Standards
ng	nanogramos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PG	Peptidoglicano
pg	picogramos
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PGH	Peptidoglicano hidrolasa
pM	picomolar
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
S.a.	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Sodium Duodecyl Sulphate
Sn	sobrenadante
SSF	solución salina fisiológica
TCA	Ácido Tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino
UF	Ultrafiltrada
UFC mL ⁻¹	unidades formadoras de colonias por mililitro
USP	United States Pharmacopea (Farmacopea de los Estados Unidos)
v/v	volumen a volumen
w/v	peso a volumen

RESUMEN

La conservación de los productos alimentarios es una preocupación de productores y consumidores, quienes buscan alternativas seguras e inocuas. La búsqueda de herramientas biológicas y de alimentos mínimamente procesados ha llevado al empleo de bacterias acidolácticas como bioconservadores. Además de las bacteriocinas, existen otros metabolitos producidas por estos microorganismos, cuya función y mecanismo de acción no han sido del todo explorados y cuya caracterización constituye el objetivo de este trabajo. En la presente investigación se demuestra que *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 es una cepa no bacteriocinogénica, que no posee el gen *pedB* ni los plásmidos que se encuentran presentes en cepas productoras de pediocinas. A pesar de esto, cuando se cultiva en medio MRS modificado tiene capacidad de bioconservación y los sobrenadantes provenientes de cultivos en fase logarítmica poseen actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*, mostrada por la generación de halos de inhibición en pruebas de difusión en agar, por las curvas de inhibición de crecimiento en placa a las 24 horas y por la visualización de *detritus* celulares en microscopía electrónica de barrido. Se descartó que el efecto fuera ejercido por el ácido láctico pues si se neutralizaban los sobrenadantes se encontraba un efecto antibacteriano, menor al detectado originalmente. Esto se explica porque la producción de ácido láctico de la cepa en medio MRS o CSTES alcanzó una concentración máxima de 0.19% a las 24 horas, que no mostró efecto antibacteriano en *S. aureus* o *L. innocua*. Esto motivó la búsqueda de otras moléculas responsables del fenómeno y se exploraron actividades enzimáticas descritas como antibacterianos en otros microorganismos: proteasa y peptidoglicano hidrolasa, de las que hay poca información en esta especie. Se ensayaron diferentes condiciones de reacción (temperatura, tiempo e iones metálicos) para diferentes sustratos proteínicos.

Se demostró en zimogramas la presencia de una actividad proteolítica tanto sobre caseína como sobre gelatina, que además fue capaz de reconocer e hidrolizar a la elastina, actividad que ha sido asociada a un efecto antibacteriano en otros géneros. Se detectaron dos bandas de hidrólisis sobre gelatina (mayor de 200 kDa y 107 kDa) y sólo la primera fue detectada también en azocaseína, caseína o elastina como sustratos. Ninguna de las dos bandas con actividad gelatinolítica fue inhibida por inhibidores de serín, cisteín o metaloproteasas. La proteína >200 kDa no se inactivó por el tratamiento térmico (90 °C durante 10 minutos), sin embargo la de 107 kDa fue termosensible. La actividad de peptidoglicano hidrolasa fue evaluada con *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato en gel renaturalizante y se observó una banda de actividad lítica de 110 kDa bajo condiciones reductoras, en cuyo caso el tratamiento térmico fue indispensable. Cuando la actividad enzimática se evaluó en dispersiones de Elastina rojo Congo, fue estimulada por Zn^{2+} y NaCl 0.2M y disminuyó en presencia de PMSF 10mM, EDTA 5mM y O-Phe 10mM, datos que sugieren la presencia de una metaloproteasa dependiente de Zn y probablemente de una serín proteasa lo que debe ser profundizado. La lisis producida por los sobrenadantes se perdió completamente en presencia de EDTA 10mM. Se puede concluir que la cepa 8042 posee al menos tres diferentes enzimas extracelulares, dos con actividades proteolíticas y una con actividad de peptidoglicano hidrolasa. Los tres tipos de enzimas han sido referidos como antimicrobianos y su presencia explicaría el efecto bioconservador causado por la cepa.

SUMMARY

The preservation of food products is a major concern for producers and consumers, who look for safe and innocuous alternatives to food preservation. The search for biological tools and minimally processed foods has led to the use of lactic acid bacteria as biopreservatives. Besides bacteriocins these microorganisms produce other metabolites with antibacterial potential, which they have not been explored. This work explores the possible role of previously uncharacterized metabolites in the antibacterial effect exerted by *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. It is shown that this is a nonbacteriocinogenic strain, that does not have the *pedB* gene nor the plasmids that are present in pediocinogenic strains of the species, exerts an antibacterial effect when cultured in modified MRS culture medium and preserves meat products. Supernatants obtained from cells harvested in logarithmic phase showed antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Listeria innocua* in agar, as inhibition halos of the test culture indicate, as well as growth abolition in 24 hours, assayed by plate counts. Finally, SEM showed only cellular debris when cells that had been in contact with the above referred supernatants were visualized in electronic microscopy. The next step was to look for the metabolite that exerted this antibacterial effect. Lactic acid was discarded, as the neutralized supernatants culture exerted an inhibitory effect, even if it was lower than the original one. This can be explained because lactic acid produced after fermentation in MRS or CSTES reached only 0.19% concentration. This amount did not inhibit growth of *S. aureus* and *L. innocua* agar diffusion tests or in turbidimetric assays. The inhibition was not achieved with concentrations as high as 4% of lactic acid or sodium lactate. Therefore, the presence of enzymatic activities that could act as an antibacterial was explored. Protease and peptidoglycan hydrolase have been reported as antibacterial in other species but there is little information about their presence in *Pediococcus*. The proteolytic activity of 8042 strain was explored and different reaction conditions, regarding response to the presence of metal ions, temperature, time and the activity towards different protein substrates (azocasein, elastin). Zymographic assays showed bands with hydrolytic activity on casein, gelatin and elastin were detected. The most remarkable bands were detected with gelatin (>200 kDa 107 kDa), and the first one was also detected with azocasein, casein or elastin like substrates. Inhibitors of serine, cysteine or metalloproteases did not inhibit any of the two bands that showed gelatinolytic activity. Heat treatment (90 °C during 10 minutes) did not affect activity shown by the >200 kDa but the 107 kDa was thermosensitive. *Micrococcus lysodeikticus* lyophilized cells as substrate on renaturing gel and a lytic activity band appeared at 110 kDa under reducing conditions, in which case the heat treatment was essential to demonstrate the activity. When the enzymatic activity was assayed on Elastin Congo red dispersions it was found that it was stimulated by 5mM Zn²⁺ and 0.2M NaCl and decreased in the presence of 10mM PMSF, 5mM EDTA and O-Phe 10mM, data that suggest the presence of a Zn dependent metalloprotease and the possible presence of a serine protease, a study that must be pursued. The lytic activity was lost completely with 10mM EDTA. It is concluded that the 8042 strain has at least three different extracellular enzymes, two proteolytic activities and a peptidoglycan hydrolase one. The three types of enzymes have been referred to as antimicrobial and their presence would explain the biopreservative effect caused by the strain.

INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos pueden representar riesgos para la salud por la presencia de patógenos como *S. aureus* (Le Loir, 2003) *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 H7, *Campylobacter* y *Salmonella*, algunos de los cuales se consideran patógenos emergentes. Con fin de obtener alimentos de mejor calidad sanitaria, se han desarrollado tecnologías de procesamiento mínimo, manejando barreras tales como la combinación deliberada de factores (temperatura, Aw, pH, Eh, conservadores, etc.) además de barreras adicionales entre las que destacan los procesos biológicos (Caplice y Fitzgerald, 1999). Tanto las bacterias acidolácticas como sus metabolitos desempeñan un papel importante en este fenómeno y presentan la ventaja de que son reconocidos como ingredientes inocuos (GRAS, *generally recognized as safe*, por sus siglas en inglés) por las entidades regulatorias de alimentos de Estados Unidos, la Unión Europea y nuestro país. Su capacidad de bioconservación se debe a que producen una amplia gama de sustancias con actividad antimicrobiana, entre las que se incluyen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina, bacteriocinas, sustancias inhibitorias similares a las bacteriocinas (BLIS), dipéptidos cíclicos e hidroxiaácidos de cadena corta (Tabla 1), con el potencial de controlar a microorganismos de interés sanitario y microbiota presentes naturalmente en los alimentos, (Fed. Reg., 1988; Montville y Winkowski 1997; Hugas, 1998; Caplice y Fitzgerald, 1999; Magnusson, *et al.*, 2003).

Existe heterogenidad en el comportamiento entre especies e incluso entre cepas. Por ejemplo, se ha reportado que *Pediococcus acidilactici* es productor de bacteriocinas, específicamente pediocina PA-1 (Bhunia, 1987, y De Vuyst *et al.*, 1996). No obstante,

algunos autores no han encontrado evidencias de la presencia del gen que codifica para su producción en la cepa objeto de este estudio, *P. acidilactici* ATCC 8042 (Nes, *et al*, 1996, Mora *et al*, 2000, Nes y Holo, 2000).

A continuación se describirá el fenómeno de bioconservación y su importancia, así como los datos que muestran que la cepa de este trabajo muestra capacidad bioconservadora, lo que lleva al planteamiento de la hipótesis de que su efecto se debe a la posibilidad de que produzca sustancias antimicrobianas diferentes a las bacteriocinas.

El conocimiento de la gama de sustancias antimicrobianas producidas por las BAL puede permitir diseñar estrategias de conservación en alimentos. Estudios preliminares de la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo iniciador habían demostrado que genera una mejor calidad sanitaria en embutidos tipo salami y ya que en la literatura existe controversia sobre su capacidad de producir pediocinas, resulta interesante identificar si la cepa es bacteriocinogénica o si el efecto antibacteriano observado era debido a la producción de algún otro compuesto inhibitorio.

En este trabajo se exploró la posibilidad de que la actividad antibacteriana se debiera al ácido láctico producido o a la actividad de enzimas hidrolíticas con actividad bacteriolítica, como son algunas bacteriolisinas reportadas en la literatura en otros microorganismos (Gram positivos y Gram negativos). Se han reportado para el género *Pediococcus* una actividad peptidoglicano hidrolasa intracelular, cuya función biológica parece ser la de autólisis (Mora *et al.*, 2003) y una tripeptidasa asociada a pared (Simitsoupoulo, *et al.*, 2003). Por otra parte existen en el mercado moléculas como LysostaphynTM, que es una glicilglicina endopeptidasa producida por *Staphylococcus*

simulans con diferentes aplicaciones clínicas. Si en el sobrenadante de cultivo de la cepa 8042 se detectan actividades enzimáticas sobre sustratos proteínicos o sobre los microorganismos de prueba, se presume que estas actividades contribuyen a ejercer la actividad antibacteriana.

En otros microorganismos se ha demostrado que ciertas actividades enzimáticas pueden ser bacteriolíticas y conducir a la inhibición del crecimiento bacteriano (Turner, *et al.*, 2007). Las BAL cuentan con sistemas proteolíticos complejos (Pritchard y Coolbear, 1993, Kunji, *et al.*, 1996; Savijoki, *et al.*, 2006), si bien en el género *Pediococcus* no está reportada ninguna actividad proteolítica extracelular, solo una peptidasa intracelular en *Pediococcus pentosaceus* (Simitsoypoulo, *et al.*, 2003) así como una actividad de peptidoglicano hidrolasa, responsable de la autólisis en BAL (Mora *et al.*, 2003).

1. MARCO TEÓRICO

1. Bioconservación

La industria de alimentos para extender la vida de anaquel de los diversos productos ha recurrido al uso de aditivos químicos como los nitratos, nitritos, bisulfitos, cuya inocuidad ha sido puesta en duda. Por ello, se han explorado los procesos de bioconservación como una alternativa al uso de dichos compuestos. En este fenómeno se recurre al uso de bacterias acidolácticas o sus metabolitos como agentes conservadores y poseen la ventaja de que han sido reconocidos con la denominación GRAS (Montville y Winkowski, 1997; Hugas, 1998; Fed. Reg., 1988).

2. Bacterias acidolácticas (BAL)

Las BAL forman un grupo filogenético compacto y sus relaciones han sido trazadas en un árbol con base en la secuencia del gen 16S ARNr (Figura 1).

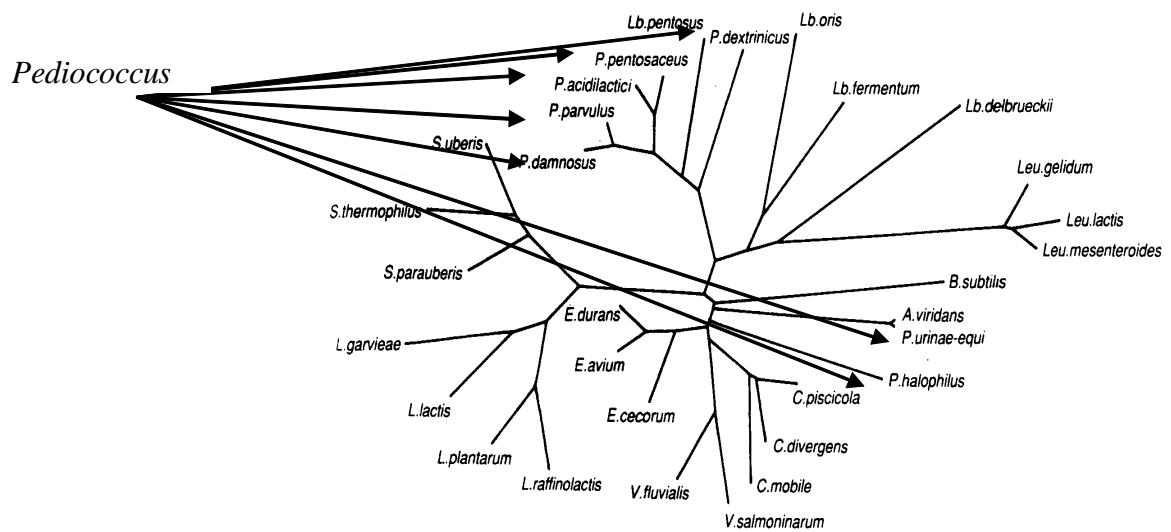


Figura 1. Árbol filogenético de las bacterias acidolácticas

Lb.= *Lactobacillus*, P= *Pediococcus*, L= *Lactococcus*, E= *Enterococcus*, C= *Carnobacterium*, A= *Aerococcus*, V= *Vagococcus*, S= *Staphylococcus*, B= *Bacillus*, Leu.= *Leuconostoc*. Fuente: Collins, *et al.* (1990).

2.1. Metabolitos con actividad antibacteriana producidos por BAL

Las BAL producen una amplia variedad de sustancias con actividad antibacteriana que se ilustra con algunos ejemplos en Tabla 1.

Tabla 1. Metabolitos con actividad antibacteriana producidos por bacterias acidolácticas

<i>Metabolito</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>Referencia</i>
Ácido Láctico	BAL	Montville y Winkowski 1997; Hugas 1998 Magnusson, 2003
Peróxido de hidrógeno	BAL	Magnusson, 2003; Rodríguez, <i>et al.</i> , 1997
Diacetilo	BAL	Montville y Winkowski 1997; Magnusson 2003
Reuterina	<i>Lb. reuterii</i> <i>Lb. coryniformis</i>	Magnusson, 2003; Magnusson, <i>et al.</i> , 2003.
BLIS: Sustancias inhibitorias similares a las bacteriocinas	BAL	Montville y Winkowski 1997
Bacteriocinas	BAL	Klaenhammer, 1993 Nes, <i>et al.</i> 1996; Nes y Holo, 2000 ; Cotter <i>et al.</i> , 2005
Dipéptidos cíclicos ciclo-PhePro ciclo-PheOHPro ciclo-GlyLeu	<i>Lb. coryniformis</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i>	Magnusson y Schnürer 2001 Ström <i>et al.</i> , 2002 Magnusson, 2003
Hidroxiácidos 3-hidroxi-tetradecanoico 3-hidroxi-decanoico 3-hidroxi-5-cis-dodecanoico 3-hidroxi-decanoico	<i>Lb. plantarum</i> MiLab 14	Magnusson, 2003; Magnusson <i>et al.</i> , 2003
peptidoglicano hidrolasa	<i>P. acidilactici</i> y <i>P. pentosaceus</i> <i>Lactobacillus</i>	Mora, <i>et al.</i> , 2003 Lortal, <i>et al.</i> , 1997

2.2. Actividad antibacteriana de sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

En una caracterización preliminar, Llorente (1998, 2003) encontró que los sobrenadantes de cultivo de la cepa 8042 inhibían algunos microorganismos de interés sanitario en alimentos (Tabla 2). Destaca el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, causante de toxiinfecciones de origen alimentario (Le Loir, *et al.*, 2003) y recomendado como microorganismo de prueba por el NCCLS. Como se aprecia en la misma tabla, los microorganismos afectados son tanto Gram positivos como Gram negativos. Resalta también la ausencia de efecto sobre otras BAL como *L. plantarum* y *P. pentosaceus*. Este

resultado indica que el efecto antibacteriano presenta un gran potencial y es dudoso que se trate de una bacteriocina, ya que no afecta a las bacterias más cercanas filogenéticamente.

Tabla 2. Espectro de actividad antibacteriana de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici*

Microorganismos susceptibles	Gram	Inhibición producida
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	+	+
<i>Listeria innocua</i>	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+
<i>Micrococcus luteus</i>	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	-

Fuente: Llorente, 1998; Llorente *et al.*, 2003

2.3. Aplicación de la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en la elaboración de salamis

Con el objeto de mejorar la calidad sanitaria de embutidos cárnicos Bello y Durán, (1992), Llorente, *et al.*, (2003) y Rivera (2004), utilizaron salamis como modelos experimentales y prepararon diferentes lotes, con objeto de comparar el efecto de la inoculación o no con la cepa de *Pediococcus* 8042 como iniciador, con el de la adición de ácido láctico o de bacteriocina comercial Nisaplín™ (elaborado con la bacteriocina nisina producida por *Lactococcus lactis*) en la vida de anaquel de estos embutidos. Se empleó la pasta de carne sin adiciones como control. Se encontró que este cultivo iniciador en salamis ejerce un efecto bioconservador a dos concentraciones de inóculo, además de favorecer el desarrollo de características sensoriales superiores, como se aprecia en los salamis de 24 h de preparación mostrados en Figura 2. En el lote de salamis de 96 h de preparación, que se aprecia en Figura 3, se evaluó también el efecto de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* proveniente de MRS modificado (fase logarítmica), neutralizado y liofilizado,

el cual también tuvo un efecto positivo en las características sensoriales producidas. Es importante resaltar que esta cepa de *P. acidilactici* es reconocida como acidificante y la reducción del pH tiene un efecto directo sobre la estabilización de los pigmentos de la carne, produciendo el color rojo característico de los productos madurados y mejores propiedades sensoriales; por el contrario los agentes curantes (nitratos y nitritos), se utilizan para conferir a los productos cárnicos su color, aroma y calidad microbiológica característicos, con la limitante de ser reconocidos como ingredientes legislados en cuanto a su concentración residual, lo que ofrece otro punto a favor del uso de esta cepa como cultivo bioprotector.

Nisaplín	Pasta sola	Ac. Láctico	Cultivo 10 ⁶	iniciador 10 ⁹
----------	---------------	----------------	----------------------------	------------------------------



Figura 2. Embutidos tipo salami de 24 h de elaboración.

Tratados con Nisaplín™ (bacteriocina comercial con Nisina de *Lc. lactis*), sin tratamiento (pasta sola) (control), con ácido láctico (1%) y con dos concentraciones de cultivo iniciador (10⁶ y 10⁹ log).

Fuente: Rivera, 2004.

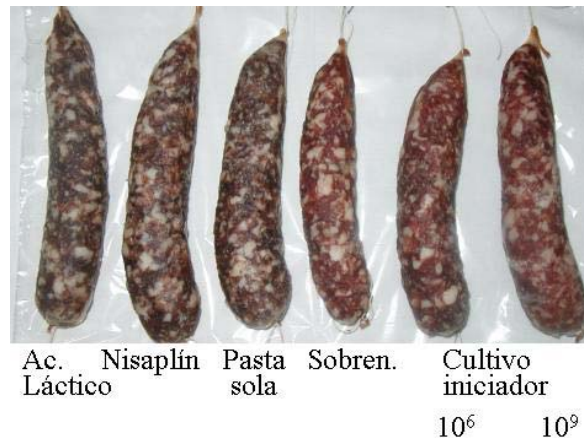


Figura 3. Embutidos tipo salami de 96 h de elaboración

Los tratamientos aplicados fueron ácido láctico (1%), Nisaplín™ (producto comercial que contiene bacteriocina Nisina de *Lc. lactis*), sin tratamiento (pasta sola) (control), sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* en MRS modificado (fase logarítmica) neutralizado y liofilizado y con dos concentraciones de cultivo iniciador (10⁶ y 10⁹ log).

Fuente: Rivera, 2004.

2.3.1. Calidad sanitaria de salamis bioconservados

El efecto benéfico se reflejó también en la calidad sanitaria, tanto por su efecto sobre la reducción en las cuentas finales, de mesófilos aerobios, como en la inhibición del microorganismo de prueba, *S. aureus* ATCC 6538P, adicionado a los salamis (Figura 4). Con la adición de los sobrenadantes provenientes de cultivos en Medio MRS en matraz Fernbach (datos no mostrados), se obtuvieron resultados similares, aunque con diferencia de un orden de magnitud menor en el número de logaritmos de mesofílicos aerobios, lo que podría explicarse por la producción de sustancias con actividad antimicrobiana, que podrían actuar en forma individual o sinérgica.

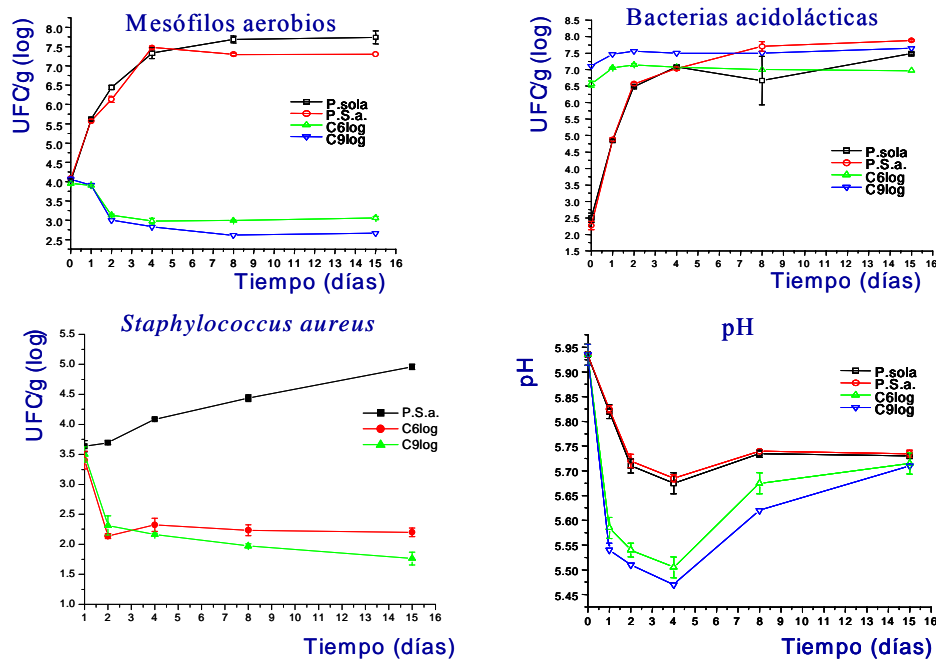


Figura 4. Evolución de pH y microbiota en salamis

Mesófilos aerobios, bacterias ácidos lácticas, *S. aureus* y pH en salamis control (Pasta sola), respecto de los inoculados con cepa iniciadora (10^6 y 10^9 log).

Fuente: Rivera, 2001, 2004.

Los resultados obtenidos indican que *P. acidilactici* ATCC 8042 produce sustancias que pueden garantizar la calidad sanitaria de embutidos cárnicos y que actúan contra el microorganismo de prueba *S. aureus*. Por tanto, la siguiente etapa del trabajo consistiría en determinar la naturaleza de la sustancia antimicrobiana. La primera hipótesis a evaluar era que se trataba de una bacteriocina y por tanto, a continuación se describe el estado del arte de la información sobre estas sustancias.

2.4. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos pequeños, sintetizados ribosomalmente, termoestables, con capacidad antimicrobiana a concentraciones nanomolares. Muchas

bacteriocinas son producidas por BAL grado alimenticio, fenómeno que ofrece a los científicos en alimentos la posibilidad de dirigir o prevenir el desarrollo de especies bacterianas específicas en alimentos. Esto puede ser particularmente útil en aplicaciones de conservación e inocuidad alimentaria y también tiene implicaciones en el desarrollo de flora deseable en alimentos fermentados que ayuden a los procesadores a extender su control sobre la microbiota de los alimentos después de su manufactura (Cotter, *et al.*, 2005).

La mayoría de las BAL sintetizan sólo una bacteriocina aunque algunas sintetizan hasta tres (Tabla 3). Hay gran variabilidad de cepa a cepa, con acción bactericida contra bacterias que pueden ser de la misma especie (espectro reducido), o de otros géneros (amplio espectro), así como contra algunos patógenos presentes o transmitidos por alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*. Durante las últimas décadas se ha realizado gran cantidad de estudios sobre estos compuestos antimicrobianos (Carolissen-McKay, *et al.*, 1997, Montville y Chen, 1998, Callewaert, *et al.* 1999). Las bacteriocinas que han representado mayor interés son las de Clase IIa (familia de las pediocinas), de las cuales se han reportado más de 50 termoestables.

2.4.1. Clasificación de bacteriocinas

De acuerdo con la clasificación de Nes y Holo, 1996 las bacteriocinas de bacterias acidolácticas se dividen en tres clases:

Clase I: Lantibióticos

Tipo A: Moléculas de forma alargada

Tipo B: Moléculas globulares

Clase II: Bacteriocinas termoestables, < 10 kD, no modificadas

Subclase IIa: Familia "pediocinas", activas contra *Listeria*
 Subclase IIb: Bacteriocinas de dos péptidos complementarios, sec-dependientes.
 Subclase IIc: Otras bacteriocinas
 Clase III: Bacteriocinas termosensible, >30 kD

Cada cepa es capaz de producir una o más bacteriocinas (Tabla 3).

Tabla 3. Bacteriocinas Clase IIa (familia de las pediocinas) producidas por diferentes especies de BAL¹

Microorganismo productor de bacteriocina (familia pediocinas)	Bacteriocina producida
<i>Carnobacterium piscicola</i>	Carnobacteriocina 1, Carnobacteriocina 2, Piscicolina
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocina A, Enterocina P
<i>Lactobacillus sakei</i>	Sakacina A, Sakacina P, Bavaricina
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Sakacina A
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Leuconocina, Mesentericina
<i>Pediococcus acidilactici</i>	PA-1/AcH

Fuente: <http://embi/Swiss-Prot> Pfam PF01721 ProDom PDO04452

Una cepa puede producir diferentes bacteriocinas (Tabla 4) o se puede dar el caso de que una misma bacteriocina, sea producida por varias cepas (Tabla 5).

Tabla 4. Cepas bacteriocinogénicas del Género *Pediococcus*

Especie	Pediocina
<i>P. acidilactici</i>	pediocina PA1
<i>P. acidilactici</i> PO2B5627	pediocina PO2
<i>P. acidilactici</i>	pediocina PAC 1.0
<i>P. acidilactici</i>	pediocina pAcH
<i>P. acidilactici</i>	pediocinas E, F y H
<i>P. cerevisiae</i> FBB63	Pediocinas
<i>P. pentosaceus</i> FBB61 y L7230	Pediocinas
<i>P. pentosaceus</i> MC 03	Pediocina

Fuente: Ray, 1993; Bhunia *et al.*, 1987; Daeschel, 1989; Foegeding, 1992; Hoover *et al.*, 1989; Hoover, 1993; Klaenhammer, 1993; Pucci, 1988; Marugg, *et al.* 1992; Mottlagh *et al.*, 1991; 1992.

¹ <http://embi/Swiss-Prot> Pfam PF01721 ProDom PDO04452

Tabla 5. Producción de pediocinas PA-1/AcH y PD-1 por diferentes especies de *Pediococcus*

Cepa	Bacteriocina (pediocina)
<i>P. acidilactici</i>	PA-1/AcH
<i>P. damnosus</i>	PA-1, PD-1
<i>P. parvulus</i>	PA-1
<i>P. pentosaceus</i>	PA-1
<i>Lb. plantarum</i>	PA-1

Fuente: Bhunia, *et al.*, 1987; Green, *et al.*, 1997; Ennahar, *et al.*, 1996; Mora, *et al.*, 2000; Bennik, *et al.*, 1999.

De acuerdo con los resultados del espectro de bacterias inhibidas por la cepa 8042 (Tabla 2), se podía pensar que se trataba de una bacteriocina y, por la inhibición sobre *Listeria innocua*, que este efecto era causado por una bacteriocina Clase IIa o por una sustancia similar a ellas (BLIS bacteriocin like substance). Sin embargo, una regla que aplica en la definición de bacteriocinas, es que son moléculas con capacidad de inhibir bacterias relacionadas. En este caso, la cepa de *Pediococcus pentosaceus*, no fue inhibida, a pesar de que son las bacterias más cercanas filogenéticamente, lo que llevaba a pensar que se trataba de otro tipo de mecanismo inhibitorio. De hecho, la clasificación de bacteriocinas propuesta por Cotter *et al.* (2005) abre la posibilidad de considerar sustancias con actividad enzimática como agentes antimicrobianos incluidos también bacteriocinas, lo que se describe a continuación.

2.4.2. Nueva clasificación de bacteriocinas (Cotter, *et al.*, 2005)

El esquema de clasificación de bacteriocinas propuesto por Klaenhammer (1993) (Figura 5A) comprendía cuatro clases mayores, en tanto que el de Nes y Holo (1996)

incluía tres clases. En contraste, la propuesta de clasificación “Universal” de Cotter, *et al.* (2005) se basa sólo en dos divisiones importantes: Clase I (los lantibióticos) y Clase II (bacteriocinas no-lantibióticos) (Figura 5B). Las clases IIc y IV de Klaenhammer fueron eliminadas por Cotter, quien las reubicó entre los diversos péptidos Clase II. La clase III de proteínas grandes termosensibles se eliminó, y se incluyó en forma independiente Clase III de proteínas grandes, que causan un un tipo de daño particular. Las proteínas bacteriolíticas, frecuentemente mureín hidrolasas, termosensibles, como lisostafina, enterocina A y zoocina A, se ubican en Clase IIIa. Algunas bacteriocinas no líticas de BAL en la Clase IIIb, como la helveticina J y la disgalacticina codificada en plásmidos. Por último Clase IV incluye a los péptidos cíclicos de BAL considerados por Klaenhammer como Clase IIc.

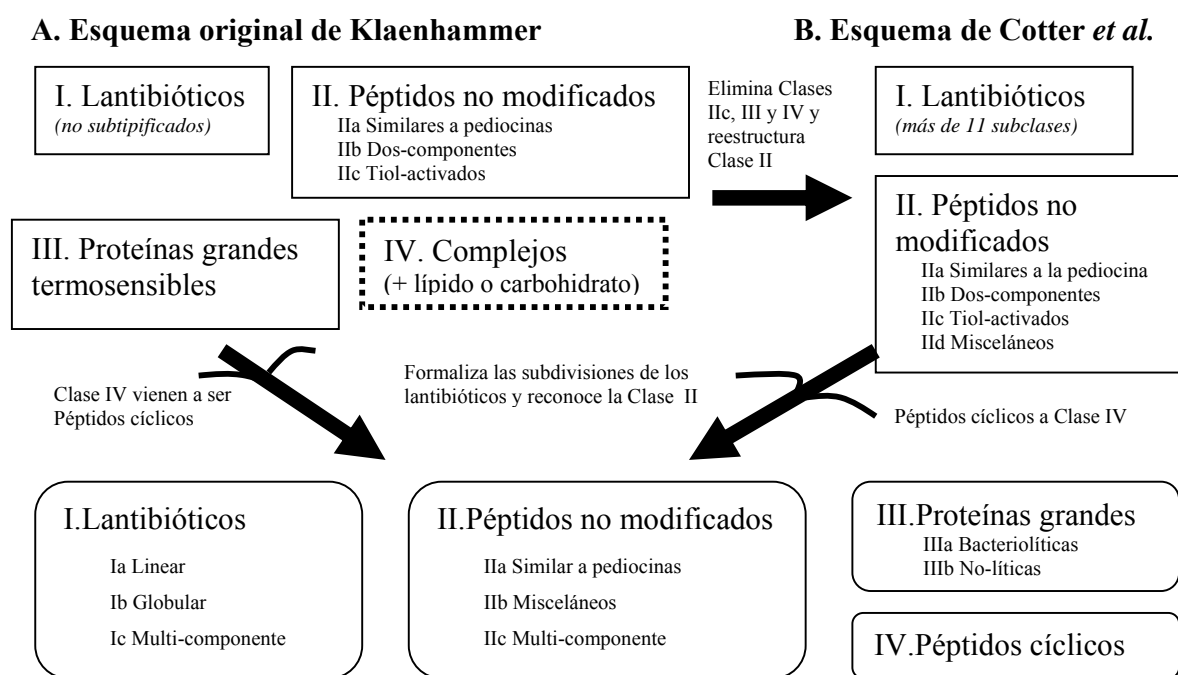


Figura 5. Esquema “Universal” de clasificación de bacteriocinas

Fuente: Heng and Tagg, 2006

2.4.3. Modo de acción de las bacteriocinas

En la literatura se encuentran modelos que tratan de explicar el modo de acción de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas. Se sabe que penetran en la membrana de las células sensibles, permeabilizándolas y provocando desarreglo de los componentes de la membrana que pueden disparar problemas metabólicos secundarios: en los sistemas de producción de energía o en la síntesis de macromoléculas (proteínas, DNA y RNA) (Moll *et al.*, 1999). Los lantibióticos (Clase I) difieren de los otros grupos en su dependencia del gradiente de potencial de membrana para su inserción. Se han propuesto modelos de barril para explicar la formación de poros entre dos o más especies de péptidos anfipáticos, que resultan en la salida de iones, la pérdida de la fuerza protón motriz y por último en la muerte de la célula (Jack, *et. al.*, 1995). La secuencia de eventos que provocan la pérdida de viabilidad de bacterias Gram positivas después del tratamiento con pediocina AcH incluyen: 1) Adsorción o unión de las moléculas de pediocina AcH sobre receptores específicos sobre la superficie de la célula, 2) entrada de las moléculas de pediocina a través de la pared celular, 3) contacto de pediocina con la membrana, 4) desestabilización de la integridad funcional como se demuestra por la salida de moléculas pequeñas como iones y ATP y 5) en algunas cepas, la pérdida de integridad estructural de la membrana al evidenciar lisis celular (Bhunja, 1991). Por último los modelos propuestos por Cotter, *et al.* (2005) para explicar el modo de acción de las bacteriocinas Clase I, Clase II y Clase III (Figura 6).

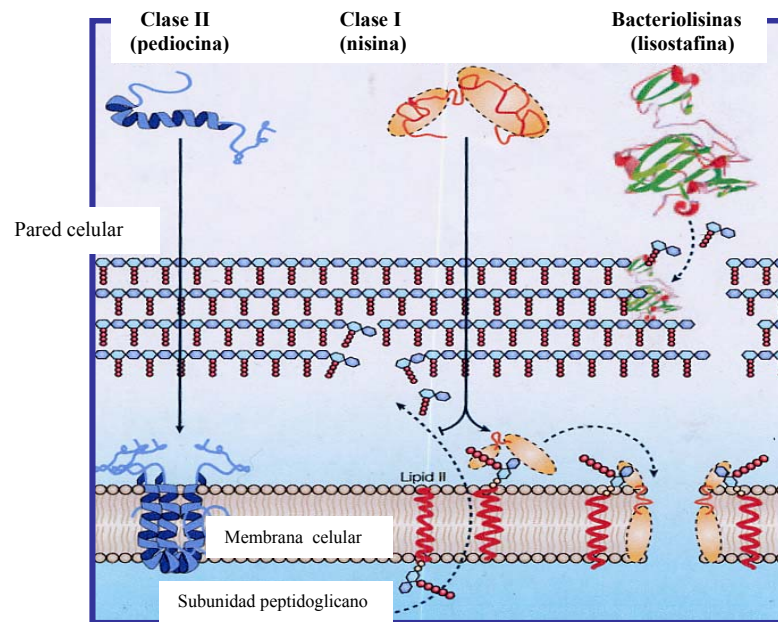


Figura 6. Modo de acción de Bacteriocinas

Clase II familia de las pediocinas (Ej. Sakacina), Clase I (Ej. Nisina), Clase III Bacteriolisinas (Ej. Lisostafina).

Fuente: Cotter, *et al.*, 2005

Las BAL cuentan con sistemas proteolíticos complejos, que se encuentran en forma *intra*, *extracelular* o *asociada a pared*. (Visser *et al.*, 1986, 1994; Kunji, *et al.*, 1996). Algunas secretan proteasas y peptidasas al medio de cultivo (Law and Kolstad, 1983; Thomas and Pritchard, 1987, Pritchard and Coolbear, 1993; Kunji, *et al.*, 1996; Exterkate, *et al.*, 1993). En el género *Pediococcus* no está reportada actividad de proteasa, sólo actividad de peptidasas para *Pediococcus pentosaceus*.

Mora *et al.* (2003) reportan la presencia de actividad peptidoglicano hidrolasa intracelular, en especies de *Pediococcus*, responsable de la autólisis de *Pediococcus acidilactici*. Lortal, *et al.* (1997) han utilizado estas enzimas como criterio de clasificación en especies del género *Lactobacillus*.

2.5. Clasificación de proteasas

Las proteasas se dividen en dos categorías, según el tipo de ataque a proteínas son **exo** y **endo**. Las Proteinasas o endopeptidasas atacan a la proteína para producir grandes péptidos. Las Peptidasas o exopeptidasas atacan el extremo NH₂ ó COOH o a fragmentos de proteína para producir pequeños péptidos y aminoácidos (Figura 7).

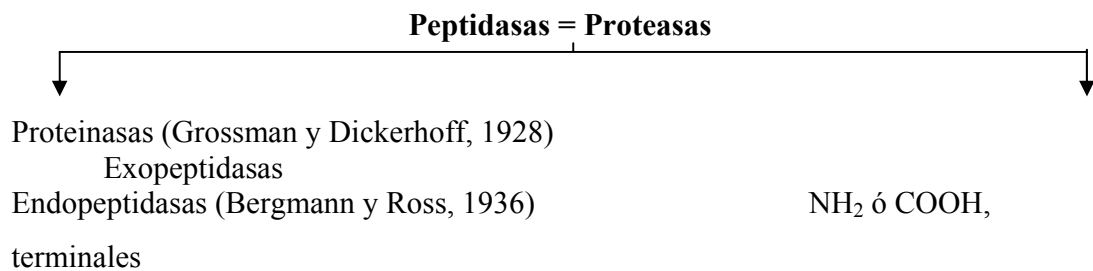


Figura 7. Definiciones aceptables para la mayoría de enzimas proteolíticas

Fuente: Barret y McDonald 1985.

Los dos grupos se subdividen de acuerdo con la composición de su sitio activo. Las proteinasas se dividen en 5 grupos: Serín, Cisteín (tiol), aspártico (ácido), metalo y mezclas, dependiendo de los aminoácidos que participan en la catálisis. Las peptidasas actúan sólo sobre un extremo de la cadena polipeptídica y se clasifican según el patrón de actividad: las aminopeptidasas cortan aminoácidos en el extremo amino y las carboxipeptidasas cortan aminoácidos en el extremo carboxilo. Las dipeptidilpeptidasas cortan liberando un dipéptido (Tabla 6). Su nomenclatura se basa en lo establecido por the Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Este Comité de Enzimas asigna a las enzimas los dígitos que siguen a "EC".

Tabla 6. Clasificación de Peptidasas según el Sistema EC ¹

EC	Nombre	Conocidas
3.4.11	Aminopeptidasas	20
3.4.13	Dipeptidasas	11
3.4.14	Dipeptidil-peptidasas	8
3.4.15	Peptidil-dipeptidasas	3
3.4.16	Tipo Serín-carboxipeptidasas	4
3.4.17	Metalocarboxipeptidasas	19
3.4.18	Tipo cisteín carboxipeptidasas	1
3.4.19	Omega peptidasas	11
3.4.21	Serín endopeptidasas	77
3.4.22	Cisteín endopeptidasas	28
3.4.23	Endopeptidasa aspártico	34
3.4.24	Metaloendopeptidasas	70
3.4.25	Treonín endopeptidasas	1
	Total	287

Fuente: Barrett y McDonald, 2000.

La mayoría de las endopeptidasas actúan sobre cadenas polipeptídicas de cualquier longitud. Estas se clasifican según la reacción catalizada y por su tipo catalítico (Tabla 7).

Tabla 7. Tipos catalíticos de enzimas peptidasas

Tipo	Ejemplo	Inhibidor típico
Aspártico	Pepsina, Catepsina E	Pepstatina
Cisteín	Papaína, Catepsina K	Iodoacetato
Metalo	Termolisina, Colagenasa de vertebrados Carboxipeptidasa A	1, 10 fenantrolina
Serín	Tripsina, prolil oligopeptidasa	Diisopropil fluorofosfato
Treonín	Proteosoma	Lactacistin para algunos

Cinco tipos de proteasas son reconocidas sobre la base química de su sitio catalítico²

Fuente: Barrett, 2000.

¹ Nomenclatura del Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Este Comité de Enzimas asigna a las enzimas los dígitos que siguen a IEC

² <http://www.merops.co.uk>

2.5.1. Proteasas y antagonismo

Baker y Cook (1974) introdujeron el término control biológico como la reducción de la cantidad de un patógeno por la acción de microorganismos antagonistas que interfieren en su desarrollo. No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la determinación del mismo es una característica a seleccionar en su aplicación. Entre los mecanismos descritos para controlar el desarrollo de patógenos: antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (lisis enzimática), e inducción de resistencia (Cook y Baker, 1983). En esta época en que las bacterias presentan resistencia a múltiples medicamentos, están en desarrollo nuevos métodos para controlar a los microorganismos patógenos. Actualmente las enzimas que degradan PG, incluida la lisostafina y bacteriófagos de endolisinas, han recibido mucha atención como agentes antimicrobianos (Turner *et al.*, 2007).

2.6. Peptidoglicano hidrolasas

El peptidoglicano (PG) es el componente mayoritario de la pared celular bacteriana. En las bacterias Gram positivas constituye más del 50% de la misma, sin embargo, está presente en las Gram negativas (Figura 8).

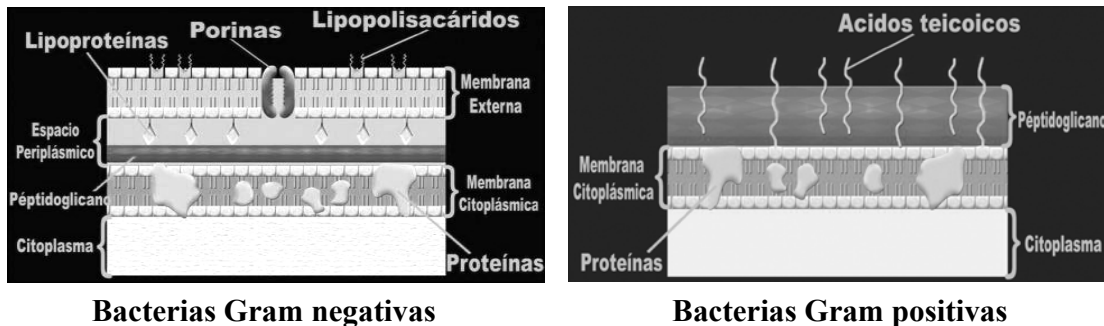


Figura 8. Estructura de la pared celular bacteriana

Fuente: Ghuysen y Strominger 1963.

El PG de bacterias Gram positivas está compuesto de cadenas de glicano que consisten de residuos de N-acetilglucosamina y de Ácido N-acetilmurámico, acoplados vía enlaces β -1,4 los cuales están entrelazados por oligopéptidos conectados por puentes interpeptídicos para formar un sáculo que encierra a la célula y la protege de la presión interna (Figura 8) (Ghuysen y Strominger, 1963, Steen, 2005).

El PG es una estructura dinámica mantenida por un balance entre biosíntesis y degradación, que es coordinado por un sistema multienzimático complejo. Las enzimas involucradas en la degradación de PG se denominan peptidoglicano hidrolasas (PGH) (Cibik y Chapot-Chartier, 2000).

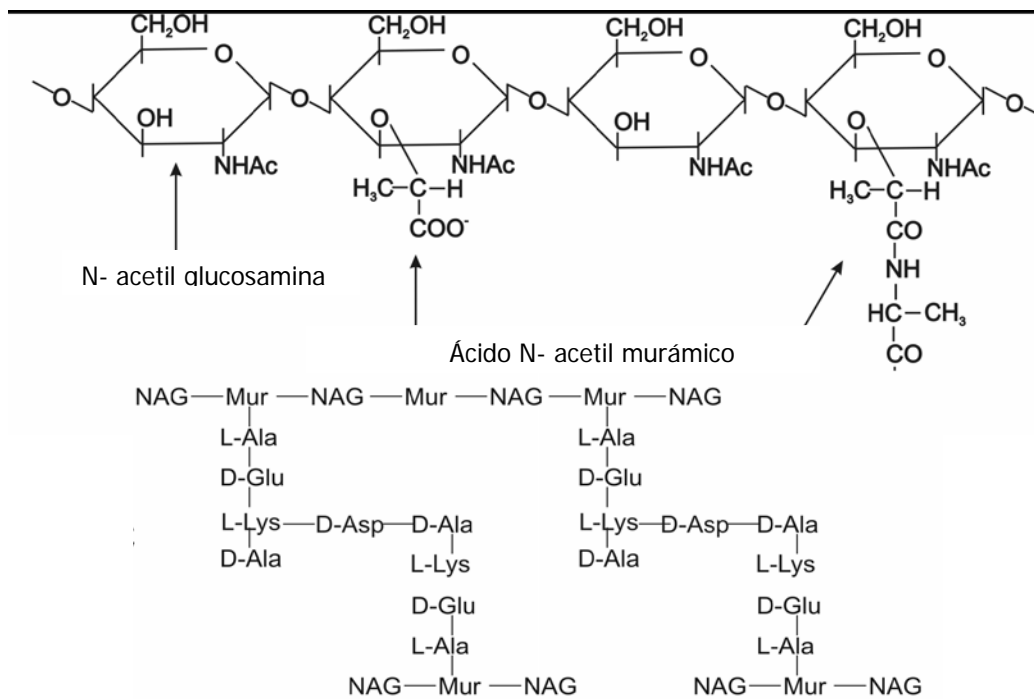


Figura 9. Composición del peptidoglicano de bacterias Gram positivas

Arriba: Estructura de la cadena de glicano del peptidoglicano, que consiste de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (Mur), acoplado por uniones β (1-4). La unidad lactil de Mur puede ser substituido con tetrapéptidos. Abajo: Estructura de PG Tipo A. El tetrapéptido unido al Mur consiste de LAla-D-Glu-X-D-Ala, en el cual X es ácido L-diamino especie específico. En el caso de *L. lactis* se muestra L-Lys. El entrelazado del tetrapéptido es vía un “puente” aminoácido (D-Asp en *L. lactis*) que une D-Ala de un tetrapéptido a un grupo amino libre de L-Lys de otro tetrapéptido.

Fuente: Ghuyssen and Strominger. 1963.

2.6.1. Función de peptidoglicano hidrolasas

Las PGH desempeñan un papel fisiológico importante en la inserción, remodelado y recambio de nuevos monómeros, durante la división y separación celular. Las bacterias producen una o varias PGH, que son capaces de hidrolizar enlaces covalentes en el PG de su pared celular. Algunas de ellas llamadas autolisinas, pueden producir lisis celular al desintegrar su PG cuando las células son colocadas en condiciones desfavorables y llevar a las células a la autólisis, posiblemente como un potencial suicida que requiere que las células regulen estrictamente la actividad de las enzimas (Cibik y Chapot-Chartier, 2000).

Se ha sugerido el mecanismo autolítico en el que están involucradas las PGH, pero aún no se comprenden todos los detalles moleculares del mismo. La evaluación de la función de estas hidrolasas es difícil debido a la variedad de enzimas que produce simultáneamente una sola especie y a la dificultad de purificarlas. Es posible que se obtengan avances al aplicar técnicas de biología molecular y se requiere el desarrollo de un sistema de pruebas para estudios funcionales de PGH (Sugai, 1997).

Las PGH se clasifican según el sitio de corte en el PG (Figura 10) y pueden ser definidas en cuatro tipos:

- (i) *N*-acetil-muramidasa: Muramidasa
- (ii) *N*-acetil-glucosaminidasas: Glucosaminidasas
- (iii) *N*-acetil-muramoil-L-alanin amidasa: Amidasa
- (iv) Peptidasas: Peptidasas

La mayoría de las PGH caracterizadas tienen una estructura modular con dos dominios: uno catalítico y otro de unión a la pared celular compuesto de varias unidades repetidas de aminoácidos (Cibik y Chapot-Chartier, 2000).

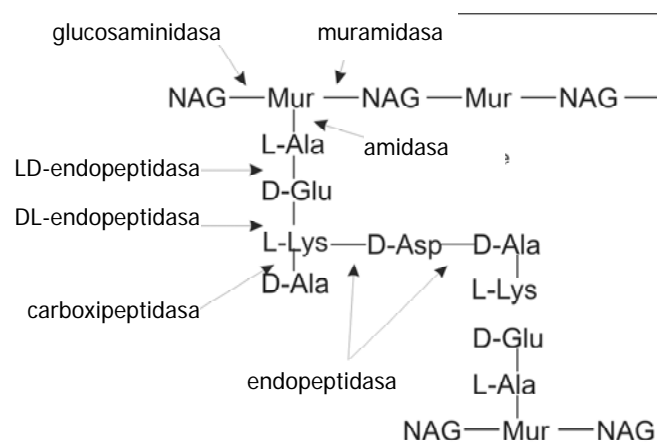


Figura 10. Sitios de reconocimiento de las peptidoglicano hidrolasas bacterianas

Fuente: Steen, 2005.

La autólisis de BAL usadas como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos y embutidos es importante en el desarrollo de sabores durante la maduración, liberan peptidasas intracelulares que generan aminoácidos libres (precursores del aroma) y degradan péptidos hidrofóbicos amargos. La mayor actividad de autolisina de diferentes especies de BAL estudiadas en SDS-PAGE es una AcmA (*N*-acetil-muramidasa) requerida para la separación de la célula después de la división celular. Está involucrada en la autólisis en fase estacionaria de especies de los géneros de *Lactococcus* y *Pediococcus*, después de su crecimiento en medio líquido (Buist, *et al.*, 1997, Mora, 2003). Se ha demostrado también la presencia de varias PGH en diversas especies de *Leuconostoc* (Cibik y Chapot-Chartier, 2000).

2.6.2. Técnicas turbidimétricas y zimográficas en la detección de actividad lítica

El método clásico de medir actividad de PGH es turbidimétrico usando células bacterianas completas, paredes celulares o PG insoluble como sustrato. Por turbidimetría se mide la disminución en turbidez que resulta de la hidrólisis del sustrato por la digestión de la enzima. *Micrococcus luteus* (*M. lysodeikticus*) ha sido usado frecuentemente como sustrato, debido a su alta sensibilidad a especímenes de la enzima cruda. No obstante, una amidasa muestra muy poca actividad lítica sobre *M. luteus* y la actividad de glicilglicina endopeptidasa no puede ser medida ya que *M. luteus* no posee cadena interpeptídica de pentaglicina. Cuando se utilizan paredes celulares o PG insoluble como sustrato, la especificidad del enlace puede ser determinado por análisis de la digestión. Se han reportado variaciones más sofisticadas y sensibles a este método (Sugai, 1997; Sugai, *et al.*, 1997).

La aplicación de electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Tris Glicina) en la detección de enzimas bacteriolíticas ha abierto un camino para el estudio de las PGH cuya actividad no puede ser medida por el método turbidimétrico estándar. Las preparaciones crudas de PGH incluyen múltiples enzimas que pueden ser analizadas sobre la base de sus diferentes movilidades electroforéticas (LeClerc y Asselin, 1989). Las PGH pueden ser visualizadas como zonas líticas claras con luz indirecta, después de su lavado para eliminar el SDS y de su incubación en buffer renaturalizante, en contraste con la pared celular opaca (o células completas) que se incorporan en los geles. La tinción con azul de metileno permite identificar más claramente las bandas líticas. Lortal, *et al.* (1997) establecieron que estos zimogramas fueron de utilidad para caracterizar el patrón electroforético de PGH en la identificación de especies de *Lactobacillus*. Este método zimográfico, es muy sensible y es posible identificar concentraciones de hasta 0.2 pg de lisozima de clara de huevo, 2 pg de lisostafina y 80 pg de N-acetilglucosaminidasa de *S. aureus*, cuyos valores son menores que el límite de detección por tinción de plata (LeClerc y Asselin, 1989, Sugai *et al.*, 1991). Se pueden detectar tanto cambios en la estructura de la pared celular, como cambios en concentración mínima bacteriolítica en el gel que contiene la pared celular o las células de interés como sustratos. La zimografía es un método muy útil porque detecta a todas las PGH (Shockman y Holtje, 1994). La masa molecular de las bandas bacteriolíticas puede ser estimada al correr en el mismo gel marcadores de peso molecular. Otra aplicación de la zimografía es caracterizar la susceptibilidad de paredes celulares de diferentes microorganismos a PGH (Sugai, 1997).

2.6.3. Sitios de reconocimiento de PGH en bacterias Gram positivas

La lisostafina es una endopeptidasa de 25 kDa, producida por *Staphylococcus simulans* bv. *staphylolyticus* ATCC 1362. El blanco natural de la lisostafina es el enlace del interpeptido de pentaglicina y de ahí su actividad limitada a *Staphylococcus aureus* y algunas especies cercanas (Figura 11). El término lisostafina fue originalmente aplicado a preparaciones crudas de PGH que incluían glicilglicina endopeptidasa, glucosaminidasa y amidasa (Schindler, y Schuhardt, 1964, 1965). El término es ahora asignado solamente a la glicilglicina endopeptidasa. La lisostafina contiene un átomo de zinc por molécula y posee poca actividad elastolítica, comparada con otras proteasas, aunque ésta es distinta de la actividad estafilolítica. Ambas actividades son sensibles a agentes quelantes del zinc (O-fenantrolina) (Sugai, 1997; Turner *et al.*, 2007).

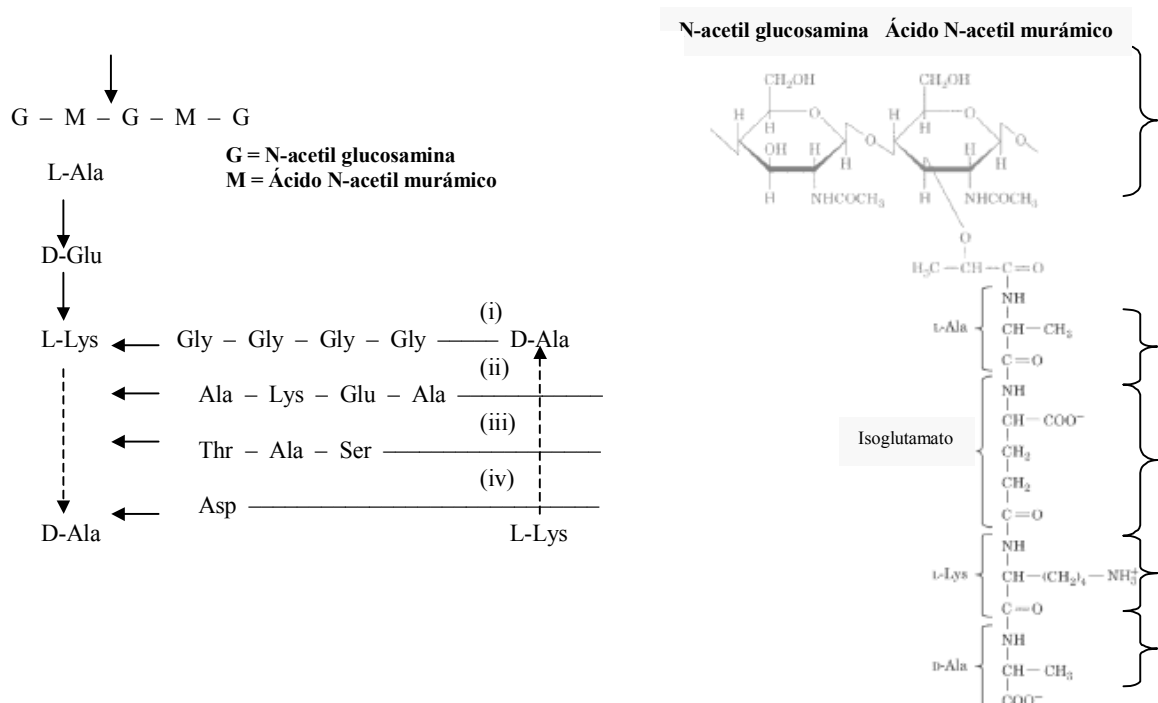


Figura 11. Sitio de reconocimiento de PGH en los interpeptidos del PG
 (i) *S. aureus*, (ii) *M. luteus*, (iii) *Streptococcus milleri*, (iv) cepas de *Lactococcus*

La Figura 12 presenta los modelos de PG de *S. aureus* que ilustran su composición y también indican el sitio de acción de las enzimas PGH.

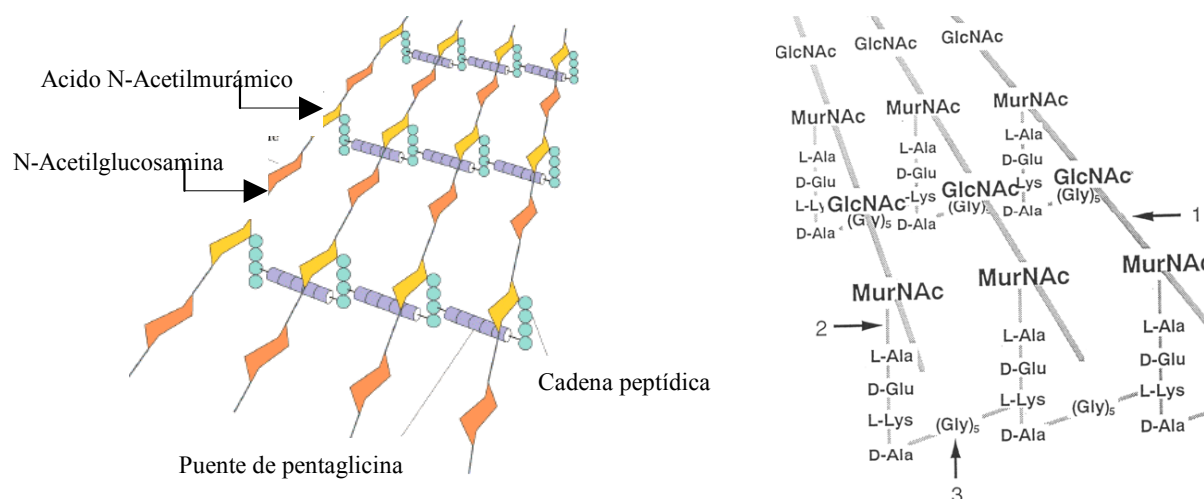


Figura 12. Estructura de PG de *S. aureus* y sitios de reconocimiento de PGH.

Las peptidoglicano hidrolasas cortan sitios de unión específicos: 1) N-acetilglucosaminidasa; 2) N acetilmuramyl-L-alanin amidasa; 3) glicilglicin endopeptidasa.

Fuente: Sugai, 1997, Steen, 2005.

Los experimentos realizados por Vocadlo *et al.* (2003) para la elucidación de los sitios de hidrólisis de la lisozima, el efecto de la orto-acetilación y el fenómeno de resistencia a la hidrólisis que ocurre en el caso de *S. aureus* (Figura 13).

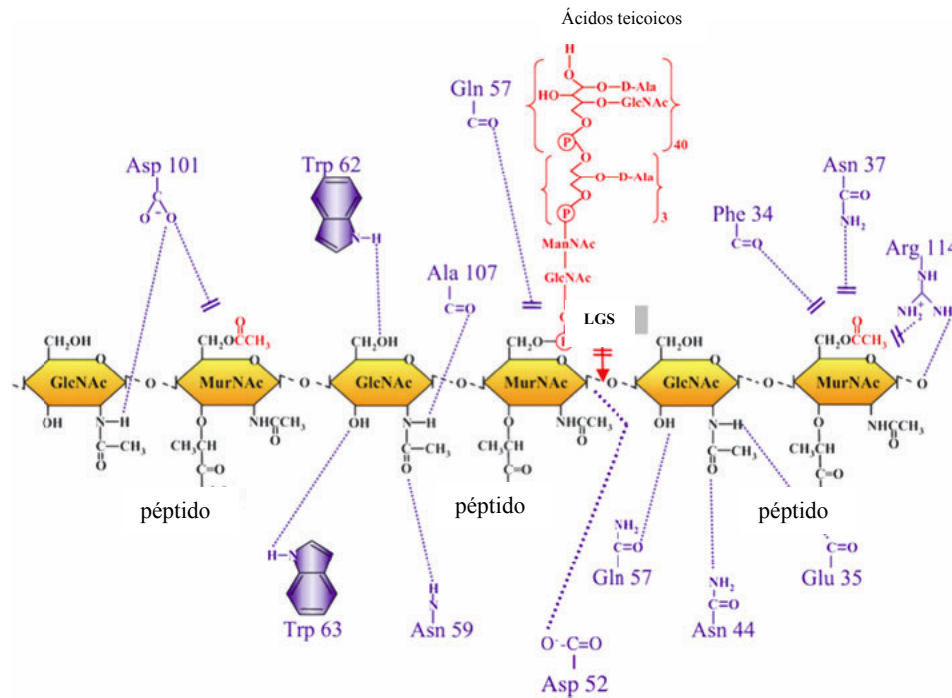


Figura 13. Interacción propuesta de la unión de lisozima y peptidoglicano de *S. aureus*

MurNAc (Ácido N-acetil murámico), GlcNAc (N-acetil glucosamina).

Fuente: Vocadlo, *et al.*, 2003.

El Grupo C₆-OH del ácido N-acetil murámico en estafilococos está modificado por O-acetilación y sirve también como ancla para los ácidos teicoicos. Cinco residuos de aminoácidos (Asp101, Gln57, Phe34, Asn37 y Arg114) interactúan con el Grupo C₆-OH del peptidoglicano sin modificar. Es posible que el alto grado de O-acetilación del peptidoglicano de *Staphylococcus* impida la interacción con lisozima, lo que lleva a la alta resistencia a la lisozima observada. Glu35 y Asp52 son los grupos catalíticos, Asp52 actúa en un primer paso como un nucleófilo para formar el intermedio enzima-glicosil. LGS es el sitio de corte de la lisozima (Vocadlo *et al.*, 2003).

Los ácidos teicoicos de algunas bacterias Gram positivas están constituidos e interaccionan con las cadenas de glicano del PG de la pared de estos microorganismos en forma característica (Figura 14).

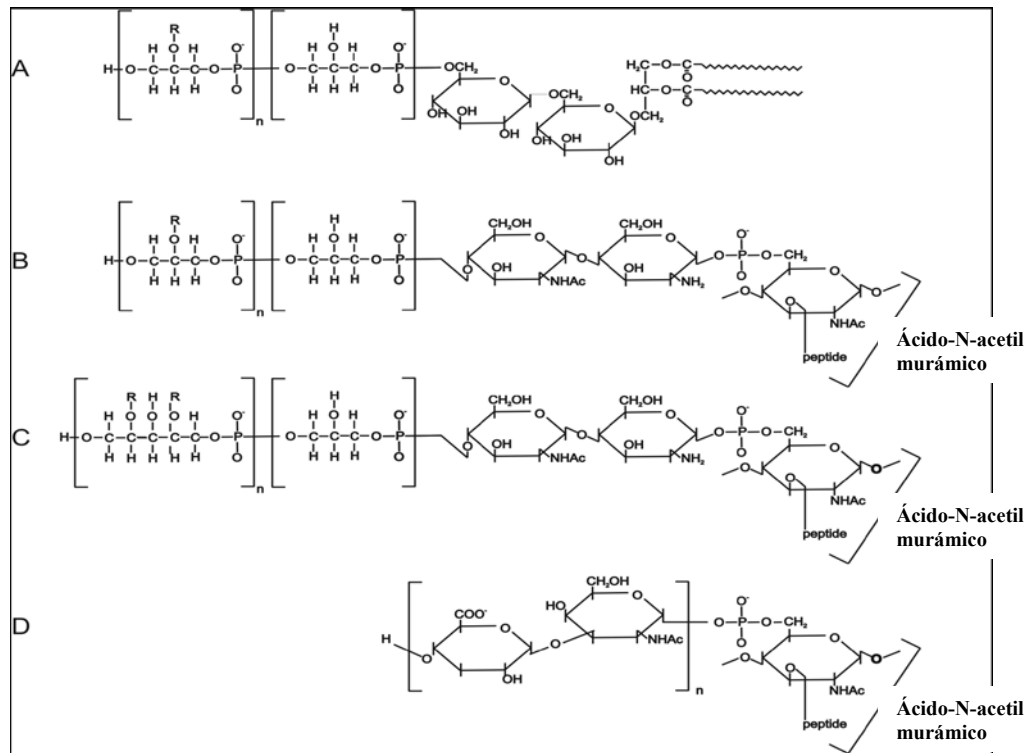


Figura 14. Estructura de ácidos lipoteicoicos en pared celular de bacterias Gram positivas

(A) ácidos lipoteicoicos poliglicerofosfato (*Listeria*) (B) ácido teicoico poliribitolfosfato (*Listeria*), (C) ácido teicurónico (*Bacillus*), (D) D-Ala, sustituyente glucosa o colina, unión a ácido N-acetilmurámico en el PG el ácido teicoico y teicurónico (*L. lactis subsp cremoris* y *Lb. casei*).

Fuente: Steen, 2005.

2.7. Proteasas bacterianas con capacidad bacteriolítica

Diferentes proteasas de origen microbiano han demostrado capacidad bacteriolítica. Algunas son consideradas bacteriolisinas, en términos de la clasificación de Cotter (2005) para bacterias Gram positivas, aunque se incluyen también algunas endopeptidasas de bacterias Gram negativas que por su tipo de acción son capaces también de producir lisis

celular. Es importante resaltar características similares que guardan estas proteasas, son termosensibles, de alrededor de 30 kDa, con capacidad de hidrolizar la pared celular de otros microorganismos por lo que se les considera bacteriolíticas (Tabla 8).

Tabla 8. Proteasas bacterianas con capacidad bacteriolítica.

BACTERIA Productora	ACTIVIDAD	pH PM FINAL	PURIFICACIÓN	microorganismo Susceptible
<i>Lb. helveticus</i> 481	Helveticina Termosensible <u>BACTERIOLISINA</u>	7 37 kDa SDS-PAGE Cromosomal 8MDa	Sephadex-Cromatografía SDS-PAGE	<i>Lb. delbrueckii</i> supsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lb. helveticus</i> G51	Helveticina 51 Termosensible <u>BACTERIOLISINA</u>	6.8 60 kDa Filtración gel 12.5 kDa SDS-PAGE Plásmido 9.4 kpb	Cromatografía Filtración en gel Intercambio Iónico	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>	LasP Termosensible			
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterolisina A Termosensible <u>BACTERIOLITICA</u>	pI 9.24 34.5 kDa	Purificada	<i>Lc. lactis</i> <i>L. innocua</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2333.	Enterolisina A Termosensible <u>BACTERIOLISINA</u> <u>BACTERIOLITICA</u>	regulada por pH, fase logaritmica- estacionaria pI 9.24 34.5 kDa	Dominio catalítico de endopeptidasas que degradan pared celular. Lisostafina , zoocina A, y LytM, ALE-1	enterococos, pediococos, lactococos, lactobacilos
<i>S. simulans</i> Park et al., 1995	Lisostafina Termosensible <u>BACTERIOLISINA</u> <u>ESTAFILOLÍTICA</u> similar a metaloproteinasas	pH neutro a ligeramente básico		
<i>Staphylococcus capitis</i> EPK1.	glicilglicina endopeptidasa ALE-1 contiene un átomo Zn ²⁺ por molécula Termosensible <u>BACTERIOLISINA</u>	7 – 9 35.6 kDa Estructura primaria similar a lisostafina Codificada en plásmido	ALE-1 y lisostafina son miembros de proteasas Zn ²⁺	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. simulans</i> Biovar. <i>staphylolyticus</i>	Lisostafina Termosensible <u>BACTERIOLISINA</u>	pI 9.5 óptimo 7.5 25 kDa	Hidrólisis de enlaces interpeptídicos Gly-Gly	<i>S. aureus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasA proteasa factor de virulencia <u>METALOELASTASA</u> <u>ESTAFILOLÍTICA</u> Extracelular hidroliza pentaglicina del PG de pared celular homología en la secuencia de aminoácidos con proteasas <u>BACTERIOLÍTICA</u>		Baja actividad detectada en los filtrados de cultivo. Requirió purificación por cromatografía DEAE- celulosa Proteasa β-lítica	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Proteasa α lítica Peptidasa <u>FIBRINOLÍTICA</u>			
<i>Lysobacter enzymogenes</i>	Lisil METALOENDOPEPTIDASA Proteasa β-lítica <u>BACTERIOLÍTICA</u> Por D.O. pH 8 30 min vs Lisozima, Lisostafina, Mutanolisina		Inhibida por Tetraetilenpentamina (TEP) 1 mM y 1,10-Phe 10 mM	Gram positivas: <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Lb. sake</i> y <i>casei</i> <i>P. acidilactici</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lc. Lactis</i> Gram negativas <i>E. coli</i> , <i>Xanthomonas</i>
<i>Lysobacter</i> sp. IB-9374	lisil Zn ENDOPEPTIDASA Extracelular Proteasa P lítica más eficiente que lisostafina y mutanolisina		Inhibida por TEP 1 mM y 1,10 O-Phe 10 mM Secuencia de nucleotidos de enzima madura 179 residuos de aminoácidos, similar a <i>Achromobacter</i>	Gram positivas <i>S. aureus</i> , <i>M.luteus</i> , <i>B. subtilis</i> Enzima purificada lisó a casi todas Gram positivas
<i>Achromobacter lyticus</i>	<u>BACTERIOLÍTICA</u> Metalopeptidasa β-lítica			

Fuente: Ahmed, et al., 2002; Bochtler, et al., 2004; Bonade, et al., 2001; Joerger, et al., 1986; Kessler, et al., 1993; Sugai, et al., 1997; Nilsen, et al., 2003; Park, et al., 1995; Peters, et al., 1992; Recsei, et al., 1987; Schindler, et al., 1964; Trayer, et al., 1970; Vesillier, et al., 2001.

2.7.1. Bacteriolisinas de Gram positivas según la clasificación de Cotter, *et al.*, 2005

La Tabla 9 incluye sólo las bacteriolisinas termosensibles de bacterias Gram positivas. Todas son metalo endopeptidasas dependientes de zinc, sus PM varían entre 21 y 37 kDa. De acuerdo con su capacidad lítica (Clase IIIa) como lisostafina, enterolisina A, zoocina A y milericina y no líticas (Clase IIIb) como la helveticina y la disgalacticina. Una endopeptidasa identificada recientemente, la glicilglicina endopeptidasa de *S. capitis* podría también ser incluida entre las líticas.

Tabla 9. Bacteriolisinas de Bacterias Gram positivas

Clasificación Modo de acción	Proteasa Homólogos	Microorganismo	Tipo	Reconocimiento Enlace peptídico de la pared celular	Características			Ref	
					PM kDa	PI	pH óptimo		
B A C T E R I O L I S I N A	III a Lítica	Lisostafina, Glicilglicina endopeptidasa lytM	<i>Staphylococcus simulans</i>	Endopeptidasa, Familia Zn ²⁺ Proteasa	α-NH ₂ de puente interpeptídico de glicina Actividad Elastolítica	27			a-e
		Enterolisina A endopeptidasa	<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 2333	Metallo endopeptidasa	Amplio espectro α-NH ₂ de Glu (péptido principal)	34.5	9.24 teórico		f
		Zoocina A endopeptidasa	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidermicus</i> 4881	Metaloproteasa Termosensible	<i>Streptococcus</i> α-NH ₂ de Ala (puente interpeptídico)	27.8			g
		Millericina B	<i>Streptococcus milleri</i> NMSCC 061	Metaloproteasa Termosensible	Amplio espectro α-NH ₂ de Glu (péptido principal) α-NH ₂ del extremo Carboxilo terminal (puente interpeptídico)	28.9			h
	III b No- lítica	Helveticina J Gen cromosomal	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	Agregado >300 000 kDa Termolábil	lactobacilos (5 especies)	37		7	i
		Disgalacticina	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>Equisimilis</i> W2580	S-S esencial para su actividad biológica	<i>Streptococcus pyogens</i>	21.5			j
	ALE-I Glicilglicina endopeptidasa	<i>Staphylococcus capitis</i>	Endopeptidasa, Familia de Zn ²⁺ Proteasas	<i>S. aureus</i>	35.6		7-9	k	

Fuente: a) Schindler *et al.* 1964. b) Schindler and Schuhardt, 1965. c) Park *et al.* 1995. d) Firczuk *et al.* 2005. e) Trayer, *et al.* 1970. f) Nilsen, *et al.* 2003. g) Simmonds, *et al.* 1996. h) Beukes M. *et al.* 2000. i) Joerger and Klaenhammer, 1986. j) Heng *et al.* 2006. k) Sugai *et al.* 1997.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

General

Caracterizar la actividad antibacteriana extracelular de la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Particulares

1. Establecer las condiciones de cultivo de *P. acidilactici* para la producción de la actividad antibacteriana.
2. Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano en los sobrenadantes de cultivo de la cepa *P. acidilactici* ATCC 8042 sobre microorganismos susceptibles de interés sanitario.
3. Establecer el papel del ácido láctico en la actividad antibacteriana.
4. Evaluar la producción de reuterina en *P. acidilactici*
5. Identificar la presencia del gen *pedB* en *P. acidilactici* ATCC 8042 para descartar la presencia de pediocinas en el efecto bioconservador
6. Evaluar la actividad enzimática extracelular en *P. acidilactici* ATCC 8042 que pueda ser la responsable del efecto antibacteriano.
7. Determinar las principales características de la actividad enzimática extracelular de *P. acidilactici* relacionadas con la actividad inhibitoria de microorganismos susceptibles

HIPÓTESIS

La actividad antibacteriana observada en sobrenadantes de cultivo de la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se debe a compuestos que pueden ser bacteriocinas, sustancias similares a bacteriocinas (BLIS) o actividades enzimáticas hidrolíticas capaces de producir lisis bacteriana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Caracterización de la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

1.1. Cepas bacterianas

La cepa MIT-B-41 P-60 ATCC 8042b-67 de *Pediococcus acidilactici* fue obtenida en Agar MRS del cepario del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), México, la cual se mantuvo en esferas de vidrio con Caldo MRS modificado estéril-glicerol 80-20% v/v y almacenados a -20 °C.

Se utilizaron como cepas susceptibles para evaluar la actividad antibacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 65385P, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, del cepario del Posgrado de la FESC-UNAM y *Listeria innocua* ATCC 33099 donado amablemente por la Dra. Isabel Guerrero de la UAM-I. Las cepas de *S. aureus* y *L. innocua* se mantuvieron también en esferas de vidrio adicionadas de caldo nutritivo (Bioxon)-glicerol (Sigma) 80-20% v/v almacenadas del mismo modo. *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma), liofilizados que fueron almacenados a -20°C

Las cepas de *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, fueron donadas amablemente por la Dra. Carmen Wachter de la FQ. Se mantuvieron en esferas de vidrio adicionadas de caldo nutritivo (Bioxon)-glicerol (Sigma) 80-20% v/v almacenadas del mismo modo.

1.1.1. Preparación de esferas de vidrio

Se prepararon esferas de vidrio de las diferentes cepas con el siguiente protocolo:

Se tomó una asada del cultivo de *P. acidilactici* en agar MRS (DeMan, *et al.* 1960) que se recibió del cepario del CINVESTAV y se inocularon 100 mL de caldo MRS modificado en matraz Erlenmeyer de 250 mL y se incubaron a 30 ± 2 °C y 120 rpm, con agitación recíproca (New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA) durante 24 h. Al término de la fermentación se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 15,000 rpm a 4 °C durante 10 min (Beckman Modelo J2-MC). Se desechó el sobrenadante y se lavó el paquete celular con 10 mL de agua destilada estéril, se homogenizó en vórtex a máxima velocidad durante 30 s y se centrifugó a las mismas condiciones. Se repitió este procedimiento dos veces.

En paralelo se esterilizaron criotubos de 1.5 mL con tapón de rosca con 13 esferas de vidrio cada uno. A cada tubo se adicionó 1 mL de Caldo MRS modificado-glicerol (Sigma) 80-20% v/v y se esterilizaron. El paquete de células lavadas se resuspendió con 200 µL del medio del criotubo y se adicionaron al mismo. Se agitó vigorosamente durante 30 s, para que las células se adhirieran a las perlas de vidrio y enseguida se eliminó el exceso de líquido con una punta estéril de 200 µL. Se almacenaron a -20 °C.

Para *S. aureus* y *L. innocua* se utilizó caldo nutritivo (Bioxon)-Glicerol (Sigma) 80-20% v/v. Durante la reactivación de los microorganismos se evitó la descongelación de las esferas de vidrio, al mantener el vial sumergido en hielo y en condiciones estériles, tomándolas con un palillo estéril, para adicionarlas al caldo de cultivo, en el menor tiempo posible.

2. Medios de cultivo y condiciones de producción

2.1. MRS modificado

Se pesaron los ingredientes del medio MRS modificado (Tabla 10), excepto el ácido ascórbico y la sacarosa, y se resuspendieron en 950 mL de agua destilada en matraz Fernbach de 2,500 mL de capacidad, para un volumen de trabajo de 1L.

2.1.1. Preparación de la sacarosa

En paralelo se pesaron 10g de sacarosa y se disolvieron en 40 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se esterizaron por separado en autoclave a 121 °C/10 lbs/10 min.

2.1.2. Preparación del ácido ascórbico

Se pesó 1g de ácido ascórbico, se disolvió en 10 mL de agua destilada y se esterilizó con membrana Millipore de 0.22 µm, en la campana de flujo laminar. Esta solución se adicionó junto con la de sacarosa al resto del medio estéril en el matraz Fernbach y se mezcló muy bien.

Tabla 10. Medio MRS modificado por Llorente (1998)

Ingrediente	g L⁻¹
Peptona proteosa No 3	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura (Oxoid)	5.0
Sacarosa	10.0
Monooleato de polisorbitán 80 (Tween) ⁴	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2.0
Ácido ascórbico	1.0

⁴ Sugerido por Bhunia, 1984.

2.2. Preparación de inóculos y fermentación

Para el cultivo de *P. acidilactici* en el matraz Fernbach se prepararon un preinóculo (20 mL de MRS modificado) y un inóculo (20 mL) en matraces Erlenmeyer de 50 mL estériles, con 20 mL del MRS modificado estéril. Para el preinóculo, se tomaron dos esferas de vidrio con *P. acidilactici* almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se adicionaron a un Erlenmeyer con 20 mL y se incubaron a $30\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h a 120 rpm (New Brunswick, Scientific Co.). Transcurrido este tiempo se inoculó el segundo Erlenmeyer con 1% del preinóculo (200 μL) y se incubó a las mismas condiciones toda la noche (aprox. 12 h). El matraz Fernbach de fermentación se inoculó al 1% (10 mL) con el cultivo del inóculo y se incubó a las mismas condiciones durante 8 h.

2.2.1. Preparación de sobrenadantes

Al término de cada tiempo de fermentación el cultivo se centrifugó a 9,500 rpm durante 30 min a 4°C . Se vació el sobrenadante y se neutralizó con solución de NaOH 1M. Se filtró con el Sistema de filtración de Millipore (estéril) con membrana (0.22 μm), se recibió en botellas de 500 mL de plástico, estériles (aprox. 300 mL en cada una) y se almacenaron en el ultracongelador REVCO a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h mínimo, para su liofilización.

2.3. Caldo de Soya Trypticaseína Extracto de Levadura Sacarosa (CSTES)

Para el crecimiento de *P. acidilactici* en CSTES se siguieron los procedimientos 2.1 y 2.2 según formulación (Tabla 11).

Tabla 11. Medio Caldo de soya tripticaseína-extracto de levadura-sacarosa⁵

Ingredientes	g L⁻¹
Soya tripticaseína	10.0
Extracto de levadura	10.0
Sacarosa	10.0
Monooleato de polisorbitán 80 (Tween)	1.0
Sulfato de manganeso	0.05
Ácido ascórbico	1.0

2.3.1. Cinética de crecimiento de *P. acidilactici*

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de MRS modificado o de CSTES y se destinó uno para cada tiempo de muestreo (inicio, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h). Todos se inocularon al 1% al tiempo cero y se incubaron a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ 120 rpm en un agitador New Brunswick Scientific Co. Se les determinó la densidad óptica con el espectrofotómetro Milton Roy a 620 nm y se utilizó el mismo medio como blanco y el pH con el potenciómetro Beckman. Se centrifugaron a 9,500 rpm a 4°C durante 30 min (Beckman Modelo J2-MC), se recuperaron los sobrenadantes, se neutralizaron con NaOH 1M y se filtraron con membrana $0.22\mu\text{m}$ (Sistema de filtración Millipore). Se guardaron a -70°C , se liofilizaron (Freeze-dry Labconco, USA) y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3. Perfil de fermentación de carbohidratos con el sistema API CH50

Con el sistema API CH50 se realizó el estudio de fermentación de carbohidratos, según las instrucciones del proveedor (Biomériux). Dado que las cepas del género *Pediococcus acidilactici* son microaerofílicas, se incubaron en condiciones de anaerobiosis, utilizando aceite mineral estéril. Para la identificación de cepas, se analizaron los resultados de las pruebas

⁵ Biswas, 1991.

bioquímicas de fermentación de carbohidratos con el Sistema APILAB Plus (Analytical Profile Index (V 3.2.2)) (Anexo 1).

4. Amplificación y detección por PCR de los genes 16S y *ldh* de cepas de *Pediococcus*

4.1. Extracción del ADN total de *P. acidilactici* (Anderson y McKay 1993, modificado por Llorente)

Se inocularon 30 mL de MRS modificado estéril con 2% del inóculo de *P. acidilactici* y se incubaron a 30 °C durante 12-16 h. Transcurrido este tiempo se cosecharon las células por centrifugación a 9000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se lavó el pellet con 200 µL de buffer Tris (25mM) pH 8.0, centrifugación a 14,000 rpm durante 1 min para eliminar el sobrenadante. Para la lisis, se resuspendieron las células en 500 µL del buffer de extracción Tris 50mM EDTA 1mM-sacarosa 6.7% pH 8.0 y se adicionaron 125 µL de lisozima (10 mg mL⁻¹ en Tris 25mM pH 8.0). La modificación de Llorente consistió en adicionar además mutanolisina (10 mg mL⁻¹) y un periodo de incubación de 45 min a 37 °C. Se adicionaron 100 µL de Tris-HCl (50mM) EDTA 25mM pH 8.0, 30 µL de SDS (20% w/v) en Tris-HCl (50mM) EDTA 25mM pH 8.0 (Anderson y McKay indican 10 min de incubación a 37 °C). Además se agregaron 7.5 µL de Pronasa B (20 mg mL⁻¹), se mezclaron por inversión durante 30 s y se incubaron 30 min a 37 °C para completar la lisis. En la extracción de ADN de *Pediococcus* tampoco se hizo la extracción alcalina del protocolo original. Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 min y se obtuvo el sobrenadante en un tubo nuevo.

El sobrenadante se desproteinizó con 700 µL de Fenol saturado-cloroformo-alcohol-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min.

Se removió la fase superior y en caso de presentar turbidez, se repitió la extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

Se recuperó la fase superior en un tubo nuevo, se le adicionaron 700 μL de isopropanol frío, se mezclaron por inversión suave y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min. El pellet se lavó con 1 mL de etanol al 70% y centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, se evaporó el etanol y el botón se resuspendió en 20 μL de agua desionizada estéril. El ADN total se visualizó por electroforesis (100V durante 1 h) en gel de agarosa al 0.7%, con buffer TAE (Tris 40mM, Ácido Acético 20mM y Na_2EDTA pH 8.1), se tiñó con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se reveló con LUV en un transiluminador Kodak (Sambrok, *et al.*, 1989, Ausubel, 1999).

4.2. Síntesis de primers y PCR

La estrategia para la amplificación por PCR y la detección e identificación de secuencias específicas de ADN del gen 16S rARN y del gen *ldh* de *Pediococcus acidilactici*, se basó en el trabajo de Mora *et al.* (1997). Los *primers* para regiones variables del gen 16S ARNr, y del gen *ldh* (Tabla 12) se sintetizaron en el Laboratorio de Síntesis del IBT-UNAM.

Tabla 12. Secuencia y posición de los primers usados en la PCR

Primer	Nomenclatura	Longitud (pb)	Secuencia (5'→3')
PacF	S-S- <i>P.pent</i> -67 (<i>P. pentosaceus</i>) –a-S-22		CGAACTTCCGTTAATTGATTAT
PpeF	S-S- <i>P. acid</i> -69 (<i>P. acidilactici</i>) – a-S-22		CGAACTTCCGTTAATTGATCAG
PuR	S- <i>*</i> -Lab-940 (<i>P. acidilactici</i>)-a-A-18	872	ACCTTGCGGTCGTACTCC
ldhD F	<i>ldh</i> -S-Pac-1192 (<i>P. acidilactici</i>)- a-S-20-		GGACTTGATAACGTACCCGC
ldhD R	<i>ldh</i> -S-Pac-1640 (<i>P. acidilactici</i>)-b-S-20-	449	GTTCCGTCTTGCATTTGACC

La nomenclatura está dada por Alm *et al.*, 1996.

Para la amplificación *in vitro* del ADN se empleó la mezcla de reacción de 20 µL que contenía 25 µmol de cada primer, 250-500 ng de templado de ADN, 100 µmol de dNTP's y 1 U de *Taq* polimerasa Hi-fidelity (Tabla 13).

Tabla 13. Mezcla de reacción para la identificación de cepas de *Pediococcus* por PCR

Mezcla de reacción	Concentración final	volumen
Agua desionizada		43 µL
buffer de <i>Taq</i>	10x	7.5 µL
MgCl ₂	1.5mM	2.25 µL
dNTP's (dATC, dCTP, dGTP, dTTP)	100 µmol de cada nucleótido	0.75 µL
Oligo <i>ldhD</i> F	25 µmol	3.0 µL
Oligo <i>ldhD</i> R	25 µmol	3.0 µL
<i>Taq</i> polimerasa (Marca Gibco)	1 U	0.5 µL
Total		60 µL

Se repartieron 20 µL de la mezcla de reacción en cada uno de 3 tubos, para las 3 reacciones diferentes: (*PacF*- *PuR*), (*PpeF*-*PuR*), (*ldhF*-*ldhR*) (Tabla 14).

Tabla 14. Combinación de primers para la identificación de cepas de *Pediococcus* por PCR

T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	Primers	Tubo 1 Reacción gen <i>ldh</i>	Tubo 2 Reacción gen <i>Pac</i>	Tubo 3 Reacción gen <i>Ppe</i>
(62,58,62)	(66.45,60.36,63.45)	F(<i>ldh,Pac,Ppe</i>)	1 µL	1 µL	1 µL
(60)	(64.75)	R (<i>ldh</i>)	1 µL		
(58)	(62)	R (<i>Pu</i>)		1 µL	1 µL

Los pasos para la amplificación incluyeron una desnaturalización a 94°C durante 5 min, para incrementar la especificidad, la temperatura de anillamiento se mantuvo a 66 °C y se disminuyó 2 °C cada dos ciclos hasta 62 °C. Después de 1 min para estabilizar la temperatura de anillamiento, se realizaron 35 ciclos adicionales a 61 °C. La extensión se desarrolló a 72 °C durante 5 min. Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un Gen Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) (Tabla 15).

Tabla 15. Condiciones de reacción empleadas para la amplificación por PCR

	2 ciclos			2 ciclos			2 ciclos			35 ciclos				
°C	94	94	66	72	94	64	72	94	62	72	94	61	72	72
min	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5

4.2.1. Análisis de productos de PCR

Después de la amplificación, se tomaron 10 µL de producto de PCR y se realizó electroforesis (100V durante 1h) en gel de agarosa 1.2% en buffer TBE 1x (pH 8).

Se purificaron las bandas de interés con el kit QIA Quick Gel Extraction de Qiagen para productos de PCR y se concentraron con el Speed-vac DNA plus. El producto purificado (concentración de 20-40 ng mL⁻¹) se visualizó en un gel de agarosa (1% y buffer TAE 0.5%)

teñido tiñó con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se reveló con LUV en un transiluminador Kodak (Sambrok, *et al.*, 1989, Ausubel, 1999).

Para la secuenciación se entregaron $15 \mu\text{L}$ del producto purificado (concentración de 20-40 ng/mL) al Laboratorio de Análisis de Secuencias del Instituto de Fisiología Celular-UNAM, la foto del gel y $20 \mu\text{L}$ de los primers *Pac* y *Ppe* (20 pM). Se hizo una comparación del porcentaje de similitud de la secuencia obtenida (BLAST⁷).

4.3. Identificación de la presencia de plásmidos

La extracción y detección de ADN-plásmidos se hizo con la técnica de Anderson y McKay, 1983. Para la identificación de los plásmidos, se adicionaron $2 \mu\text{L}$ de RNAsa (10 mg mL^{-1}) al ADN total extraído y se incubó a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h. Se purificaron con el kit Rapid Plasmid Miniprep Protocol™ (Qiagen).

Se verificó la presencia de ADN plasmídico por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, desarrollado a 100V durante 1 h con buffer TAE (Tris 40mM, Ácido Acético 20mM y Na_2EDTA pH 8.1, se tiñó con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se reveló con LUV en un transiluminador Kodak (Sambrok, *et al.*, 1989, Ausubel, 1999).

⁷ <http://www.ncbi.org>

4.4. Detección de la presencia del gen *pedB* por PCR

4.4.1. Síntesis de primers y PCR

Se realizó la amplificación por PCR directamente del pellet de células de *Pediococcus* tras 4 horas de cultivo a 30 °C en MRS modificado. Se empleó la secuencia genética reportada por Martínez *et al* 1998, para determinar la presencia del gen de pediocina *pedB* (Tabla 16), presente en el operón de la pediocina (Figura 15) con un producto esperado de 713 pb. La síntesis de los mismos se solicitó a Invitrogen, vía su representante en México, la compañía Accesolab.

Tabla 16. Secuencia de los primers usados en la detección del gen *pedB* por PCR

Primer	Secuencia	Longitud (pb)	Tm
347 F	AAAATATCTAACTAAATACTTC		50°C
347 R	AAAACCAGTTTATAGAAAAAT	713	50°C

Fuente: Martínez, *et al.*, 1998

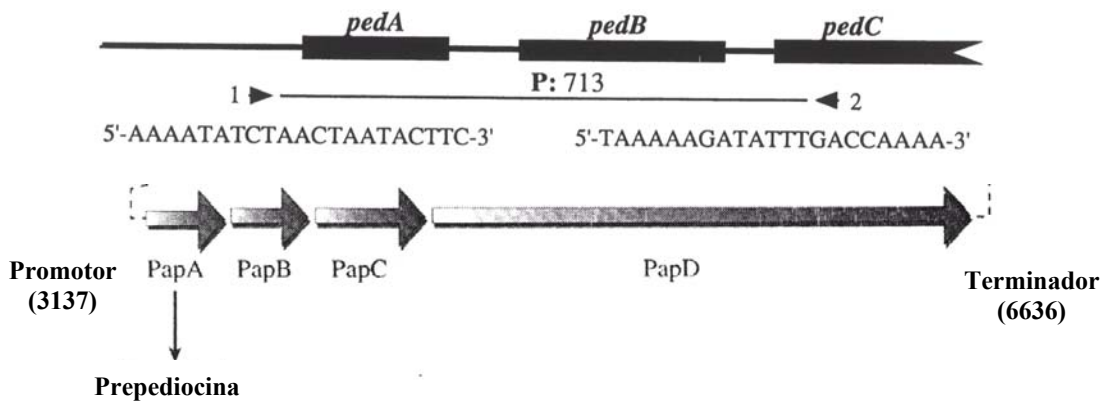


Figura 15. Operón de la pediocina

Fuente: Martínez, *et al.*, 1998

Se preparó la mezcla de reacción como templados y para cada uno se utilizaron los primers *pedBF* y *pedBR* (Tabla 17) a dos concentraciones 10 y 25 pmol, con dos volúmenes de

reacción 50 y 100 μL , para 8 reacciones diferentes con ADN cromosomal y ADN plasmídico (Tabla 18).

Tabla 17. Mezcla de reacción para PCR para la detección del gen *pedB*

Mezcla de reacción	Concentración final	DNA cromosomal	DNA plasmídico
Agua desionizada		39.8 μL	36.8 μL
buffer de Taq	10x	5 μL	5 μL
MgCl_2	1.5mM	1.5 μL	1.5 μL
dNTP's	100 μmol	0.5 μL	0.5 μL
Oligo <i>pedB</i> F	10, 25 pM	1.0 μL	1.0 μL
Oligo <i>pedB</i> R	10, 25 pM	1.0 μL	1.0 μL
DNA		1.0 μL	4.0 μL
Taq polimerasa (Gibco)	1 U	0.2 μL	0.2 μL
Total		50 μL	50 μL

Después de la amplificación, la visualización de los productos de PCR, se hizo con 10 μL del producto, sobre geles de agarosa 1.2% en buffer TBE 1x (pH 8), durante 1 h a 80V en buffer TBE 1x. Se tiñó con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se reveló con LUV en un transiluminador Kodak (Sambrok, *et al.*, 1989, Ausubel, 1999).

Tabla 18. Reacciones para la detección del gen *pedB*

ADN Cromosomal		ADN Plasmídico	
<i>pedBF</i>	<i>pedBR</i>	<i>pedBF</i>	<i>pedBR</i>
10, 25 pM	10, 25 pM	10, 25 pM	10, 25 pM
50, 100 μl	50, 100 μl	50, 100 μl	50, 100 μl

Todas las reacciones de amplificación fueron realizadas en un Gen Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). El perfil de temperaturas fue el siguiente: un paso de desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, para incrementar la especificidad, la temperatura de anillamiento se estableció a 58 $^{\circ}\text{C}$ y disminuyó hasta 52 $^{\circ}\text{C}$. Después de 1 min para estabilizar la temperatura de anillamiento,

se realizaron 40 ciclos adicionales a 57 °C para alta astringencia y 52 °C para baja astringencia. La extensión se desarrolló a 72 °C durante 5 min (Tabla 19).

Tabla 19. Condiciones de PCR para la detección del gen *pedB*

	Desnaturalización	Anillamiento 40 ciclos			Extensión
°C	94	94	57 (alta astringencia) 52 (baja astringencia)	72	72
min	5	1	1	1	5

4.4.2. Análisis de productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos se purificaron con el QIA Quick Gel Extraction Kit de Qiagen, se concentraron en el Speed-vac DNA plus. El producto se visualizó en un gel de agarosa (1.2% y buffer TAE 1.0%), tras aplicar 2 µL (concentración de 20-40 ng mL⁻¹). Las bandas obtenidas se purificaron directamente del gel. Para la secuenciación en el IFC-UNAM y el análisis del porcentaje de similitud de la secuencia obtenida, mediante BLAST.

5. Evaluación del daño a microorganismos susceptibles

Para evaluar la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *P. acidilactici* sobre microorganismos susceptibles se probaron diferentes metodologías que incluyeron pruebas microbiológicas y de microscopía.

En este trabajo se utilizaron *S. aureus* ATCC 6538P y *Listeria innocua* ATCC 33099, como microorganismos susceptibles incubados con los sobrenadantes de cultivo, para determinar los cambios en viabilidad en un tiempo determinado y los resultados mostraron el poder inhibitorio de

las mismas. Las células tratadas y las células control fueron preparadas para su observación al microscopio óptico y al microscopio electrónico de barrido.

5.1. Pruebas microbiológicas

Las pruebas microbiológicas para evaluar la actividad antibacteriana consistieron de métodos de punto final: prueba de difusión y de dilución en agar para determinar la concentración efectiva aproximada y métodos descriptivos: curvas de inhibición con el procedimiento de conteo de microorganismos, (curvas “time-kill”) y así definir la respuesta sobre el crecimiento de células susceptibles en el tiempo: incremento de la fase lag, supresión de la fase estacionaria, disminución en la velocidad de crecimiento en la fase log y letalidad (Davidson y Parish, 1989; NCCLS, 1991).

5.1.1. Prueba de difusión en agar

En este trabajo la actividad inhibitoria se detectó en placas de agar Antibióticos No 11 estéril. El microorganismo susceptible en fase logarítmica se adicionó al BHI (0.6% de agar), 10 mL por caja (Piddock, 1990) y se vertieron en sobrecapa en las cajas de agar Antibióticos No 11, se dejaron solidificar en el refrigerador por 10 min para que fuese más fácil hacer los pozos, con un sacabocados estéril. En cada pozo se colocaron 300 μ L del sobrenadante concentrado diez veces por liofilización y se incubaron a 37 °C durante 24 h. La actividad inhibitoria se identificó por la formación de halos de inhibición alrededor de cada pozo.

5.1.1.1. Preparación de los microorganismos susceptibles

Para obtener cultivos estandarizados de las cepas de *S. aureus* ATCC 6538P y *Listeria innocua* ATCC 33099, se inoculó un matraz Erlenmeyer de 50 mL, con 20 mL de caldo BHI, con una perla de vidrio de cada cepa. Se incubaron 24 h a 37 ± 2 °C, y a partir de estos se inocularon

tubos con 10 mL de caldo BHI estéril, cada uno con 1 % de inóculo y se incubaron hasta la fase logarítmica ($5-7 \log \text{ UFC mL}^{-1}$). Con cada cultivo se hizo una serie de diluciones decimales y se realizó cuenta en placa de cada uno en agar BHI al aplicar 20 μL por triplicado para cada dilución (Figura 16).

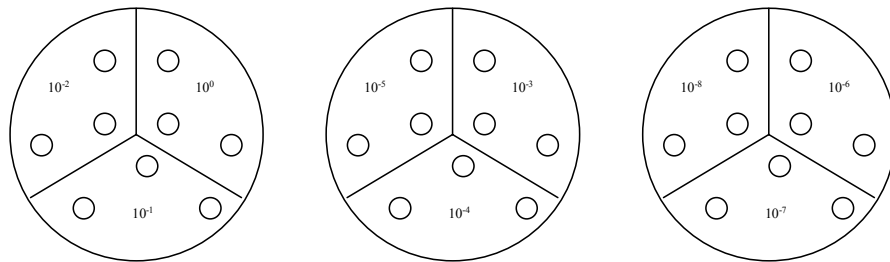


Figura 16. Siembra en placa de serie de diluciones decimales

Se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se contaron las colonias en la dilución que contenía menos de 30 y se multiplicaron por el factor de dilución (Fd).

$$\text{Ej} \quad \text{Fd} = \frac{10,000 \mu\text{L}}{20 \mu\text{L}} = 500$$

Después por la dilución en donde se encontraron 30 colonias o menos. A continuación se presenta el ejemplo con la dilución 10^{-2} para obtener el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en 1mL.

$$\text{No de colonias (3)} \times \text{Fd (500)} \times 100 = 1.5 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$$

5.1.1.2. Producción de la actividad antibacteriana en las distintas fases de crecimiento bacteriano

Para identificar el medio de cultivo y la fase de crecimiento de *P. acidilactici* en la que se presentara la mayor actividad antibacteriana, se analizaron los sobrenadante de cultivo en MRS modificado y CSTES para cada tiempo de muestreo (inicio, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h), obtenidos

bajo las condiciones mencionadas antes. Los sobrenadantes liofilizados se resuspendieron en agua destilada estéril en la décima parte del volumen inicial y con este material se realizaron pruebas de difusión en agar con los microorganismos susceptibles.

5.1.2. Espectro de actividad antibacteriana

Para evaluar y corroborar la efectividad del sobrenadante de cultivo, como antibacteriano, se utilizaron microorganismos Gram positivos, algunas cepas cercanas, y algunas Gram negativas y se midió el incremento en turbidez con respecto al tiempo con un espectrofotómetro (Spectronic 21-D) de los cultivos de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Listeria innocua* ATCC 33099, *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

5.1.3. Viabilidad de microorganismos

Los cultivos de *S. aureus* y *L. innocua* se incubaron en presencia de sobrenadantes liofilizados (5% de proteínas) durante 24 h a 37 °C y transcurrido este tiempo se observaron los cambios en viabilidad.

5.1.3.1. Curvas “time-kill” (UFC mL⁻¹) (NCCLS, 1991)

Se obtuvieron las curvas “time-kill”, al muestrear al inicio, 1, 2, 3 y 4h de incubación de los microorganismos susceptibles con los sobrenadante de cultivo, se preparon series de diluciones decimales y se hicieron conteos en placa (Figura 16), al sembrar 20 µL por triplicado de cada dilución en cajas de agar BHI, se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se cuantificaron y se reportaron UFC mL⁻¹.

5.1.3.2. Prueba de dilución en caldo (NCCLS, 1991)

La prueba de dilución en caldo se usó para determinar si el sobrenadante causaba letalidad sobre el microorganismo susceptible y conocer la concentración mínima inhibitoria (MIC). La MIC es definida como la concentración mas baja de un antimicrobiano que previene el crecimiento de un microorganismo después de un período de incubación de 24 h a 37 °C.

5.1.3.3. Características coloniales

Como parte de la identificación de daño se contrastaron los cambios coloniales observados en las colonias de las cepas de prueba con aquellas que se cultivaron bajo condiciones óptimas.

5.1.4. Observación de cambios morfológicos al microscopio óptico

Las células de *Staphylococcus aureus* cultivadas en los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* en MRS (neutralizados y concentrados por liofilización), se sometieron a tinción de Gram para su observación al microscopio óptico (OLYMPUS OPTICAL modelo CX31).

5.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Con objeto de observar directamente el daño producido por los sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* en MRS modificado, sobre los microorganismos susceptibles *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Listeria innocua* ATCC 33099), fueron procesados para su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido tras incubarse a 37 °C durante 24 h, en presencia solo de sobrenadante (5% de proteínas). Los controles negativos consistieron de cultivos en BHI de

los microorganismos susceptibles (*S. aureus* y *L. innocua*), incubados también a 37 °C durante 24 h. Asimismo como controles positivos de actividad antibacteriana, se prepararon cultivos de los microorganismos susceptibles, tratados con Nisaplín™ (10 mg mL⁻¹) e incubados del mismo modo.

5.2.1. Preparación de células para su observación al MEB

Las células tratadas con sobrenadante y las células de los cultivos control, cultivadas a 37 °C durante 24 h, se cosecharon por centrifugación a 10,000 rpm. Se fijaron con glutaraldehído al 4% (w/v), durante 2 horas, se lavaron dos veces con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.2 M pH 7.3 (Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ · 7 H₂O, Ted Pella Inc. Reactivo ACS), se mezclaron por inversión suave y centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min (2 veces).

La solución amortiguadora de Sorenson's de fosfato de sodio (pH 7.3) se preparó con las soluciones: A: 0.2M de NaH₂PO₄ H₂O (27.6g L⁻¹) y B: 0.2M de Na₂HPO₄ anhidro (28.4g L⁻¹). Se mezclaron 23 mL de la solución A y 77 mL de la solución B, según Tabla 20 y se aforó a un volumen final de 200 mL con agua destilada (Tabla 20).

Tabla 20. Soluciones de fosfatos de sodio para preparar la solución de Sorenson's

pH (temperatura ambiente)	Solución A (mL)	Solución B (mL)
5.8	4.0	46.0
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.5	25.5
7.0	30.5	19.5
7.2	36.0	14.0
7.4	40.5	9.5
7.6	43.5	6.5
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

Las células se trataron en post-fijación adicional con tetraóxido de osmio al 4% (w/v), durante 30 min. Se lavaron dos veces con la misma solución amortiguadora de Sorenson's (pH 7.3 2 veces). Por último las células se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%), 10 min en cada una, con 3 cambios en etanol absoluto. Se secaron a 0 °C en atmósfera de CO₂ (Secador Emitech Modelo K850). Se cubrieron con oro (Evaporador con placa de oro paladio Emitech Modelo K550). Se observaron al microscopio electrónico de barrido (Hitachi S 2460-N).

5.3. Búsqueda de otras sustancias con actividad antibacteriana producidas por la cepa 8042 diferentes a las pediocinas

5.3.1. Ácido láctico-lactato de sodio

La determinación del ácido láctico producido por la cepa 8042 en medio MRS y CSTES se realizó por titulación potenciométrica (AOAC, 2000), para lo cual se tomaron 15 mL de cultivo, se centrifugaron a 9,500 rpm y se obtuvieron 10 mL de los sobrenadantes a los cuales se midió el pH y se adicionó NaOH 0.1N hasta alcanzar la neutralidad. La medición se realizó en paralelo con potenciómetro de mesa Beckman.

5.3.1.1. Ácido láctico-lactato de sodio en la inhibición de *S. aureus* y *L. innocua*

Con objeto de evaluar el daño producido por el ácido láctico o el lactato de sodio, se prepararon soluciones al 1, 2 y 3% de cada uno y se realizaron pruebas de difusión en agar con sobrecapa de agar con *S. aureus* o *L. innocua* como microorganismos susceptibles, para lo cual se

colocaron en pozos, 300 μ L de cada solución y concentración. Se incubaron a 37 °C durante 24 h y se observó la presencia de halos de inhibición.

5.3.2. Determinación cualitativa de la producción de reuterina

Bajo la hipótesis de que el 3-hidroxiacetaldehído (3-HPA), conocido como reuterina, sea el compuesto responsable de la actividad inhibitoria, se utilizaron las condiciones establecidas por Magnusson *et al.*, 2003.

Para evaluar la producción de reuterina se adicionó glicerol 250mM a los cultivos de *P. acidilactici* de 24 h a 30 °C en anaerobiosis, para estimular la producción de reuterina, al término de la cual se probaron los sobrenadantes en pruebas de difusión en agar.

6. Detección primaria de actividad enzimática extracelular

La detección y caracterización de la actividad proteolítica extracelular del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se realizó según la Figura 17.

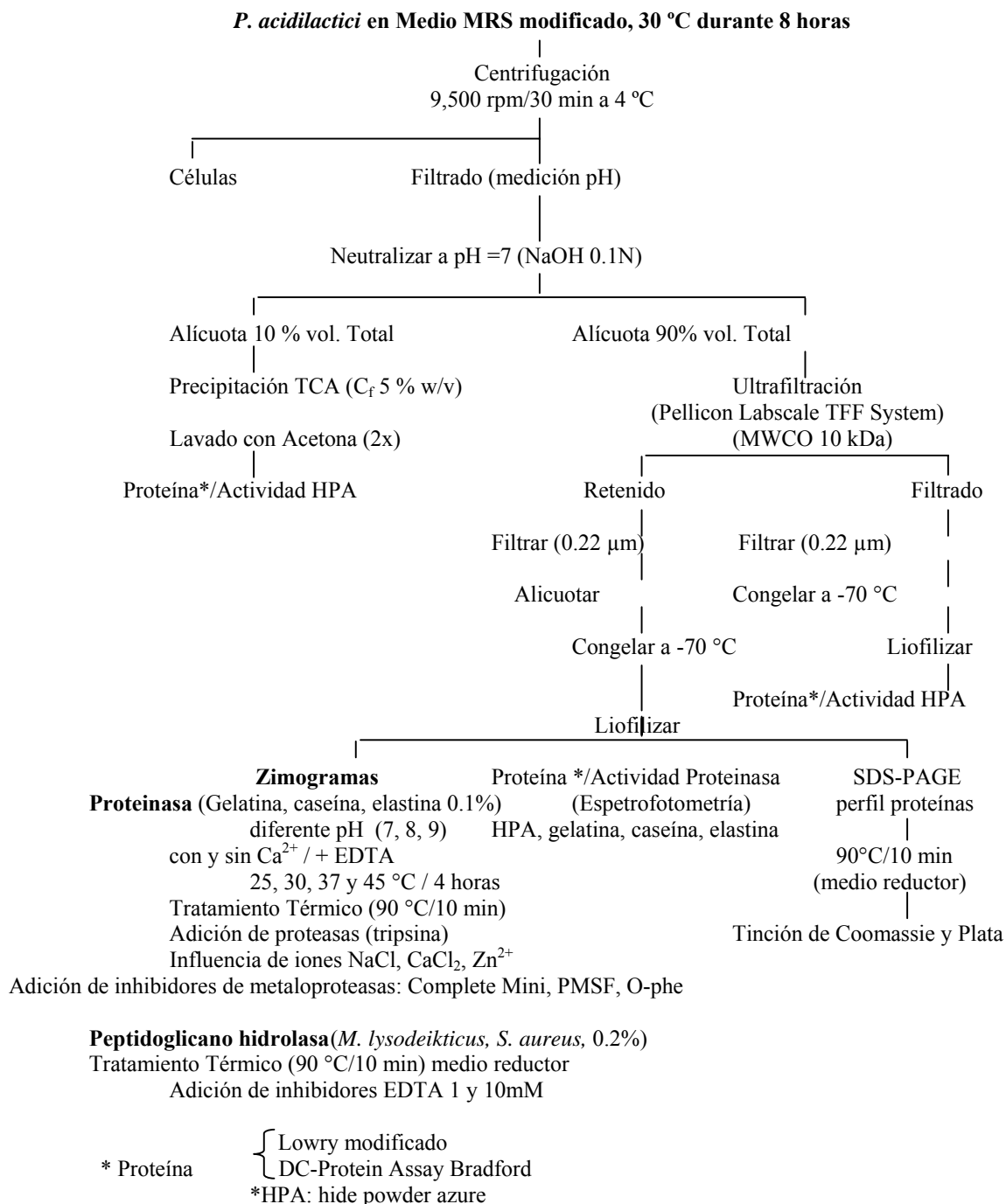


Figura 17. Caracterización de la actividad enzimática extracelular del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

6.1. Preparación del stock de sobrenadante de cultivo en fase logarítmica en MRS

Para la preparación del stock de sobrenadante, *Pediococcus acidilactici* se cultivó dos veces a $30^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ for 24 h en matracer Erlenmeyer de 50 mL, en caldo MRS modificado para ser usado como inóculo al 1% en matraces Fernbach 2,500 mL con un volumen de trabajo de 1L, a $30^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y 120 rpm, en un fermentador New Brunswick Scientific Co. (New Jersey, USA). Los sobrenadantes fueron colectados por centrifugación después de 8 h de incubación a 9,500 rpm durante 30 min a 4°C (centrífuga Beckman Modificado J2-MC). Se ajustó el pH a 7.0, con NaOH 1 M, ultrafiltrado (Pellicon™ Labscale TFF System, Millipore, Bedford, MA, USA) con un cartucho de celulosa regenerada (PLCGC) de 10 kDa MWCO para obtener la décima parte del volumen inicial. El retenido fue filtrado usando membrana de $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore) y entonces liofilizado (Freeze-dry Labconco, USA) y almacenado a -20°C hasta su uso.

6.2. Determinación de proteína soluble por el método de Bradford (Volumen Reducido)

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976) para volumen reducido, empleando el kit comercial DC Protein Assay y albúmina sérica bovina como estándar (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). En este caso se obtiene una curva con intervalo lineal en un intervalo de

Albúmina sérica bovina (BSA)	1.2 a $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$
γ -globulina bovina (IgG)	1.2 a $25.0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Se prepararon las soluciones de la siguiente manera:

- Solución de albúmina (-20°C) en viales eppendorf $C_f = 1.40 \pm 0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ (stock)
- Diluir la solución stock 1:1 con agua destilada $C_f = 0.70 \text{ mg mL}^{-1}$
- Tomar una alícuota de $178 \mu\text{L}$ y aforar a 10 mL con agua destilada. Solución A
 $C_f = 12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$
- Reactivo Azul Brillante de Coomassie concentrado.

Se prepara según la curva patrón mostrada en la Tabla 34 del Anexo 3.
Se mezclaron los reactivos en las celdas de volumen reducido ($V_f = 1\text{ mL}$).
Después de 5 minutos se tomó la lectura de absorbancia a λ 595 nm.

6.3. Determinación del perfil electroforético por SDS-PAGE (Tris Glicina) de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici*

Se prepararon muestras de sobrenadante de cultivo de la cepa 8042, proveniente del retenido de membranas de ultrafiltración de dos tamaños de corte (10 y 50 kDa). Se concentraron por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (5% concentración final) y se hicieron dos lavados consecutivos con acetona (90 % v/v) (Wu y Wong, 1984). Para la resuspensión y solubilización de sólidos se adicionó NaOH 0.2 N y se diluyó al adicionar el buffer (Nandakumar *et al.*, 2003). Las muestras se prepararon en buffer reductor (urea 1.75M, CHAPS 0.65 %, SDS 1.87 %, azul de bromofenol 0.001% y DTT 1.25%) o buffer no reductor (urea, CHAPS, agua SDS y azul de bromofenol) y se calentaron por 5 minutos a 90 °C. Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), bajo condiciones desnaturalizantes. Para la electroforesis se utilizaron 30 μL de muestra con 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína, en geles de 7.5 y 12.5% (1mm) a 100 V, en una cámara Mini-Protean III (Bio-Rad), bajo refrigeración. Al término de la electroforesis se desmontaron los geles, se lavaron con agua destilada y se tiñeron con azul brillante de Coomassie (Bio-Rad). La decoloración se realizó con Metanol-Ácido Acético-Agua (60:30:10).

6.4. Detección de actividad de proteinasa por métodos espectrofotométricos

La actividad proteolítica se midió por métodos espectrofotométricos (Espectrofotómetro LambdaBio, Perkin Elmer) basados en la determinación colorimétrica de la digestión de la enzima a ensayar.

6.4.1. Curva patrón de tirosina

Caseína (*Hammerstein quality, Research Organics, MW 75,000-100,000*), Tripsina (*USP Grade, Research Organics, 2500 USP U/g*⁸), Fosfato monobásico y fosfato dibásico de sodio 7 H₂O (R.A., J.T. Baker), HCl (R.A., J.T. Baker), Tirosina (*Organic Chemicals*), Ácido Tricloroacético (TCA, R.A., J.T. Baker), Acetato de sodio 3 H₂O (R.A., J.T. Baker), Ácido acético glacial (R.A., J.T. Baker). Se pesaron 40 mg de tirosina, se disolvieron y aforaron a 200 mL con HCl 0.1M. Se preparó, a partir de la solución *stock*, la curva patrón de tirosina. Se registró la absorbancia de cada concentración, contra un blanco de HCl y se construyó la gráfica de absorbancia vs concentración de tirosina (Anexo 4).

6.4.2. Curva patrón de tripsina

Solución de caseína (1%, w/v). Se pesó 1.0g de caseína en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se adicionaron aproximadamente 70 mL del buffer de reacción. Se mezcló y calentó la dispersión de caseína en un baño de agua en ebullición por 15 minutos, hasta su completa disolución. Se dejó

⁸ Una USP unidad de tripsina es la actividad que causa un cambio en la absorción de una solución de N-benzoyl-L-arginina etil ester hidrocloreuro de 0.003/min bajo el ensayo especificado en la guía de referencia de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 25th, 2002).

que la temperatura de la solución disminuyera hasta temperatura ambiente. Se vertió la solución en un matraz aforado de 100 mL y se aforó con el mismo buffer de reacción.

Solución *stock* de tripsina. Se pesaron 50 mg de tripsina y se disolvieron en un matraz Erlenmeyer con aproximadamente 40 mL de HCl 0.1M. Se aforó a 50 mL con HCl 0.1M.

1. Se prepararon las diferentes concentraciones de la proteasa a partir de la solución *stock* de tripsina (Anexo 4).
2. Solución TCA mezcla (TCA_m). Se prepararon 250 mL de: TCA 0.11M, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 0.22M y CH_3COOH 0.33M.

6.4.3. Reacción de hidrólisis enzimática

Se vertieron 3.0 mL de la solución de caseína en tubos cónicos de 15 mL sumergidos en un baño de agua con control de temperatura hasta alcanzar el equilibrio térmico (5-10 min), se adicionó 0.5 mL de enzima y se agitó con un vórtex. Después de 20 minutos se detuvo la reacción con 3.0 mL de TCA_m y se mezcló. Para cada concentración de tripsina, se corrió en paralelo un control sin caseína. Al término de 20 minutos se adicionaron 3.0mL de TCA_m , seguidos de 3.0mL de la solución de caseína y se mezclaron.

Se incubaron los tubos a la temperatura de reacción por una hora más. Se centrifugaron y se separó el precipitado y se registró la absorbancia del sobrenadante de cada muestra. Se calculó el delta (Δ) de absorbancia (A) como: $A_{reacción} - A_{control}$. Se construyó la gráfica de Δ Absorbancia vs concentración de tripsina Se calculó la pendiente de la región lineal de la curva de hidrólisis de caseína y se dividió entre el tiempo de reacción para expresar la actividad de tripsina en

equivalentes de tirosina al interpolar el valor de la pendiente de la curva de hidrólisis de caseína en la curva patrón de tirosina.

6.4.4. Sustratos proteínicos

La detección de actividad proteolítica fue medida espectrofotométricamente después de incubar la mezcla de reacción a 37 °C en tres diferentes sustratos: azocaseína (Sulfamide-azocasein) 0.25% (w/v) (Sigma-Aldrich, MO, USA) para probar actividad caseinolítica (Charney-Tomarelli, 1974), hide powder azure (HPA) 5 mg mL⁻¹ (Sigma-Aldrich) para actividad colagenasa (Rinerknecht, *et al.*, 1968) y Elastina rojo Congo, para actividad elastasa, los ensayos fueron corregidos usando el medio de cultivo como blanco para restar el color del sobrenadante.

6.4.4.1. Azocaseína

La reacción de hidrólisis de azocaseína se llevó a cabo en tubos de 2.0 mL, con agitación y temperatura controlada (Thermomixer, Eppendorf, 800 rpm y 37 °C) (Tabla 21).

Tabla 21. Reacción enzimática con azocaseína

Reactivo (mL) Orden de adición.	Reacción con Muestra	Control	Blanco
Azocaseína	0.8	0.8	0.8
Enzima	0.2	---	---
Buffer (pH 8)	---	---	0.2

Se incubó a las mismas condiciones durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo, se adicionaron los reactivos según Tabla 22 y se incubó a 37 °C durante 30 minutos más, sin agitación. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10min, se tomó una alícuota del sobrenadante (1.0 mL) y se adicionó un volumen equivalente de NaOH 0.1N, que se mezcló a homogeneidad.

Finalmente se registró el valor de absorbancia ($\lambda_{\text{max}}=440\text{nm}$) del sobrenadante (Espectrofotómetro LambdaBio, Perkin Elmer). Una unidad de actividad enzimática se define como el incremento de absorbancia/hora μg de proteína (Anexo 5).

Tabla 22. Reacción enzimática (Continuación)

Reactivo (mL) Orden de adición.	Reacción con Muestra	Control	Blanco
TCA _m	1.0	1.0	1.0
Enzima	---	0.2	---

6.4.4.2. Elastina

Se llevó a cabo la reacción de hidrólisis en tubos de 2.0 mL, con agitación y temperatura controlada (Thermomixer, Eppendorf, 800 rpm a 37 °C). Se tomó 0.8 mL y se adicionó a cada tubo. Se incubó 5 min y se adicionó 0.2 mL de enzima, se mezcló y se mantuvo la reacción en agitación (800 rpm). Se registró el tiempo de incubación (2h). En paralelo se corrió (por triplicado) el blanco de reacción (0.8 mL de solución de elastina y 0.2 mL de solución buffer, pH 8). Se detuvo la reacción en baño de hielo. Se centrifugaron (10,000 rpm, 10 min a 4 °C). Se registró el valor de absorbancia ($\lambda_{\text{max}}=495\text{nm}$) del sobrenadante de cada muestra (Espectrofotómetro LambdaBio, Perkin Elmer) y se calculó el delta (Δ) de absorbancia como: $A_{\text{reacción}} - A_{\text{blanco}}$. Una unidad de actividad elastasa se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de absorbancia de una unidad/hora (Anexo 5).

6.4.4.3. Colágeno

La reacción se realizó en tubos de 2.0 mL con agitación y temperatura controlada (Thermomixer, Eppendorf, 800 rpm, 37 °C). Se adicionó a cada tubo 0.5 mL de agua destilada y

0.5 mL de buffer pH 8 y se mantuvo en agitación. Se tomó 0.8 mL en cada tubo y se incubaron 5 min. Se adicionó 0.2 mL de enzima, se mezcló y se mantuvo en agitación (800 rpm) por 2h. Se corrió en paralelo (por triplicado) el blanco de reacción (0.8 mL de solución de colágeno y 0.2 mL de solución buffer, pH 8). La reacción se detuvo en un baño de hielo. Se centrifugó (10, 000 rpm, 10 min a 4 °C). Se registró el valor de absorbancia ($\lambda_{\text{max}}=595\text{nm}$) del sobrenadante de cada muestra (Espectrofotómetro LambdaBio, Perkin Elmer) y se calculó el delta (Δ) de absorbancia como: $A_{\text{reacción}} - A_{\text{blanco}}$. Una unidad de actividad enzimática se define como el incremento de absorbancia/ hora (Anexo 5).

Se utilizó tripsina (USP Grade, Research Organics, (2500 USP U/g) como control. Una unidad de tripsina USP es la actividad que causa un cambio en la absorción de una solución de sustrato etil éster hidrocloreuro de N-benzoyl-L-arginina de 0.003/min, bajo las condiciones de prueba especificadas en la guía de referencia de United States Pharmacopeia, 2002.

6.5. Detección de actividad de proteinasa por técnicas zimográficas

Para la detección de proteinasas microbianas por técnicas zimográficas, se prepararon geles de poliacrilamida copolimerizada con gelatina, de acuerdo con los protocolos de Lantz y Ciborowski (1994) y Heussen y Dowle (1980) y por inmersión (en una solución de caseína, García-Carreño, 1993). Se utilizó tripsina como control positivo. La muestra preconcentrada por ultrafiltración y liofilización se redisolvió en el buffer de Laemmli y en presencia de urea, CHAPS y SDS en no reductoras y condiciones reductoras (β -mercaptoetanol y DTT).

Tras la electroforesis los geles se desmontaron y se lavaron con agua, se sumergieron en una solución de Tritón X-100 al 2.5% w/v en buffer (Tris-HCl 0.05M pH 8.0, CaCl₂ 5mM, NaCl

0.2M) durante 1 h. Para evaluar la actividad caseinolítica, los geles se incubaron en una dispersión de caseína al 2% w/v en el mismo buffer durante una hora y con agitación a baja temperatura. Posteriormente los geles con gelatina o caseína se incubaron a 37 °C durante 14 h. Al término de la incubación se lavaron con agua destilada y se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie (R-250) al 0.1% en metanol:ácido acético:agua destilada (40:10:50; v/v/v) y se destiñeron con la misma solución. El peso molecular relativo de las bandas de proteínas y de las bandas de actividad que se desarrollan en el zimograma, fue determinado al incorporar en el mismo gel estándares de alto y de amplio peso molecular (Molecular Weight SDS-PAGE Standards High Range y Preteñidos SDS-PAGE Standards Broad Range; Bio-Rad). Los geles fueron escaneados en un densitómetro (Imaging Densitometer GS-700 (Bio-Rad) y con la ayuda del programa Quantity One 4.2.1 (Bio-Rad) se determinaron los pesos moleculares de las bandas obtenidas.

6.5.1. Efecto de inhibidores de metaloproteasas

Para determinar si la enzima era una metaloproteasa, los geles se incubaron en buffer de renaturalización en la presencia de EDTA (1 y 10mM) tanto en el buffer de muestra como en el buffer para renaturalizar e incubar el gel (Boehringer-Mannheim, Germany).

6.5.2. Termosensibilidad

Las muestras con actividad proteolítica se incubaron a 90° C durante 10 min antes de la electroforesis y se prepararon según el buffer para la determinación de cada actividad proteolítica y se realizaron las zimografías y renaturalización como se indica antes.

6.6. Detección de actividad peptidoglicano hidrolasa por técnicas zimográficas

Con objeto de dilucidar sobre la sustancia responsable de la actividad antibacteriana que presentan los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, se realizó una estancia de investigación para estudiar el fenotipo autolítico en cepas de *P. acidilactici* bajo la supervisión de la Dra. Antonieta Galli y el Dr. Diego Mora del Departamento de Ciencia de Alimentos y Microbiología, en la Sección de Microbiología Industrial de la Università degli Studi de Milano, Italia, en donde se comparó la actividad autolítica intracelular de la cepa 8042 *P. acidilactici* con la de las siguientes cepas PAC1.0 (productora de pediocina AcH), *P. pentosaceus* Psp2 (productora de pediocinas) aislada de embutidos italianos y *Lactobacillus* sp NCK 537 (productora de pediocinas).

6.6.1. Actividad peptidoglicano hidrolasa intracelular

P. acidilactici se cultivó hasta fase exponencial en medio MRS, se cosechó por centrifugación a 13,000 rpm durante 10min a 4 °C y se lavó dos veces. Las células se resuspendieron en 100 µL de solución de extracción de Mora, *et al.* (2003) que contiene: Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 10mM, NaCl 10mM, SDS al 2% (w/v). La suspensión obtenida se mezcló vigorosamente y se hirvió a 100° C durante 10 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min y el fluido sobrenadante contenía el extracto de proteínas celulares recuperadas.

El contenido de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976) con un lector de microplacas (Bio-Rad Mod. 680) y las proteínas extraídas se analizaron en gel renaturalizante SDS-PAGE según Leclerc y Asselin (1989), Buist *et al.* (1995) y Mora, *et al.* (2003), poliacrilamida al 7 y 12%, en cámara Mini-protean III (Biorad) y se corrió a 100 V

durante 1 h. La actividad autolítica fue evaluada al adicionar 0.2% (w/v) de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma) en el gel de separación.

Las muestras se prepararon con una mezcla de 50 μ L de extractos de células y 50 μ L de buffer de muestra (Tris-HCl 50mM pH 6.8, SDS al 2% (w/v), glicerol al 2.5% (v/v), β -mercaptoetanol al 0.5% (w/v), azul de bromofenol al 0.5% (w/v). Después de la electroforesis los geles fueron lavados dos veces con 200 mL de agua destilada estéril durante 30 min y después colocados en 200 mL de solución de Tris-HCl 25mM pH 7 con 1% Tritón X-100 (w/v) por 12-36 h en agitación suave a temperatura ambiente. El peso molecular se estima al aplicar en el mismo gel marcadores de peso molecular preteñidos (Bio-Rad).

Con los mismos extractos utilizados para este gel ya adicionados de buffer de muestra y calentados a 100 °C durante 10 min se volvieron a hervir durante 5 min y se utilizaron 5 y 10 μ L de cada extracto para correr un gel SDS-PAGE copolimerizado con *M. lysodeikticus*.

La especificidad de sustrato de las peptidoglicano hidrolasas se evaluó con células de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 productora de enterotoxina A, cosechadas de 50 mL de un cultivo de 12-18 h en BHI a 37° C, se lavaron 2 veces con solución de NaCl 0.9% estéril, se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se incorporaron en el gel de separación.

Tras la electroforesis se hicieron dos lavados en agua desionizada en agitación suave, durante 30 min cada uno, y posteriormente se incubaron en solución amortiguadora de renaturalización (Tris-HCl 25mM pH 8 con Tritón al 1% durante 6-40 h). Se tiñeron durante 30 min con azul de metileno (Sigma) al 1% w/v en KOH al 0.1% w/v y se destiñeron con agua destilada. Las imágenes de los geles fueron analizadas en un densitómetro (Imaging

Densitometer GS-700) y el software Quantity One 4.2.1 (Bio-Rad Ca, USA) para el cálculo de los pesos moleculares relativos.

6.6.1.1. Inhibidores de proteasas

Para determinar si se trataba de una metaloproteasa, los geles se incubaron en buffer de renaturalización en la presencia de EDTA 1 y 10mM (Boehringer-Mannheim, Germany), según Mora *et al.*, (2003).

6.6.2. Actividad peptidoglicano hidrolasa extracelular

La actividad lítica extracelular se identificó en los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 cosechadas en fase logarítmica, utilizando los protocolos de Leclerc y Asselin (1989), Buist, (1997) y Mora, *et al.* (2003). Se hicieron geles renaturalizantes SDS-PAGE (Tris Glicina) al 7.5-12.5% de poliacrilamida adicionados del 0.2% de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma) o *S. aureus* ATCC 6538P como s para demostrar la actividad peptidoglicano hidrolasa.

6.6.2.1. Termosensibilidad

Para determinar la influencia de la temperatura en la detección de la actividad peptidoglicano hidrolasa, se preparó la muestra de sobrenadante con buffer reductor (β -MetOH) según Mora *et al.* (2003) y otra muestra en el mismo buffer se dejó sin tratamiento térmico. La electroforesis en geles renaturalizantes adicionados de 0.2% de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma), como sustrato. Tras la electroforesis se hicieron dos lavados en agua desionizada

en agitación suave durante 30 min cada uno y posteriormente se incubaron en el buffer de renaturalización (Tris-HCl 25 mM pH 8 con Tritón al 1% durante 6-40 h). Se tiñeron durante 30 min con azul de metileno (Sigma) al 1% w/v en KOH al 0.1% w/v y se destiñeron con agua destilada. Las imágenes se analizaron en un densitómetro (Imaging Densitometer GS-700) y el software Quantity One 4.2.1 (Bio-Rad Ca, USA) para el cálculo de los pesos moleculares relativos.

6.7. Determinación de actividad peptidoglicano hidrolasa extracelular por Espectrofotometría

La actividad PGH se midió por Espectrofotometría (Espectrofotómetro LambdaBio, Perkin Elmer) basados en el principio de la disminución en la lectura de absorbancia debido a la hidrólisis del peptidoglicano por lisozima, según el protocolo de Morsky (1983). Se construyó la curva patrón (Anexo y se utilizaron como sustrato suspensiones de 350 mg mL⁻¹ de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma-Aldrich). Se utilizó una solución de lisozima de 1.5 µg mL⁻¹ en NaCl al 0.9%, en buffer Na-KPO₄ 50mM, pH 6.2. El volumen de ensayo fue de 1.2 mL (duplicado para cada tiempo de reacción). La reacción se realizó a 500 rpm (Thermomixer, Eppendorf, Germany) a 37 °C y las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro A_{600nm}. Posteriormente se midió bajo las mismas condiciones de reacción la actividad PGH de los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042, sustituyendo estos por la solución de lisozima y por último se hizo el cálculo de actividad.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

1.1. Perfil de fermentación de carbohidratos

Existe la posibilidad de que cepas de la misma especie sean productoras de antibacterianos o pediocinogénicas y que otras no lo sean. Por otra parte, el mismo género *Pediococcus* ha sido objeto de diversas reclasificaciones en el grupo de bacterias ácido lácticas, las que han sido dirimidas recientemente por el uso de la secuenciación de 16S ARNr (Roselló-Mora, 2001). Por tanto, se llevó a cabo una serie completa de pruebas, tanto bioquímicas como moleculares, para establecer con certeza la identificación de la cepa de trabajo y contar con las herramientas necesarias para hacer comparaciones con datos reportados en la literatura.

Inicialmente, se verificó al microscopio óptico el aspecto de las colonias de *Pediococcus acidilactici* teñidas y éstas presentaron las características de la especie: bacterias Gram positivas, en pares o tétradas. La prueba de catalasa fue negativa y posteriormente fueron sometidas a pruebas de identificación bioquímica con el sistema API CH50 (Biomérieux) según las instrucciones del proveedor. *Pediococcus acidilactici* es microaerofílico, por lo que las reacciones se llevaron a cabo en cámara de anaerobiosis. Los resultados (Tabla 23) se analizaron con el Sistema APILAB Plus (Analytical Profile Index (V 3.2.2)), y se obtuvo una excelente identificación % Id = 99.9 de que la cepa corresponde a *Pediococcus acidilactici*.

Tabla 23. Perfil de fermentación de carbohidratos de *P. acidilactici*

0	Control	-	25	Esculina	+
1	Glicerol	-	26	Salicina	-
2	Eritritol	-	27	Celobiosa	+
3	D- Arabinosa	-	28	Maltosa	-
4	L-Arabinosa	+	29	Lactosa	-
5	Ribosa	+	30	Melibiosa	-
6	D-Xilosa	+	31	Sacarosa	-
7	L-Xilosa	-	32	Trehalosa	+
8	Adonitol	-	33	Inulina	-
9	β Metil-D-xilósido	-	34	Melezitosa	-
10	Galactosa	+	35	D-Rafinosa	-
11	D-Glucosa	+	36	Almidón	-
12	D-Fructosa	+	37	Glicógeno	-
13	D-Manosa	+	38	Xilitol	-
14	L-Sorbosa	-	39	β Gentobiosa	+
15	Ramnosa	-	40	D-Turanosa	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lixosa	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatosa	+
18	Manitol	-	43	D-Fucosa	-
19	Sorbitol	-	44	L-Fucosa	-
20	α Metil-D-manósido	-	45	D-Arabitol	-
21	α Metil-D-glucósido	-	46	L-Arabitol	-
22	N Acetil glucosamina	+	47	Gluconato	-
23	Amigdalina	-	48	2-keto-gluconato	-
24	Arbutina	-	49	5-keto-gluconato	-

1.2. Análisis de los productos de la amplificación por PCR del gen 16S ARNr

Para verificar una mejor resolución a nivel de especie se emplearon las técnicas de secuenciación de ARN ribosomal 16S. Se emplearon primers especie específicos diseñados para el análisis de dicho gen en *Pediococcus acidilactici* (Mora *et al.*, 1997) y se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado (872 pb) (Figura 18). La secuencia del mismo (Anexo 2) se analizó por BLAST y se determinó el porcentaje de similitud que guarda con otras cepas del mismo

género. Se encontró que la cepa ATCC 8042 de *Pediococcus acidilactici* guarda similitud de 91% a 98% con otras cepas del mismo género y especie; de 96% al 97% con cepas de *Pediococcus pentosaceus* y de 93% y 94% con cepas de *Pediococcus damnosus*.



Figura 18. Producto de PCR del gen ARNr 16S
(Gel de Agarosa 1.2% TE 1%)

Esto quiere decir que en este caso no es posible discernir entre especies del mismo género con esta metodología. Estos resultados pueden ser explicados ya que de acuerdo a la literatura, un género podría ser definido por especies con 95% de similitud en su secuencia total de genes ribosomales. Se ha observado que organismos con similitudes DNA-DNA por arriba de 70% usualmente tienen más del 97% de similitud en la secuencia ARNr 16S. Estos valores podrían ser utilizados como límites absolutos para la circunscripción de especies, de acuerdo con Roselló-Mora (2001).

El problema de establecer la diferencia entre *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* ha sido resuelto por otros autores al evaluar la presencia del gen de lactato deshidrogenasa (*ldh*), que sólo se expresa en la primera especie, por lo que se procedió a llevar a cabo dicho análisis.

1.3. Análisis de los productos de la amplificación del gen *ldh* por PCR

Con los primers diseñados por Martínez, *et al.*, 1998 y las condiciones de amplificación reportados por Mora, *et al.*, 2000, se obtuvo un producto de alrededor de 450 pb igual al esperado (Figura 19). En el caso de *P. pentosaceus* dió negativo para *ldh*. De estos resultados se concluyó que la cepa de trabajo corresponde a *P. acidilactici*.

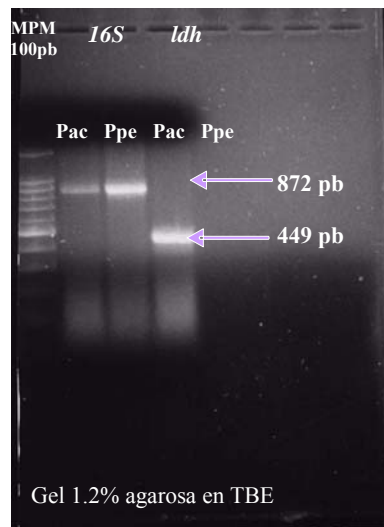


Figura 19. Fragmentos de PCR de los genes 16S ARNr y *ldh* para *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*.

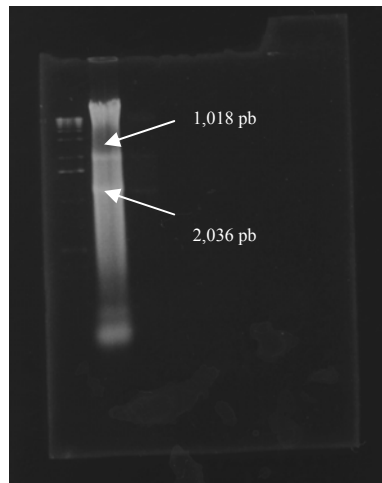
1.4. Verificación de la presencia de plásmidos

La producción de pediocina por *P. acidilactici* ha sido ligada a la presencia de plásmidos en las cepas en que ha sido reportada su producción, con los tamaños que se mencionan a continuación:

- pSRQ11 plásmido de 9.4 kpb codifica la producción de pediocina AcH in *Pediococcus acidilactici* (Marugg, *et al.*, 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(8):2360-2367).
- pSMB74 plasmido de 8,877 pb que codifica la producción de pediocina AcH in *Pediococcus acidilactici* (Motlagh, *et al.* 1994. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**:305-312

Por lo tanto, se buscó la presencia de plásmidos. Se utilizaron diversos protocolos, como el de Kanatani (1991) para la extracción de ADN-plásmidos en *Lactobacillus acidophilus*, el de Motlagh (1994), para la extracción de megaplásmidos de *Pediococcus acidilactici* que codifican la producción de pediocina AcH. También se utilizó el protocolo de Anderson y McKay (1983) para ADN-plásmidos de *Streptococcus*.

Tras la evaluación de estos protocolos, y la modificación introducida en este trabajo al utilizar enzimas hidrolíticas adicionales, o en concentración mayor y tiempos de incubación más largos, se encontró sólo un plásmido en la cepa ATCC 8042 (Figura 20). Una banda corresponde a un plásmido de 1,018pb y otra banda (2,036pb) puede ser el mismo plásmido en un arreglo diferente. Sus tamaños son mucho menores que los reportados en la literatura para la producción de pediocinas por otras cepas de *P. acidilactici*, por lo que se presume que no está involucrado en la producción de estas moléculas en la cepa de estudio, aunque esta hipótesis se deberá evaluar al realizar una caracterización mas detallada del mismo. De cualquier modo, a continuación se exploró la presencia del gen *pedB*, que forma parte del operón de producción de pediocina (tanto en al ADN plasmídico como en el cromosoma).



**Figura 20. Plásmidos identificados de *P. acidilactici* ATCC 8042
gel de agarosa 0.7% buffer TAE 0.5%**

1.5. Búsqueda del gen *pedB* mediante amplificación por PCR

El gen *pedB* forma parte del operón responsable de la producción de pediocina PA-1-AcH, única bacteriocina reportada para la cepa de *Pediococcus acidilactici*. Esta pediocina posee un amplio espectro de actividad antibacteriana y está clasificada dentro de las bacteriocinas Clase II termoestables y con PM <10kDa. Si bien el género y especie han sido reportados por diversos autores como productores de bacteriocinas, específicamente pediocina PA-1 (Bhunja, 1988, 1990; Biswas, 1991; Ray y Hoover 1993; De Vuyst *et al.*, 1996).

Callewaert, *et al.* (1999) afirman que la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 produce la pediocina PA-1, pero otros investigadores, tras utilizar técnicas moleculares para la identificación del gen que codifica para pediocina, afirman que la cepa ATCC 8042 pertenece a un grupo no bacteriocinogénico (Mora *et al.*, 1997; Mora *et al.*, 2000; Nes, *et al.*, 1996 y Nes y Holo, 2000).

En este estudio se utilizaron los primers específicos para la detección del gen de la pediocina reportados por Martínez (1998) en condiciones de alta astringencia y tras ensayar diferentes condiciones de reacción, no se obtuvieron productos de amplificación a partir de ADN genómico o plasmídico (Figura 21a).

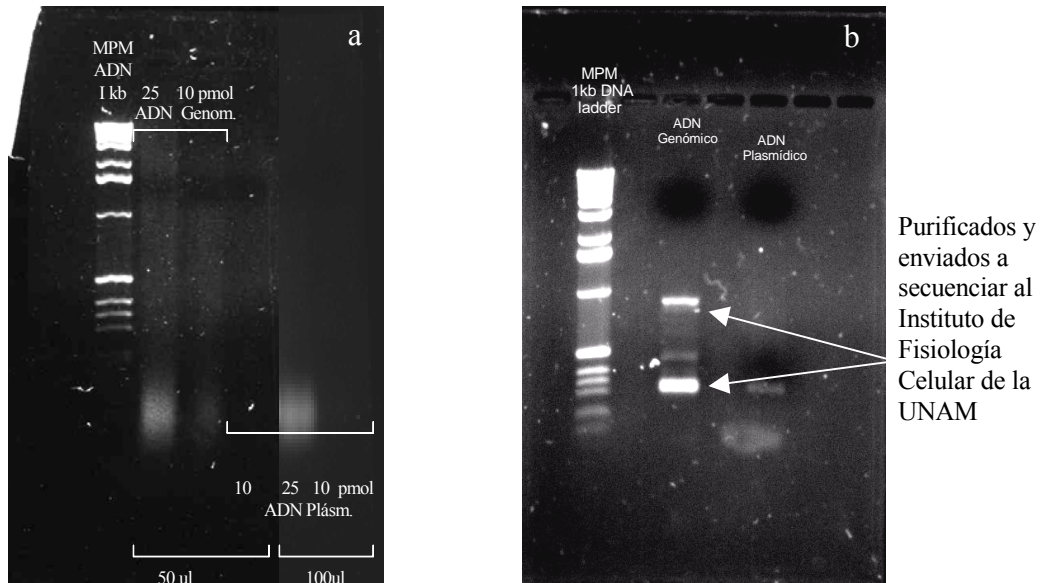


Figura 21. Fragmentos de PCR obtenidos con los primers específicos para el gen de la pediocina *pedB* con ADN genómico y plasmídico de *P. acidilactici*.

a) Alta astringencia b) Baja astringencia (0.7% de agarosa).

En tanto en baja astringencia (Figura 21b) se presentan los productos de amplificación obtenidos, donde se observan tres bandas para el ADN genómico, entre ellas la de 700 pb (tamaño esperado) y otra intensa de 250 pb. Ambas fueron purificadas y concentradas para su secuenciación en el laboratorio de Análisis de Secuencias del IFC-UNAM. El análisis de los datos con el programa BLAST de comparación de secuencias demostró que los productos obtenidos fueron inespecíficos, ya que no guardaban homología con otras cepas productoras de pediocinas, sus operones o sus genes. Al no ocurrir amplificación incluso en condiciones de baja

astringencia se concluyó que la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 no posee el gen de la pediocina *pedB* al menos en las condiciones de reacción evaluadas, lo que coincide con lo reportado por Mora *et al.*, 2000 quienes encontraron un alto grado de polimorfismo genético entre especies de *Pediococcus*, con genotipos diferentes en las diversas subpoblaciones, mismo que se relaciona con su perfil de fermentación de carbohidratos o con su capacidad de producir bacteriocinas. Ellos afirman que la cepa ATCC 8042 corresponde al genotipo II, no productor de bacteriocina PA-1, lo que concordaría con los resultados obtenidos en este trabajo.

Estos hechos llevaron a la búsqueda de sustancias diferentes a las pediocinas reportadas como responsables de ejercer el efecto antibacteriano encontrado en esta cepa. En búsqueda de claves sobre la naturaleza de las mismas, se procedió a realizar un análisis del daño ejercido a nivel celular por los sobrenadantes de cultivo. La primera parte del trabajo consistió en la estandarización de las condiciones de crecimiento y producción.

2. Evaluación del daño de microorganismos susceptibles mediante pruebas de actividad antibacteriana

La caracterización de sustancias antibacterianas requiere de la consideración de múltiples factores: la identidad de la cepa, como se explicó en el capítulo anterior, las condiciones de cultivo, para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Se requiere también verificar el espectro antimicrobiano, saber si el tipo de daño es bacteriostático o bactericida, y, si es posible, verificar físicamente el daño, para posteriormente abordar el análisis de los mecanismos de acción.

2.1. Efecto del medio de cultivo y condiciones de producción en la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de la cepa 8042.

Biswas *et al.* (1991) investigaron las condiciones de cultivo de *Pediococcus acidilactici* AcH para la producción de la pediocina PA-1 y señalan una relación importante entre el tipo de atmósfera utilizado y el crecimiento de la cepa. Lewus y Montville (1991) sugieren utilizar condiciones de anaerobiosis durante la fermentación con bacterias acidolácticas para evitar la formación de compuestos como el peróxido de hidrógeno, en consideración a la ausencia de catalasa de estos microorganismos pues este podría ser también un agente antibacteriano. Rodríguez *et al.* (1997) mencionan que el medio MRS es el más usado para la investigación de cepas productoras de bacteriocinas de BAL y afirman que el suplementar el medio con catalasa para eliminar la actividad del peróxido de hidrógeno es innecesaria, ya que éste es degradado rápidamente debido a la presencia de catalasa en el extracto de levadura con que se formula este medio.

El sistema de producción empleado en este trabajo fue descrito crecimiento por Llorente (1998): medio MRS modificado por la adición de ácido ascórbico y $MnSO_4$ como requerimientos especiales de crecimiento. Sin embargo, en este trabajo se quiso verificar el resultado y se comparó el comportamiento con el obtenido en medio CSTES (Biswas, 1991). Por otra parte la escala de cultivo y las condiciones de aireación inciden en la producción como se describe en el párrafo anterior. En este trabajo se estableció que en matraz Erlenmeyer de 50 mL se obtuvieron resultados reproducibles para identificar las condiciones de producción de la actividad inhibitoria al construir cinéticas de crecimiento y producción de las sustancias antibacterianas.

Posteriormente para obtener el stock de trabajo se empleó matraz Fernbach a 30 ± 2 °C, 120 rpm en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific Co.).

Se debía identificar si el ácido láctico producido por la fermentación de sacarosa era el responsable de los resultados de inhibición. Por esta razón las pruebas de difusión en agar se realizaron con los sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 en MRS modificado, sin neutralizar y neutralizado.

Se concentraron los sobrenadante diez veces por liofilización para obtener más claridad en los resultados. Se compararon los resultados de las pruebas de difusión en agar con el sobrenadante sin tratamiento y el liofilizado y además se contrastó el efecto de la neutralización para descartar la influencia del ácido láctico. El inóculo de *S. aureus* se incorporó en BHI agar al 0.6% (NCCLS, 1991) éste provenía de fase crecimiento logarítmico, donde las células vegetativas son mas sensibles a estrés ambiental causado por factores antimicrobianos, que cuando están en fase estacionaria. Los resultados mostraron que la mejor actividad inhibitoria se obtuvo de sobrenadante de cultivo proveniente de medio MRS, comparado con el obtenido del cultivo en CSTES (Figura 22) y la inhibición con sobrenadante neutralizado y liofilizado produjo un halo menor respecto del que sólo se liofilizó. Esto hacía pensar que de alguna forma el ácido láctico producido o el lactato, producto de la neutralización del ácido láctico eran responsables al menos en parte de la inhibición observada.

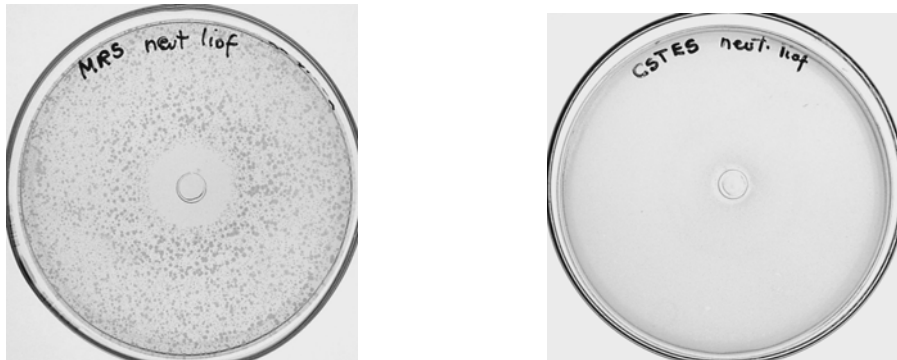


Figura 22. Comparación de la inhibición obtenida con sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* en MRS modificado y CSTES.

Medio MRS modificado (izquierda), CSTES (derecha) ambos neutralizados y concentrados por liofilización.

Estas evidencias llevaron a plantear la necesidad de cuantificar la concentración de ácido láctico y del lactato de sodio en las distintas fases de crecimiento, así como a buscar la posible presencia de otros compuestos en el sobrenadante que pudiesen también estar relacionados con el efecto inhibitorio observado.

3. Cuantificación de Ácido láctico producido por la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042.

Para evaluar lo anterior se realizó una cinética de crecimiento del microorganismo en los medios a evaluar, y se siguió la producción de ácido láctico con respecto al crecimiento, que se ilustra para el caso de MRS (Figura 23).

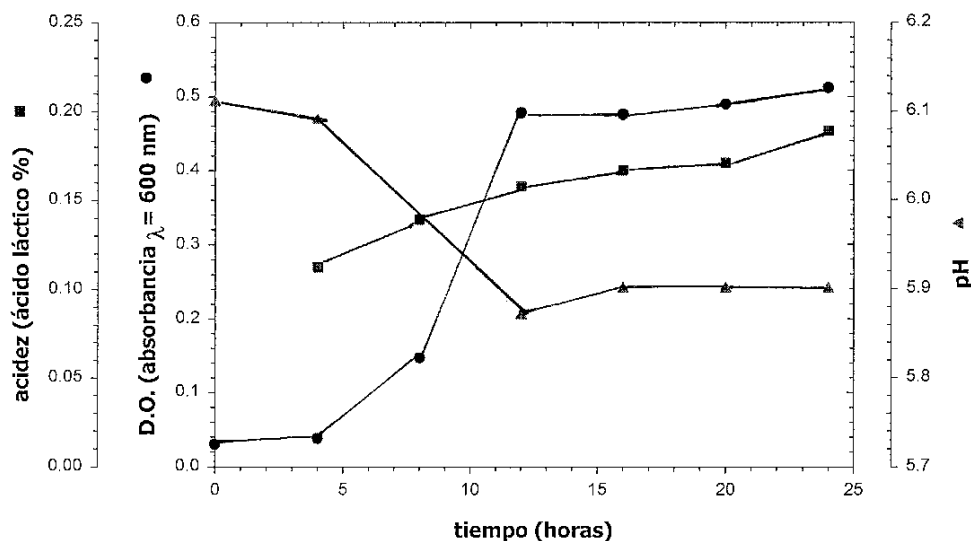


Figura 23. Cinética de crecimiento de *P. acidilactici* en MRS modificado

La máxima cantidad de ácido láctico en cultivos en MRS y CSTES llevaron a una producción máxima de 0.189% (Tabla 24).

Tabla 24. Ácido láctico (%) producido por *Pediococcus acidilactici* en medio MRS y CSTES

Tiempo de cultivo (h)		0	4	8	12	16	20	24
Acido láctico (%)	MRS	—	0.1125	0.1396	0.1666	0.171	0.171	0.189
	CSTES		0.0225	0.12611	0.12611	0.12611		

Para saber si el ácido láctico producido era capaz inhibir al microorganismo susceptible, se sometieron a la acción de soluciones de ácido láctico y de lactato de sodio, (1-4 %) y se realizaron pruebas de difusión en agar con *S. aureus*. Los resultados de las mismas no produjeron halos de inhibición, por lo que se realizaron también pruebas de inhibición en caldo con soluciones de ácido láctico y lactato de sodio a las mismas concentraciones y se hizo cuenta en

placa tras incubarlos 24 h a 37 °C, sin embargo a ninguna concentración de lactato de sodio se obtuvo inhibición de *S. aureus* (Tabla 25).

Tabla 25. Resultados de las pruebas de inhibición de *S. aureus* en BHI al adicionar lactato de sodio

	Concentración de lactato de sodio			
Tiempo	1%	2%	3%	4%
Inicio	1×10^3 UFC mL ⁻¹	1×10^3 UFC mL ⁻¹	1×10^3 UFC mL ⁻¹	1×10^3 UFC mL ⁻¹
24 h	7×10^9 UFC mL ⁻¹	7×10^9 UFC mL ⁻¹	7×10^9 UFC mL ⁻¹	4.8×10^9 UFC mL ⁻¹

4. Determinación cualitativa de la producción de reuterina

Magnusson, *et al.* (2003) sugieren que algunas especies de bacterias acidolácticas homofermentativas como el caso de *Pediococcus* son capaces de utilizar la vía oxidativa de degradación del glicerol cuando es la única fuente de carbono, con la producción del intermediario reuterina, en condiciones de anaerobiosis según el esquema mostrado en la Figura 24. Para observar los halos de inhibición al utilizar *S. aureus* como microorganismo de prueba (Magnusson y Schnürer, 2001).

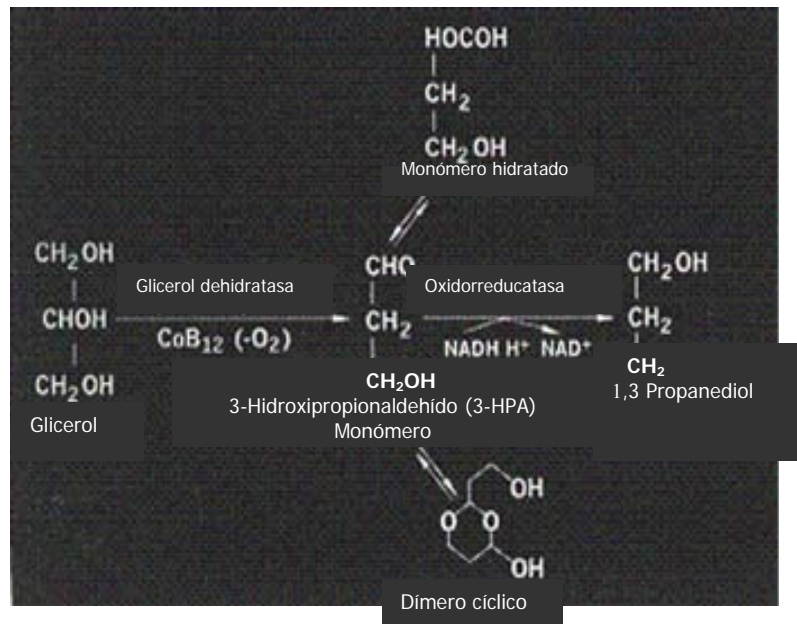


Figura 24. Vía oxidativa de la degradación de glicerol de BAL homofermentativas.

Fuente: Magnusson y Schnürer, 2001.

Este compuesto tiene actividad inhibitoria contra *S. aureus* (Magnusson, *et al*; 2003). Se evaluó la posible presencia de este compuesto siguiendo el procedimiento descrito por este autor, para lo cual se cultivó en anaerobiosis a la cepa de estudio y se le adicionó glicerol 250mM, sin embargo, no se produjeron halos de inhibición al utilizar *S. aureus* o *L. innocua* como microorganismos de prueba en ensayos de difusión en agar, lo que sugiere que no hay biotransformación de glicerol a reuterina por *P. acidilactici* ATCC 8042.

5. Actividad antibacteriana similar a la producida por bacteriocinas

El efecto antibacteriano de las pediocinas sobre *Listeria* se utiliza como criterio de clasificación para estos compuestos, por lo que se llevaron a cabo pruebas de difusión en agar utilizando como microorganismo susceptible *Listeria innocua* ATCC 33099 en paralelo con *S.*

aureus. La nisina corresponde a las bacteriocinas Clase I, que tiene actividad antilisterial, por lo que se empleó con fines comparativos una solución de Nisaplín™ (producto comercial con nisina, a una concentración de 10 mg mL⁻¹).

Los resultados se muestran en las Figuras 25 y 26. La solución de Nisaplín™ produjo un halo de igual magnitud en cada uno de los microorganismos. La inhibición obtenida con sobrenadante neutralizado y liofilizado fue de mayor tamaño al utilizar *L. innocua* en comparación con *S. aureus* ATCC 6538P. En este último el halo fue menor que los producidos con Nisaplín. Esto significa una respuesta diferente de acuerdo con el microorganismo utilizado, que podría guardar relación con la composición de la pared de cada uno de estos microorganismos. Tomando en cuenta que ocurrió inhibición sobre *L. innocua*, y que el mayor efecto inhibitorio se observó en este microorganismo, se podía sugerir que el efecto inhibitorio se debía a la presencia de sustancias similares a bacteriocinas (BLIS), que se han reportado para este género.

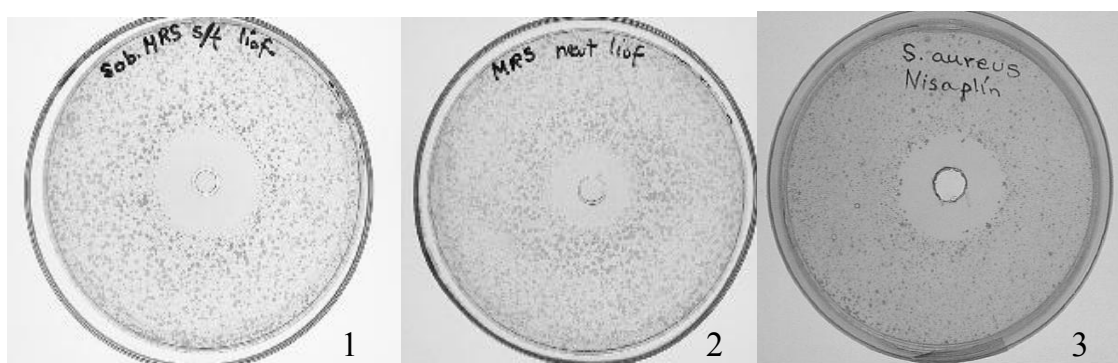


Figura 25. Resultados de la prueba de difusión en agar con sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* sobre *S. aureus*.

- 1) Sobrenadante liofilizado, 2) sobrenadante neutralizado y liofilizado, 3) Nisaplín 10 mg mL⁻¹.

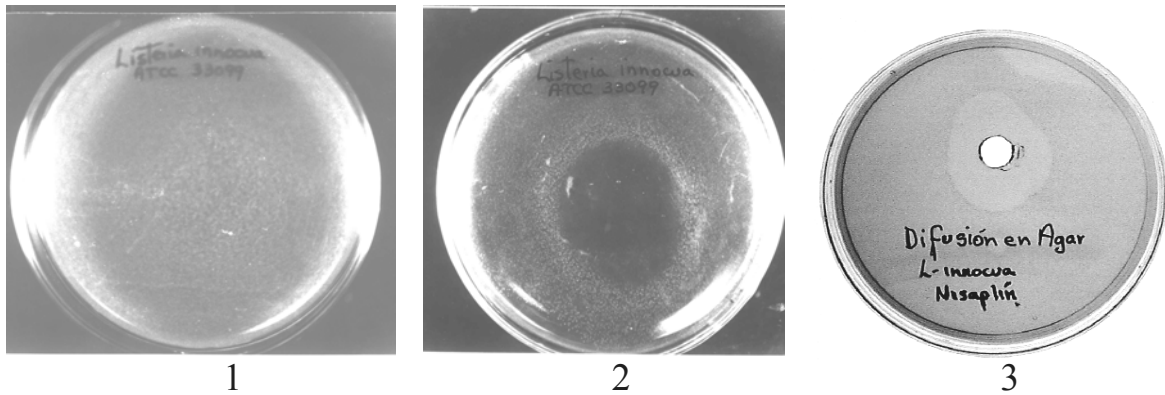


Figura 26. Resultados de la prueba de difusión en agar con sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* sobre *L. innocua*

1) Control Medio MRS; 2) sobrenadante neutralizado y liofilizado, 3) Nisaplin 10 mg mL⁻¹

Una vez establecida la presencia de actividad inhibitoria en sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 en medio MRS modificado, que se veía mas claramente si éste era liofilizado, y aún cuando estaba neutralizado, fue posible identificar halos de inhibición, lo que permitía afirmar que el ácido láctico tenía sólo un papel aditivo o sinérgico en el fenómeno inhibitorio, se debía determinar la fase de crecimiento en que se producía la mayor actividad.

6. Producción de la actividad antibacteriana de *P. acidilactici*

6.1. Sobrenadantes de cultivo en distintas fases de crecimiento en pruebas de difusión en agar

Muestras de sobrenadantes obtenidos cada 4h en un intervalo de 0-24 h, provenientes tanto de caldo MRS modificado como de CSTES, se aplicaron en pozos sobre céspedes con *S. aureus* y *L. innocua*. En el caso de *S. aureus* se observaron halos de inhibición desde las 4h y se produjo la máxima inhibición en fase de crecimiento logarítmico a las 8h (20 mm de diámetro). El nivel del halo se mantuvo durante las primeras horas de la fase estacionaria y en la etapa tardía

comenzaron a decrecer. En el caso de *L. innocua* el comportamiento es similar en el sentido de que se produce la máxima inhibición a partir de la fase logarítmica tardía (8h) (Figura 27). Sin embargo, la inhibición se mantiene durante la fase estacionaria (12-16 h) (Tabla 26). Esta diferencia en respuestas puede deberse a que se tengan sustancias diferentes que ejerzan el efecto sobre cada microorganismo, o a que las diferencias en la composición de sus paredes y membranas permitan manifestar diferente susceptibilidad a la sustancia producida por *P. acidilactici* 8042. Los resultados obtenidos en esta etapa llevaron a establecer que en la fase de crecimiento logarítmico se obtenían los halos de inhibición de mayor tamaño y para la caracterización de las sustancias con actividad antibacteriana se emplearía el material obtenido en la fase de crecimiento logarítmico tardío y en medio MRS modificado.

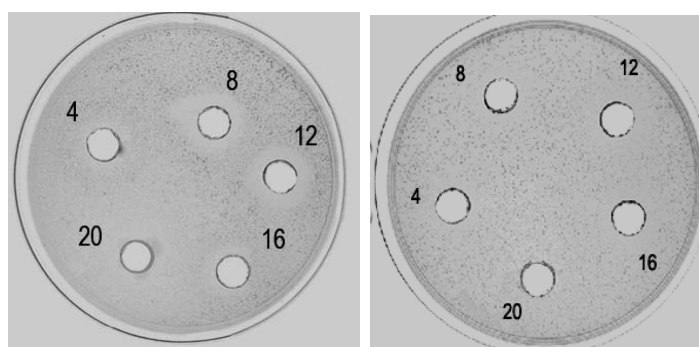


Figura 27. Resultados de la prueba de difusión en agar con los sobrenadante de cultivo de la cepa 8042 en medio MRS modificado obtenidos en diferentes fases de crecimiento.

Neutralizados y concentrados diez veces por liofilización (10x) Izquierda sobre *S. aureus*, derecha *L. innocua*.

Tabla 26. Resultados de la prueba de difusión en agar con sobrenadantes de cultivo de la cepa 8042 en diferentes fases de crecimiento con *S. aureus* o *L. innocua* como microorganismos susceptibles.

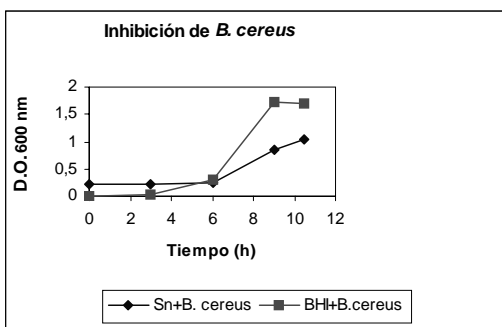
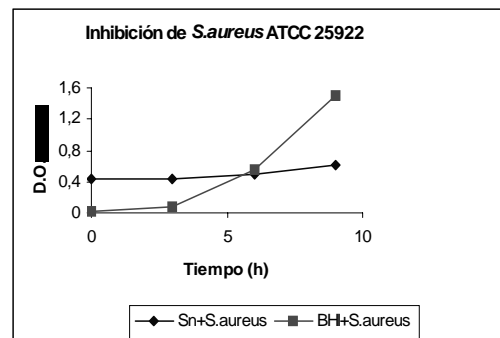
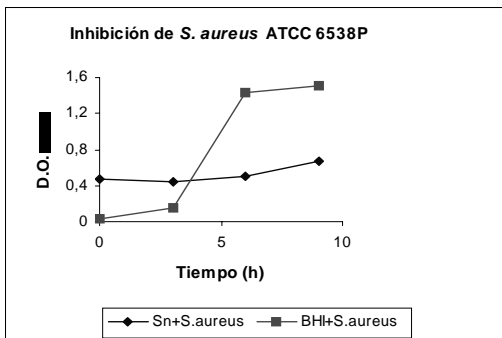
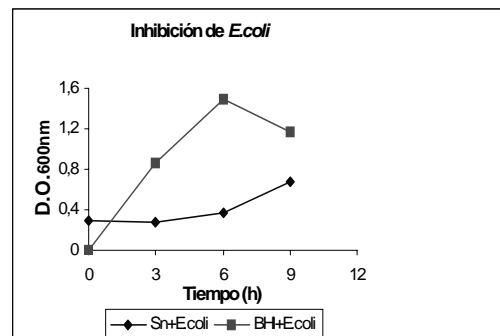
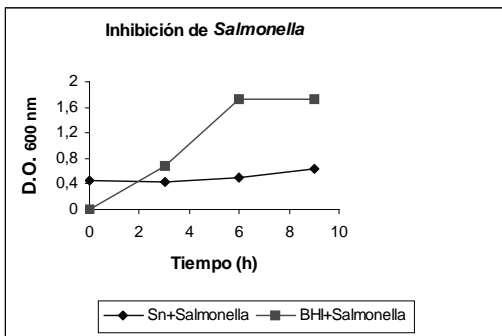
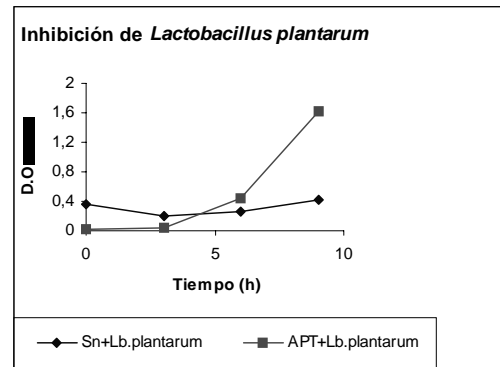
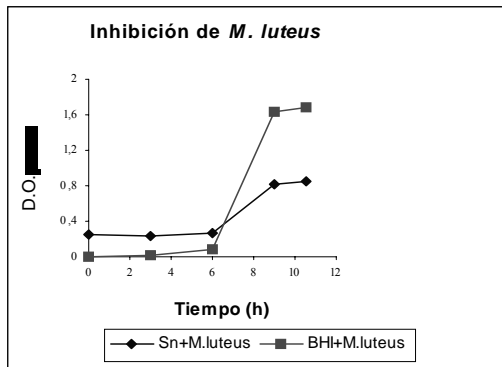
Tiempo de fermentación de <i>P. acidilactici</i> en MRS	Diámetro de Inhibición	
	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>
4h	9 mm	12 mm
8h	20 mm	18 mm
12 h	20 mm	18 mm
16 h	12 mm	18 mm
20 h	8 mm	12 mm
24 h	8 mm	10 mm

6.2. Identificación del espectro de actividad antibacteriana producido por los sobrenadantes de cultivo de la cepa 8042 sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos

Un criterio importante de caracterización de sustancias con actividad antibacteriana es la determinación del espectro de microorganismos sobre los que tiene efecto. Este es amplio si incluye microorganismos de diferentes géneros *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* o reducido si inhibe sólo a los del mismo género o a las cercanas filogenéticamente, como *Lb. plantarum* y *P. pentosaceus*. En este trabajo además se consideraron microorganismos de interés sanitario como *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 y 6538P, *Listeria* sp, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Tiphymurium de acuerdo con lo recomendado (NCCLS, 1991, Hoover, 1993).

Se demostró que los sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 fueron capaces de inhibir a los microorganismos utilizados: BAL relacionadas *Lb. plantarum*; bacterias Gram positivas *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* y Gram negativas *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Tiphymurium; así como los microorganismos de interés sanitario utilizados *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 y 6538P, *Listeria* sp. (Figura 28). Aún cuando se trata de métodos descriptivos, la respuesta inhibitoria fue evidente al contrastarlos con los

cultivos control, en los términos indicativos de inhibición (incremento de la fase lag, supresión de la fase estacionaria, disminución en la velocidad de crecimiento en la fase log y letalidad) que señalan Davidson y Parish, 1989 y el NCCLS, 1991. El comportamiento indicó que la actividad producida era de amplio espectro. Por lo que se procedió a identificar el tipo de daño celular generado evaluándolo por técnicas microbiológicas y de microscopía.



Sn = sobrenadante

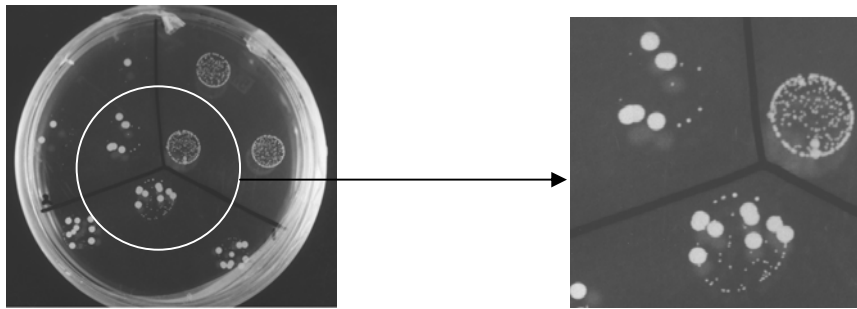
Figura 28. Gráficas de inhibición de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 sobre diferentes microorganismos susceptibles

6.3. Viabilidad de microorganismos

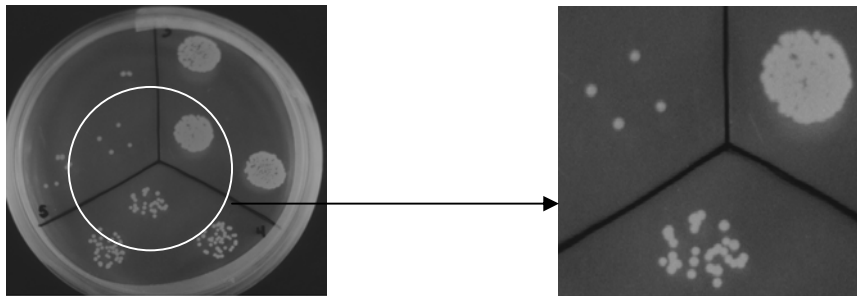
En esta etapa se seleccionó como microorganismo *S. aureus* 6538P, recomendado como microorganismo de prueba por el NCCLS, 1991 y por tratarse de un patógeno frecuentemente encontrado en alimentos (Le Loir, 2003). Se sometió a incubación durante 24 h a 37 °C con los distintos lotes de los sobrenadantes (sin procesar, neutralizados, liofilizados, neutralizados y liofilizados) para lo cual se realizó cuenta en placa para evaluar viabilidad. En paralelo las células se tiñeron por Gram para su observación al microscopio óptico.

6.4. Cambios morfológicos

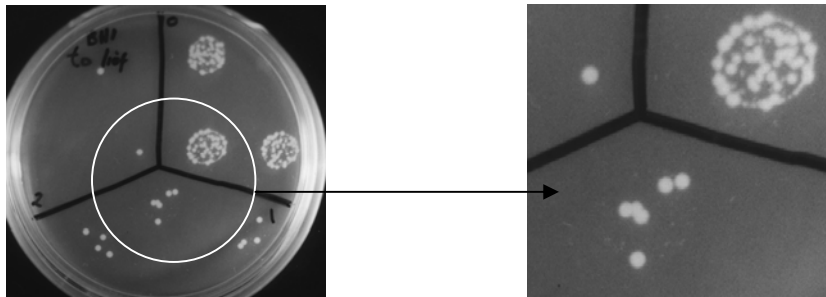
Las colonias de *S. aureus* son amarillo claro redondas y miden 2-3 mm de diámetro, en condiciones óptimas de crecimiento. En las fotografías de los cultivos en placas de agar son evidentes los cambios en morfología colonial y crecimiento atípico en las células de *S. aureus*, sometidas a tratamientos con los diferentes sobrenadantes, ya que no mostraban una definición clara y las que lograron definirse eran muy pequeñas, de alrededor de 1mm. Esta alta sensibilidad a la manipulación para su cuenta en placa puede ser una clara evidencia de daño celular. Es importante resaltar que estas colonias tiñeron de rojo en Gram en lugar del azul característico de las Gram positivas, como *S. aureus*, evidencia adicional de que el daño podía haber ocurrido a nivel de la pared celular (Figura 29). Resalta el efecto de la concentración por liofilización de los sobrenadantes, que mostraron un mayor daño las células tratadas con los sobrenadantes liofilizados que no presentaron crecimiento a las 24 h. Los sobrenadantes neutralizados y liofilizados presentaron crecimiento atípico a las 24h, incontables en la primera y segunda diluciones y a partir de la tercera dilución no hubo crecimiento.



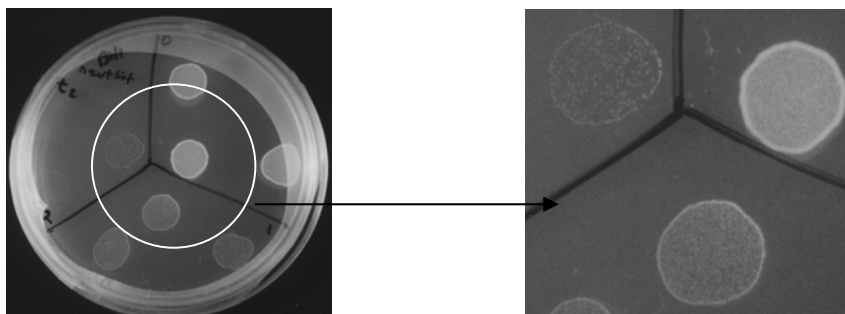
Sin tratamiento 24 h



MRS neutralizado 24h



MRS liofilizado Inicio



MRS neutralizado y liofilizado 24h

Figura 29. Cambios morfológicos y coloniales de células de *S. aureus* tratadas con diferentes sobrenadantes de cultivo de 8 h de *P. acidilactici*

El cultivo control de *S. aureus* en caldo BHI logró un crecimiento de 9 ciclos logarítmicos, tras 24 de incubación a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. En las células cultivadas con sobrenadantes sin tratamiento o neutralizadas, ocurrió una reducción de 2 ciclos logarítmicos a las 24 h de incubación, la mayoría eran colonias atípicas y muy pequeñas. Los sobrenadantes liofilizados produjeron una reducción de 3 ciclos en 4 h de incubación y a las 24 h no se obtuvo crecimiento y en las cultivadas en sobrenadantes neutralizados y liofilizados, no se obtuvo crecimiento alguno a las 24 h a partir de la tercera dilución.

Estas evidencias llevaron a la búsqueda de protocolos para una mejor observación del daño producido en los microorganismos susceptibles con microscopía electrónica de barrido.

6.5. Observación al MEB del efecto antibacteriano de los sobrenadantes de *P. acidilactici* sobre *S. aureus* y *L. innocua*

Para observar directamente el efecto antibacteriano producido en los microorganismos susceptibles, se utilizaron los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* en MRS, neutralizados y liofilizados, para incubar (*S. aureus* y *L. innocua*) 24 h y se procesaron para su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (Figura 30). Los controles negativos fueron los cultivos de los microorganismos indicadores en BHI a 37 °C durante 24 h (condiciones óptimas) los cuales conservan sus características morfológicas normales (1 y 4). Los controles positivos de actividad fueron los microorganismos indicadores tratados con Nisaplín™ (3 y 6) en los que se pueden ver las células que han perdido su característica de cocos y su forma esférica, por el contrario se observan de forma alargada y plana, aunque están completas. En las imágenes en las que se identifica el daño más severo en las células de *S. aureus* ATCC 6538P y *Listeria innocua* es en

las tratadas con el sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* (2 y 5) en donde sólo se distinguen *detritus* celulares.

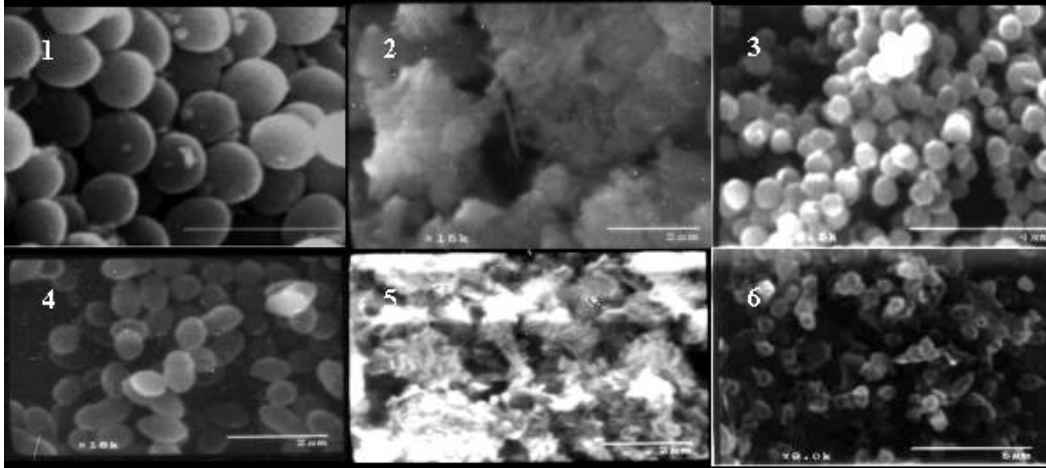


Figura 30. Micrografías de MEB de células de *S. aureus* y *L. innocua*

1. *S. aureus* y 4. *Listeria innocua* en BHI (control)

2. *S. aureus* y 5. *Listeria innocua* tratadas con sobrenadante neutralizado y concentrado

3. *S. aureus* y 6. *Listeria innocua* tratadas con una solución de Nisaplin 10 mg mL⁻¹

6.6. Curvas “time-kill” (UFC mL⁻¹) (NCCLS, 1991)

Los resultados de la prueba turbidimétrica de dilución en caldo (NCCLS, 1991, Hoover, 1993) no dejaban en claro si la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de cultivo efectivamente inhibían el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P o provocaban su lisis. Por el contrario las pruebas cuantitativas (curvas “time-kill”) permitieron observar un mayor impacto en la actividad inhibitoria. El microorganismo indicador fue incubado durante 24 h en el tratamiento a analizar y tras preparar diluciones decimales seriadas, se contaron las UFC mL⁻¹ residuales en agar BHI. El efecto de la dosis de los sobrenadantes de cultivo neutralizadas y liofilizadas, indicaron que al utilizar sobrenadantes sólo como medio de cultivo, no fue posible observar crecimiento de los microorganismos susceptibles en la tercera dilución y en la segunda el

daño fue evidente al mostrar células atípicas muy pequeñas, que teñían de rojo, como si se tratara de bacterias Gram positivas. Al utilizar una relación 1:4 de Sobrenadante:BHI fresco, la reducción fue de un ciclo logarítmico y se alcanzó un crecimiento de 8 ciclos de *S. aureus* respecto del control en medio BHI, que logra un crecimiento de 9 ciclos (Tabla 27).

Tabla 27. Efecto de la dosis de sobrenadante de *P. acidilactici* en MRS en la inhibición de *S. aureus* (UFC mL⁻¹)

BHI Control	sobrenadante neutralizado, 10x solo	Sobrenadante:Caldo BHI				
		1:1	1:2	1:4	1:6	1:8
1.65 x 10 ⁹	No crecimiento (3 ^a dilución) 2 ^a dilución colonias muy pequeñas en Gram teñían rojo	5.0 x 10 ⁵	2.0 x 10 ⁷	7.5 x 10 ⁸	1.75 x 10 ⁹	2.25 x 10 ⁹

6.7. Identificación de la fracción de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* con actividad inhibitoria

Con el objeto de iniciar una purificación de la o las sustancias con actividad antibacteriana, se hizo una separación de fracciones mediante ultrafiltración. Se empleó un sistema de Ultrafiltración Amicón con membranas YM 100 y YM 10. Se obtuvieron las fracciones > 100, los retenidos de YM10 y los filtrados de YM10 y como control el sobrenadante completo. Se congelaron a -70 °C y se concentraron por liofilización. Se buscaba identificar en que fracción se tiene la sustancia inhibitoria y se encontró que el sobrenadante completo lograba una reducción de 3 ciclos logarítmicos, al utilizar 50% de sobrenadante y 50% de caldo BHI la reducción era sólo de 2 ciclos respecto del cultivo control de *S. aureus* en BHI. Con respecto de las fracciones, la >100 kDa redujo 2 ciclos, la de 10-100 kDa y la <10 kDa 1 ciclo cada una (Tabla 28).

Tabla 28. Efecto de la dosis de fracciones de sobrenadante de *P. acidilactici* en MRS en la inhibición de *S. aureus* (UFC mL⁻¹)

Inóculo inicial 6.0 x 10⁵ UFC mL⁻¹	UFC mL⁻¹ a las 24 h
BHI (control) (0:1)	2.33 x 10 ⁹
Sobrenadante + BHI (1:1)	6.16 x 10 ⁷
Sobrenadante (1:0)	1.5 x 10 ⁶
Fracción >100 kDa	1.17 x 10 ⁷
Fracción 10-100 kDa	1.66 x 10 ⁸
Fracción <10 kDa	6.67 x 10 ⁸

Se utilizaron también tubos Centricón™ de 50 mL (MWCO 100 y 50), para obtener las fracciones y con el sobrenadante completo como control, todas las muestras fueron calentadas a 90 °C durante 10 min y con ellas se realizaron pruebas de difusión en agar sobre *S. aureus*. Los resultados se presentan en la Figura 31, donde se observa que la zona de inhibición obtenida de la fracción de 50kDa fue de mayor tamaño que la observada con la fracción de 100 kDa y con el sobrenadante completo de cultivo de *P. acidilactici* la inhibición fue aún mayor. Esto podía indicar que en ambas fracciones se tenían sustancias con actividad antibacteriana.

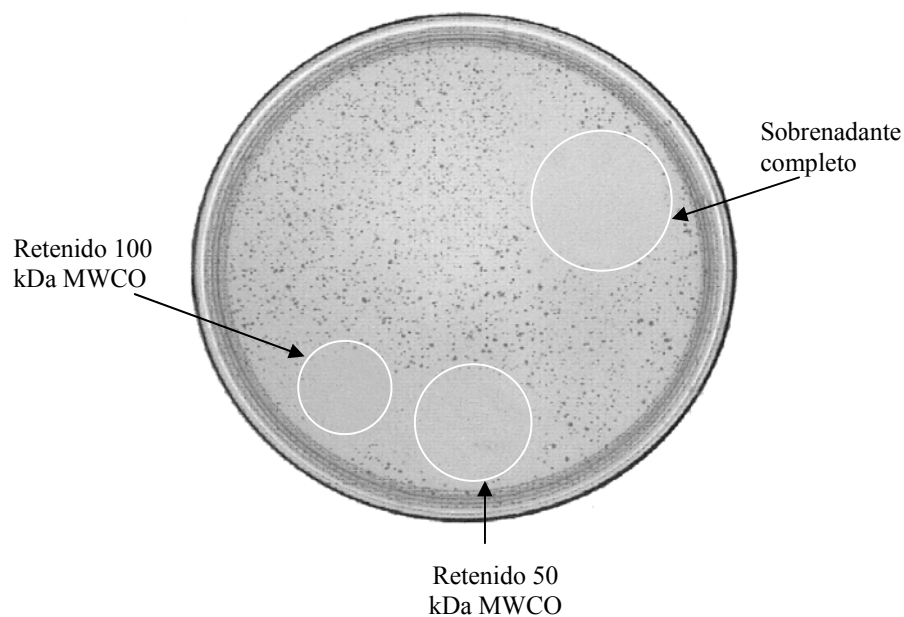


Figura 31. Resultados de la prueba de difusión en agar sobre *S. aureus* con sobrenadante completo y sus fracciones de cultivo de *Pediococcus*

Green, en 1997 estableció que la principal diferencia entre las pediocinas producidas por *Pediococcus acidilactici* (PA-1/AcH) y por *Pediococcus damnosus* (PD-1), es que la PD-1 no es sensible a tripsina, ni quimotripsina y al igual que PA-1/AcH, tampoco inhibe a *P. pentosaceus*. El hecho de que los sobrenadantes de cultivo de la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 no inhibieron a *Pediococcus pentosaceus* coincide con las características de la pediocina PD-1 producida por *P. damnosus*, que también tiene actividad anti *Listeria*, y no con las de la pediocina PA-1, reportada para *P. acidilactici* (Tabla 29).

Tabla 29. Características de las pediocinas PA-1/AcH, PD-1 y de la actividad antibacteriana observada en sobrenadantes de *P. acidilactici* ATCC 8042

	Pediocina PA-1/AcH	Pediocina PD-1	Actividad antibacteriana de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042
Espectro de actividad	Amplio	Amplio	Amplio
Actividad anti <i>Listeria</i>	Positiva	Positiva	Positiva
Termorresistencia a 100° C 10 min	Positiva	Positiva	Positiva
Sensibilidad a proteasas	Tripsina y Proteinasa K	No sensible a Tripsina ni a α Quimotripsina	No sensible a Tripsina. Sensible a Proteinasa K
Antagonismo contra especies relacionadas	No inhibe a <i>P. pentosaceus</i> ni <i>L. plantarum</i>	No inhibe a <i>P. pentosaceus</i>	No inhibe a <i>P. pentosaceus</i>

Asimismo los resultados de sensibilidad a proteasas, se observa que los sobrenadantes conservaron su capacidad inhibitoria sobre *S. aureus* después del tratamiento con tripsina y quimotripsina (Figura 32).



Figura 32. Sensibilidad de los sobrenadantes a proteasas

Resultados de las pruebas de difusión en agar que muestran que las enzimas tripsina y quimotripsina no inhibieron totalmente la actividad antibacteriana de los sobrenadantes.

7. Determinación de actividad de proteinasa

Las BAL poseen herramientas fisiológicas que requieren de mayor investigación, entre ellas poseen sistemas proteolíticos complejos que se encuentran en forma *intra*, *extracelular* o *asociada a pared* (Visser *et al.*, 1986, 1994; Kunji, *et al.*, 1996).

Diversos estudios indican que las BAL secretan proteasas y peptidasas en el medio de cultivo. La actividad proteolítica se ha explorado sobre todo en relación a la degradación de caseína y se han descrito proteasas tipo PI y PIII, en cepas estudiadas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *cremoris*, mientras que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Streptococcus thermophilus* también producen dipeptidasas. Varias proteasas con diferentes especificidades se han encontrado en los lactobacilos (Thomas y Pritchard, 1987, Law y Kolstad, 1983, Pritchard y Coolbear, 1993, Exterkate, *et al.*, 1993, Kunji, *et al.*, 1996, Savijoki, *et al.*; 2006).

La localización externa de las proteinasas es consistente con los hallazgos en la literatura soportados por evidencias bioquímicas e inmunológicas, de que son sintetizadas con una secuencia de péptido señal típica, aunque esta propiedad no ha sido encontrada en ninguna otra peptidasa estudiada (Kok, 1990, De Vos y Siezen, 1994) y todas las peptidasas reportadas se encuentran en el citoplasma. Estas aparentes discrepancias podrían ser explicadas por (i) la existencia de peptidasas extracelulares que han permanecido sin ser caracterizadas, posiblemente porque la mayoría de los trabajos han estado enfocados a la purificación de peptidasas solubles, (ii) una menor especificidad restrictiva de las proteinasas localizadas en la pared celular y/o (iii) la actividad de los acarreadores de membrana capaces de facilitar el transporte de péptidos no mayores de 5-6 residuos de aminoácidos (Kunji, *et al.*; 1996; Savijoki, *et al.*; 2006). Las

propiedades bioquímicas de las proteinasas de varias BAL son muy similares; por ejemplo, la mayoría de las enzimas sino todas son serino proteinasas de tamaños similares de aproximadamente 160-190 kDa y la comparación de secuencias ha revelado un alto grado de identidad (Buist, *et al*, 1998).

En el género *Pediococcus* no está reportada actividad de proteasa, sólo actividad de una tripeptidasa para *Pediococcus pentosaceus*.

Pediococcus acidilactici crece en productos cárnicos, aunque se ha reportado como negativo a la prueba de coagulación de gelatina. En este trabajo se buscó actividad de proteinasa por medio de análisis espectrofotométricos y zimografías y para ello se ensayaron las condiciones reportadas para bacterias lácticas con diferentes sustratos, que permitieran evidenciar actividad extracelular.

7.1. Determinación del perfil electroforético por SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo

Se partió de una concentración de proteína de 0.518 ug de Proteína/mg de sobrenadante liofilizado de MRS (5.18% de proteínas) y 0.89 ug de Proteína/mg de sobrenadante liofilizado de CSTES (8.9% de proteínas).

Para determinar el perfil electroforético de proteína extracelular los sobrenadantes se concentraron por ultrafiltración (Pellicon™ Labscale TFF System de Millipore) con membranas de tamaño de corte de 10 y 50kDa y fue necesario posteriormente su precipitación con TCA/acetona. Se utilizó además un agente caotrópico (urea) y desnaturalizantes (CHAPS y SDS) para facilitar la solubilización del precipitado. Las muestras se prepararon en buffer (urea 1.75 M,

CHAPS 0.65%, SDS 1.87%, azul de bromofenol 0.01%) condiciones desnaturalizantes, no reductoras y adicionalmente DTT 1.25% (condiciones reductoras) y se calentaron durante 5 minutos a 90 °C.

El perfil de proteína extracelular de sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* fue similar para una misma concentración de proteínas, cuando se utilizaron agentes solubilizantes: NaOH, urea, surfactantes (CHAPS y SDS) para evitar la persistente agregación de la muestra y permitir la migración de las bandas en SDS-PAGE (7.5%) bajo condiciones no reductoras y reductoras (DTT) (Figura 33).

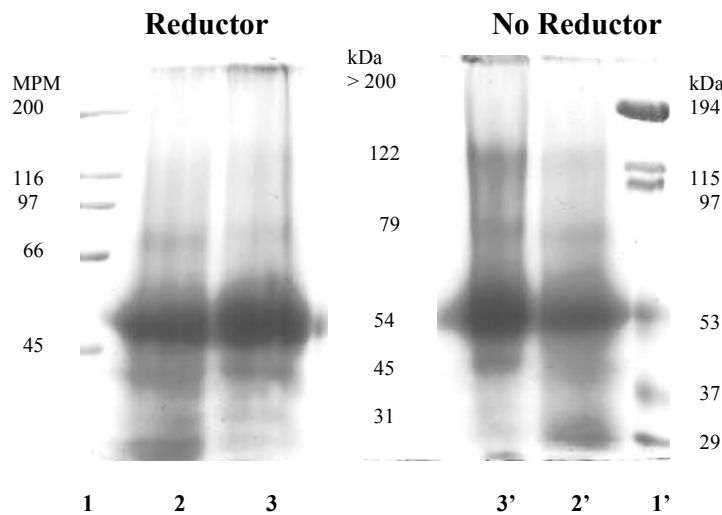


Figura 33. Perfil electroforético de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici*

Carril (1) Estándar de alto peso molecular; (2) muestra UF MWCO 10 kDa liofilizada, 7 µg proteína; (3) UF MWCO 50 kDa, 23 µg proteína; (3') UF MWCO 50 kDa, 22 µg proteína; (2') UF MWCO 10 kDa, 8 µg proteína; (1') MPMBR (Bio-Rad). Gel de poliacrilamida 7.5% T (1mm). Tinción con Azul Brillante de Coomassie.

La tinción de plata permitió utilizar una concentración menor de proteínas para lograr una mayor definición de las bandas de proteínas (Figura 34).

Simitsopoulou, *et al.* (1997) reportaron una actividad de tripeptidasa intracelular producida por *Pediococcus pentosaceus*, la cual fue mejorada por Ca^{2+} y fuertemente inhibida por DTT y β -MET. Los requerimientos de calcio observados en estos ensayos pueden sugerir la presencia de metaloproteasas. La actividad hidrolítica de la cepa 8042 fue evidente después de estar sujeta a condiciones reductoras (2.5% β -MET o 1.25% DTT) o de la adición de 1.75 M urea, 0.65% CHAPS y 2.4% SDS. Estos resultados sugieren la identificación de una actividad diferente a la reportada.

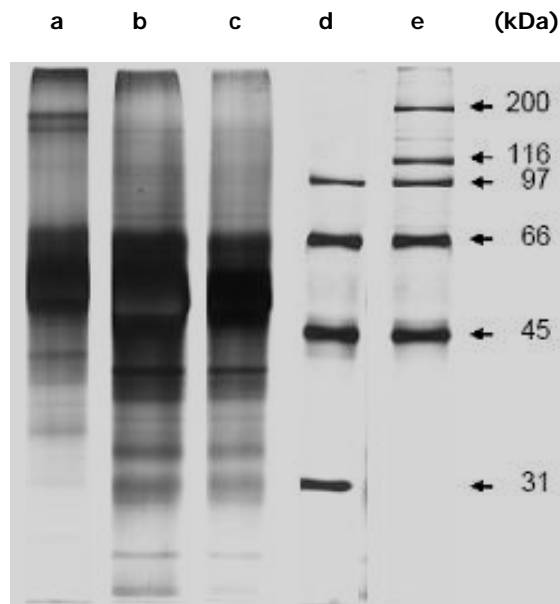


Figura 34. Perfil electroforético de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* bajo diferentes tratamientos

Carriles

- a. Condiciones desnaturalizantes, no reductoras Tinción de plata.**
- b. Condiciones desnaturalizantes, no reductoras, con tratamiento térmico Tinción de plata.**
- c. Condiciones desnaturalizantes, reductoras, con tratamiento térmico Tinción de plata.**
- f. Marcadores de bajo peso molecular (MPMLR) Tinción de plata.**
- g. Marcadores de alto peso molecular (MPMHR) Tinción de plata.**

7.2. Determinación de actividad proteolítica en dispersión

Los resultados de la evaluación de la actividad proteolítica provenientes de los diferentes medios de cultivo de *P. acidilactici* y una tripsina (5µg) como referencia, indican que no se detectó actividad hidrolítica sobre caseína a 37 °C (pH 7.1) (Tabla 30). El color de las muestras interfirió con el ensayo y fue responsable de las altas lecturas obtenidas. El valor de ΔA para tripsina fue de 0.204, lo que equivale a 0.00817 µmol Tirosina/ min µg Tripsina.

Tabla 30. Resultados de la actividad proteolítica de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici*

	Absorbancia a 275 nm		ΔA_{275}
	Control	Reacción	
Tripsina (5 µg)	0.158	0.362	0.204
MRS	1.720	1.760	0.040
CSTES	1.760	1.800	0.040

Los resultados de actividad proteolítica obtenidos con sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* (Figura 35) indican que fue posible detectar una pequeña señal en el caso de dispersiones de azocaseína (A) En dispersiones de HPA también la señal fue pequeña (B), sin embargo en elastina se detectó una actividad específica de 0.089 UA/ h µg proteína (C).

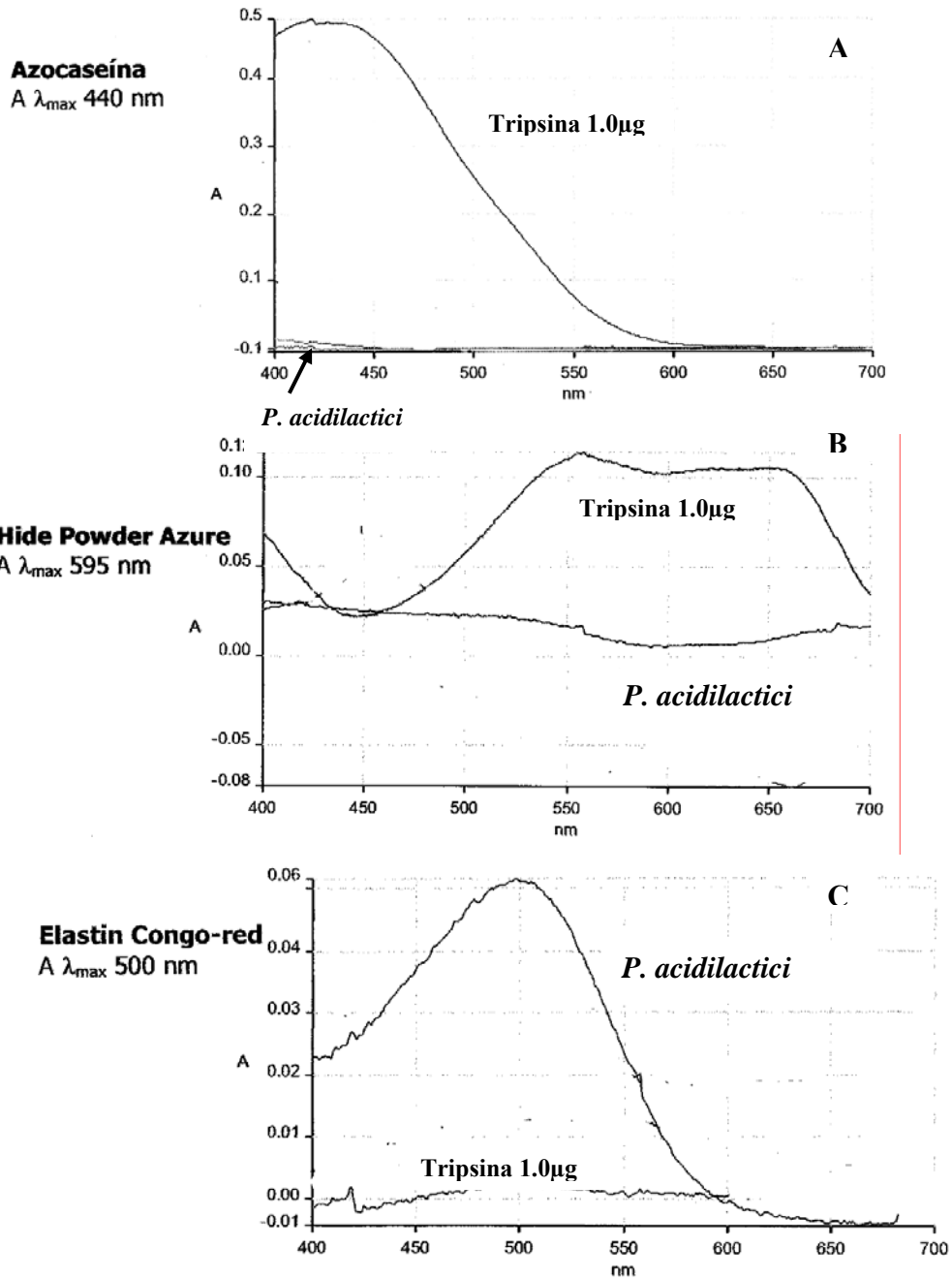


Figura 35. Resultados de actividad de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* en dispersiones de diferentes sustratos proteínicos

(A) Azocaseína, (B) Hide powder azure y (C) Elastina rojo Congo

Los triplicados de cada experimento se realizaron al mismo tiempo con su respectivo Sobrenadante de cultivo (2.7 mg de proteína) Tiempo de incubación 18 h, 37 °C y 800 rpm pH 8.5

Estos resultados fueron interesantes debido a la estructura inusual de la elastina, que impide que muchas proteasas tengan actividad elastolítica. Las elastasas pertenecen a las metaloproteinasas y frecuentemente pueden degradar además de elastina, proteoglicanos, caseína o gelatina, su actividad se ha demostrado en péptidos glicil-glicina, que se encuentran presentes en el peptidoglicano de la pared celular de bacterias. Esta característica es de gran interés, puesto que preparaciones con este tipo de actividad han encontrado un nicho comercial de interés para el ataque a cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos tradicionales (Park, *et al.*, 1885; Jado, *et al.*, 2003; Turner, *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta los resultados anteriores se utilizaron dispersiones de elastina para explorar los efectos de diferentes condiciones sobre la actividad de elastasa (Figura 36). Los cationes divalentes ejercieron un efecto ligeramente positivo (barras 2-4), aunque el efecto más notorio fue mostrado por Zn^{2+} 5mM (barra 5). Estos resultados sugieren la presencia de una metaloproteinasa dependiente de Zn^{2+} .

La actividad más alta se observó cuando se adicionó en el buffer de reacción NaCl 200mM (barra 6) lo que indicó que la fuerza iónica juega un papel importante en la estructura y actividad enzimática. Simitsopoulou *et al.* (1997) reportaron que la actividad una tripeptidasa producida por *Pediococcus pentosaceus* fue mejorada por Ca^{2+} y fuertemente inhibida por DTT and β -MET.

En seguida se exploró el efecto de inhibidores de proteasas y se utilizó una mezcla que inhibe ambas serín y cisteín proteasas (Complete™). Esta no tuvo efecto sobre la actividad (barra 7). Cuando se utilizó PMSF inhibidor de serín proteasas, se observó una pérdida de actividad del

20% (barra 8). Cabe señalar que las condiciones de reacción fueron más adecuadas para serín que para cisteín proteasas, puesto que la prueba se realizó a pH neutro.

La abolición parcial de actividad con EDTA 20mM sugiere la presencia de una metaloproteinasa. El resultado es reforzado por la disminución en actividad observada con un inhibidor de metaloproteinasas con gran afinidad por Zn (O-Phe) a una concentración 10mM (barra 10). El CaCl₂ combinado con NaCl 200mM sólo incrementó en 1% la actividad (barra 11) y finalmente la actividad fue afectada por el tratamiento térmico con una reducción del 50% que fue observada antes de incubar a 90 °C durante 10 min.

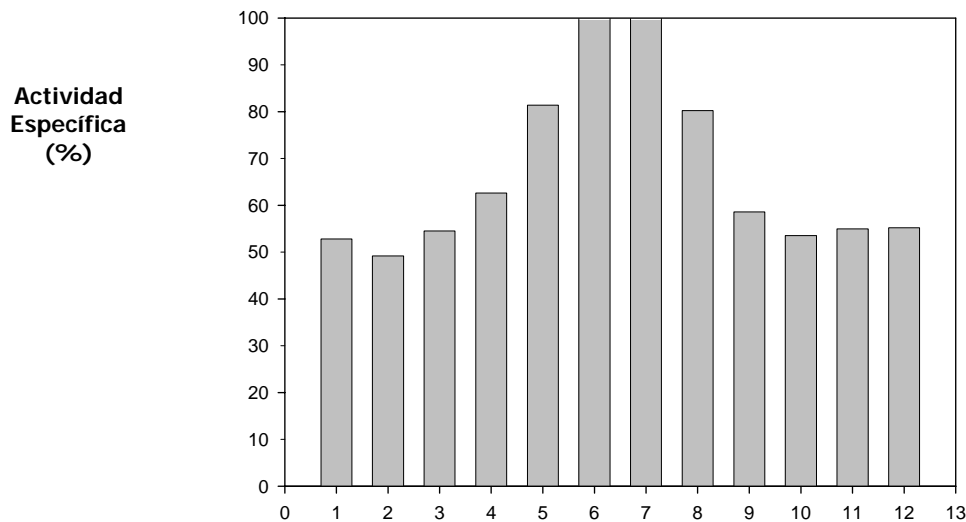


Figura 36. Efecto del tratamiento térmico e inhibidores de proteasas en la actividad elastasa de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* con Elastina rojo Congo

300 µl de sobrenadante de cultivo (0.33 mg proteína) incubados con Elastina rojo Congo (5 mg mL⁻¹) en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.0 a 800 rpm (Thermomixer, Eppendorf, Germany) durante 2 h a 37 °C y se midió Absorbancia_{495nm} en espectrofotómetro (LambdaBio, Perkin Elmer).

Barra (1) control; (2) MgCl₂ 0.5mM; (3) CaCl₂ 0.5mM; (4) ZnCl₂ 0.5mM; (5) ZnCl₂ 5.0mM; (6) NaCl 0.2M; (7) NaCl 0.2M, Complete™ (EDTA 1mM); (8) NaCl 0.2M, PMSF 10mM; (9) NaCl 0.2M, EDTA 5mM; (10) NaCl 0.2M, O-Phe 10mM; (11) NaCl 0.2M, CaCl₂ 0.5mM; (12) NaCl 0.2M incubación a 85-90 °C durante 10 min.

7.3. Detección de proteinasas por técnicas zimográficas

Los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 mostraron bandas de actividad enzimática capaces de degradar proteínas embebidas en geles, tras renaturalizarse en presencia de Tritón al 2.5 % w/v en buffer Tris-HCl, pH 8.0. Se obtuvieron los resultados de la actividad proteolítica sobre los diferentes sustratos y el perfil electroforético de los sobrenadantes de cultivo de la cepa 8042 (Figura 37). Bajo las condiciones de trabajo no se detectaron otras bandas de actividad proteolítica de menor masa molecular. Las proteasas actuaron aún en presencia de urea (1.75M), CHAPS (0.65%), SDS (1.5 %) y β -mercaptoetanol (2.5%) o DTT (1.25%). Por el contrario Simitsopoulou, *et al.* (1997) reportaron una actividad de tripeptidasa intracelular producida por *Pediococcus pentosaceus*, la cual fue mejorada por Ca^{2+} y fuertemente inhibida por DTT y β -MET.

7.3.1. Actividad sobre diferentes sustratos proteínicos

Se identificaron dos bandas de hidrólisis, la primera con un peso molecular mayor de 200 kDa (tanto en gelatina, caseína o elastina soluble) (Figura 37 carriles a, b, c, respectivamente); la segunda detectada sólo en gelatina de aproximadamente 107 kDa. La banda de actividad gelatinolítica de 107 kDa se perdió completamente después del tratamiento térmico (90 °C durante 10 minutos) (carril f), aunque las bandas de hidrólisis de alto peso molecular permanecieron sin alterarse.

Estos resultados probablemente indican que enzimas diferentes son responsables de fenómenos distintos, degradación de gelatina, caseína y actividad sobre elastina.

Se requirieron diferentes condiciones de reacción para demostrar estas dos actividades y ambas requirieron de un exceso de SDS en la preparación de las muestras para su detección en zimogramas. La banda mayor de 200 kDa estaba compuesta de varias bandas separadas que pudieron observarse en geles polymerizados a concentraciones bajas de poliacrilamida (6%). Para evitar la sobreestimación del peso molecular de las bandas hidrolíticas obtenidas, que puede ocurrir en estos geles de poliacrilamida, se utilizaron en cada zimograma marcadores de peso molecular (MPM) (Martínez-Moya, *et al.*, 2002).

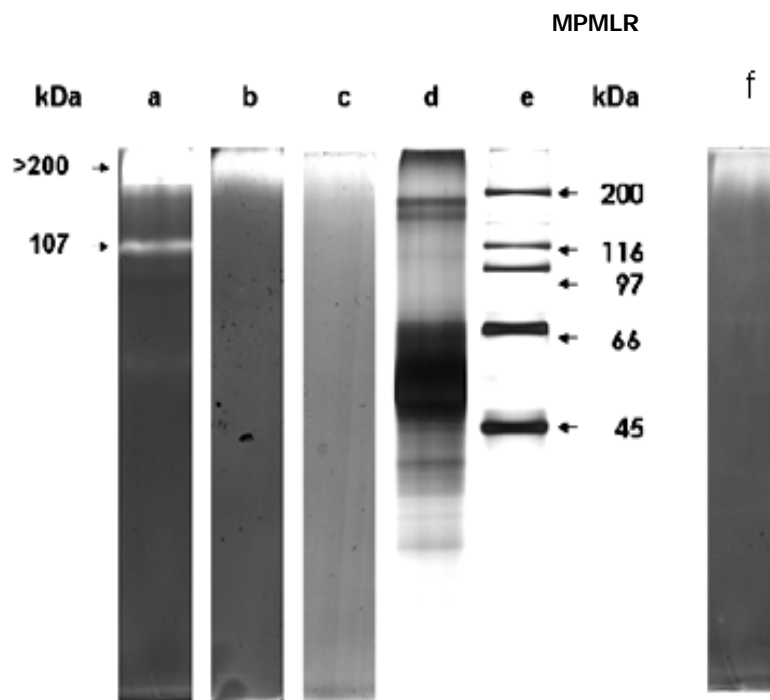


Figura 37. Actividad proteolítica de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* sobre zimogramas con diferentes sustratos proteínicos

Carriles (a) gelatina, (b) caseína, (c) elastina soluble, (d) perfil electroforético (tinción de plata), (e) MPMHR (Bio-Rad), (f) gelatina, los sobrenadantes fueron calentados durante 10 minutos a 90 °C. Buffer de renaturalización: Triton X-100 (2.5% (w/v), Tris-HCl 50mM, CaCl₂ 5mM, NaCl 0.2M, pH 8.0). SDS-PAGE (10% T, 3.3 % C; 1mm) (100 V a 4 °C). Geles de actividad Tinción Azul Brillante de Coomassie. Llorente, *et al.*, 2005.

Las bandas hidrolíticas se identificaron mejor cuando se adicionó al buffer de muestra, EDTA (Figura 38). La presencia EDTA (10mM) en el buffer de renaturalización permitió mejorar la detección de la banda gelatinolítica de 107 kDa, pero no llevó a un incremento de la actividad elastolítica cuando se realizó la determinación espectrofotométrica. Se puede observar en el gel de acrilamida que existe cierta degradación de las bandas que podría deberse a la propia actividad de la muestra. De hecho, se aprecian mejor las bandas de actividad cuando al buffer de muestra se le adicionó EDTA, indicando que alguna de las enzimas hidrolíticas presentes en el sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* puede ser una metaloproteasa.

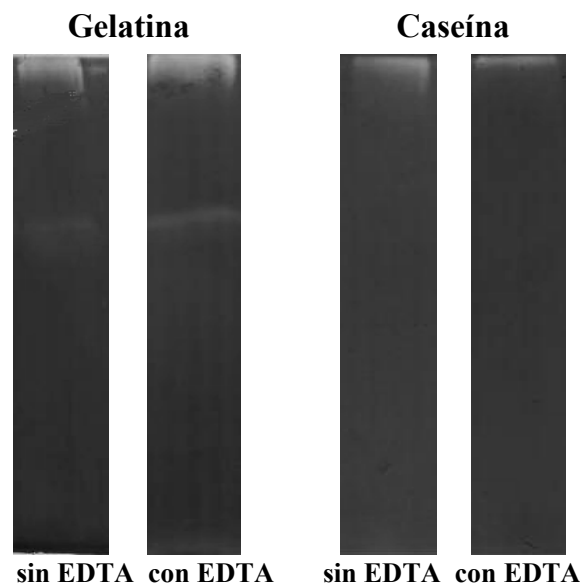


Figura 38. Efecto del EDTA sobre la actividad gelatinasa y caseinolítica de los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici*.

Buffer 0.065M Tris-HCl (pH 6.8), 2.4 % SDS, 10 % de glicerol, 0.001% de azul de bromofenol, con y sin EDTA (10mM). Muestra UF MWCO 50, 1.15 µg proteína/carril. SDS-PAGE 7.5% T (1mm). Tinción con Azul Brillante de Coomassie.

7.3.2. Efecto de inhibidores de proteasas

Para poder establecer el tipo de mecanismo responsable de la hidrólisis del enlace peptídico fue necesario hacer uso de los inhibidores de proteasas más comunes. Se observa que la actividad gelatinasa no se inhibió en presencia de PMSF y para poder afirmar lo anterior se trabajó con tripsina como control positivo y se establecieron las condiciones necesarias previas y posteriores a la electroforesis, para alcanzar prácticamente la inhibición de la tripsina. Se utilizó una concentración final de 10mM de EDTA durante la renaturalización y en el buffer de desarrollo y se observó con mayor definición la zona de hidrólisis correspondiente a la proteasa de menor peso molecular, pero no fue un resultado contundente. Explorando la posibilidad de una metaloproteínasa se evaluó el efecto de los iones Ca^{2+} en el buffer y el pH óptimo de actividad de las enzimas (Figura 39).

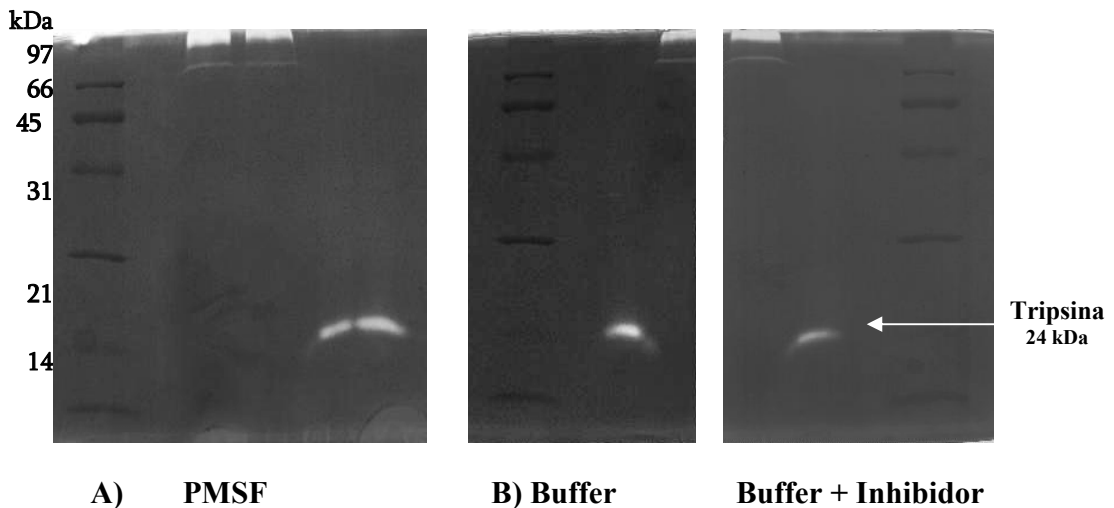


Figura 39. Efecto de PMSF sobre la actividad gelatinasa de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici*.

Muestra UF (MWCO 10 kDa) y liofilizada.

Gel (A) Inhibición enzimática previa a la electroforesis (100 V a 4 °C). Carril (1) MPMLR; (2) Muestra; (3) Muestra + PMSF (7mM); (4) Tripsina (15 ng) + PMSF (7mM); (5 y 6) Tripsina (15 ng).

Gel (B) Ensayo de inhibición posterior a la electroforesis. PMSF 2mM en Buffer I Incubación 4 h a 37 °C

SDS-PAGE (12.5% T, 3.3%C; 1mm). Tinción con Azul Brillante de Coomassie.

Buffer I (Tris-HCl 50mM, NaCl 200mM y CaCl_2 5mM, pH 8.0).

La actividad gelatinasa de la muestra concentrada no disminuyó en presencia de Complete™ Mini EDTA-free, ni PMSF, pero sí inhibió a la tripsina reduciendo su señal hidrolítica en los geles (Figuras 39-41).

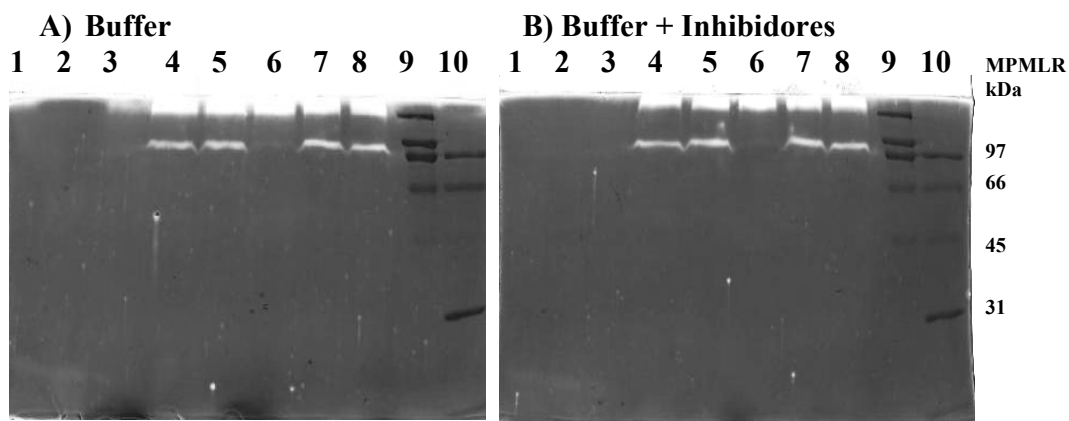


Figura 40. Efecto de inhibidores de proteasas adicionados después de la electroforesis sobre la actividad gelatinasa de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici*

Sobrenadante de cultivo (8h 30 °C) UF (MWCO 10 kDa) y liofilizado. Gel (A) Incubación en buffer I, 16 h a 37 °C. Gel (B) Incubación en buffer I, 16 h a 37 °C, pH 8.0, 4 h a 37 °C, adicionado de 2mM de PMSF posterior a la electroforesis. Carriles (1-3) tripsina; carril (4) muestra en isopropanol; carril (5) muestra recién preparada + PMSF 20mM en isopropanol; carril (6) muestra con tratamiento térmico (90 °C, 10 minutos), en agua; carril (7) muestra en agua; carril (8) Muestra recién preparada+Complete™-Mini EDTA-Free; carril (9) MPMHR; carril (10) MPMLR. SDS-PAGE 10% T, 3.3% C; 1mm. (100 V a 4 °C). Tinción con Azul Brillante de Coomassie. Buffer I (Tris-HCl 50mM, NaCl 0.2M y CaCl₂ 5mM, pH 8.0).

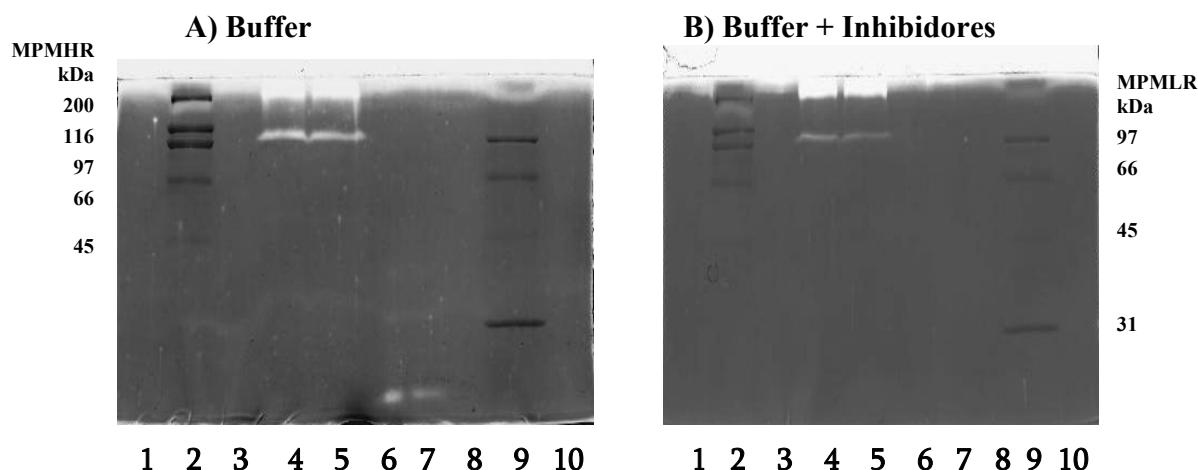


Figura 41. Comparación del efecto de PMSF sobre la actividad gelatinasa de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* y de tripsina adicionados después de la electroforesis

Sobrenadante de cultivo (8h 30 °C) UF (MWCO 10 kDa) y liofilizado. Gel (A) Incubación 16 h a 37 °C en buffer I, sin inhibidor, Carril (2) MPMHR; carriles (4,5) Muestra; carriles (6,7) Control de tripsina; carril (9) MPMLR. Gel (B) Incubación 16 h a 37 °C en buffer I, con la adición del Inhibidor posterior a la electroforesis. Carril (2) MPMHR; carriles (4,5) Muestra; carriles (6,7) Control de Tripsina con PMSF (20mM) en isopropanol; carril (9) MPMLR. Gel de poliacrilamida (10% T, 3.3%C; 1mm). (100 V a 4 °C). Tinción con Azul Brillante de Coomassie. Buffer I (Tris-HCl 50mM, NaCl 200mM y CaCl₂ 5mM, pH 8.0).

7.3.3. Termosensibilidad

La actividad gelatinasa observada corresponde a por lo menos dos enzimas diferentes, por su respuesta a los diversos tratamientos. Una de alto peso molecular (mayor de 200 kDa), que igualmente actúa sobre geles de gelatina, caseína y elastina, y no se inactiva con un tratamiento térmico (90°C, 10min). La banda de actividad de alrededor de 107 kDa es termosensible y no es capaz de hidrolizar a la caseína (o su derivado cromóforo azocaseína), bajo las condiciones de ensayo (Figuras 37, 40, 42 y 43). El límite de detección encontrado en los geles de azocaseína fue de un orden de magnitud superior al observado en gelatina (10 ng de tripsina).

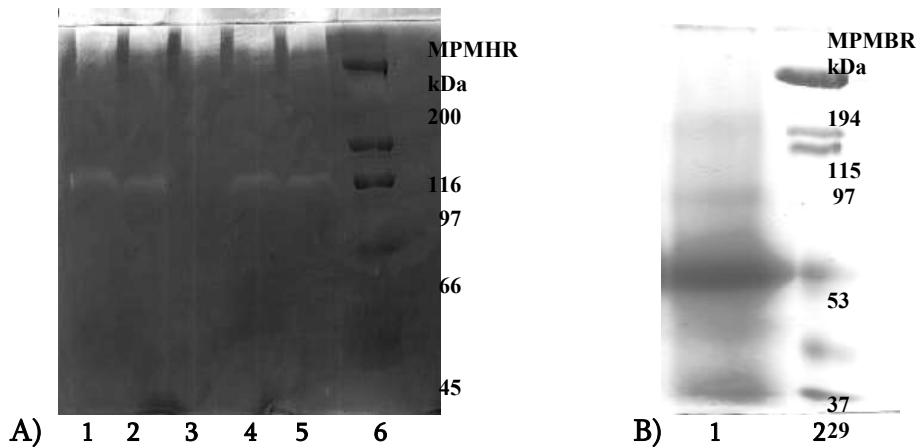


Figura 42. Efecto de las condiciones de manejo de las muestras de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* en su actividad gelatinasa

Sobrenadante de cultivo (8h 30°C) UF (MWCO 10 kDa) y liofilizado. Gel (A) Carril (1) Muestra con isopropanol; carril (2) Muestra con PMSF 20mM en isopropanol; (3) muestra con tratamiento térmico (90 °C, 10 min); carril (4) muestra en agua; carril (5) muestra recién preparada; carril (6) MPMHR. Incubación 4 h a 37 °C en buffer I. Gel (B) SDS-PAGE no reductor. (1) Muestra concentrada con TCA/acetona; (2) MPMBR. Geles de poliacrilamida (A) 7.5% T, 3.3% C; 1mm; (B) 7.5% T, 2.6% C; 1mm). Tinción con Azul Brillante de Coomassie. Buffer I (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200mM y CaCl₂ 5mM, pH 8.0).

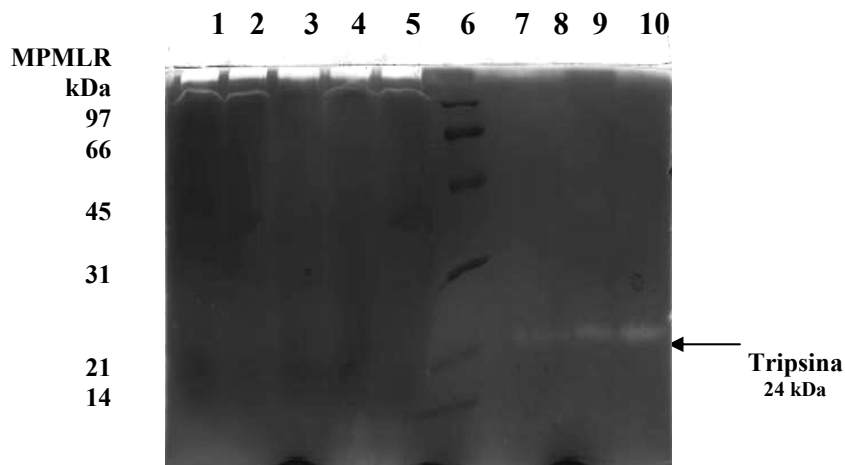


Figura 43. Efecto del manejo de la muestra de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* y de la tripsina (control) en la actividad gelatinasa

Carriles (1, 2, 4 y 5) Incubación en buffer I, 4 h a 37 °C sin tratamiento térmico, carril (3) Muestra tratada a 90 °C 10 min, carril (6) MPMLR, carril (7) Tripsina con PMSF (20mM) en isopropanol, carril (8) Muestra recién preparada en agua, inhibidor de tripsina PMSF (20mM) en isopropanol, carril (9) Tripsina en agua, carril (10) Control de tripsina. Gel de poliacrilamida (12.5% T, 3.3%C; 1 mm). Tinción con Azul Brillante de Coomassie. Buffer I (Tris-HCl 50mM, NaCl 0.2M y CaCl₂ 5mM, pH 8.0).

7.3.4. Influencia de la presencia de iones en el perfil de actividad gelatinasa

La influencia de la presencia de iones mono y divalentes en el buffer de renaturalización para la detección de la actividad proteolítica se ensayó en zimografías de gelatina para identificar su efecto en las dos bandas de actividad, la termoestable mayor de 200 kDa y la termosensible de alrededor de 107 kDa (Figura 44).

Al disminuir 10 veces la concentración final de Ca^{2+} se observó una disminución de la actividad proteolítica en la muestra y en el control de tripsina. El Ca^{2+} juega un papel importante y se pudo observar otra banda de actividad de aproximadamente 50 kDa (0.5mM Ca^{2+}) (carril b) que no aparece si se adiciona EDTA 10mM. Para poder afirmar que las proteasas son metaloproteasas, fue necesario emplear otro agente quelante con una mayor afinidad por el Zn^{2+} que por el Ca^{2+} (O-Phe) (carril e) o adicionar ZnCl_2 en el buffer de incubación para la renaturalización (Figura 44).

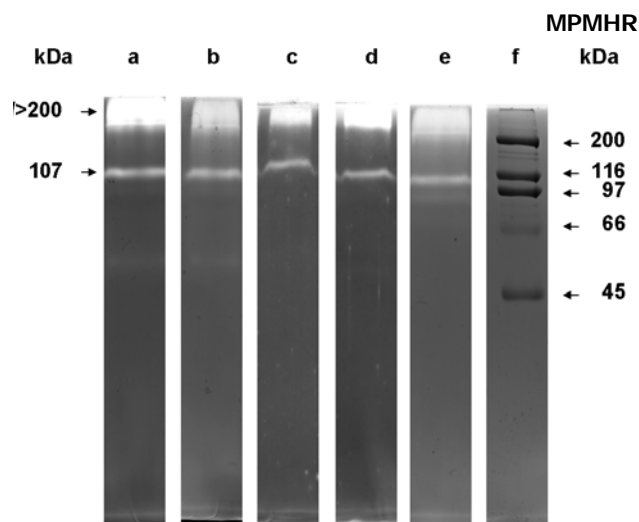


Figura 44. Efecto del pH y los iones metálicos en la actividad gelatinasa de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* bajo diferentes condiciones de reacción

Buffer de incubación (Tris-HCl 50mM, pH 8.0) fue adicionado con (a) Ca^{2+} 5mM; NaCl 0.2M; (b) Ca^{2+} 0.5mM; (c) Ca^{2+} 5mM, NaCl 0.2M, PMSF 10mM; (d) Ca^{2+} 5mM, NaCl 0.2M, Complete™ Mini EDTA free 10mM, (e) Ca^{2+} 0.5mM, O-Phe 10mM, (f) MPMHR. SDS-PAGE (poliacrilamida 10%, 1mm), (100 V, 4 °C), los geles de actividad teñidos con Azul Brillante de Coomassie.

Fuente: Llorente, *et al.*, 2007.

Los datos numéricos de la actividad elastasa y el efecto que guarda el uso de iones mono y divalentes, así como de inhibidores de proteinasas, cuando la actividad enzimática se evaluó en dispersiones de Elastina rojo Congo, indican que fue estimulada por Zn^{2+} y NaCl 0.2M y disminuyó en presencia de PMSF 10mM, EDTA 5mM y O-Phe 10mM, lo que sugieren la presencia de una metaloproteasa dependiente de Zn y probablemente de una serín proteasa lo que debe ser profundizado (Tabla 31).

Tabla 31. Efecto del tratamiento térmico e inhibidores de proteasas en la actividad elastasa de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* con Elastina rojo Congo

Ensayos	Buffer Tris-HCl 50 mM	$\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$	Actividad elastasa (%)
1	(control)	0.415	52.8
2	MgCl ₂ 0.5mM	0.386	49.2
3	CaCl ₂ 0.5mM	0.428	54.5
4	ZnCl ₂ 0.5mM	0.492	62.6
5	ZnCl ₂ 5.0mM	0-639	81.4
6	NaCl 0.2M	0.786	100.0
7	NaCl 0.2M, Complete™ (EDTA 1mM)	0.806	102.5
8	NaCl 0.2M, PMSF 10mM	0.630	80.1
9	NaCl 0.2M, EDTA 5mM	0.461	58.6
10	NaCl 0.2M, O-Phe 10mM	0.420	53.4
11	NaCl 0.2M, CaCl ₂ 0.5mM	0.433	55.1
12	NaCl 0.2M incubación a 85-90 °C 10 min	0.434	55.2

Los resultados presentados son el promedio de tres reacciones. Se utilizaron 0.33 mg de proteínas extracelulares. El sustrato fue elastin congo red.

Un microorganismo cuya capacidad antimicrobiana ha sido relacionada con la presencia de proteasas es *Pseudomonas aeruginosa*. Es un patógeno psicrotrófico Gram negativo que secreta varias proteasas relacionadas con su patogenicidad y que incluyen al menos a cuatro endopeptidasas: elastasa también llamada pseudolisina, alcalino proteinasa, proteasa LasA (estafilolisina) y una endopeptidasa específica de lisina que corta enlaces peptídicos adyacentes a residuos de lisina en péptidos y proteínas. La elastasa Las A es una proteasa extracelular de *Pseudomonas* que mejora la actividad elastolítica de la elastasa de *Pseudomonas* y otras proteasas que cortan elastina a distintos sitios. La acción de LasA es de una proteasa potente que corta proteínas en múltiples sitios y puede degradar a muchas las proteínas incluso a la elastina. Su actividad hidrolítica es dirigida a las secuencias Gly2 y Gly2-Ala, poco comunes en la mayoría de las proteínas, detectada entre la subunidad peptídica y en la unión Gly-Gly del puente interpeptídico de la pentaglicina que entrelaza el PG de la pared celular y produce lisis de las células de *Staphylococcus aureus* (Kessler, *et al.*, 1993; Vessillier, *et al.*, 2001). Por otra parte

Kessler, *et al.* (1997) reportan que LasA es una proteasa estafilolítica que se inhibe con EDTA y 1,10-Phe (agentes quelantes de zinc), así como un exceso de zinc y DTT. Por otro lado, es una zinc metaloendopeptidasa relacionada con la termolisina. Pertenece a la familia de proteasas endopeptidasas β -líticas como la endopeptidasa β -lítica de *Achromobacter lyticus* (Kessler, *et al.*, 1998).

Kessler (1993), reportó una endopeptidasa en *Pseudomonas aeruginosa* con actividad elastinolítica sobre *S. aureus* que hidroliza uniones peptídicas específicas: D-Ala-Gly/Ala, detectada entre la subunidad peptídica y en la unión Gly-Gly del puente interpeptídico (Figura 48).

Olson y Ohman (1992) mencionan que la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para degradar a la elastina se debe a dos enzimas con actividad elastolítica, una elastasa y la enzima LasA. La elastasa es una zinc metaloproteasa y cuando *Pseudomonas* crece bajo condiciones de deficiencia de iones metálicos, exhibe un nivel bajo de actividad elastolítica, por el contrario cuando crece en medio suplementado con zinc (10^{-4} M) y CaCl_2 (2.5×10^{-3} M), posee altos niveles de actividad proteolítica y elastolítica. La producción de LasA, es estimulada por zinc y el calcio facilita su procesamiento. Serán necesarios estudios posteriores acerca de la naturaleza de las enzimas aquí presentes.

Se puede apreciar que la actividad enzimática encontrada en este trabajo presenta algunas similitudes con este tipo de enzimas. Estudios posteriores deberán centrarse en la caracterización detallada de la misma.

8. Actividad peptidoglicanohidrolasa

8.1. Detección de actividad extracelular por técnicas zimográficas

Los microorganismos emplean otro grupo importante de enzimas hidrolíticas, una de las más conocidas es la autolítica, las peptidoglicano hidrolasas (PGH) endógenas también denominadas autolisinas, hidrolizan el peptidoglicano de la pared celular y por tanto, causan la lisis bacteriana, lo que resulta en la muerte celular o detención del crecimiento, también pueden lisar a otros como una respuesta de defensa.

Mora *et al.* (2003) reportan la presencia de actividad autolítica intracelular en *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, en tanto Cibik y Chapot Chartier (2000) la han encontrado en *Leuconostoc mesenteroides*, Buist *et al.* (1998) en *Lactococcus lactis*, en fase estacionaria.

Pediococcus acidilactici es una cepa de BAL importante de uso industrial, se utiliza principalmente como iniciador en la producción de salamis fermentados. Las actividades proteolíticas y peptidoglicano hidrolasa en este género, sin embargo, han sido poco estudiadas. Benito *et al.* (2007) aisló flora nativa de embutidos españoles y más del 50% de las especies encontradas fueron *P. pentosaceus* o *P. acidilactici*. Tres de estas cepas mostraron actividad proteolítica pobre sobre las proteínas miofibrilares. Simitsopoulou *et al.* (1997), reportaron una tripeptidasa intracelular en *P. pentosaceus* y Makarova *et al.* (2006) completaron el genoma de esta especie, parece contener al menos 60 peptidasas o proteasas que aún no se han demostrado y caracterizado bioquímicamente. Mora *et al.* (2003) identificaron una PGH intracelular responsable de autólisis en ambos *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*. En este estudio, se encontró que durante la fase de crecimiento logarítmico tardío, *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

produjo actividad extracelular proteolítica y PGH y se describen aquí algunas de sus propiedades. Una comprensión detallada de estas enzimas puede dar lugar a la generación de cepas superiores para ser utilizadas en la producción de productos cárnicos en procesos de bioconservación, ya que el uso de enzimas proteolíticas o líticas puede ser considerado como agentes antimicrobianos. Lysostaphin™, con actividades elastasa y estafilolítica producida por *Staphylococcus simulans*, actualmente es utilizado como un agente antimicrobiano (Turner *et al.*, 2007).

8.2. Detección de actividad extracelular por técnicas espectrofotométricas

La actividad peptidoglucano hidrolasa fue detectada en sobrenadante ultrafiltrado (Pellicon™, Labscale System) con membrana de 30 kDa de MWCO, neutralizado y liofilizado de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, con una concentración de proteína de 2.7 mg al causar una disminución en la absorbancia de suspensiones de células de *Micrococcus lysodeikticus*. El tiempo de reacción fue diez veces mayor que el requerido para lograr el efecto visto con una cantidad similar de un estándar de lisozima (Tabla 32).

Tabla 32. Resultados de actividad lítica de sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici*

Lisozima	Sobrenadantes
1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2.7 mg mL^{-1}
Disminución de D.O.=0.024	Disminución de D.O.=0.089
Por minuto	120 minutos

Sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* UF con membrana 30 kDa de MWCO, neutralizado y liofilizado. Buffer: Tris-Hci 50 mM, pH 8.0. $\Delta A=0.089$ en un tiempo de reacción de 120 minutos.

En el presente trabajo la evidencia de lisis enzimática provocada por los sobrenadantes concentrados y liofilizados es un mecanismo que puede explicar el efecto antibacteriano que se observó. Se encontró actividad de PGH extracelular de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

cuando se hicieron geles renaturalizantes SDS-PAGE, con células de *Micrococcus lysodeikticus* embebidos. Estas células son usualmente utilizadas como blanco para probar esta actividad enzimática y se detectó una banda de 110 kDa después de 6 h en buffer de renaturalización, aún cuando el buffer de muestra incluye β -MET y tratamiento térmico. En ausencia de tratamiento térmico no fue posible identificar esta actividad lítica.

Mora, *et al*, 2003, describieron una actividad similar en *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*, pero lo que ellos describen es una actividad autolítica producida intracelularmente y en fase estacionaria. Sus propiedades y condiciones de crecimiento son similares a las autolisinas producidas por especies de *Lactobacillus* (Lortal, *et al*; 1997) y de *Lactococcus lactis* (Buist, *et al*, 1998). La actividad peptidoglicanohidrolasa detectada en la cepa 8042 es diferente a las reportadas previamente. El uso de EDTA redujo la actividad lítica en zimogramas con *Micrococcus lysodeikticus*, cuando se utilizó una concentración de 1mM EDTA y se inhibió completamente con 10mM de EDTA. El uso de PMSF no ejerció efecto en la señal lítica (Figura 45).

MPMBR

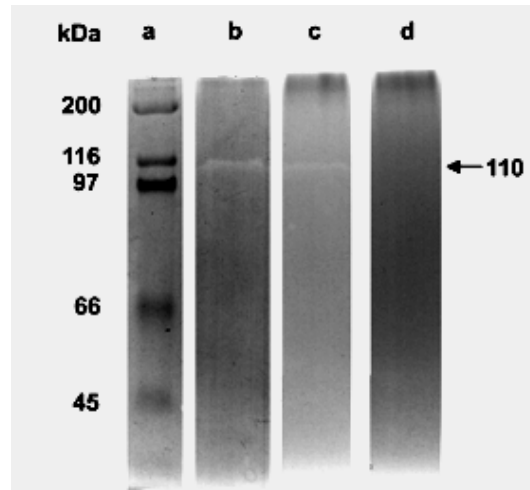


Figura 45. Zimogramas de actividad PGH de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 con *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato

Carriles (a) MPMBR; (b) Sobrenadante; (c) Sobrenadante + EDTA 1 mM. Las condiciones de reacción fueron: SDS-PAGE poliacrilamida 7.5%, 1mm; 0.2% de células de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 resuspendidas en 1 ml de agua y adicionadas a la mezcla del gel antes de la polimerización, 100 V, a 4 °C. La actividad fue detectada después de 6 h en el buffer de renaturalización (Tris-HCl 25 mM, pH 7 con 1% v/v Triton X-100). Tinción azul de metileno 0.01% (w/v) disuelto en 0.1% KOH. (Llorente, *et al.*, 2007).

El mismo efecto se observó cuando se utilizaron células de *S. aureus* ATCC 6538P. Se observó una banda de actividad lítica de 110 kDa tras 18 h de incubación en el buffer de renaturalización, que disminuyó en presencia de 1mM de EDTA y se perdió totalmente al utilizar 10mM de EDTA en el buffer de renaturalización (Figura 46).

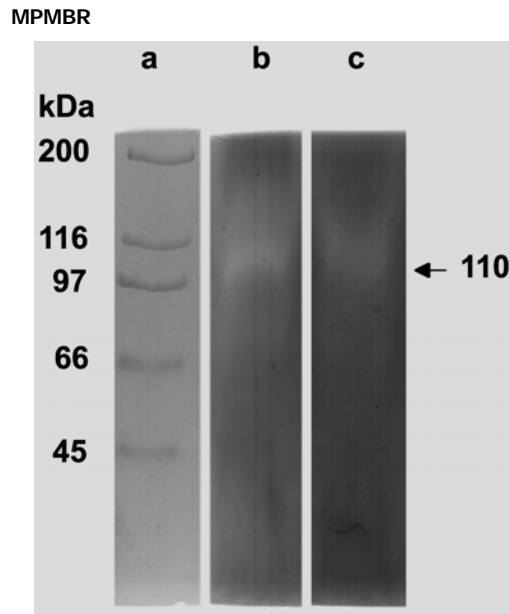


Figura 46. Zimogramas de actividad PGH de sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 con *Staphylococcus aureus* como sustrato

Carril (a) MPMBR; carril (b) Sobrenadante; carril (c) Sobrenadante + EDTA 1mM. Con EDTA 10mM la actividad se perdió totalmente (datos no mostrados).

SDS-PAGE 7.5% con 0.2% de células de *S. aureus* ATCC 6538P (18 h en buffer de renaturalización) Sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 concentrado con Amicón MWCO 30 kDa

Fuente: Llorente, *et al.*, 2007.

Algunos autores han encontrado que la actividad proteolítica afecta el proceso autolítico en *Lactococcus lactis* (Leclerc y Asselin, 1989, Lortal, *et al.*, 1997). En otros grupos bacterianos la actividad elastolítica se debe a la presencia de ambas una elastasa y una proteasa, como en *Pseudomonas aeruginosa* (Peters, *et al.*, 1992), mientras *Staphylococcus simulans* produce una enzima, lisostafina, que muestra ambas actividades gelatinasa y elastasa (Park, *et al.*; 1995).

Los estudios de Steen (2005) plantean los modelos que permiten apreciar que la lisostafina es producida por *Staphylococcus simulans* (A), *S. aureus* posee receptores para lisostafina (B) la lisostafina se une a receptores específicos en *S. aureus* (C) y de esta unión se

puede inducir lisis celular (D) (Figura 47). Los alineamientos de secuencias muestran que estas proteinasas están relacionadas con las subtilisinas que son serín proteasas con dominios catalíticos similares (Poolman, *et al.*, 1995).

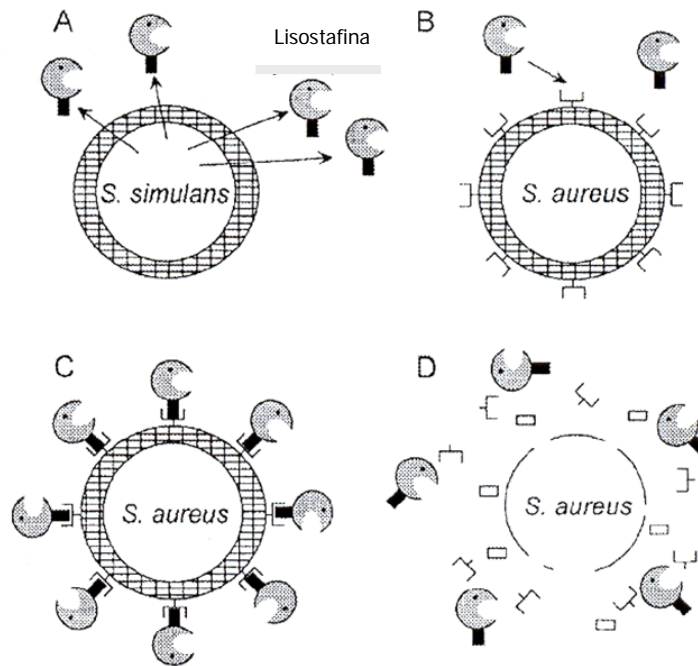


Figura 47. Producción de lisis celular de *S. aureus* por lisostafina de *S. simulans*

Fuente: Steen, 2005

La lisostafina hidroliza el enlace peptídico de Gly-Gly que forma el puente interpeptídico que entrelaza transversalmente las cadenas de PG.

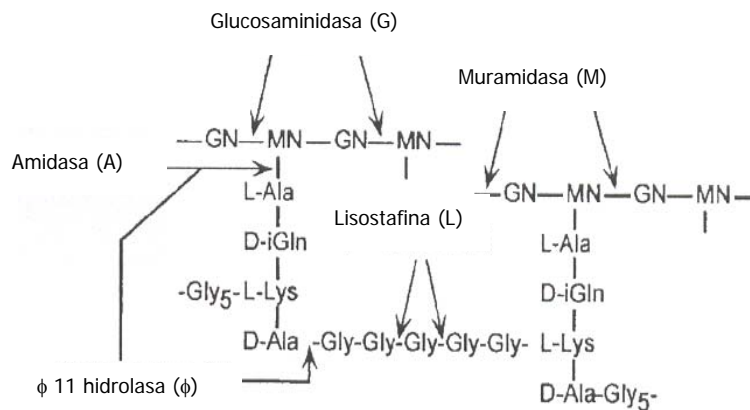


Figura 48. Esquema del puente interpeptídico de PG de *S. aureus* que muestra los sitios de acción de la lisostafina.

Fuente: Steen, 2005

La actividad lítica extracelular (110 kDa) de *Pediococcus acidilactici* detectada en este trabajo es termoestable, mientras la actividad gelatinolítica (107 kDa) no lo es, además de que se requieren diferentes condiciones de reacción para demostrar ambas actividades.

Es evidente que proteínas diferentes son responsables de estos dos fenómenos: degradación de proteínas (gelatina, caseína y elastina) y lisis celular. La purificación y caracterización de las mismas permitirá demostrarlo. La presencia de este tipo de enzimas en el género *Pediococcus* es una característica interesante debido a que esta cepa es utilizada como cultivo iniciador en productos cárnicos fermentados y las actividades reportadas aquí podrían afectar el desarrollo de sabor y podría posiblemente ejercer un efecto antibacteriano similar al Lysostaphin™

8.3. Detección de actividad intracelular por técnicas zimográficas

Con extractos celulares de *P. acidilactici* ATCC 8042 obtenidos de acuerdo al protocolo sugerido por Mora *et al.* (2003) se hicieron pruebas de difusión en agar y el buffer de extracción se usó como control en la misma caja. Se adicionó *S. aureus* ATCC 6538P y *L. innocua* como microorganismos susceptibles y en ambos casos se identificó inhibición. El tamaño del halo fue de alrededor de 30 mm en cada caso y el del control con buffer sólo de la mitad (Figura 49).



Figura 49. Extractos celulares de *P. acidilactici* sobre *S. aureus* y sobre *L. innocua*.

Estos resultados llevaron a explorar la posibilidad de que se detectara actividad lítica por electroforesis, con los microorganismos de prueba copolimerizados en ellos. La banda de actividad lítica (bandas translúcidas) se visualizó después de 1 h para la 8042 y 2 h para las otras cepas. Se pudo observar que las bandas más intensas fueron de la cepa 8042 con 10 y 20 μ L de extracto celular. Los geles se quedaron en el buffer de renaturalización toda la noche (12h) en agitación suave. Las bandas de actividad se visualizaron con mayor claridad teñidos con azul de metileno al 1% (w/v) (Sigma) en KOH al 0.01% (w/v); fue posible observar varias señales líticas más tenues que fueron mayor en número e intensidad respecto de las otras cepas (Figura 50).

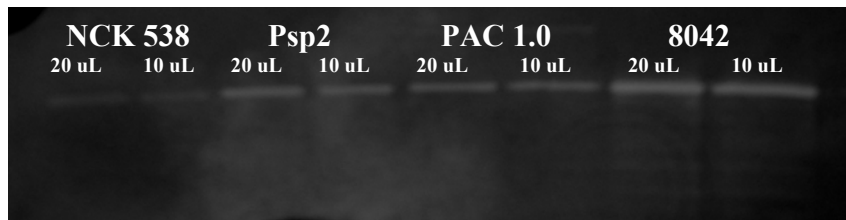


Figura 50. Actividad lítica de extractos celulares de cepas productoras de pediocinas y 8042 sobre *M. lysodeikticus*.

SDS-PAGE 7.5% de poliacrilamida

Con los mismos extractos utilizados para este gel ya adicionados de buffer de muestra y tratados a 100 °C 10 min se hirvieron por segunda ocasión durante 5 min y se utilizaron 5 y 10 uL de cada extracto para correr un gel SDS-PAGE copolimerizado con *M. lysodeikticus*. La actividad se conservó a pesar del segundo tratamiento térmico lo que demuestra que la enzima responsable es termorresistente. Las bandas líticas fueron nuevamente más intensas en la cepa 8042 y se identificaron 12 bandas en la 8042, la más intensa de aproximadamente 110 kDa que se identificó en menos de 1 hora en buffer de renaturalización y 11 bandas más después de 18 h en buffer de renaturalización (Figura 51). Es importante resaltar que se observaron 3 bandas adicionales entre 40 y 60 kDa en la 8042 que no se observaron en la cepa productora de pediocinas Psp2, que tuvo un perfil de actividad similar.

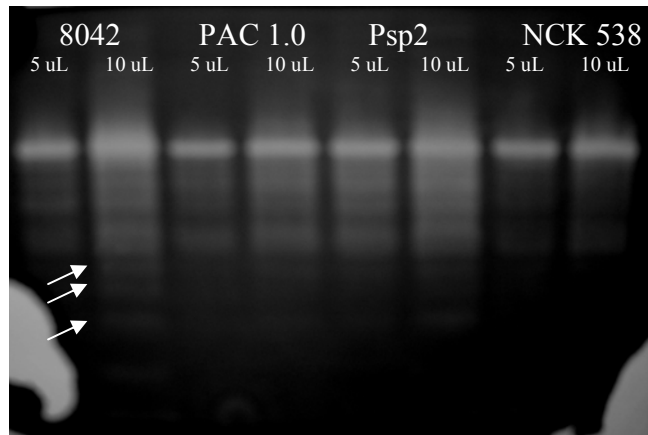


Figura 51. Perfil de actividad PGH de cepas productoras de pediocinas y 8042 sobre *M. lysodeikticus*.

SDS-PAGE 7.5% de poliacrilamida

Al comparar la actividad PGH de los extractos celulares de cepas de *Pediococcus* sobre *S. aureus* ATCC 13565 productora de enterotoxina A. La 8042 (no productora de pediocinas) demostró mayor actividad lítica que la cepa PAC1.0 (productora de pediocinas). La señal producida con 2 ug de proteína de la primera, fue similar a la producida con 10 ug de proteína de la segunda (Figura 51).

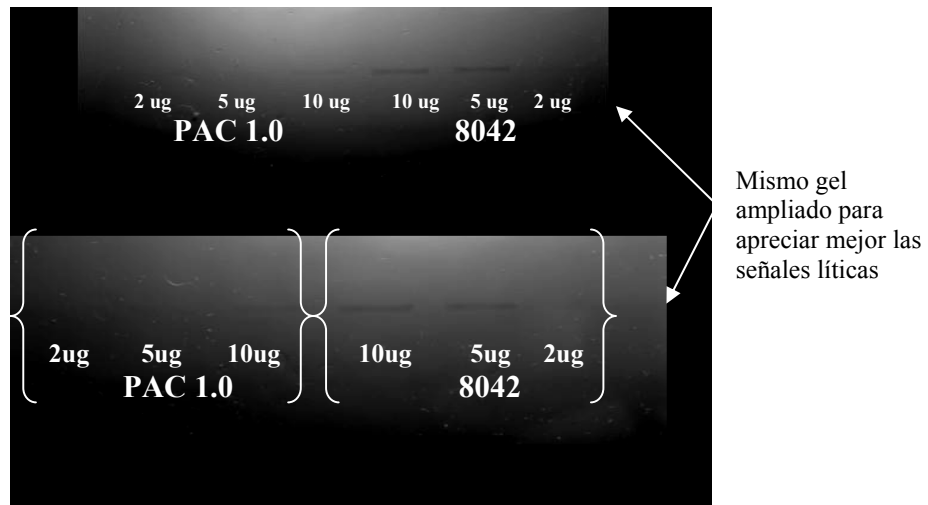


Figura 52. Zimograma de actividad lítica de las cepas PAC1.0 y 8042 sobre *S. aureus* ATCC 13565 enterotoxigénica

Los resultados de las actividades enzimáticas identificadas en los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042, en donde se presentan sus pesos moleculares y el sustrato en que se demostró la actividad, así como cual fue determinada por técnicas zimográficas o espectrofotométricas (Tabla 33).

Tabla 33. Cuadro resumen de los resultados de actividad proteolítica y lítica de los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Zimografía				
	Sustrato	PM (kDa)	SDS-PAGE	SDS-PAGE reductoras TT
Actividad proteolítica	Azocaseína	> 200	++	+
	Caseína	> 200	+++	++
	Gelatina	> 200	+++	++
		110	++	-
		80	+	-
		50	+	-
	Elastina soluble		+++	+
Actividad lítica	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	116	-	++
Actividad en dispersiones de sustratos proteínicos				
Actividad proteolítica	Hide Powder Azure		-	
	Azocaseína		-	
	Elastin congo red		0.1 ΔA (2h a 37 °C; 800 rpm)	
Actividad en dispersiones de células				
Actividad lítica	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>		-0.09 ΔA (2h a 37 °C; 500 rpm)	

Las herramientas metabólicas que presenta la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 le permiten ejercer un efecto antimicrobiano, el cual se demostró por microscopía electrónica de barrido, por técnicas microbiológicas cualitativas y cuantitativas y al manifestar actividad tanto de proteinasa en diferentes sustratos proteínicos (gelatina, caseína, elastina), como peptidoglicano hidrolasa, al observar las bandas líticas en ambos microorganismos (*M. lysodeikticus* y *S. aureus*). Esta actividad lítica de la cepa es uno de los objetivos por los cuales se utilizan las BAL como cultivos iniciadores, en la elaboración de productos alimentarios fermentados-madurados, para generar las características sensoriales y sanitarias que se mostraron al inicio de este trabajo y que fueron el fundamento para identificar a las sustancias responsables.

CONCLUSIONES

La cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, que había mostrado un efecto de bioconservación al emplearse en embutidos cárnicos, muestra una actividad lítica diferente a la producida por bacteriocinas reportadas, que ofrece una nueva alternativa a las herramientas metabólicas tradicionalmente utilizadas.

La identificación precisa de la cepa 8042 y su caracterización por técnicas bioquímicas y moleculares permiten afirmar:

- a) Carece de plásmidos similares a los reportados como responsables de la actividad de pediocina en otras cepas del género. Presenta un plásmido de 1,018 pb.
- b) No presentó un producto génico correspondiente a la secuencia reportada para el gen de la pediocina tras evaluarse diversas condiciones de amplificación de PCR, lo que concuerda con reportes de otros autores.

Se demostró la presencia de actividad antibacteriana en los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* en medio MRS suplementado con ácido ascórbico y Mn^{2+} cuando las células se cosecharon en fase logarítmica tardía.

- a) El efecto antibacteriano se demostró sobre: BAL relacionadas (*Lb. plantarum*), bacterias Gram positivas (*Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Tiphymurium), así como sobre los microorganismos de interés sanitario *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 y 6538P, *Listeria* sp., lo que indica que se trata de una sustancia antibacteriana de amplio espectro.

- b) El daño celular producido en los microorganismos de prueba observados mediante MEB fue un efecto lítico diferente al causado por la bacteriocina Nisina.
- c) El efecto antibacteriano incluyó la reducción de la población bacteriana, cambios morfológicos, coloniales y por tinción de Gram, que sugieren un daño a nivel de pared celular.

Sobre la naturaleza de la sustancia antibacteriana se puede afirmar que:

- a) Ni los niveles del ácido láctico producido ni el lactato de sodio generado de la neutralización resultaron inhibitorios para los microorganismos de prueba.
- b) La adición de glicerol al medio de cultivo para estimular la producción de reuterina no incidió en un incremento en actividad inhibitoria, por lo que se descarta su producción y su responsabilidad en el fenómeno antibacteriano.

Sobre la actividad proteolítica encontrada en los sobrenadantes:

Mediante técnicas espectrofotométricas.

- a) Cuando la actividad enzimática se evaluó en dispersiones de Elastina rojo Congo, fue estimulada por Zn^{2+} y NaCl 0.2M y reducida en presencia de PMSF 10mM, EDTA 5mM y O-Phe 10mM, datos que sugieren la presencia de una metaloproteasa dependiente de Zn y probablemente de una serín proteasa.
- b) La actividad elastolítica se redujo alrededor del 50% al utilizar 10mM de 1,10 fenantrolina (O-Phe), inhibidor de metaloproteinasas que tiene una mayor afinidad por el Zn^{2+} que por el Ca^{2+} , lo que indica que la actividad elastolítica corresponde a una metaloproteasa dependiente de zinc.

Mediante técnicas zimográficas.

- a) Se demostró la presencia de una actividad proteolítica sobre caseína y gelatina, que además fue capaz de reconocer e hidrolizar a la elastina, actividad asociada a actividad antibacteriana en otros géneros.
- b) La actividad gelatinolítica observada es ejercida por dos enzimas diferentes: una de alto peso molecular (mayor de 200 kDa) que igualmente actúa sobre caseína, azocaseína y elastina, y no se inactiva con tratamiento térmico (90 °C, 10min). La banda de actividad de 107 kDa, es termosensible y no es capaz de hidrolizar a la caseína (o su derivado cromóforo azocaseína), bajo las condiciones de ensayo.
- c) Ninguna de las dos bandas con actividad gelatinolítica fue inhibida por inhibidores de serín, cisteín o metaloproteasas.
- d) La masa molecular relativa encontrada en elastina embebida en geles fue diferente de la encontrada en zimogramas de gelatina y caseína, lo que probablemente indica que las diferentes proteinasas encontradas son responsables de los dos fenómenos: degradación de gelatina y caseína y actividad sobre elastina.
- e) Para lograr mayor definición en la zona de hidrólisis correspondiente a la proteasa de 107 kDa las mejores concentraciones de iones fueron 5mM Ca^{2+} y 0.2mM de NaCl. Al disminuir 10 veces la concentración de Ca^{2+} en el buffer de renaturalización, se observó una disminución de la actividad proteolítica y se pudo identificar otra banda de actividad de aproximadamente 50 kDa (0.5mM Ca^{2+}) que no apareció al adicionar 10mM de EDTA.

Se encontró actividad peptidoglicano hidrolasa extracelular bajo condiciones reductoras (β -MET) en cuyo caso el tratamiento térmico fue indispensable.

- a) Se observó una banda de actividad lítica de 110 kDa en zimogramas con *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato, después de 6 h de incubación en el buffer de renaturalización. Zimogramas con células de *S. aureus* ATCC 6538P requirieron 18 h de incubación en el buffer de renaturalización para identificar la actividad lítica de 110 kDa. La lisis producida por los sobrenadantes se redujo al usar EDTA 1 mM en el buffer de renaturalización y se inhibió completamente con EDTA 10mM.
- b) La actividad PGH fue detectada en sobrenadantes de cultivo de la cepa 8042 con una concentración de proteína de 2.7 mg al causar una disminución en la absorbancia de suspensiones de células de *Micrococcus lysodeikticus*. El tiempo de reacción fue diez veces mayor que el requerido para lograr el efecto visto con una cantidad similar de lisozima.

Se puede afirmar que en el sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, no pediocinogénica y con capacidad limitada de producir ac. Láctico está presente un grupo de enzimas con capacidad lítica, de amplio espectro lo que explica el efecto bioconservador de esta cepa. Posee al menos tres diferentes enzimas extracelulares con potencial antimicrobiano dos con actividades proteolíticas y una actividad peptidoglicano hidrolasa. Se pudo apreciar la lisis de los microorganismos embebidos en geles de acrilamida con las técnicas para demostrar actividad PGH, sin embargo la cercanía en pesos moleculares de una proteasa termosensible y una PGH termoestable (107 vs 110 kDa) presentes en el sobrenadante obliga a la purificación y caracterización posteriores de las actividades encontradas, para determinar con certeza el papel de cada una.

LITERATURA CITADA

1. Ahmed, K., Chohnan, S, Ohashi, H. Hirata, T., Masaki, T. and Sakiyama, F. 2002. Purification, bacteriolytic activity, and specificity P-Lytic protease from *Lysobacter* sp. IB-9374. *J. Biosc. Bioeng.* **95**(1):27734.
2. Alm, E.W., Oerther, D.B., Larsen, Sthal, D.A. and Raskin, L. 1996. The oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3557-3559.
3. Anderson, D. G. and McKay, L. L. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Applied Environ. Microbiol.* **46**(3):549-552.
4. AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17^a ed. Virginia, USA.
5. APILAB Plus V3.2.2 Version B 01.93-D.09. Instruction Manual. I-Presentation, VI-Bacterial Identification.
6. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K (Eds). 1999. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. 4th ed. Greene Pub. Assoc. John Wiley & Sons., New York. USA.
7. Baker. E. F and R.J. Cook, 1974. Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman & Co. Sanfrancisco, pp 433.
8. Barret, A. and McDonald, J.K. 1985. *Biochem. J.Lett.* **237**:935
9. Barret, A. 2000. *Curr. Protocols Prot. Sci. Supl.* **21.1.1-21.1.12**
10. Bello, H. H. y Durán, B. I. 1992. Aplicación de *Pediococcus acidilactici* en la elaboración de un embutido tipo salami. Tesis. Ingeniería en Alimentos. FESC-UNAM, México, pp 66-70.
11. Benito, M.J. Martin, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F. Ruiz-Moyano, S. and Córdoba, M.G. 2007. Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichon and chorizo sausages. *J. Food Sci.* **72**(6):M193-201.
12. Bennik, M.H.J. Smid, E.J. and Gorris, L.G.M. 1997. Vegetable associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(5):2074-2076.

13. Bergmann, M. & Ross, W. F. 1936. *J. Biol. Chem.* **114**:717-726
14. Beukes, M., Bierbaum, H.-G. Sahl, and Hastings, J.W. 2000. Purification and partial characterization of murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061. *Appl Environ Microbiol.* **66**(1):23-28.
15. Bhunia, A.K. Johnson, M.C. and Ray, B. 1987. Direct detection an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate polyacrilamye gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.* **2**:319.
16. Bhunia, A.K. Johnson, M.C. and Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**:261-268.
17. Bhunia, A.K. Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. App. Bacteriol.* **70**:25-33.
18. Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., y Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1265-1267.
19. Bochtler, M., Odintsov, Sergey G. Marcyjaniak M. and Sabala I. 2004. Similar active sites in lysostaphins and D-Ala-D-Ala metallopeptidases *Protein Science* **13**:854-861.
20. Bonade A. Murelli, Á. F. Vescovo, M. and Scolari, G. 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Letters Appl. Microbiol.* **33**:153-158.
21. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microGrams quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
22. Buist, G., Karsens, H., Nauta, A., van Sinderen, D., Venema, G. and Kok, J. 1997. Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by overproduction of its major autolysin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2722-2728.
23. Buist, G., Venema, G., and Kok J. 1998. Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. *J. Bacteriol.* **180**:5947-5953.
24. Callewaert, R., Holo, H., Devreese, B. Van Beeumen, J. Nes, I. and De Vuyst, L. 1999. Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method. *Microbiol.* **145**:2559-2568.

25. Caplice, E., Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. . *Int. J. Food Microbiol.* **50**:131-149.
26. Carolissen-Mackay V, Arendse G, Hastings J W. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int J Food Microbiol.* **34**:1–16.
27. Charney, J. and Tomarelli, R. M. (1947) A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* **171**:501-505.
28. Cibik, R., and M.-P. Chapot-Chartier. 2000. Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing SDS-PAGE. *J. Appl. Microbiol.* **89**:862–869.
29. Collins, M.D., Williams, A.M., and Wallbanks, S. 1990. Phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:225-262.
30. Cook, R.J., Baker K.F. 1983. The nature of biological control of plant pathogens. MN (USA) APS Press pp 60.
31. Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* **3**:777.
32. Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as preservatives. *Food Technol.* **42**(1):164.
33. Davidson, P.M. and Parish, M.E. 1989. Methods for testing the efficacy of foods antimicrobials; *Food Technol.* **42**(1):148-155.
34. DeMan, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**:130-135.
35. De Vos, W.M. and Siezen, R.J. 1994. Engineering pivotal proteins for lactococcal proteolysis. In: Andrews AT & Varley J (Eds) *Biochemistry of Milk Products*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, England. pp 56-71.
36. De Vuyst, L. Callewart, R and Pot B. 1996. Characterization of the antagonistic activity of *Lactobacillus amilovorum* DCE 471 and large scale isolation of its bacteriocin amylovorin L 471. *System. Appl. Microbiol.* **19**:9-20.
37. Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Sorokine, A. Van Dorsselaer, F. Bringel, J-C. Hubert and C. Hasselmann 1996. Production of Pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4381-4387.

38. Exterkate, F.A. Alting, A.C. and P.G. Bruinenberg. 1993. Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3640-3647.
39. Federal Register. 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status a direct human food ingredient. *Fed. Register.* **54**:11247-11251.
40. Firczuk, M., Mucha, A. and Bochtler, M. 2005. Crystal structures of active LytM. *J Mol Biol.* **354**:578-590.
41. Foegeding, P.M. Thomas, A.B., Pilkington, D.H. y Klaenhammer, T.R. 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by *in situ*-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 884.
42. García-Carreño, F.L.; Dimes, L.E. and Haard, N.F. (1993) Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* **214**:65-69.
43. Ghuysen, J. M. and J. L. Strominger. 1963. Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. I. Preparation of fragments by enzymatic hydrolysis. *Biochem.* **338**:1110-1119.
44. Green, G., Dicks, L.M.T., Bruggeman, G. Vandamme, E.J. and Chikindas, M.L. 1997. Pediocin PD-1 a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832; *J. App. Microbiol.* **83**:127-132.
45. Grossmann, W. & Dyckerhoff, H. 1928. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **179**: 41-78
46. Heng, N.C.K and Tagg, J.R. 2006. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology.* **4**:1-2.
47. Heng, N.C., Ragland, N.L., Swe, P.M., Baird, H.J., Inglis, M.A., Tagg, J.R. and Jack, R.W. 2006. Dysgalacticin: A novel, plasmid-encoded antimicrobial protein (bacteriocin) produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Equisimilis*. *Microbiol.* **152**(7):1991-2001.
48. Heussen, C. and Dowdle, B.E. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* **102**:196-202.
49. Hoover, D.G., Dishart, K.J. y Hermes, M.A. 1989. Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.* **3**: 183.

50. Hoover, D.G. 1993. Chap. 12. Bacteriocins with potential for use in foods, en Davidson, P.M. and Larry, B.A. (Eds.) Antimicrobials in foods. 1st ed. Marcel Dekker Inc.N.Y.
51. <http://embi/Swiss-Prot> Pfam PF01721 ProDom PDO04452.
52. Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.* **49**(Suppl.1):S139-S150.
53. Jack., R. W. and Jung, G. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**:310-317.
54. Jado, I., López, R., García, E., Fenoll, A., Casal, J., García, P. 2003. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:967-73.
55. Joerger, M.C. and Klaenhammer, T. R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol.* **167**(2):439-446.
56. Kanatani, K., Yoshida, K., Tahara, T, Miura, H, Sakamoto, M and Oshimura, M 1991. Isolation and characterization of plasmid DNA in *Lactobacillus acidophilus*. *Agric. Biol.C hem.* **55**:2051-2056.
57. Kessler, E., Safrin, M., Olson, J. C. and Ohman, D. E. 1993. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J. Biol. Chem.* **268**:7503-7508.
58. Kessler, E. Safrin, M., Abrams, W.R., Rosenbloom, J. and Ohman D.E. 1997. Inhibitors and Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J. Biol. Chem.* **272**(15):9884–9889.
59. Kessler, E., Safrin, M., Gustin, J.K. and Ohman, D.E. 1998. Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. *J. Biol. Chem.* **273**(46):30225–30231.
60. Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:39-86.
61. Kok, J. 1990. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **87**:15-42.
62. Kunji, E.R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. and Konings, W.N. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**:187-221.

63. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London). **227**:680-685.
64. Lantz, M.S. and Ciborowski, P. 1994. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. Bacterial pathogenesis Part A. Identification and regulation of virulence factors. In: *Methods in Enzymol* (Clark, V.L. and Bavoil, P.M. Eds.). Acad. Press Inc. NY. **235**:563-594.
65. Law, B.A. and Kolstad, J. 1983. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**:225-245.
66. Leclerc, D and Asselin, A. 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrilamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* **35**:749-753.
67. Le Loir, Y., Baron, F. and Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Gent. Mol. Res.* **2**(1):63-76.
68. Lewus, C.B., Kaiser, A., y Montville, T.J. 1991. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1683.
69. Llorente, B. A. 1998. Evaluación de la Producción de Bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici* bajo diferentes condiciones de cultivo, Tesis de Maestría en Microbiología, FESC-UNAM.
70. Llorente, B.A. y Farrés, G.S.A. 2003. Caracterización de la actividad antimicrobiana de *P. acidilactici* ATCC 8042. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Méx.
71. Llorente, B.A. Pérez M.S. y Farrés, G.S.A. 2005. Caracterización de actividad proteolítica de *P. acidilactici* ATCC 8042. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida Yuc. Méx.
72. Llorente, B.A. Pérez M.S. y Farrés, G.S.A. 2007. Caracterización de proteasas extracelulares de *P. acidilactici* ATCC 8042. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich., Méx.
73. Lortal, S., Valence, F., Bizet, C. and Maubois, J.L. 1997. Electrophoretic pattern of PGHs a new tool for bacterial species identification application to 10 *Lactobacillus* species. *Res. Microbiol.* **148**:461-474.

74. Magnusson, J. and Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *App. Environ. Microbiol.* **67**:1-5.
75. Magnusson, J., K. 2003. Antifungal activity of lactic acid bacteria. Doctor's dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
76. Magnusson, J., K. Ström, S. Roos, J. Sjögren, and J. Schnürer. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**:129-135.
77. Makarova, K. Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N. Karamychev, V. Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hakins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J. -H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G. Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y. Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Braodbent, J., Hutkins, R., O,Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, B., Weimer, B. and Mills, D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS.* **103**(42):15611-15616.
78. Martínez, M.I., Rodríguez, E., Medina, M., Hernández, P.E. and Rodríguez, J.M. 1998. Detection of specific bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization. *J. Appl. Microbiol.* **84**:1099-1103.
79. Martínez-Moya. T.F., Newbold, C. J., Wallace, R.J. and Moyano, F.J. 2002. Effects of high-molecular-mass substrates on protein migration during sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* **23**:1-7.
80. Marugg, J.D., González, C.F., Kunka, B.S., Ledebøer, A.M., Pucci, M.J., Toonen, M.Y. Walker, S.A., Zoetmulder, L.C. y Vanderbergh, P.A. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(8):2360-2367.
81. Mini-PROTEAN^R 3 Cell Instruction Manual. *Bio-Rad Laboratories.* Cat. Num. 165-3301, 165-3302.

82. Montville, T.J. and Winkowski, K., Chap. 30. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds.) *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*; 1st ed. Am. Soc. Microbiol. Washington. USA.1997.
83. Montville, T. J. and Chen Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**(5):511-519.
84. Mora, D., Fortina, M. G. Parini, C. and Manachini, P. L. 1997. Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* based on 16S rRNA and *ldhD* gen-targeted multiplex PCR analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**:231-236.
85. Mora, D., Fortina, M. G. Parini, C., Daffonchio, D. and Manachini P. L. 2000. Genomic subpopulations within species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin AcH/PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiol.* **146**:2027-2038.
86. Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M.G. Senini, L. and Manacchini P.L. 2003. Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *J Appl. Microbiol.* **94**:561-570.
87. Mörsky, P. 1983. Turbidimetric determination of lysozyme with *Micrococcus lysodeikticus* cells: Reexamination of reaction conditions. *Anal. Biochem.* **128**:77-85.
88. Motlagh, A.M., Johnson, M.C. y Ray, B. 1991. Viability loss of food borne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food Prot.* **54**(11):873-884.
89. Motlagh, A. Bukhtiyarova, M. and Ray, B. 1994. Complete nucleotide sequence of pSMB74, a plasmid encoding the production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. *Lett. Appl. Microb.* **18**:305-312.
90. Nandakumar, M.P., Shen, J., Raman B. and Marten, M. R. 2003. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for Two-Dimensional Electrophoresis. *J. Proteome Res.* **2**:89-93.
91. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1991. Antimicrobial susceptibility testing. 3rd Ed. Wayne PA, USA.
92. Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **70**:113-128.

93. Nes, I. F. and Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*. **55**(1):50-61.
94. Nilsen, T., Nes, I.F. and Holo, H. 2003. Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(5):2975–2984.
95. Olson, J.C. and Ohman, D.E. 1992. Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. *J. Bacteriol.* **174**(12):4140-4147.
96. Park, P.W., Senior, R.M., Griffin, G.L., Broekelmann, T.J., Mudd, M.S. and Mecham, R.P. 1995. Binding and degradation of elastin by the staphylolytic enzyme lysostaphin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**(2):139-146.
97. Peters, J.E., Park, S.J., Darzins, A., Freck, L.C., Saulnier, J.M., Wallach, J.M. and Galloway, D.R. 1992. Further studies on *Pseudomonas aeruginosa* LasA: analysis of specificity. *Mol. Microbiol.* **6**(9):1155-62.
98. Poolman B, Kunji E.R.S., Hagting, A., Juillard, V. & Konings, W.N. 1995. The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **79**:65-75.
99. Pritchard, G.G. and Coolbear, T. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology. Rev.* **12**:179-206.
100. Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S. y Vandenberg, P.A. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 Produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2349.
101. Recsei, P.A., Gruss, A.D. and Novick, R.P. 1987. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gen from *Staphylococcus simulans*. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA. Biochemistry* **84**:1127-1131.
102. Rinderknecht, H., M.C. Geokas, P. Silverman and B.J. Haverback. 1968. A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chim. Acta.* **21**:197-203.
103. Rivera, J. y Llorente A. 2001. Resultados preliminares de la inhibición de *Staphylococcus aureus* al aplicar *Pediococcus acidilactici* como cultivo iniciador en salami. IX Congreso Nacional de Biotecnología, 20-24 Septiembre, Veracruz, Ver.

104. Rivera, J. 2004. Evaluación del efecto de bioconservación en salami al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo iniciador. Tesis de Maestría en Microbiología, FESC-UNAM.
105. Rodríguez, J.M. Martínez, M.I., Suárez, A.M., Martínez, J.M. and Hernández, P.E. 1997. Research note: Unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**:73-75.
106. Rogers, H. J., H. R. Perkins, and J. B. Ward. 1980. The bacterial autolysins, *In* H. J. Rogers, H. R. Perkins, and J. B. Ward (eds.), *Microbial cell walls and membranes*. Chapman and Hall, London. pp. 437-460.
107. Roselló-Mora, R. and Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. Review. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:39-67.
108. Sambrook, J. Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Vol II. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U. S. A.
109. Savijoki, K., Ingmer, Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **71**:394-406.
110. Schindler, C.A. and Schuhardt, V. T. 1964. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *staphylococcus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA Microbiology.* **51**:414-421.
111. Schindler, C.A. and Schuhardt, V.T. 1965. [Purification and properties of lysostaphin-a lytic agent for *S. aureus*](#). *Biochim Biophys Acta.* **97**:242-250.
112. Shockman, G. D. and J. V. Holtje. 1994. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. *In* J. M. Ghuyssen and R. Hakenbeck (eds.), *Bacterial cell wall*. Elsevier Science B.V., Amsterdam. The Netherlands. pp. 131-166.
113. Simitsopoulou, M., Vafopoulou, A., Choli-Papadopoulou, T and Alichandis, E. 1997. Purification and partial characterization of a tripeptidase from *P. pentosaceus* K9.2. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(12):4872-4876.
114. Simmonds et al., 1996. Mode of action of a lysostaphin-like bacteriolytic agent produced by *Streptococcus zooepidemicus* 4881. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4536-4541.
115. Steen, A. 2005. Functional characterisation and cell wall interactions of peptidoglycan hydrolases of *Lactococcus lactis*. Dissertation, Univ. Groningen. The Netherlands.

116. Ström, K. Sjögren, J. Broberg, A. and Schnürer, J. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(9):4322-4327.
117. Sugai, M., Komatsuzawa, H., Tomita, S., Akiyama, T., Miyake, Y., Suginaka, H. 1991. Detection of a staphylococcal endo- β -N-acetylglucosaminidase using polyacrylamide gels. *J. Microbiol. Meth.* **13**:11-16.
118. Sugai, M., Fujiwara, T., Akiyama, T., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Inoue, S. and Suginaka, H. 1997. Purification and molecular characterization of glycylglycine endopeptidase produced by *Staphylococcus capitis* EPK1. *J Bacteriol.* **179** (4):1193–1202.
119. Sugai, M. 1997. Peptidoglycan Hydrolases of the *Staphylococci*. *J Infect Chemother.* **3**:113-127
120. The Complete Guide for Protease Inhibition. 1999. Roche Molecular Biochemicals. *Biochemica* (1). <http://biochem.roche.com>
121. Thomas, T.D. and Mills, O.E. 1981. Proteolytic systems of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* **35**:255-273.
122. Thomas, T.D. and Pritchard, G.G. 1987. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**:245-268.
123. Trayer H. R. and Buckley, C. E. 1970. Molecular Properties of Lysostaphin, a Bacteriolytic Agent Specific for *Staphylococcus aureus*. *J Biol. Chem.* **245**(18): 4842-4846.
124. Turner, M.S., Waldherr, F., Loessner, M.J. and Giffard, P.M. 2007. Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria *Systematic and Applied Microbiol.* **30**:58–67.
125. United States Pharmacopeia USP 25th. 2002.
126. Vessillier, S., Delolme, F., Bernillon, J. Saulnier, J. and Wallach. J. 2001. Hydrolysis of glycine-containing elastin pentapeptides by LasA, a metalloelastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Eur. J. Biochem.* **268**:104-1057.
127. Visser, S., Exterkate, F.A., Slagen, C.J., and De Veer G.J.C.M. 1986. Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{S1} -, β - y κ -caseína. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:1162-1166.

128. Visser, S., Slagen, C.J., Robben, A.J.P.M., Van Dongen, W.D., Heerma, W. and Haverkamp, J. 1994. Action of a cell-envelope proteinase (CEP_{III}-type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM1 on bovine κ -casein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**:644-651.
129. Vocadlo, D., Howard, J., Hang, C., Kim, E-J., Hanover, J.A. and Bertozzi, R.C. 2003. A chemical approach for identifying O-GlcNAc modified proteins in cells. *PNAS.* **100**(16):9116-9121.
130. Wu, F.S. and Wong, M.Y. 1984. Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis from protease-rich plant tissues. *Anal. Biochem.* **139**:100-104.
131. Zavizion, *et al.*, 1995. Effects of *Staphylococcus aureus* toxins on the growth of bovine mammary epithelial cells (MAC-T) in culture. *J. Dairy Sci.* **78**(2):277-284.

ANEXOS

Anexo 1. Analytical Profile Index (APILAB PLUS) en la identificación de cepas según perfil de fermentación de carbohidratos con el sistema API CH50 (Biomériux)

El Sistema API es una herramienta muy importante que facilita la identificación de microorganismos, ya que permite de una sola vez utilizar diferentes pruebas bioquímicas, lo que ha reducido en gran medida el trabajo en el laboratorio.

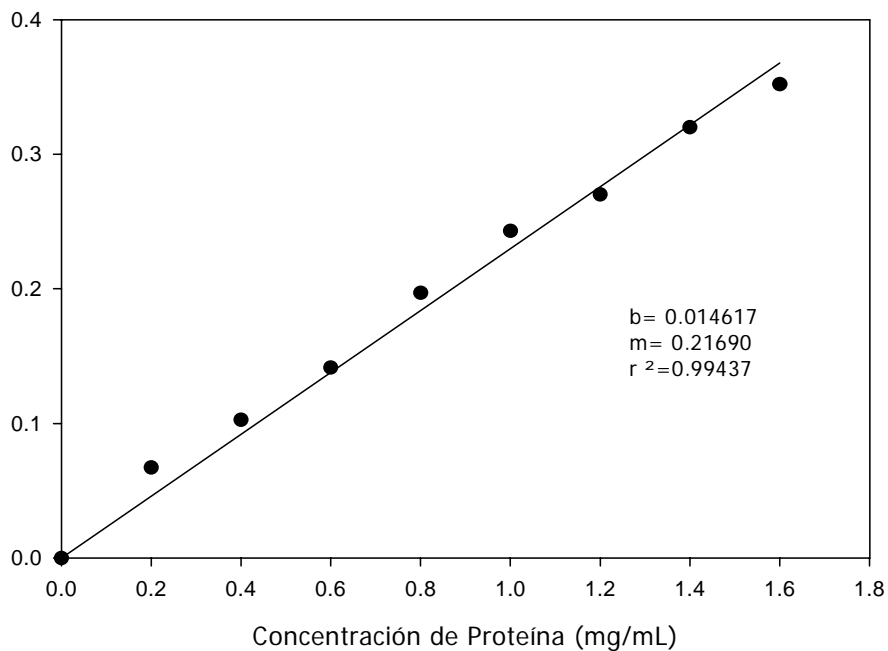
Una vez que se tienen los resultados de la galería se utiliza el software Analytical Profile Index, programa que permite la identificación bacteriana de especies y niveles de biotipos entre especies, al interpretar los perfiles bioquímicos obtenidos con las galerías de identificación API 50 (50 pruebas). Los cálculos para el *perfil numérico* son realizados con el *Teorema de Bayes* y considera el porcentaje de reacciones positivas de una combinación de pruebas para cada taxón e indica la probabilidad de que cada prueba sea positiva para cada taxón, y las frecuencias de ocurrencia de las reacciones observadas. El cálculo del porcentaje de identificación (% id) un estimado de que tan cercano es el perfil de los taxones con respecto de otros taxones en la base de datos y del índice T, que da un estimado de la cercanía al perfil de reacciones más típico para cada taxón. Compara los perfiles observados para taxón en la base de datos del software APILAB Plus, los clasifica de acuerdo con los valores de estos parámetros y da una propuesta de identificación. La *base de datos* de cada identificación están hechas de varios taxones p. ej. Los grupos de bacterias pueden ser distinguidos de otros grupos por las pruebas bioquímicas de las galerías. Un taxón puede ser una especie, un biotipo dentro de una especie, un taxón múltiple.

Anexo 3. Determinación de proteína soluble por el método de Bradford (Volumen Reducido)

Tabla 34. Curva patrón patrón para la determinación de proteínas por el método de Bradford (Volumen reducido)

No. de Tubo	Azul de Coomassie (μL)	Agua Destilada (μL)	Solución A (μL) BSA	Concentración (μg/mL)
0	200	800	0	0.000
1	200	650	150	1.875
2	200	600	200	2.500
3	200	500	300	3.750
4	200	400	400	5.000
5	200	300	500	6.250
6	200	200	600	7.500
7	200	100	700	8.750
8	200	0.0	800	10.000

Mezclar al adicionar los reactivos en las celdas de volumen reducido ($V_f = 1\text{mL}$). Esperar 5 minutos y tomar la lectura de absorbancia a $\lambda 595\text{ nm}$.



Anexo 4. Determinación de actividad proteolítica en dispersión

En el barrido espectral (de 200 a 300 nm) de la tirosina se observan las dos bandas características de los aminoácidos aromáticos. De menor a mayor energía se observa la primera banda con un máximo de absorción a 275 nm, debido posiblemente a los estados de transición ($\pi \rightarrow \pi^*$) característicos de las dobles ligaduras del anillo aromático, y un hombro a 280 nm. Por lo que para realizar la curva patrón de tirosina se decidió registrar la absorbancia a 275 nm para cada concentración (en un volumen final de 6.5 mL). El coeficiente de extinción molar obtenido fue de $1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ comparable al reportado en la literatura ($\epsilon = 1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

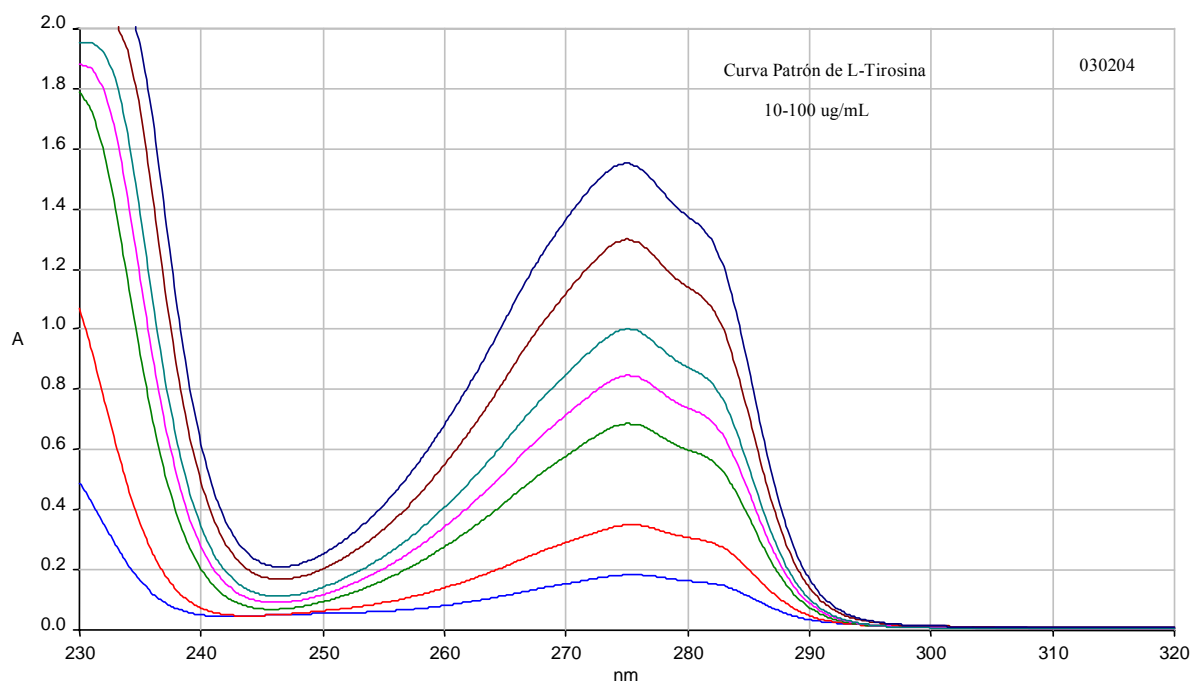


Tabla 35. Curva patrón de tirosina

Tubo	Sol Stock Tirosina (20 µg mL ⁻¹)	HCl 0.1N (mL)	Concentración (µM)	Absorbancia 275 nm	
				Experimental	Teórica⁹
1	1	5.5	16.98	0.01	0.024
2	2	4.5	33.96	0.03	0.044
3	3	3.5	50.94	0.06	0.065
4	4	2.5	67.92	0.09	0.08
6	5	1.5	84.91	0.11	0.114

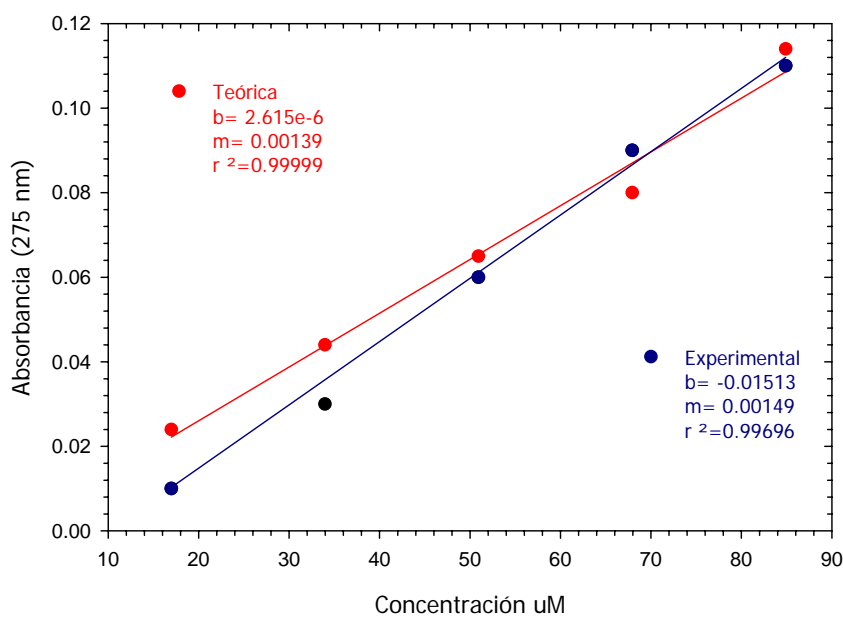
Se construyó la curva patrón de tripsina (Tabla 36) mediante las mediciones de Absorbancia con un espectrofotómetro (Spectronic 21D)

Tabla 36. Curva patrón de tripsina

Sol. Stock Tripsina (1 x 10 ⁻³ g mL ⁻¹) (mL)	HCl 0.1M (mL)	Tripsina (µg)	Concentración (µg mL ⁻¹)	Absorbancia 275 nm		Δ Abs
				Control	Reacción	
0.25	9.75	1.25	0.19			
0.50	9.50	2.50	0.38	0.148	0.252	0.104
1.00	9.00	5.00	0.77	0.148	0.371	0.223
2.00	8.00	10.00	1.53	0.150	0.547	0.397
4.00	6.00	20.00	3.07	0.148	0.748	0.600
6.00	4.00	30.00	4.61	0.153	0.882	0.729
10.00	0.00	50.00	7.70	0.172	1.075	0.903

Spectronic 21D. Blanco (100 % T) = 3 mL de agua + 3 mL de TCA_m + 0.5 mL de HCL 0.1M.

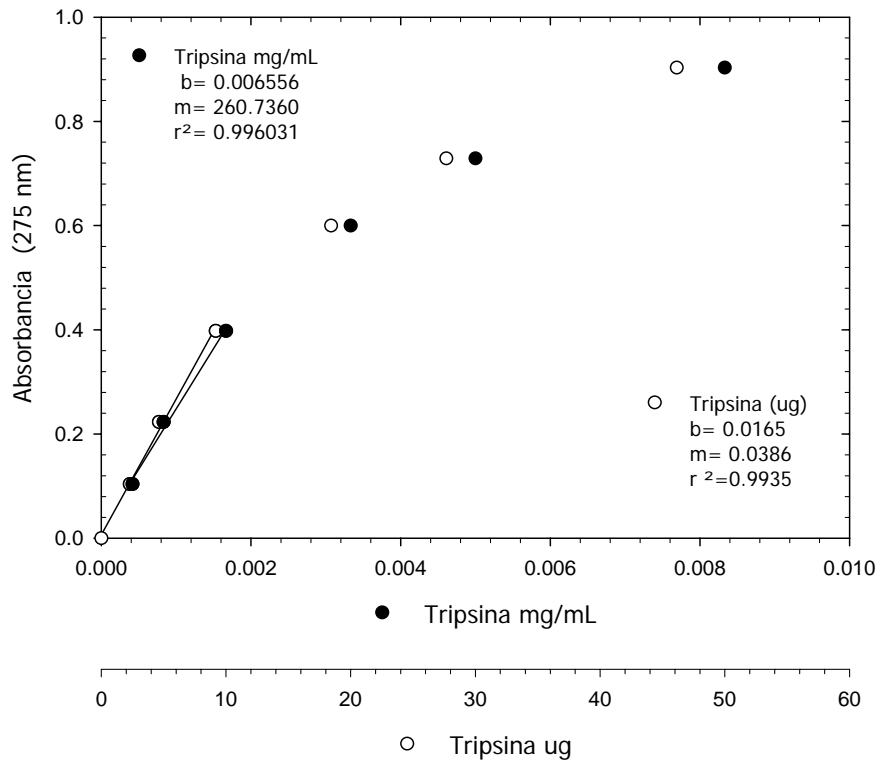
⁹ Reportado por R., Murthy *et al.*, 1997, ε= 1390 M⁻¹ cm⁻¹



$$\Delta A_{275} \text{ cm } \epsilon_{\text{exp}}^{-1} = \text{Tirosina equivalente (M)} \times 20 \text{ min}^{-1}$$

A partir de la máxima pendiente de la curva de hidrólisis de caseína, se calculó la actividad específica de la tripsina sobre una solución de caseína (0.85 % w/v, pH 7.13, 37°C), y equivale a $0.0386 \Delta A_{275} / \mu\text{g Tripsina}$.

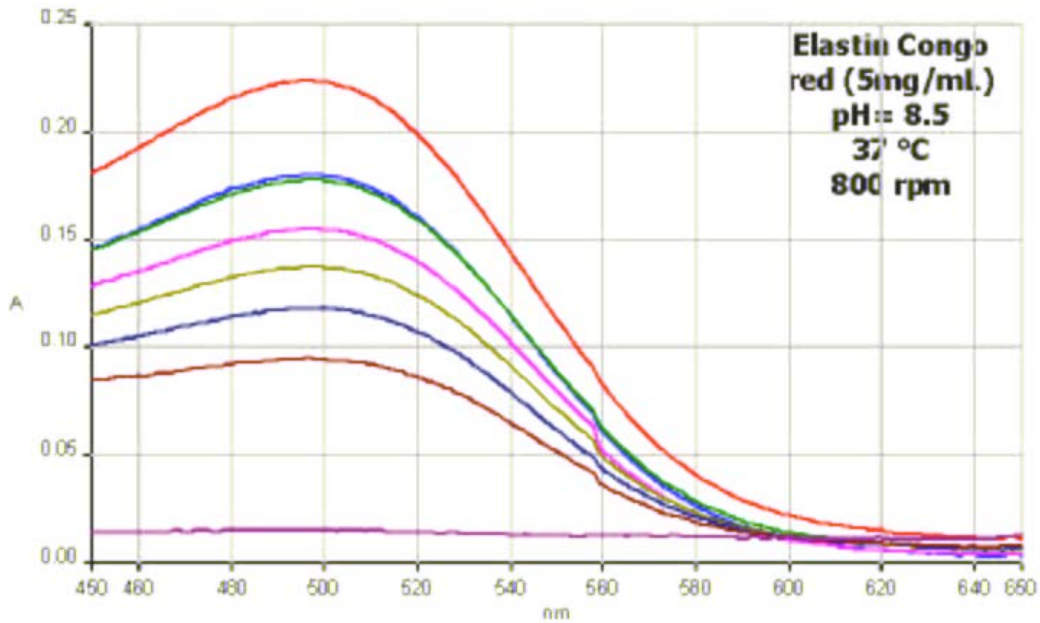
Al dividirlo entre el coeficiente de extinción molar obtenido de la curva patrón de tirosina se puede expresar la actividad en términos de equivalentes de tirosina.



Si se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que produce un micromol de tirosina por minuto, se obtiene lo siguiente:

$$1 \text{ UA} = 118.7 \mu\text{g Tripsina} = 1 \mu\text{mol de tirosina equivalente/min}$$

Anexo 5. Curva de hidrólisis enzimática de elastina¹⁰



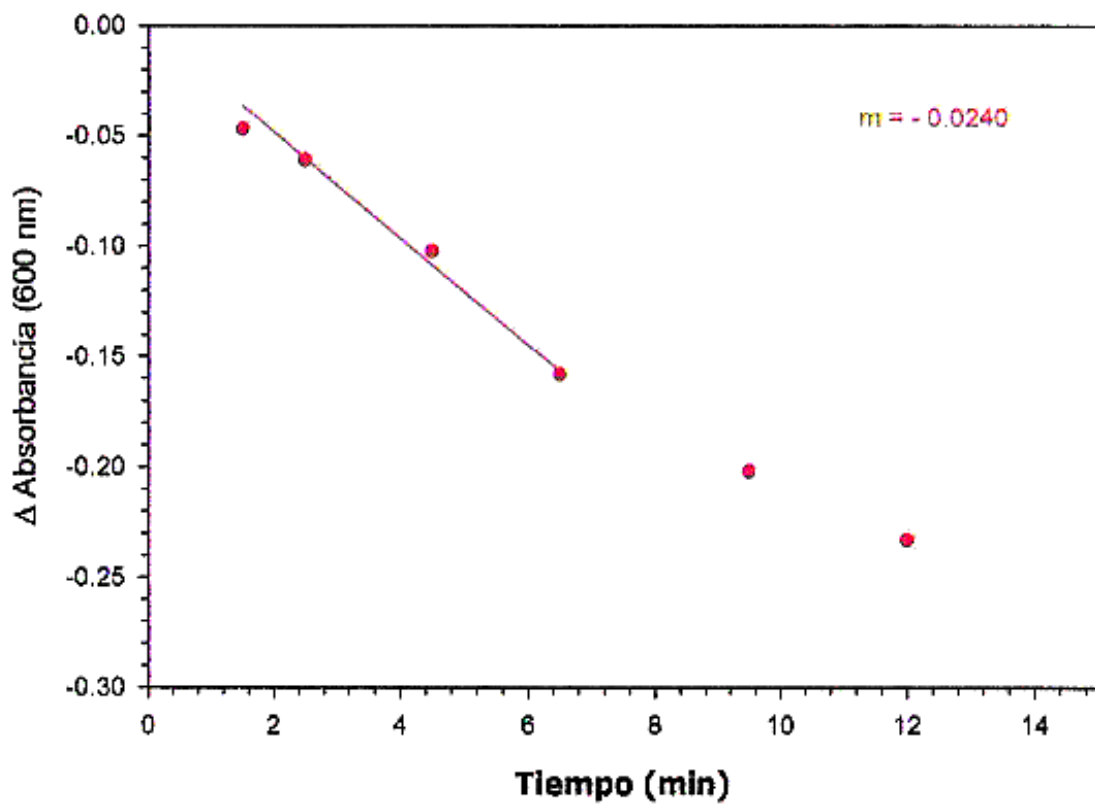
Una unidad de actividad elastasa se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de absorbancia ($\lambda=495\text{nm}$) de 1 unidad/hora.

$$1\text{U}=\mu\text{g proteína}=1.0 \Delta\text{A/h}$$

¹⁰ Kessler, E., Safrín, M., Olson, J.C., and Ohman, D.E. 1993. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J. Biol. Chem.*, **268**:7503-7508.

Anexo 6. Curva patrón de actividad lítica¹¹

La curva de actividad lítica se hizo con dispersión de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (350 mg mL⁻¹), se utilizó como referencia un stock de Lisozima 1.5µg mL⁻¹ en NaCl 0.9%, el buffer de reacción Na-KPO₄ 50mM pH 6.2. El volumen de ensayo: 1.2 mL (duplicado para cada tiempo de reacción). La reacción se hizo a 500 rpm (Thermomixer Eppendorf, Germany) a 37 °C y la Absorbancia se leyó en Espectrofotómetro (LambdaBio, Perkin Elmer) a 600nm.



¹¹ Mörsky, P. 1983. Turbidimetric determination of lysozyme with *Micrococcus lysodeikticus* cells: Reexamination of reaction conditions. *Anal. Biochem.* **128**, 77-85.