



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Actividad antimicrobiana de enzimas recombinantes generadas a partir de una proteína bifuncional producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

TESIS

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

PRESENTA

Alejandra Itzel Ortega Escobar

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Amelia Farrés Gonzáles Saravia



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**
VOCAL: **Profesor: AMELIA FARRÉS GONZALES SARABIA**
SECRETARIO: **Profesor: GLORIA DIAZ RUIS**
1er. SUPLENTE: **Profesor: OSCAR HERNANDEZ MELENDEZ**
2° SUPLENTE: **Profesor: CARMINA MONTIEL PACHECO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto “E”, Facultad de Química, Circuito de la Investigación Científica s/n, Ciudad Universitaria, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

Dra. Amelia Farrés González-Sarabia

SUPERVISOR TÉCNICO

Dr. Israel García Cano

SUSTENTANTE

Alejandra Itzel Ortega Escobar

La sustentante participó en el Subprograma 127 en el año 2015-2016
Proyecto financiado por Programa PAIP Facultad de Química 9000-9095

ÍNDICE

1. Introducción	5
1.1 Peptidoglucano	5
1.2 Heterogeneidad del peptidoglucano.....	6
1.3 Peptidoglucano HIDROLASAS (PGHs)	11
1.4 N-acetilmuramil-L-alanina amidasas y N-acetil glucosaminidasas.....	13
1.5 Aplicaciones	14
2. Antecedentes	15
2.1 Bacterias ácido lácticas.....	15
2.2 Efecto antimicrobiano de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	16
2.3 Subclonación de la proteína bifuncional de 99 kDa	18
3. Preguntas	20
4. Objetivo general	20
4.1 Objetivos particulares.....	20
5. Metodología	21
5.1 Materiales	21
5.2 Verificación de clonas	22
5.3 Inducción y producción de enzimas recombinantes.....	22
5.4 Determinación de proteína.....	23
5.5 Perfil electroforético y actividad lítica por zimograma	23
5.6 Microscopia electrónica de transmisión	24
5.7 Determinación de actividad específica.....	25
5.8 Detección de actividad antimicrobiana: Difusión en agar.....	25
5.9 Detección de actividad antimicrobiana: Densidad óptica	26
5.10 Detección de actividad antimicrobiana: Zimogramas	26
6. Resultados y discusión	26
6.1 Verificación por PCR.....	27
6.2 Perfil electroforético y actividad lítica en zimograma.....	28
6.3 Condiciones de extracción	31
6.3.1 Pruebas de amortiguador	31

6.3.2 Temperatura de inducción	33
6.4 Determinación de actividad específica para las cuatro subclonas	36
6.5 Determinación de actividad antimicrobiana de las diferentes subclonas	39
6.5.1 Pruebas de inhibición por difusión en agar	40
6.5.2 Determinación de densidad óptica.....	46
6.5.3 Zimogramas.....	48
7. Conclusiones	50
8. Bibliografía.....	51

1. Introducción

La naturaleza sigue siendo la fuente más importante de nuevos antimicrobianos, sin embargo, la diversidad de lugares y formas de donde provienen éstos es más amplia que nunca. Alternativas tales como péptidos antimicrobianos, extractos de plantas, aceites esenciales, bacteriófagos y enzimas como las peptidoglucano hidrolasas están ahora en todo el mundo siendo estudiados como potenciales agentes antibacterianos de próxima generación [Briers *et al*, 2015].

1.1 Peptidoglucano

El peptidoglucano es un componente esencial y específico de la pared celular bacteriana que se encuentra en el exterior de la membrana citoplasmática de las eubacterias. El peptidoglucano (PG) proporciona fuerza y rigidez a la pared celular bacteriana y contribuye al mantenimiento de una forma definida de la célula. Además, sirve como un anclaje para otros componentes de la envoltura celular tales como proteínas y ácidos teicoico [Vollmer *et al*, 2008; de Pedro y Cava, 2015; Münch y Sahl, 2015].

Las principales características estructurales de peptidoglucano es que son hebras de glucanos reticuladas por péptidos cortos. Las hebras de glucano se componen de residuos alternados de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc) unidos mediante un enlaces β -1-4 y que se entrecruzan por péptidos cortos formados por *L*- y *D*-aminoácidos [Anzengruber *et al*, 2014]. El grupo *D*-lactoil de cada residuo de MurNAc está sustituido por el primer aminoácido del tallo peptídico, éste usualmente es *L*-Alanina. El entrecruzamiento de las hebras de glucano se produce generalmente entre el grupo carboxilo de *D*-Alanina en la posición 4 y el grupo amino del aminoácido en la posición 3, ya sea directamente o a través de un puente corto de péptidos (Figura 1) [Vollmer *et al*, 2008; de Pedro y Cava, 2015].

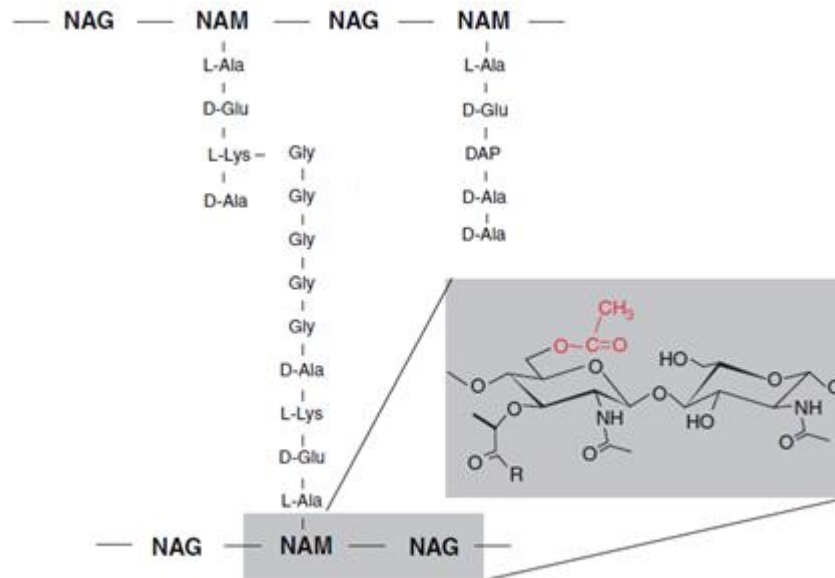
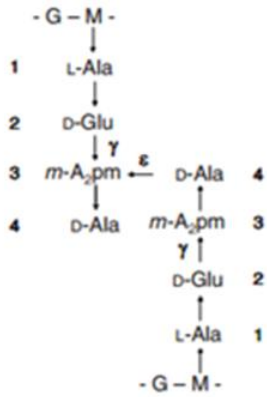


Figura 1. Peptidoglucano de *S. aureus*. Los puentes peptídicos están unidos por un pentámero de glicinas característico de esta bacteria. *N*-acetilglucosamina (NAG) y ácido *N*-acetilmurámico (NAM) [tomado y modificado de Callewaert *et al*, 2011].

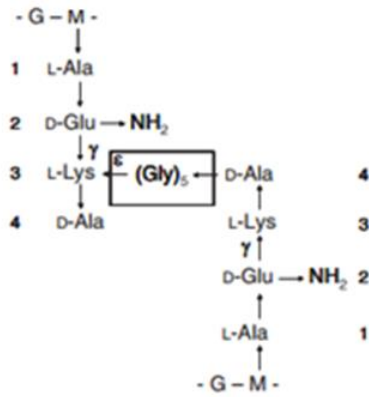
1.2 Heterogeneidad del peptidoglucano

Existe un cierto grado de variación, ya sea en el puente peptídico, en las hebras de glucano o en la posición o composición del puente interpeptídico (Figura 2). La variación intergénero es el caso general, sin embargo, puede haber variaciones intragénero de acuerdo con las condiciones de crecimiento, la fase de crecimiento, la composición del medio, el crecimiento intra/extracelular o a presencia de antibióticos [Vollmer *et al*, 2008].

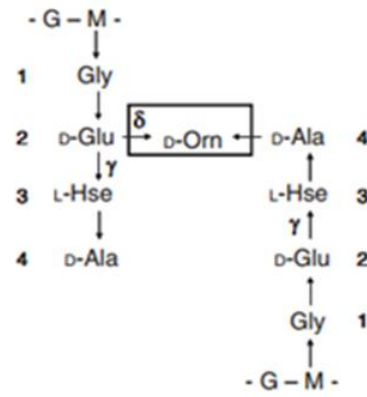
Escherichia coli (enlace 3-4)



Staphylococcus aureus (enlace 3-4 con un puente de pentámero de glicina)



Corynebacterium pointsettiae (enlace 2-4 con un puente de D-ornitina)



Micrococcus lysodeikticus (enlace 3-4 con un puente peptídico)

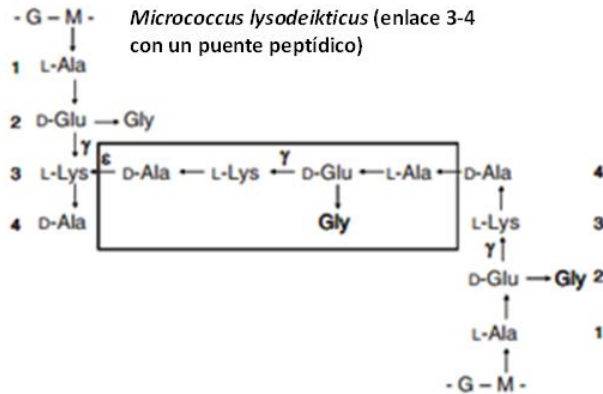


Figura 2. Ejemplos de la reticulación y puentes peptídicos en el peptidoglucano de distintas bacterias. G, N-acetilglucosamina; M, ácido N-acetilmurámico [tomado y modificado de Vollmer *et al*, 2008].

El PG tiende a formar una estructura helicoidal u ondulada y compacta gracias a la interacción por puentes de hidrógeno entre D-Ala terminal y L-Ala en la posición dos de la cadena paralela. Comparaciones hechas mediante modelos computarizados sugieren una diferencia importante en enlaces entre D-aminoácidos y L-aminoácidos y enlaces entre dos aminoácidos con conformación D-, que se dan entre puentes peptídicos. La ausencia del residuo aminoácido D-Ala unido a meso-A₂mp de la posición dos con un enlace L-D- hace el tallo peptídico más rígido y con una conformación más extendida que los enlaces D-D- [de Pedro y Cava, 2015].

La estructura del PG depende también de la longitud, la orientación y los enlaces que en éste se hallan. La longitud de las hebras puede ser medida gracias a la presencia específica de ácido *N*-acetilmurámico anhidro en el extremo de la cadena. La longitud promedio varía entre bacterias, la cual es altamente influenciada por las condiciones de crecimiento y alteraciones químicas o mutacionales del metabolismo celular. Se sabe que la longitud promedio y la distribución de las cadenas de glucanos va a influir en la estructura conformacional del PG, sin embargo, sólo hay contados casos de investigaciones extensas sobre este tema [Vollmer *et al*, 2008; de Pedro y Cava, 2015].

La conformación del peptidoglucano puede ser lineal, ramificada e, incluso, puede formar trímeros y tetrámeros mediante uniones entre los puentes peptídicos (Figura 3) [Hayhurst *et al*, 2008; de Pedro y Cava, 2015].

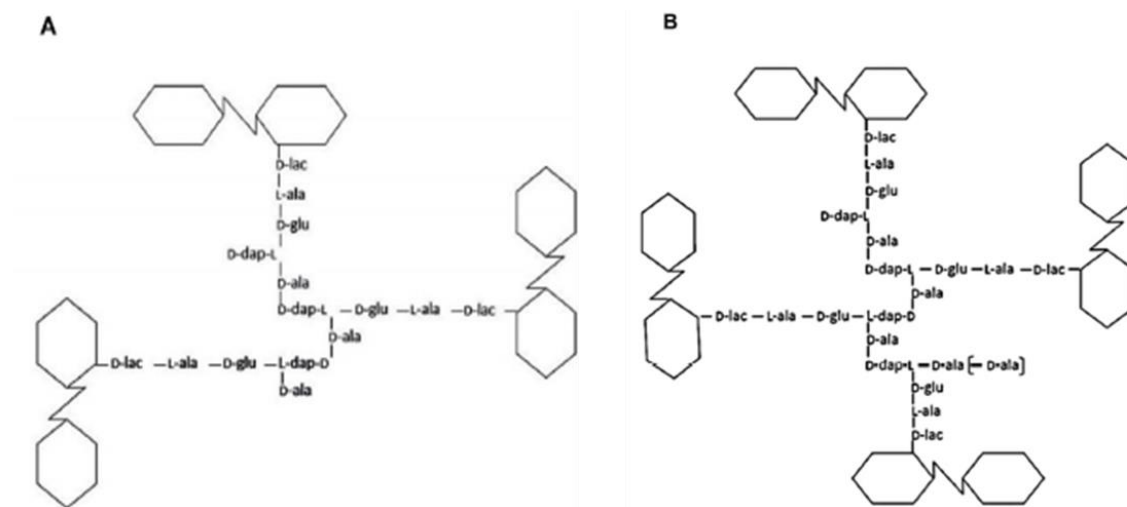


Figura 3. A) Trímero tri-disacárido tetrapéptido. B) Tetrámero tetra-disacárido tetrapéptido [Tomado y modificado de de Pedro y Cava, 2015].

Las enzimas involucradas en la biosíntesis del peptidoglucano son un factor importante en la variabilidad del tallo peptídico. La proteína MurC ligasa une el primer aminoácido del puente peptídico, que en la mayoría de las bacterias es *L*-Ala (raramente puede ser *L*-Gly o *L*-Ser). Otra proteína, llamada MurD ligasa, une el segundo aminoácido en la cadena, que en todas las especies es *D*-Glu. La adición del tercer aminoácido es catalizada por MurE ligasa y es en donde se

Tabla 1. Variación de los aminoácidos en el tallo peptídico dependiendo de la especie [Tomado y modificado de Vollmer *et al*, 2008].

Posición	Residuo encontrado	Ejemplos
1	L-Ala	Mayoría de las especies
	Gly	<i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Brevibacterium imperiale</i>
	L-Ser	<i>Butyribacterium rettgeri</i>
2	D-Isoglutamato	Mayoría de las especies Gram-negativas
	D-Isoglutamina	Mayoría de las especies Gram-positivas, Micobacterias
3	Meso-A2pm	Mayoría de las especies Gram-negativas, Bacilos y Micobacterias.
	L-Lys	Mayoría de las especies Gram-positivas
	L-Orn	Espiroquetas, <i>Thermus thermophilus</i>
	L-Lys / L-Orn	<i>Bifidobacterium globosum</i>
	Meso- Lantionina	<i>Fusobacterium nudeatum</i>
	L-homoserina	<i>Corynebacterium poinsettiae</i>
	L-Ala	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
4	Meso-A2pm amidado*	<i>Bacillus subtilis</i> .
	D-Ala	Todas las bacterias
5	D-Ala	La mayoría de las bacterias
	D-Lac	<i>Lactobacillus casei</i> , Enterococos con resistencia a vancomicina

Después de la síntesis del PG existen modificaciones que se han visto tanto en bacterias Gram-negativas como en -positivas. La mayoría de estas variaciones estructurales proporcionan a la células la capacidad para regular o inhibir enzimas líticas exógenas o endógenas. Por otro lado la formación de 1,6 anhidrogalactosa y D-lactama MurNAc son el resultado de actividades metabólicas (Figura 5) [Clarke *et al*, 2014; María-Neto *et al*, 2015].

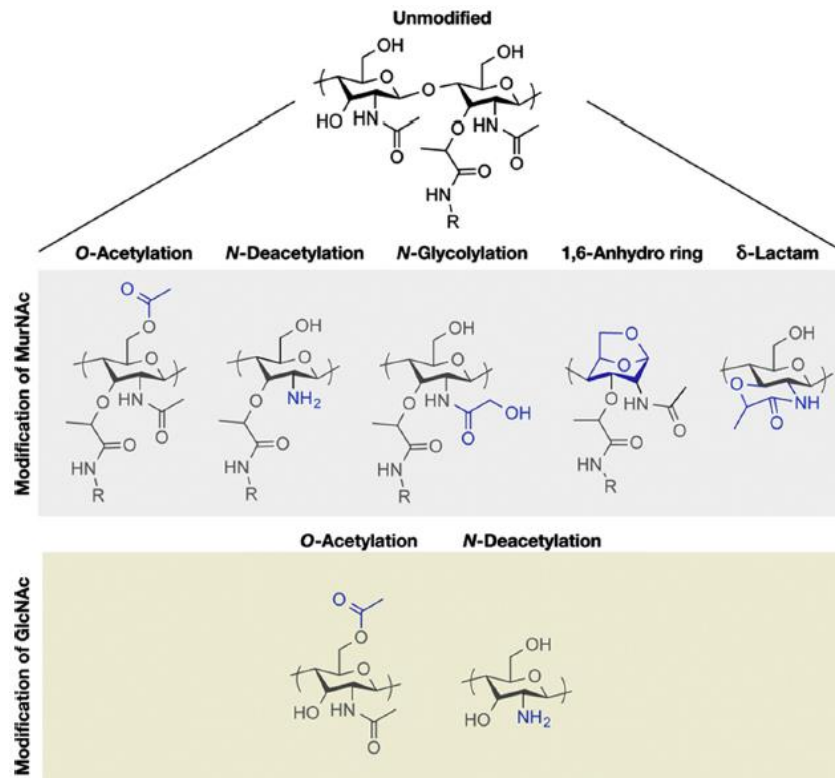


Figura 5. Modificaciones en las hebras de glucano. Las modificaciones se muestran en color azul [Clarke *et al*, 2014].

1.3 Peptidoglucano hidrolasas (PGHs)

Las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) son capaces de hidrolizar los enlaces presentes en el peptidoglucano. Estas proteínas están involucradas en aspectos fundamentales de la vida de las células bacterianas y algunos ejemplos se describen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Función de las PGHs en bacterias [Tomado y modificado de Vollmer *et al*, 2008].

Función	Descripción
Regulación del crecimiento celular	Remoción del exceso de pentapéptidos en el peptidoglucano recién formado.
Elongación del sáculo del peptidoglucano	Ruptura de enlaces en el peptidoglucano para permitir la elongación del sáculo

Recambio del peptidoglucano	Liberación de fragmentos solubles de peptidoglucano que pueden ser utilizados
Separación celular	Ruptura del septum durante la división celular en bacterias Gram negativas
Esporulación y germinación	Maduración del córtex de la espora y la digestión del peptidoglucano de la célula madre para la liberación de la espora
Ensamblaje de pili y flajelo	Ensamblaje mediante peptidoglucano hidrolasas especializadas en esta función
Formación de biopelículas	Adhesión inicial de células a soporte hidrofóbico
Interacción patógeno-hospedero	Modificación de la estructura de peptidoglucano del patógeno para evitar la acción en el hospedero sobre el mismo

La clasificación más utilizada para las PGHs se basa en el enlace que hidrolizan [Vollmer *et al*, 2008]:

- *N*-acetilmuramidasa (muramidasa). Hidrolizan el enlace β -1-4 entre el ácido *N*-acetilmurámico y la *N*-acetilglucosamina, dejando un extremo reductor en el ácido *N*-acetilmurámico.
- *N*-acetilglucosaminidasa (glucosaminidasa). Hidrolizan el enlace β -1-4 entre el ácido *N*-acetilmurámico y la *N*-acetilglucosamina, dejando un extremo reductor en *N*-acetilglucosamina.
- *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa (amidasa). Hidrolizan el enlace amida entre el ácido *N*-acetilmurámico y el primer aminoácido del puente peptídico.
- Endopeptidasas. Hidrolizan el enlace amida formado entre aminoácidos en los puentes peptídicos.

En la figura 6 se ejemplifica de manera gráfica la manera en que las PGHs funcionan de acuerdo con la clasificación anterior.

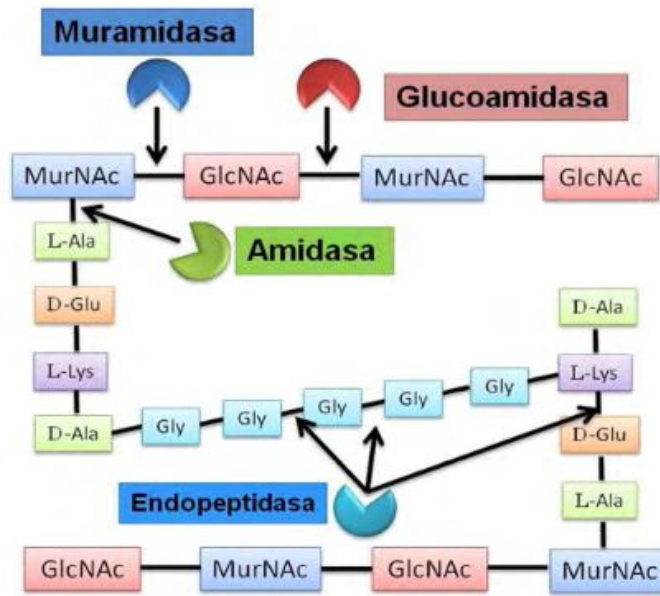


Figura 6. Especificidad por sustrato de las PGHs [García-Cano, 2013]

La regulación de estas enzimas es esencial para la adecuada homeostasis de la pared celular, una actividad lítica descontrolada podría provocar la ruptura del sáculo del peptidoglucano y resultar en lisis celular. Estudios recientes indican que el propósito de las peptidoglucano sintasas y las peptidoglucano hidrolasas son parte de un sistema complejo de enzimas que pueden regular las actividades de hidrólisis y se aseguran que ésta ocurra en los sitios específicos donde el PG se sintetiza. El conocimiento acerca del mecanismo de cada bacteria es muy escaso, sólo se conocen algunos muy específicos propios de ciertas bacterias [Firdich y Gaynor, 2013].

1.4 *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasas y *N*-acetil glucosaminidasas

Las glucosaminidasas de origen bacteriano se han estudiado ampliamente por su efecto contra patógenos. Un ejemplo concreto: en la leche de vaca se ha visto que reduce la carga microbiana de *Staphylococcus aureus*, *Arcanobacterium pyrogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* [Hussain *et al*, 1992].

De ambas enzimas el efecto bactericida se observa comúnmente contra Gram-positivas, ya que éstas tienen 50-90% de PG en la pared celular, mientras que las Gram-negativas sólo contienen entre 5-10% de éste, además de su membrana externa característica.

1.5 Aplicaciones

Existen reportes de PGHs en bacterias ácido lácticas y sus fagos [Zhang, 2012], sin embargo, las únicas peptidoglucano hidrolasas permitidas en alimentos hasta el momento es la lisozima de huevo de gallina [Callewaert *et al*, 2011].

Las hidrolasas son un grupo muy utilizado en la industria de alimentos. La estructura y el mecanismo de estas enzimas está bien definido, y las mejoras en la enzima elegida pueden hacerse por métodos de tecnología de ADN recombinante con ingeniería genética (usando ingeniería de proteína) o por la alteración química directa en la estructura para conseguir la modificación del sustrato elegido.

En el 2013 se calculaba que el mercado global de las enzimas era de alrededor de 4.5 billones de dólares y se espera que crezca para el 2020 a un ritmo del 8.3% y alcance cifras de más de 7.5 billones de dólares. Dentro de este mercado se estima que las enzimas destinadas al procesamiento de alimentos y bebidas captan alrededor de 40% del mercado global y que dentro de este sector al menos 45% están destinadas a la modificación de carbohidratos, particularmente, aquellas destinadas a la transformación de almidones. En segundo lugar, se calcula que la industria de los detergentes capta alrededor del 30% del mercado, la industria textil y la industria del papel entre el 12 y 10% del mercado respectivamente y el resto del mercado se divide en aplicaciones diversas para industria química, farmacéutica y biológica [Rodríguez-Alegría y Castillo-Rosales, 2014].

El interés en la biopreservación de alimentos ha impulsado la búsqueda para nuevos compuestos antimicrobianos naturales de diferentes orígenes. Las bacteriocinas han sido ampliamente reconocidas como biopreservantes

alimentarios naturales pero los últimos avances en biología de las bacteriocinas han abierto nuevos campos para explorar. Por otro lado, el uso de bacteriófagos y endolisinas sólo se ha considerado en los últimos años y los acontecimientos recientes han dado perspectivas prometedoras [García *et al*, 2010].

2. Antecedentes

2.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) comprende una diversidad de organismos con las siguientes características morfológicas: cocos o bacilos Gram-positivos, no esporulados, catalasa negativos y anaerobios facultativos. Los principales géneros que conforman este grupo son: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* [Salminen *et al*, 2004; Callewaert *et al*, 2011].

Las BAL son utilizadas como cultivo iniciador en diferentes alimentos, las cuales producen una amplia gama de metabolitos que pueden aumentar la vida de anaquel por inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos [Leroy *et al*, 2004]. Son utilizadas por ejemplo en productos cárnicos fermentados, las principales especies implicadas son *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *S. carnosus* y *S. xylosus*, las BAL degradan los hidratos de carbono principalmente en ácidos orgánicos que proporcionan sabor. Su acidificación y su capacidad para producir bacteriocinas contribuyen a la inhibición del deterioro y de bacterias patógenas y, por otra parte, la selección de estos cultivos debe incluir criterios tales como la incapacidad para producir aminas biógenas y no transferir genes de resistencia a antibióticos [Talon y Leroy, 2014].

A continuación se enlistan algunas bacterias ácido lácticas que tienen un efecto protector en distintos alimentos.

Tabla 3. Efecto de BALs contra patógenos en alimentos [Tomado y modificado de Devlieghere *et al*, 2004].

Cultivo	Organismo blanco	Alimento	Efecto
<i>Lactobacillus sakei</i> TH1	<i>L. monocytogenes</i>	Jamón cocido	Reducción 1 log (4°C)
<i>Lactobacillus casei</i> D6	<i>L. monocytogenes</i>	Salchicha Frankfurt	Reducción 2-2.5 log (4°C)
<i>Lactococcus spp.</i>	<i>B. cereus</i>	Leche	Inhibición del crecimiento
<i>Enterobacter spp.</i>	<i>L. innocua</i>	Lechuga	Inhibición del crecimiento
<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	<i>Salmonella</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. botulinum</i>	Salchicha cocida	Inhibición del crecimiento

2.2 Efecto antimicrobiano de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 es una BAL utilizada como cultivo iniciador en productos cárnicos, la cual tiene un efecto bioconservador conferido por la actividad de peptidoglucano hidrolasa intracelular [García-Cano *et al*, 2011]. En extractos celulares de esta cepa evaluados por zimografía contra *M. lysodeikticus* se reportaron dos bandas con actividad lítica a los 110- y 99-kDa. Con el extracto que contenía las dos proteínas se realizó un espectro antibacteriano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas mediante la técnica de difusión en agar, y se encontró actividad contra algunas bacterias no deseables en alimentos, entre las que resaltan: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* (Tabla 4) [García-Cano *et al*, 2011].

Inicialmente, la proteína de 99-kDa fue reportada como una muramidasa. Sin embargo, a partir de un análisis de secuencias tomando como referencia el genoma de *P. acidilactici* 7_4, primer genoma reportado para esta especie, ahora

la secuencia de aminoácidos de esta proteína ya se encuentra reportada como peptidoglucano hidrolasa bifuncional (GenBank: AKD44141) por presentar dos dominios catalíticos: de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa y de *N*-acetilglucosaminidasa. En la figura 7 se muestra la secuencia de aminoácidos, donde se diferencian con colores ambos dominios catalíticos.

```

1  MFKSGKKWAF ASIATASLGL VALNTNAEKA HADSDAQANT NSASQLDQQT KTAPVNEKQV
61  TLAKPATVKA SAAVTAQSA APAPSAAQSA AKVNADSTAK ADQHSAAKV GTKATTSSAV
121 KPAKEAASAN AVKAAPASSA AKKVSTSVAS SAAPSSAASK TVTSAAVKDS AAKEAVSSAA
181 NVKSSSAAK TSVNSSAVSE AAKKDAKAEK TAEKKTDNSS KDYTIDNTYR LADNEGSDQK
241 TNNKIIVAHA VGQYSSARDV AIYEKREWDS SETYVQYIVG DGGRVYAVGE EGYVAWGAGK
301 WANENAPVQV ELAQTYSDSQ FKKDYQTYVN LLRDSAKKWN IPTTLDSEY TGIKSHVWVT
361 EHVWGNHVDP YGYLGTHGIT KEQFAHDLAY GFDNDAANDN QNNNQNDNHQ NDNQNNQNNN
421 HQNDSSNNHG NQNNQSYHVG DKVTIKNSAS HWATGQSIYN GVKGHTYKII QTNGHKLLLD
481 QVISWINDGD VYKAGSNSGS SNNHNNNHTT NNADIKVGTV VTINNNASHW ATGQSIYSGV
541 KGKSYKVIQT NGNRLLLDKV ISWINKGDVH VPGSNSNNNN SGNQNHNNGN NHNNNGNTES
601 IHVGSKVTIN NNAKRWATGQ NIYSGVKGKT YTVIQMNGSR LLLDKVISWI NKGDVHLPGS
661 NGSQNNNNNN NNHANNNDGT IRVGTNVTIK PSAKRWATGQ NIYYGVKGKT YKVIQMNGNR
721 LLLDKVISWI NKGDVYVPGS SNNNNSNSN NHNNNGSNYH FTNQNWTAAQ TNFVNSIASD
781 VMNVCQNNHL YASVAMAQAV VESAYGASTL AQEAHNLFGI KADSTWHGAT YTKNTQEVIN
841 GRVVTISAAF RKYDSFKDSI ADYAKKLESR PQYANAFSNH AHNYVESVKA IKAGGYATAP
901 TYVSSIVNCI NNYGFYKLDG LNSAISL

```

Figura 7. Secuencia en aminoácidos de la enzima de 99-kDa reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7_4. Verde: péptido señal Rojo: dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-amidasa Azul: dominio de *N*-acetilglucosaminidasa [RefSeq: WP_002829921; NCBI, 2014] [Campos, 2016].

Posteriormente la proteína de 99kDa se clonó y expresó en el vector pET-19b, se purificó por medio de columna de exclusión molecular, posteriormente se realizó otro espectro antimicrobiano, en el que disminuyó el número de cepas susceptibles, sobre todo en Gram-negativas (Tabla 4) [García-Cano *et al*, 2011].

Tabla 4. Inhibición de cepas bacterianas por PGHs provenientes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 [García- Cano et al, 2011].

Cepa	Extracto con las PGHs 110 y 99-kDa	PGH recombinante de 99-kDa
Gram-positivas		
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	✓	✓
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	✓	✓
<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	✓	✓
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	✓	✓
<i>Enterococcus faecalis</i> QB	✓	✓
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	✓	ND
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	✓	ND
Gram-negativas		
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 27853	✓	ND
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	✓	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ND	ND

ND= no detectada

2.3 Subclonación de la proteína bifuncional de 99 kDa

Existen reportes de enzimas con actividad bifuncional que contienen los dominios de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina y *N*-acetilglucosaminidasa producidas por el género *Staphylococcus* [Yokoi *et al*, 2008]. Estas enzimas presentan una secuencia de aminoácidos entre los dominios catalíticos, las cuales se denominan secuencias repetidas y se han relacionado con el anclaje a membrana celular. Algunos autores han generado proteínas recombinantes con un solo dominio catalítico variando la longitud de la región intermedia, además estas enzimas han tenido actividad lítica de manera independiente [Bourgeois *et al.*, 2009]. Con estos antecedentes bibliográficos, se generaron 8 subclonas que contenían un dominio

catalítico y una parte de la región intermedia, la cual esta reportada como rica en asparaginas (figura 8) [Campos 2016].

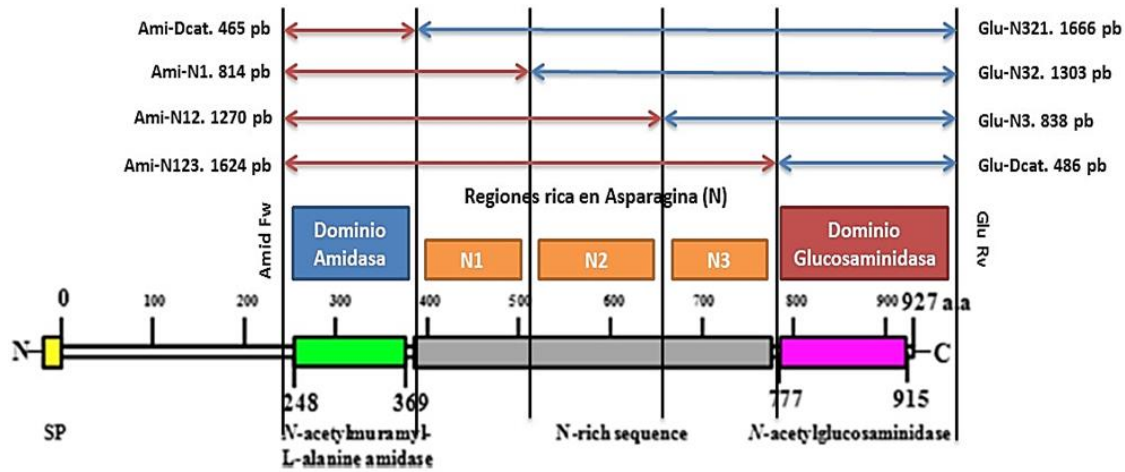


Figura 8. Subclonas de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa y *N*-acetilglucosaminidasa [Campos 2015].

Al nombrar las subclonas se les asignó el prefijo p22 (haciendo referencia al vector utilizado) seguido del dominio catalítico que contenían; Ami (*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa) o Glu (*N*-acetilglucosaminidasa), Dcat si sólo contenía el dominio catalítico y N1, N12 o N123 de acuerdo con la región intermedia que abarcaba la construcción. Así, las construcciones generadas fueron las siguientes.

Tabla 5. Subclonas generadas para ambos dominios [Campos, 2016].

Subclona Dominio amidasa	Peso molecular kDa	Subclona Dominio glucosaminidasa	Peso molecular kDa
p22AmiDcat	20	p22GluDcat	22
p22AmiN1	31	p22GluN1	35
p22AmiN12	55	p22GluN12	51
p22AmiN123	65	p22GluN123	65

Se demostró que ambos dominios catalíticos (*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa y *N*-acetilglucosaminidasa) presentan actividad lítica independiente. Del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa la única subclona que presentó actividad lítica fue p22AmiN123 y del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa las 3 subclonas que contienen región espaciadora (p22GluN3, p22GluN32 y p22GluN321) presentaron actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus* [Campos, 2016].

El presente proyecto tiene como objetivo determinar el espectro antimicrobiano de cada dominio de manera independiente, compararlos con el espectro generado por la proteína recombinante intacta y con el de la mezcla de dos enzimas producidas por el microorganismo. La actividad antimicrobiana se evaluará por tres métodos distintos y se emplearán microorganismos Gram-positivos, entre los que se incluyen BAL, así como Gram-negativos.

3. Preguntas

- ¿La aplicación de una proteína recombinante con mayor especificidad en su actividad permitirá llevar a cabo la lisis celular?
- ¿Tendrán un espectro antimicrobiano diferente los dos dominios?

4. Objetivo general

Evaluar el espectro antibacteriano de enzimas recombinantes generadas a partir de una proteína bifuncional producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

4.1 Objetivos particulares

- Seleccionar una construcción por dominio, bajo el criterio de selección de presentar mayor actividad en zimograma contra *M. lysodeikticus*.
- Seleccionar las mejores condiciones de extracción.
- Evaluar y comparar la actividad específica de ambos dominios.
- Seleccionar el mejor método de determinación de actividad antibacteriana (zimograma, halos de inhibición, métodos espectrofotométricos)
- Determinar el espectro antibacteriano y compararlo con el espectro generado por el extracto que contenía las dos enzimas (99- y 110-kDa) y con el de la proteína recombinante de 99-kDa

5. Metodología

5.1 Materiales

En la tabla 6 se describen la cepa y el plásmido utilizados para la producción de las enzimas recombinantes usadas en la presente investigación. Las cepas transformadas se almacenaron a -70°C en crio-viales con el medio de cultivo LB adicionado con glicerol (80-20 %, v/v).

Tabla 6. Cepa de expresión y plásmido utilizados.

Cepa/ Plásmido	Observaciones
<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS	Cepa de clonación y expresión (Novagen, USA). Ampliamente reportado en la expresión de genes tóxicos
pET- 22b	Vector de expresión, resistencia a Ampicilina, promotor T7 lac, His-Tag en el amino terminal, péptido señal <i>pe/B</i> leader, tamaño 5.493 kb (Novagen,USA)

A continuación se describen las cepas y los medios de cultivo utilizados para realizar el espectro antibacteriano. Todas las cepas se almacenaron a -20°C con el medio de cultivo óptimo adicionado con glicerol (80-20 %, v/v). Las cepas se reactivaron añadiendo 50 μL de cada uno de los microorganismos, almacenados a -20°C , a 5 mL de medio fresco y después incubándolas a 37°C (Tabla 7).

Tablas 7. Cepas utilizadas para el espectro antibacteriano

Cepas	Medio de cultivo
Gram-positivas	
<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	MRS
<i>Enterococcus faecalis</i> QB	MRS
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	BHI
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	BHI

<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	BHI
Gram-negativas	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 27853	BHI
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	BHI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	BHI

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

5.2 Verificación de clonas

Utilizando como ADN templado (100 ng) los plásmidos extraídos con el Kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, USA) de las clonas, se realizó la PCR (Termociclador Maxigene, Axygen) con la enzima *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) y con los cebadores universales T7, los cuales están presentes en la secuencia del vector. Como control negativo se utilizó una transformante la cual contenía el vector de clonación pET-22b sin ningún inserto. Los cebadores se utilizaron a una concentración final de 0.1 μ M y los dNTP's (Thermo Scientific, USA) a 0.1 mM. De la enzima se ocuparon 1 U y el amortiguador de la enzima (10X PCR buffer) se diluyó a una concentración final de 1X. Se adicionó agua para llevar a un volumen final de 25 μ L por cada reacción. Las condiciones térmicas se muestran en la tabla 9.

Tabla 8. Condiciones térmicas de la PCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	35
Alineamiento	55°C	30 s	
Extensión	72°C	4 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

5.3 Inducción y producción de enzimas recombinantes.

Se realizó un preinóculo partiendo de la construcción a expresar conservada a -70°C, adicionando 100 μ L por cada 5 mL de medio LB, incubado a 37°C, 200 rpm,

durante 12 h. Este preinóculo se resembró tomando una alícuota (1% con respecto al volumen de inducción) que fue adicionado a matraces Erlenmeyer con medio LB con los respectivos antibióticos (ampicilina y cloranfenicol), los cuales se incubaron a 37°C, 250 rpm, hasta llegar a una DO_{600nm} entre 0.5 y 0.8 (Espectro Biomate 3; Thermo Scientific). Posteriormente se adicionó IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (Thermo Scientific) como inductor en una concentración final de 0.4 mM. Una vez adicionado el IPTG se incubó 3 h en las mismas condiciones y a 4°C.

Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 8,500 rpm durante 15 min para separar las células. Estas células se resuspendieron en amortiguador de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, pH=8), ajustando la DO_{600nm} entre 2.0 y 2.5, se sonicaron (Sonic Dismembrator F550 Ultrasonic Homogenizer, Fisher Scientific, USA) utilizando pulsos de 30 s con 15 s de descanso durante 10 min a 4°C. Después se centrifugó a 17,000 rpm durante 20 min a 4°C para separar la fracción citosólica (I) de los restos celulares o cell debris (II). El extracto libre de células o sobrenadante fue concentrado por ultrafiltración (III) utilizando una membrana Amicon® MWCO de 10 kDa (Merck Millipore, USA) hasta obtener aproximadamente 5% de volumen inicial. Las fracciones que se evaluaron son las siguientes: I. Fracción citosólica; II. Restos celulares; III. Extracto libre de células.

5.4 Determinación de proteína

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

5.5 Perfil electroforético y actividad lítica por zimograma

El perfil proteico de todas las fracciones fue determinado por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Power-Pac 300) a 120 V durante 3 h. Los geles se prepararon al 10% o al 12% de poliacrilamida con los reactivos necesarios para la elaboración

según lo indicado por el proveedor (manual de Bio-Rad Mini-PROTEAN 3). Los geles desnaturalizantes SDS-PAGE se tiñeron con azul de Coomassie y se destiñeron con solución desteñidora (10% etanol/10% ácido acético/80% agua) en agitación suave.

Para la elaboración de los zimogramas se prepararon SDS-PAGE con 0.2% de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* como sustrato (Leclerc et al, 1989). Una vez realizada la electroforesis, el gel se lavó con agua desionizada, se adicionaron 70 mL de amortiguador de renaturalización (Tris-HCl 10 mM pH= 8.0 con Tritón X-100 al 1% v/v) y se incubó a 37°C durante 12 h en agitación suave. Finalmente el gel se tiñó con 0.01% de KOH y 0.1% de azul de metileno durante 30 min y se destiñó con agua destilada. El peso molecular de las bandas de actividad lítica fue determinado por la comparación con marcadores de peso molecular (Bio-Rad, USA).

5.6 Microscopia electrónica de transmisión

Se realizó un preinóculo partiendo de la construcción a expresar conservada a -70°C, adicionando 100 µL por cada 5 mL de medio LB, incubado a 37°C, 200 rpm, durante 12 h. Este preinóculo se resembró tomando una alícuota (1% con respecto al volumen de inducción) que fue adicionado a matraces Erlenmeyer con medio LB con los respectivos antibióticos (ampicilina y cloranfenicol), los cuales se incubaron a 37°C, 250 rpm, hasta llegar a una DO_{600nm} entre 0.5 y 0.8 (Espectro Biomate 3; Thermo Scientific). Posteriormente se adicionó IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (Thermo Scientific) como inductor en una concentración final de 0.4 mM. Una vez adicionado el IPTG se incubó 3 h en las mismas condiciones y a 4°C. Los cultivos se centrifugaron a 8,500 rpm durante 15 min para separar las células. Las células se resuspendieron en 1mL de agua estéril, se tomaron 5 µL de esta muestra y se pusieron sobre una rejilla de cobre de 200 mesh recubierta con una película de carbón e hidrofílica por una descarga eléctrica. Se dejó adherir la muestra durante 1 minuto, después se lavó dos veces con 100 µL de agua destilada y estéril. Posteriormente se agregó medio de contraste (acetato de

uranilo al 2% en solución acuosa) y se observó en un microscopio Geol 1200EXII a 80 KVolts.

5.7 Determinación de actividad específica

La actividad de PGH del dominio de glucosaminidasa se determinó utilizando como sustrato al 4-nitrofenil *N*-acetil- β -*D*-glucosamina (Sigma-Aldrich). Al adicionar la enzima se hidroliza el sustrato y se libera *p*-nitrofenol y *N*-acetil- β -*D*-glucosamida; a su vez, el *p*- nitrofenol forma *p*- nitrofenolato en medio básico que da característico color amarillo. En una microplaca se colocaron 10 μ L de una solución de 1 mg/mL de NP-GlcNAc, 30 μ L de la enzima en estudio y 80 μ L de un amortiguador citrato de sodio 100 mM, pH 4.8. El blanco consistió en 10 μ L de sustrato y 90 μ L amortiguador. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 20 min. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de carbonato de sodio 140 mM para detener la reacción e incrementar el color. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Epoch de BioTek). También se midió la absorbancia de una solución estándar de *p*-nitrofenol 5 mM para realizar los cálculos de actividad. Una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de 4-nitrofenil *N*-acetil- β -*D*-glucosamina a *p*-nitrofenol y *N*-acetil- β -*D*-glucosamina en 1 min a 37°C [García-Cano *et al*, 2015]. Para determinar la actividad específica del dominio de *N*-acetil muramil-*L*-alanina amidasa se utilizó hidrocloreuro de 4-nitroanilidina como sustrato. Al adicionar la enzima se libera alanina + *p*-nitroalanina, este último da un color amarillo, y se hace la lectura a 405nm.

5.8 Detección de actividad antimicrobiana: Difusión en agar

En la caja Petri se colocaron 25 mL de medio de cultivo BHI al 1.0% de agar, se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 20 min, posteriormente a la caja se le adicionaron 15 mL del mismo medio pero al 0.6% de agar con 1×10^7 UFC/mL del microorganismo de interés. Con un penicilindro se hicieron pozos sobre la doble capa de agar, a los cuales se les adicionaron 200 μ L de las fracciones

obtenidas y las cajas se incubaron a 37°C por 12 h. Se tomó como positiva la prueba cuando el diámetro del halo de inhibición del microorganismo indicador fue mayor a 1 mm, el que se correlacionó con la concentración de proteína total colocada en cada pozo [García-Cano *et al*, 2015].

5.9 Detección de actividad antimicrobiana: Por densidad óptica

Esta determinación se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Yuan y Yang, [2002] en donde utilizando una microplaca de 96 pozos se colocan 250 µL de suspensión de *M. lysodeikticus* al 0.015% a los cuales se les adicionaron 10 µL de enzima. Se realizó la lectura a 450 nm, cada min durante 15 min. Se utilizó buffer de fosfato de potasio 66 mM pH 6.24 como blanco y para hacer la suspensión de *M. lysodeikticus*. Como control positivo se utilizó lisozima (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 µg/mL [García-Cano 2013].

5.10 Detección de actividad antimicrobiana: Zimogramas

Las bacterias con las cuales se iba a hacer el ensayo de espectro antimicrobiano se reactivaron adicionaron 100 µL de éstas a 50 mL de medio BHI y se incubaron a 37°C durante 12 h a 200 rpm. Posteriormente se centrifugaron a 8,500 rpm durante 15 min para obtener un pellet de células. Éstas se lavaron 3 veces resuspendiéndolas en agua estéril (30 mL aprox.) y centrifugando a las condiciones antes mencionadas [Yokoi *et al*, 20008].

Después de los lavados, las células se resuspendieron en 8.5 mL de agua estéril y se ajusta la DO₆₀₀ entre 8 y 10. Posteriormente se realizó un zimograma, como se describió anteriormente.

6. Resultados y discusión

Del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina se evaluaron las subclonas que contenían diferente número de las unidades repetitivas que forman el dominio y sólo la subclona p22AmiN123, que contiene las tres, presentó actividad lítica en zimogramas, con un peso molecular aproximado de 65 kDa [Campos, 2016].

Para el dominio de *N*-acetilglucosaminidasa 3 subclonas (p22GluN1/ p22GluN12/ p22GluN123) presentaron actividad lítica en zimogramas contra *M. lysodeikticus*, por lo que se realizaron más pruebas por zimografía en donde se ajustó la proteína y se hizo un análisis de densidad relativa de imagen (TotalLab, 1D or Western Blot Analysis Free Trial Version) para saber cuál de estas tres presentaba mayor actividad. Esta información se complementó con pruebas de actividad específica. Estos resultados determinarán con cuál subclona de este dominio se generará el espectro antimicrobiano.

6.1 Verificación por PCR

Se realizaron amplificaciones de los genes de interés en los vectores por PCR para verificar las construcciones. Esta verificación sólo se hizo para las subclonas que presentaban actividad lítica en zimogramas contra *M. lysodeikticus*. Las PCR se realizaron de acuerdo a lo descrito en la metodología.

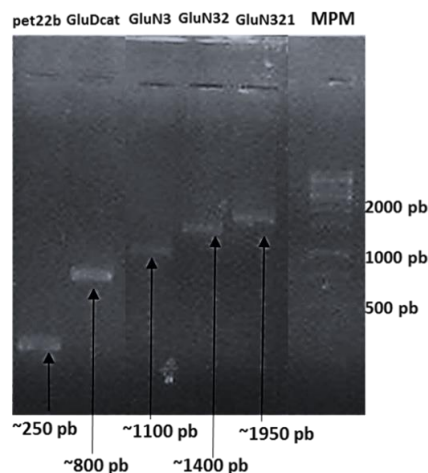


Figura 9. Verificación de clonas por PCR. Dominio de *N*-acetilglucosaminidasa. MPM. Marcador de pb. Vector Pet22b vacío 250 pb; Glu Dcat 800 pb; GluN3 110 pb; GluN32 1400 pb; GluN321 1950 pb. Gel de agarosa al 1%, revelado con bromuro de etidio (0.01%).

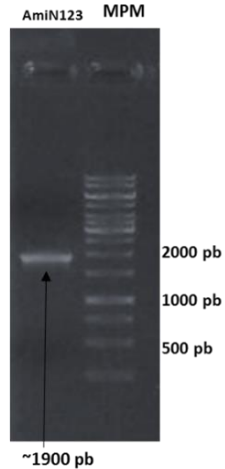


Figura 10. Verificación de clonas por PCR. Dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa. MPM. Marcador de pb. AmiN123 1900 b. Gel de agarosa al 1%, revelado con bromuro de etidio (0.01%).

Las figuras 9 y 10 confirman que el inserto de interés está contenido en cada una de las construcciones ya que los pesos moleculares coinciden para cada subclona; GluDcat= 800 pb; GluN3= 1100 pb; GluN32= 1400 pb; GluN321= 1950 pb; AmiN123= 1900 pb.

6.2 Perfil electroforético y actividad lítica en zimograma

Se sabe que del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa, la única subclona que presentó actividad lítica en zimograma fue la p22AmiN1N2N3 [Campos 2016], sin embargo, para el dominio de *N*-acetilglucosaminidasa fue necesario hacer pruebas de actividad para elegir la subclona más activa y generar con ésta el espectro antimicrobiano.

Para conocer cuál subclona presentaba mayor actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus* se ajustó la cantidad de proteína a 50 µg en la fracción citosólica. Adicionalmente, se cargaron restos celulares, para los cuales se hizo una dilución 1:10 (Figura 11). Esta información se complementó con un SDS-PAGE para confirmar los pesos moleculares de las proteínas de interés (Figura 12).

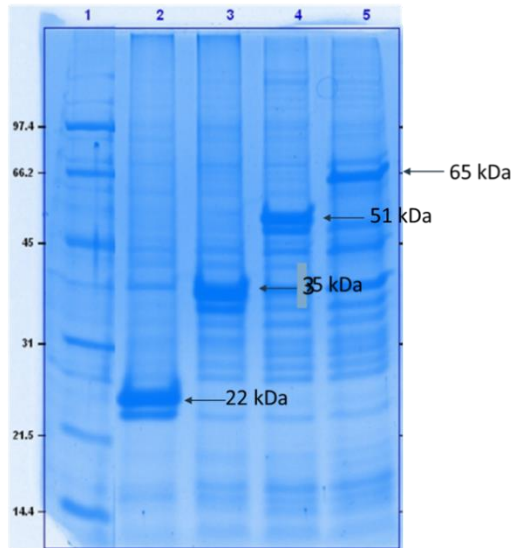


Figura 11. SDS-PAGE del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa. Restos celulares. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, p22GluDcat; carril 3, p22GluN3; carril 4, p22GluN32; carril 5, p22GluN32.

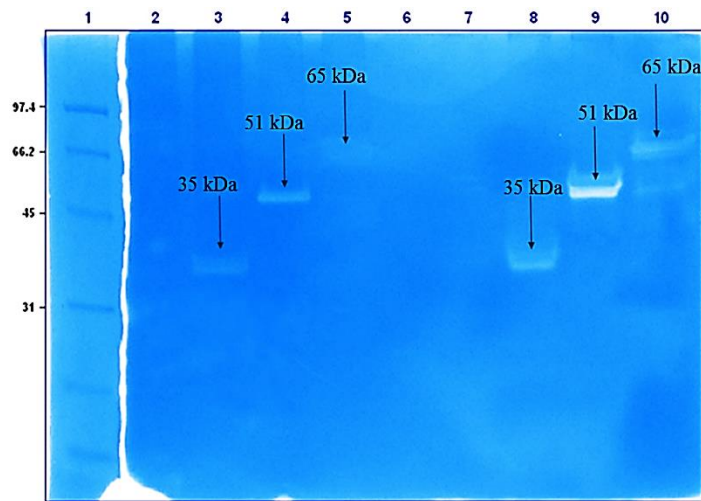


Figura 12. Zimograma contra *M. lysodeikticus* del dominio de *N*-glucosaminidasa. Proteína 50 μ g. Carril 1, Marcador de bajo peso molecular; carriles 2 y 7, citosol y restos celulares p22GluDcat; carriles 3 y 8, citosol y restos celulares p22GluN3; carriles 4 y 9, citosol y restos celulares p22GluN32; carriles 5 y 10, citosol y restos celulares p22GluN321.

Las cuatro construcciones están al peso esperado (Figura 11); p22GluDcat 22 kDa, p22GluN3 35 kDa, p22GluN3N2 51 kDa, p22GluN3N2N1 65 kDa. Con el gel de la figura 12 (zimograma contra *M. lysodeikticus*) confirmamos que todas las subclonas presentan actividad lítica a excepción de p22GluDcat (Carriles 2 y 7 de

la Figura 12 la cual es la construcción que sólo contiene el dominio catalítico. La banda que pareciera ser la de mayor intensidad tanto en citosol como en restos celulares corresponde a la subclona p22GluN32, sin embargo, para complementar la información se hizo un análisis densitométrico con el software TotalLab Quant del mismo zimograma (Figura 13). Estas pruebas de actividad se realizaron únicamente con la fracción citosólica y restos celulares. Se realizaron también cultivos en condiciones de inducción de hasta 1 L, de los que el sobrenadante (fracción libre de células) fue concentrado 200 veces, hasta un volumen de 5 mL, por medio de diafiltración (membrana 10 kDa) y no presentó actividad en zimograma (resultados no mostrados). Se sugiere que a pesar de que las construcciones contienen el péptido señal, la enzima interactúa con el sustrato (peptidoglucano) de la misma cepa de expresión (*E. coli* Rosetta 2De3pLys) y por eso la PGH no es secretada al exterior de la célula.

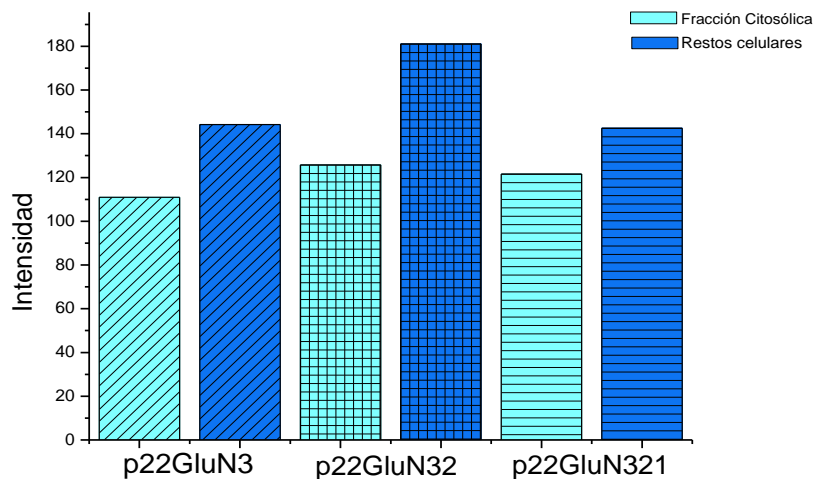


Figura 13. Densidad relativa de banda del zimograma contra *M. lysodeikticus* del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa de la Figura 12.

La intensidad, también conocida como densidad relativa de banda, corresponde a la altura de pico de la banda detectada menos el ruido de fondo eliminado mediante la función Rolling Ball [Vorácková *et al*, 2011]. Los resultados confirman que la subclona que presenta mayor intensidad de banda fue p22GluN32, que

contiene dos partes de la región intermedia, tanto para la fracción citosólica como la de restos celulares. La diferencia es más notable entre la fracción de restos celulares de las tres subclonas (Figura 13).

Considerando que la mayor actividad se encontró en restos celulares, y que por lo tanto la proteína de interés podía estar adherida a membrana, se probaron distintos amortiguadores para tratar de aumentar la cantidad de proteína en la fracción citosólica. Esto es de interés porque las pruebas de inhibición bacteriana deben preferentemente hacerse con esta fracción, ya que los restos celulares u otros solutos hacen imprecisa la cuantificación de proteína por el método de Bradford (1976).

6.3 Condiciones de extracción

6.3.1 Pruebas de amortiguador

Se llevaron a cabo cultivos en condiciones de inducción tanto para la clona p22AmiN1N2N3 como la p22GluN3N2, para determinar cuál es el amortiguador de lisis óptimo. Al término de la inducción se centrifugó a 8,500 rpm y las células se resuspendieron para su posterior sonicación. El amortiguador en el que se resuspenden es llamado amortiguador de lisis y es relevante para conservar la actividad de la enzima. Se probaron tres distintos amortiguadores: 1) Tris-HCl 10 mM pH 8 (control); 2) Tris-HCl 10 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, Lisozima 100 µg/mL pH 8; 3) NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, Lisozima 100 µg/mL pH 8.

En el zimograma (Figura 14) se cargaron dos fracciones de la subclona p22GluN32: extracto libre de células y fracción citosólica.

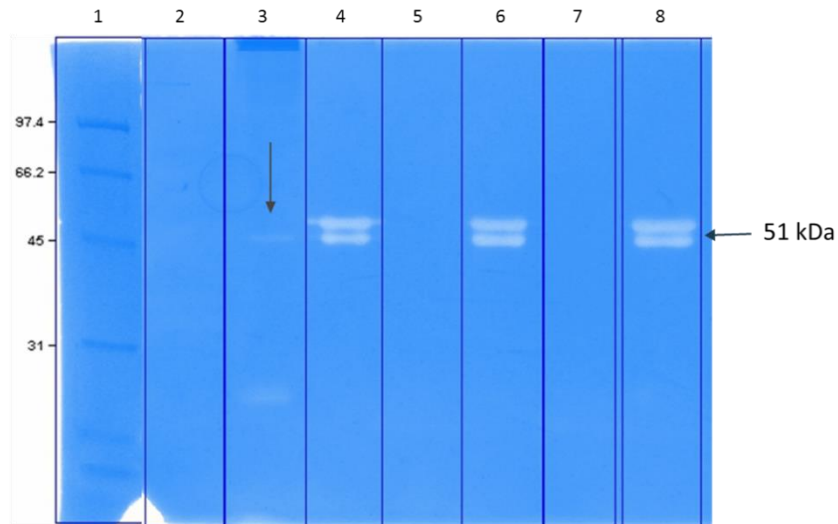


Figura 14. Zimograma contra *M. lysodeikticus* de p22GluN32, muestras con distintos amortiguadores de lisis. Carril 1, marcador de bajo peso molecular; carril 2, sobrenadante; carril 3, citosol con amortiguador Tris-HCl; carril 4, restos celulares con amortiguador Tris-HCl; carril 5, citosol con amortiguador Tris-HCl + NaCl; carril 6, restos celulares con amortiguador Tris-HCl + NaCl; carril 7, citosol con amortiguador NaH₂PO₄; carril 8, restos celulares con amortiguador NaH₂PO₄.

En el único tratamiento en el que se observó banda de actividad lítica en la fracción citosólica usando el amortiguador Tris-HCl 10 mM pH= 8. En el carril 3 se aprecia una banda tenue a 51 kDa (Figura 14). Esto puede deberse a que el tratamiento con Imidazol y lisozima puede desnaturalizar la enzima y ésta pierde actividad [Nelson y Cox, 2005].

En contraste, en las fracciones de restos celulares (carriles 4, 6 y 8) se aprecia en todas las condiciones una doble banda, aproximadamente en el mismo peso. Sin embargo la fracción citosólica de las condiciones 5 y 7 no presentaron actividad lítica.

Además midiendo la concentración de proteína por el método de Bradford se obtuvo una mayor cantidad (hasta dos veces más) en las fracciones citosólicas extraídas con el amortiguador Tris-HCl 10 mM pH= 8, tanto de p22Amin123 ($935.60 \pm 17.2 \mu\text{g/mL}$) como de p22Glu32 ($867.64 \pm 12.1 \mu\text{g/mL}$), por lo que éste será utilizado en la siguiente etapa de la optimización de temperatura de inducción. Estos resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentración de proteína total en citosol de p22Amin123 y p22GluN32.

Subclona	Amortiguador de lisis	Concentración (µg/mL)
p22Amin1N2N3	Tris-HCl 10 mM pH= 8	935.60± 17.2
	Tris-HCl 10 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10m M, Lisozima 100 µg/mL pH= 8	857.93± 8.6
	NaH ₂ PO ₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, Lisozima 100 µg/mL pH= 8.	464.73± 14.6
p22GluN3N2	Tris-HCl 10 mM pH= 8	867.64± 12.1
	Tris-HCl 10 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10mM, Lisozima 100 µg/mL pH= 8	469.58± 7.8
	NaH ₂ PO ₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, Lisozima 100 µg/mL pH= 8.	285.12± 16.3

6.3.2 Temperatura de inducción

Con el fin de extraer y mantener activa la proteína, se llevaron a cabo inducciones en las cuales después de agregar el inductor (IPTG), se varió la temperatura de incubación. Un lote de la subclona p22Amin123 del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa se continuó incubando a 37°C, un segundo lote se incubó a 4°C. Se midió actividad específica tanto espectrofotométricamente como en zimograma contra *M. lysodeikticus*. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

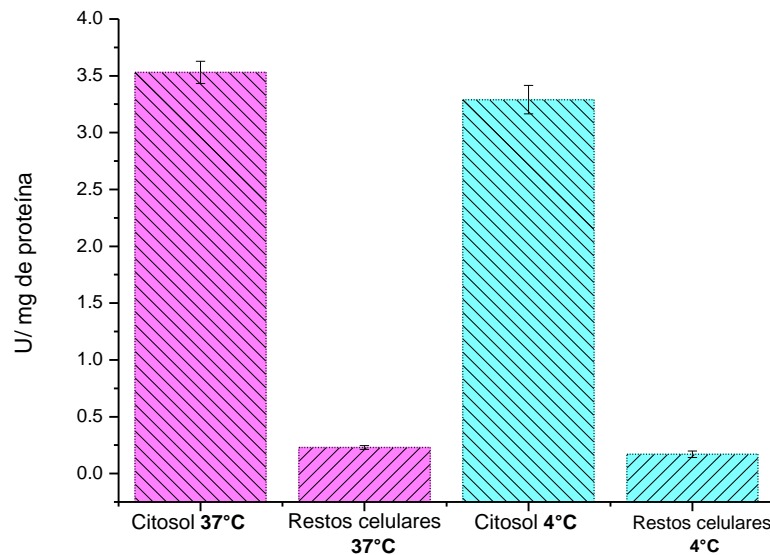


Figura 15. Actividad específica (U/mg de proteína) de la subclona p22Amin123. Variación de la temperatura de inducción, a 37 y 4°C.

Se encontró una diferencia de 0.24 unidades de actividad específica, determinada por densidad óptica (Figura 15), entre el citosol del lote inducido a 37°C y el citosol del lote inducido a 4°C. Sin embargo, la diferencia entre el citosol y restos celulares es muy notoria siendo esta última la que mostró tener una menor actividad. Estos resultados recalcan la idea de que la enzima está interactuando con el PG de la cepa productora (*E. coli* Rosetta 2 (DE3) Plys) y por tal motivo no está hidrolizando en mayor medida el sustrato (Hidrocloruro de 4-nitroanilina) disuelto en el medio de reacción de esta prueba, mientras que la enzima concentrada en la fracción citosólica si está disponible para llevar a cabo la hidrólisis. Cabe mencionar que altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* pueden resultar en acumulaciones de las mismas como un agregado insoluble llamado cuerpos de inclusión, una de las características de éstos es que tienen mayor densidad (1.3 mg/mL aprox.) que muchos de los componentes celulares, por lo que pueden ser fácilmente separados por centrifugación después del rompimiento celular por sonicación. Se descartó que la proteína pudiera estar en la fracción de restos celulares, debido a la formación de cuerpos de inclusión, observando las células mediante microscopía electrónica de transmisión. Estos agregados se pueden ver como dos sombras en los extremos de las células unidas mediante hilos o ramificaciones. En la figura 16 se puede observar el sombreado en la zona de la membrana celular lo que pareciera una acumulación de proteína, y aunque siempre está la posibilidad de que se formen cuerpos de inclusión, en este caso se infiere que se forman a una escala no significativa [Lile *et al*, 1998; Tsumoto *et al*, 2002; Singh y Panda, 2005].

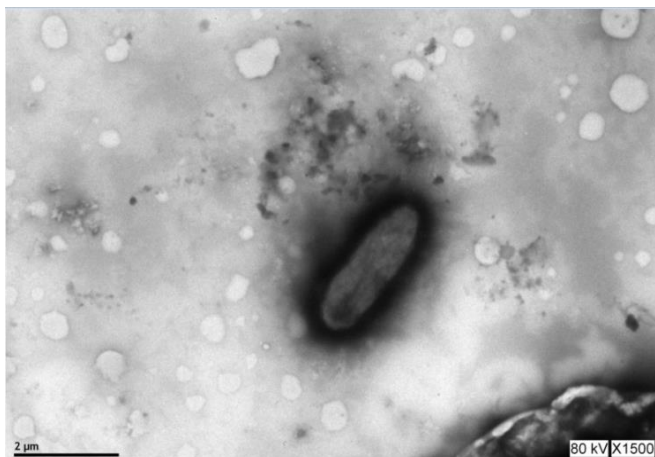


Figura 16. Microscopía electrónica de transmisión de una célula *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLys, vector pET22-b, subclona p22AmiN123. Unidad de Microscopía, IFC UNAM

Posteriormente se hizo un zimograma contra *M. lysodeikticus* (Figura 17) que se analizó con el software Total Lab Quant. La densidad relativa de banda se asoció con la cantidad de proteína (μg) cargada en cada carril del gel de poliacrilamida (Tabla 11).

Contrario a los resultados de actividad obtenidos por densidad óptica, la muestra con mayor actividad fue la fracción citosólica inducida a 4°C (Figura 17 Carril 3), incluso mayor que la obtenida en las muestras de la fracción de restos celulares. Este resultado indica que bajar la temperatura a 4°C ayuda a estabilizar la enzima y aunque se obtenga menor concentración de proteína ($19.9 \mu\text{g}$ proteína) se va a tener una mayor actividad lítica (6.45 densidad de banda/ μg proteína). En este caso de la muestra de citosol inducida a 4°C se obtuvieron $17.9 \mu\text{g}$ proteína mientras que de la fracción citosólica inducida a 37°C se obtuvieron $39 \mu\text{g}$ proteína, sin embargo, la mejor condición fue la inducción a 4°C ya que la relación entre la densidad de banda y la concentración de proteína (con un valor de 6.45) fue la más alta.

Tabla 10. Relación de la concentración de proteína con la densidad de imagen de acuerdo a la variación de temperatura de inducción.

Fracción	Citosol 37°C	Citosol 4°C	Restos celulares 37°C	Restos celulares 4°C
μg proteína por carril	39.0	17.9	48.1	37.7
Densidad relativa de banda	113.5	115.5	134.9	142.6
Densidad de banda/μg proteína	2.91	6.45	2.80	3.78

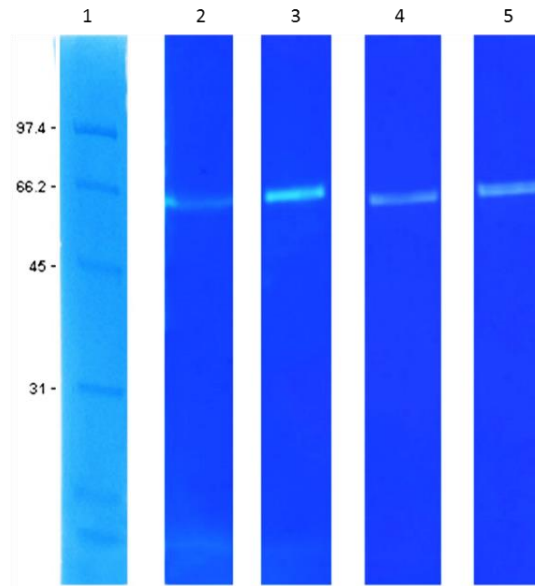


Figura 17. Zimograma contra *M. lysodeikticus* con la variación de temperatura de inducción de la subclona p22AmiN123. Carril 1, marcador de bajo peso molecular; carril 2, citosol a 37°C; carril 3, citosol a 4°C; carril 4, restos celulares a 37°C; carril 5, restos celulares a 4°C.

Con los resultados obtenidos se determinó que para generar el espectro antibacteriano se utilizará el amortiguador Tris-HCl pH= 8 con una temperatura de incubación de 4°C después de agregar el inductor (IPTG 0.4 mM).

6.4 Determinación de actividad específica para las cuatro subclonas

Campos (2015) planteó que la región intermedia es importante para llevar a cabo la catálisis ya que ninguna de las construcciones que contenían sólo el dominio catalítico presentaron actividad lítica en zimograma, además en la secuencia de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 no se encuentra ningún dominio de unión a peptidoglucano. Con esta información se planteó hacer pruebas espectrofotométricas de actividad específica comparando entre sí las cuatro subclonas de cada dominio. Los cálculos de actividad se realizaron de acuerdo con lo indicado por el proveedor de los reactivos utilizados para esta determinación, los ensayos se realizaron por triplicado. Esta prueba

espectrofotométrica se hizo para corroborar los resultados obtenidos en los zimogramas contra *M. lysodeikticus* y se obtuvo lo siguiente.

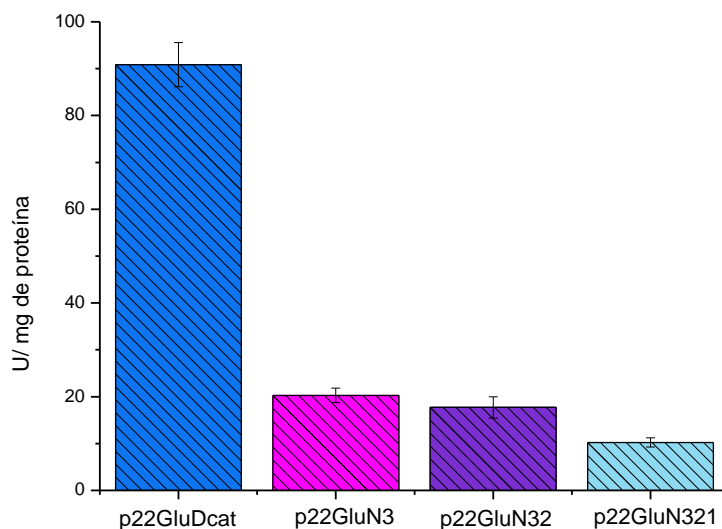


Figura 18. Actividad con sustrato específico de la fracción citosólica de las subclonas del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa.

La subclona con mayor actividad, medida mediante una prueba espectrofotométrica con sustrato específico, es la subclona p22GluDcat (Figura 18). Se infiere que esto se debe a que el sustrato en solución es fácilmente hidrolizado por el dominio catalítico. Este resultado difiere a lo que sucede en el zimograma contra *M. lysodeikticus*, en donde la clona con mayor actividad fue p22GluN32 (Figura 12). Es decir, cuando el sustrato (NP-GlcNAc) se encuentra en solución la subclona que contiene sólo el dominio catalítico presenta más actividad, pero cuando se emplea un método con células de microorganismos de prueba embebidas en un gel es necesario que la subclona contenga una parte de la región intermedia para poder llevar a cabo la catálisis.

Estos resultados sugieren que la región intermedia tiene alguna función en el plegamiento de la proteína o en la afinidad al sustrato, ya que, en las pruebas con células (zimograma contra *M. lysodeikticus*), sólo cuando está presente dicha región la enzima es capaz de hidrolizar el peptidoglucano.

No se tiene mucha información acerca de esta región inter-dominios, sin embargo, Campos (2015) realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en el que las secuencias con las cuales alinearon contienen dominios de unión a peptidoglucano. Además es una secuencia muy conservada en el género *Pediococcus*, pero que también alinea con peptidoglucano hidrolasas de otras bacterias lácticas. como *Enterococcus* y *Lactobacillus*. Cabe mencionar que la región de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa está contenida dentro de un dominio conservado denominado PGRP Superfamily (Peptidoglycan Recognition Proteins) el cual está definido en la base de datos (NCBI Conserved Domain Search) como una región de aminoácidos los cuales se unen, y en algunos casos hidrolizan, al peptidoglucano de la pared celular. Este dominio conservado contiene sitios de unión a sustrato, los cuales podrían estar interactuando con el peptidoglucano de la pared celular.

Los tres aminoácidos mayoritarios en la región intermedia, que representan el 40% del total de la secuencia, son los siguientes: asparagina 23%, glicina 9.5% y serina 8.5%. No existen reportes que indiquen que estos aminoácidos, por sus características fisicoquímicas, estén involucrados en alguna interacción con la pared celular y aunque la glicina tiene propiedades adherentes no es posible saber si a esta escala favorezca en la unión al sustrato. Más adelante, en la Tabla 11, se muestra uno de los varios reportes que indican que la actividad lítica de las peptidoglucano hidrolasas se ve favorecida por la presencia de dominios conservados [Bourgeois *et al*, 2008; Yokoi *et al*, 2008]. Complementando los resultados de la actividad espectrofotométrica con sustrato específico y la actividad en zimografía obtenidos en este trabajo se puede decir que la secuencia intermedia rica en asparaginas de esta peptidoglucano hidrolasa bifuncional favorece la actividad lítica facilitando la unión o reconocimiento al peptidoglucano.

Se tiene interés principalmente en que la enzima tenga más actividad sobre células que sobre un sustrato específico por lo que la construcción con la que se generará el espectro antimicrobiano será con p22GluN3N2 ya que es la que presentó mayor actividad en zimograma.

Los resultados de las pruebas de actividad del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa se muestran en la siguiente gráfica (Figura 19):

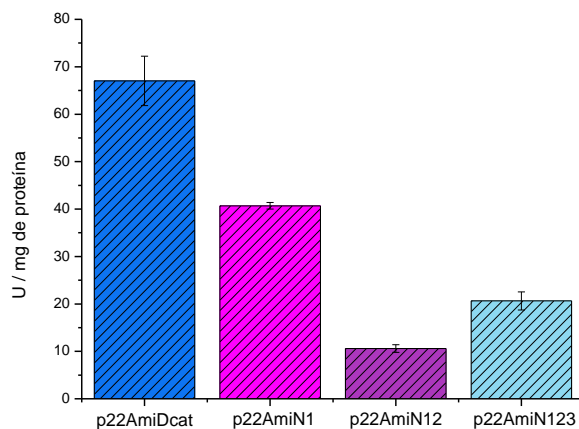


Figura 19. Actividad con sustrato específico de la fracción citosólica del dominio de *N*-acetil muramil-*L*-alanina amidasa.

Estos resultados son muy parecidos a los que se obtuvieron con el dominio de *N*-acetil glucosaminidasa ya que la subclona con mayor actividad en la prueba espectrofotométrica con sustrato específico fue p22AmiDcat, la cual sólo contiene el dominio catalítico. Sin embargo la única subclona que presentó actividad en gel fue la que contenía toda la región intermedia, p22AmiN123. Aunque no se tiene suficiente información para saber el mecanismo de funcionamiento de la región intermedia, estos resultados muestran que ayuda de alguna manera a que la enzima llegue al sustrato (peptidoglucano) y se lleve a cabo la catálisis.

6.5 Determinación de actividad antimicrobiana de las diferentes subclonas

Se realizaron varios tipos de prueba para determinar actividad antimicrobiana pues si sólo se analizan halos de inhibición por difusión en agar puede haber interferencia por la naturaleza y consistencia de los geles de agar, que derivan en resultados alterados.

6.5.1 Pruebas de inhibición por difusión en agar

Se realizaron ensayos de difusión en agar contra los siguientes microorganismos: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. paracasei*, *P. acidilactici*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*. De éstos, se obtuvieron resultados positivos de p22GluN3N2 contra: *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Figura 20), y de p22AmiN123 contra: *E. faecalis* y *L. paracasei* (Figura 21). Estos ensayos se hicieron por lo menos dos veces.

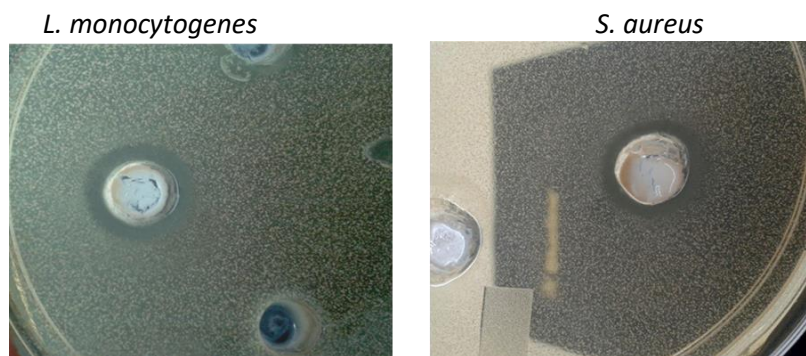


Figura 20. Inhibición de cepas bacterianas por **p22GluN32**

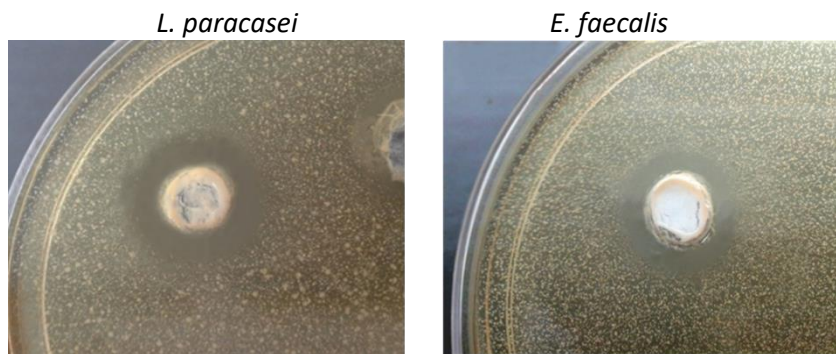


Figura 21. Inhibición de cepas bacterianas por **p22AmiN123**

El tamaño de los halos de inhibición en relación a la cantidad de proteína adicionada permite tener una idea de la susceptibilidad de los microorganismos a esta enzima. En este caso (Figura 20), podemos observar que, de las dos cepas que presentaron resultado positivo para GluN32, *S. aureus* es la menos susceptible. Sin embargo, es relevante que la enzima tenga efecto inhibitorio

contra ésta ya que *S. aureus*, por su facilidad para formar biopelículas en presencia de materia orgánica, ha sido descrito como un agente causal de un amplio espectro de infecciones humanas que van desde infecciones menores a enfermedades potencialmente mortales, como la osteomielitis, endocarditis y sepsis, incluyendo varios síndromes asociados con la producción de enterotoxinas y exotoxinas. Además la intoxicación alimentaria estafilocócica (gastroenteritis estafilocócica) está considerado como una de las enfermedades transmitidas por los alimentos más frecuentes en todo el mundo [Jaglig *et al*, 2014]. Esta misma PGH tuvo actividad inhibitoria contra *L. monocytogenes* el cual es un patógeno causante de listeriosis y puede ser una fuente de contaminación de una amplia gama de alimentos crudos y procesados, este microorganismo es capaz de resistir y crecer bajo un rango amplio de condiciones ambientales incluyendo pH (4.3-9.6), temperatura (1-45°C), sal (hasta 10% de NaCl) y la actividad acuosa (a_w hasta 0.93) [Jaglig *et al*, 2014].

Como ya se describió en la introducción, el peptidoglucano se compone de hebras de glicano que se forma de restos alternantes de ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc) y *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) reticulada por péptidos cortos. El residuo *D*-lactoil del MurNAc está sustituido por un pentapéptido que termina en *D*-Ala-*D*-Ala o que termina en *D*-Ala-*D*-Lac (*D*-Lac, *D*-lactato), cuya composición en lactobacilos, en su forma no modificada, es *L*-Ala (1) -*gD*-Glu (2) - (*L*-Lys o meso-A2pm o *L*-Orn) (3) -*D*-Ala (4) - (*D*-Ala o *D*-Lac) (5) [2,6 diaminopimelato (A2pm); Ornitina (Orn)]. Muchas modificaciones de esta composición básica se encuentran en las hebras de glicano y sus péptidos de tallo asociados. En lactobacilos, se han reportado *N*-desacetilación de GlcNAc/MurNAc (*L. fermentum*) y la 6-O-acetilación de MurNAc (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* y *L. fermentum*) como mecanismo de defensa [Kleerebezem *et al*, 2010]. Su composición no varía en la posición 1 por lo que se puede inferir que la estructura no es relevante para que la amidasa lleve a cabo la catálisis. Además se entiende que la amidasa tenga actividad contra bacterias ácido lácticas por la similitud de la cepa origen con las cepas blanco [Vollmer *et al*, 2008].

Enterococcus ocupa actualmente el tercer lugar entre los patógenos Gram-positivos que causan infecciones asociadas a los hospitales en los Estados Unidos, causando hasta el 10% de las infecciones nosocomiales. En los últimos años, *Enterococcus faecium* multirresistente ha reemplazado a *Enterococcus faecalis* como las principales especies enterocócicas nosocomiales. Debido a la resistencia endógena y adquirida a muchos compuestos antimicrobianos, el tratamiento de las infecciones causadas por *E. faecium* es cada vez más difícil y se necesitan nuevos objetivos para los antibióticos y estrategias de vacunación [Bychowska *et al*, 2011; Kumariya *et al*, 2015]. Tal vez esta resistencia mayor esté relacionada con el hecho de que *E. faecalis* si fue inhibido por la subclona p22AmiN123 mientras que esta misma construcción no tuvo efecto inhibitorio contra *E. faecium*. Sólo se presentó inhibición de *E. faecium* con la fracción de restos celulares de esta subclona (datos no mostrados) por lo que se puede inferir que la especie tiene alguna variación estructural o composicional en el peptidoglucano y que se necesita una mayor cantidad de enzima para lisar las células, recordemos que la enzima se quedaba adherida al PG de la membrana celular de la cepa de expresión (Rosetta 2 (DE3) pLys) por lo que la fracción de restos celulares presentaba una mayor actividad inhibitoria en difusión en agar.

De la información que se encontró en la literatura, Yokoi (2008) reporta una autolisina putativa de *Staphylococcus warneri* M con actividad bifuncional de *N*-acetil muramil-*L*-alanina amidasa y *N*-acetil glucosaminidasa. Ésta enzima fue subclonada y el espectro antimicrobiano, por método de zimograma midiendo la actividad relativa, que reportan se muestra en la tabla 11. Las unidades de ésta actividad es en porcentaje, tomaron como punto de partida que la actividad de Zamiatwm contra *S. warnei* M era un 100% y a partir de eso calcularon la actividad contra los demás microorganismos evaluados.

Tabla 11. Espectro antimicrobiano *Zami_{atlw}m y **Zglu_{atlw}m [Tomado y modificado de Yokoi et al, 2008].

Microorganismo de prueba	Zami _{atlw} m	Zglu _{atlw} m
<i>Staphylococcus aureus</i> RN4220	175.8	96.2
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM2151	133.9	17.4
<i>Lactobacillus gasseri</i> JMC 1130 (ATCC 19992)	24.0	30.9
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> IAM 1045	146.6	42.3
<i>Lactococcus lactis</i> C2	106.3	22.3
<i>Enterococcus hirae</i> IAM 1262	32.1	24.8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	129.4	47.1
<i>Bacillus subtilis</i> Murburg 168	152.7	134.7
<i>Micrococcus luteus</i> IAM 1056	100.2	94.9

*Zami_{atlw}m : Subclona del dominio de N-acetil-L-alanina amidasa de *Staphylococcus warnei* M.

**Zglu_{atlw}m : Subclona del dominio de N-acetil glucosaminidasa de *Staphylococcus warnei* M.

Mellroth y Steiner (2006) reportan una N-acetil muramoil L-alanina amidasa, llamada PGRP-SBI (conservada en mamíferos y plantas), que tiene actividad antimicrobiana y al parecer es altamente activa contra *Bacillus mesenteroides* pero no se detectó actividad contra otras especies de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. brevis*, *B. cereus*, etc.) ni tampoco contra *S. aureus*, *M. luteus*, *S. pyrogenes* y *S. faecalis*. Estos ejemplos muestran que aunque la enzima pertenezca a las N-acetil muramoil L-alanina amidasa la susceptibilidad de los microorganismos blanco es cambiante, en el ejemplo de la tabla 11 *S. aureus* es más susceptible a amidasa, sin embargo N- acetilglucosaminidasa también presenta un valor alto contra éste. En cuanto a bacterias ácido lácticas hay un comportamiento similar entre el dominio de amidasa de la referencia y p22Amin123 ya que éstas presentan mayor actividad que el dominio de glucosaminidasa. Cabe mencionar que hay otros reportes de efecto inhibitorio de glucosaminidasa contra *S. aureus* y Gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa* [Hussain, et al, 1991].

Adicionalmente se hizo difusión en agar mezclando, a partes iguales de concentración de proteína, las subclonas de ambos dominios; p22AmiN123 + p22GluN32. Cuando se hizo la mezcla aumentó la actividad inhibitoria contra las bacterias lácticas *E. faecalis* y *L. paracasei* a pesar de que no se presentó actividad de p22GluN32 contra éstas cuando se hizo el ensayo únicamente con esta subclona, por lo que puede ser que tengan sinergia para actuar contra algunos patógenos. De manera contraria, cuando se utilizó la mezcla contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* la actividad no aumentó respecto a la que ya presentaba p22GluN32, lo que sugiere que el dominio de *N*-acetil muramil-*L*-alanina amidasa proveniente de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 no tiene afinidad por estas dos cepas patógenas. En la figura 22 se muestran estos resultados, en color azul marino se representa la actividad de la subclona p22AmiN123, en color azul claro la actividad de p22GluN32 y en color morado la actividad de la mezcla de estas dos subclonas. Más adelante en la Tabla 12 se muestran los valores de actividad inhibitoria (en mm/mg de proteína) de cada dominio, de la mezcla de estos y de los trabajos realizados en investigaciones previas por García Cano (2011 y 2015).

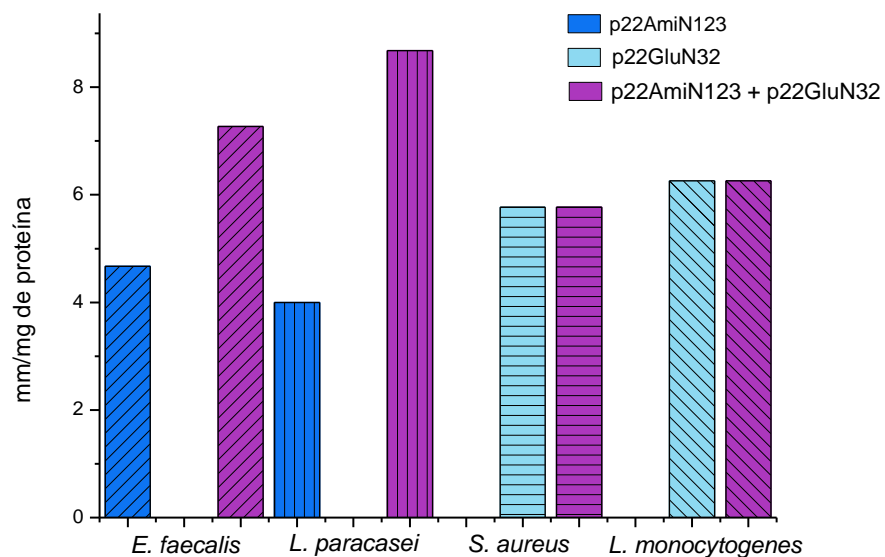


Figura 22. Comparación de la actividad inhibitoria de las subclonas de ambos dominios y la mezcla de las mismas por el método de difusión en agar (unidades: mm/mg de proteína). A p22GluN32. B p22GluN123. C Mezcla de p22GluN32 y p22AmiN123.

Tabla 12. Inhibición de cepas bacterianas por PGHs. Método: difusión en agar. Unidades: mm/mg de proteína

Cepa	Extracto con las PGHs 99 y 110 kDa [García-Cano <i>et al</i> , 2011]	PGH recombinante de 99 kDa [García-Cano <i>et al</i> , 2015]	Subclona p22AmiN123	Subclona p22GluN32	Mezcla p22AmiN123 + p22GluN32
Gram-positivas					
<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	79.2	24.7	4.0	---	8.7
<i>Enterococcus faecalis</i> QB	88.9	19.9	5.7	---	7.3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	180.2	11.4	---	5.8	5.8
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	77.8	23.6	---	6.3	6.3
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	89.6	22.1	---	---	---
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	206.4	---	---	---	---
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	127.2	---	---	---	---
Gram-negativas					
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 27853	200.6	---	---	---	---
<i>Escherichia coli</i> DH5 α /	76.6	---	---	---	---
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	---	---	---	---	---

Las diferencias en la estructura de la pared celular entre Gram-positivas y las especies Gram-negativas hacen a este último grupo insensible a la lisis por algunas endolisinas aplicadas externamente. A pesar de que la capa de PG en especies Gram-negativas es mucho más delgada en comparación con la PG de bacterias Gram-positivas, su membrana externa posee una barrera impermeable para moléculas hidrófilas de mucho menor tamaño que estas enzimas, lo que protege a la capa peptidoglucano de la acción lítica de endolisinas [Briers *et al*, 2015]. En investigaciones previas del grupo de trabajo se ha visto que la proteína de 99 kDa no tiene efecto contra las Gram-negativas que se probaron [García-Cano 2013]. Las pruebas de esta investigación incluyeron éstas cepas, con el propósito de corroborar que la enzima no tiene efecto lítico sobre éstas.

En investigaciones previas se ha visto que el extracto que contiene ambas enzimas tiene un espectro de inhibición mayor que solo la proteína de 99-kDa, mientras que la proteína de 110-kDa aún está en estudio y por lo tanto aún no se sabe si una actividad dependa de la otra o si el efecto de inhibición sea una sinergia. La susceptibilidad de las cepas blanco es menor cuando la actividad de la peptidoglucano hidrolasa se hace más específica.

6.5.2 Determinación de densidad óptica

Para validar la técnica de Yuan y Lee (2002) se hizo una curva de referencia en la que se evaluó la actividad de lisozima (10 µg/mL) contra *M. lysodeikticus*.

Una vez hecha esta curva que se corroboró que los tiempos de medición las medidas en cuanto a amortiguadores, muestra y enzima eran adecuados, la actividad antimicrobiana por densidad óptica fue evaluada para ambas subclonas, para p22GluN32 (resultados no mostrados) y para p22AmiN123, se evaluó la actividad de ambas contra las cepas en las cuales ya se habían visto resultados positivos con la difusión en agar, *L. paracasei*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Cabe mencionar que estas pruebas se hicieron paralelamente al método por difusión en agar para determinar cuál era el más adecuado. Una de las ventajas de este método es que se puede identificar si el efecto es bactericida o

bacteriostático. Tomando en cuenta que una unidad (U) es igual a 0.001 Δ Abs/tiempo se calculó la actividad específica respecto a la concentración de proteína, así los datos tratados se muestran en la siguiente gráfica (Figura 23):

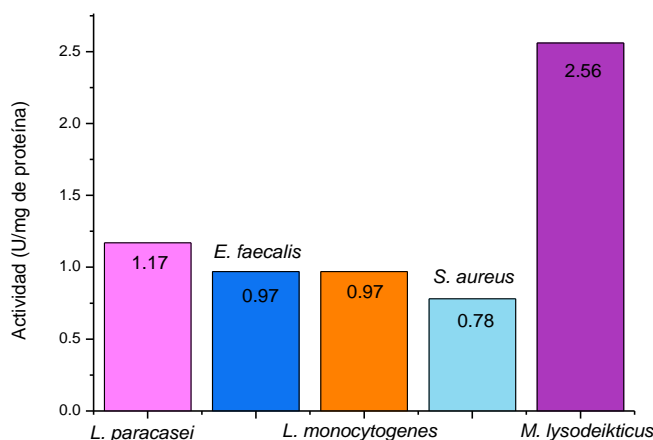


Figura 23. Actividad específica p22Amin123.

La actividad específica de la clona p22Amin123 es mayor contra *M. lysodeikticus*, una cepa liofilizada con la que está descrito el método de Yuang (2002), que también se refleja en los zimogramas, sin embargo no se puede ver una diferencia importante entre las distintas cepas. Entre *L. paracasei* y *L. monocytogenes* (que son los valores más alejados) sólo hay una diferencia de 0.39 Unidades, aparentemente los valores de ésta actividad reflejan poca eficiencia de la enzima porque hay poca disminución en la densidad óptica, sin embargo, en conjunto con los resultados obtenidos con la prueba de difusión en agar se puede decir que hay un efecto bacteriostático. Se optó por repetir el experimento pero ésta vez con una duración de 80 min haciendo una lectura cada 2 minutos (resultados no mostrados). En este ensayo extendido se obtuvieron resultados similares a los de la prueba de 15 minutos por lo que, para intereses de esta investigación, esta metodología sirvió como un respaldo alternativo para el método de difusión en agar.

6.5.2 Zimogramas

Adicionalmente a la prueba de difusión en agar, se realizaron zimogramas al 12% contra distintas cepas bacterianas Gram-positivas; *L. paracasei*, *L. innocua*, *S. aureus* y *E. faecalis*. A continuación se muestran los geles realizados con distintas fracciones de la subclona p22GluN32.

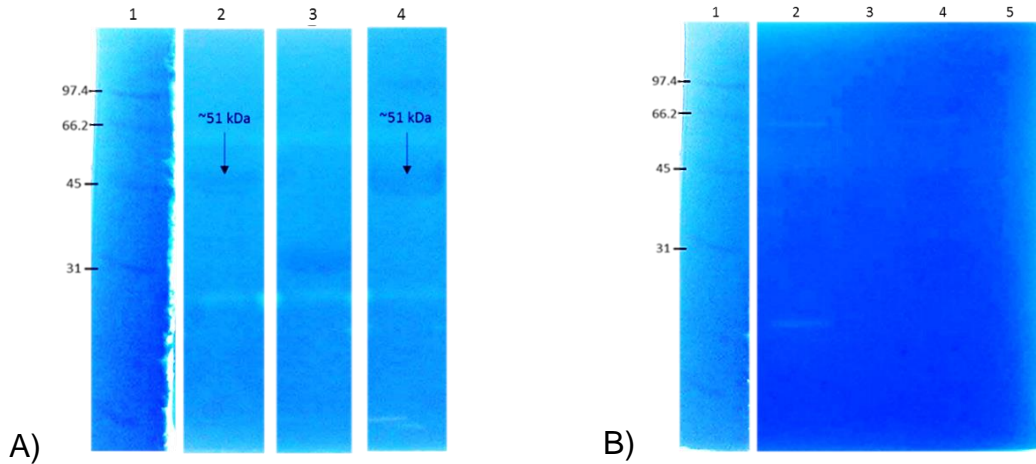


Figura 24. A) Zimograma contra *L. paracasei*. Subclona p22GluN32. Carril 1, marcador de bajo peso molecular; carril 2, citosol; carril 3, sobrenadante; carril 4, restos celulares. **B)** Zimograma contra *E. faecalis*. Subclona GluN32. Carril 1, marcador de bajo peso molecular; carril 2, citosol; carril 3, sobrenadante; carril 4, restos celulares; carril 5, restos celulares.

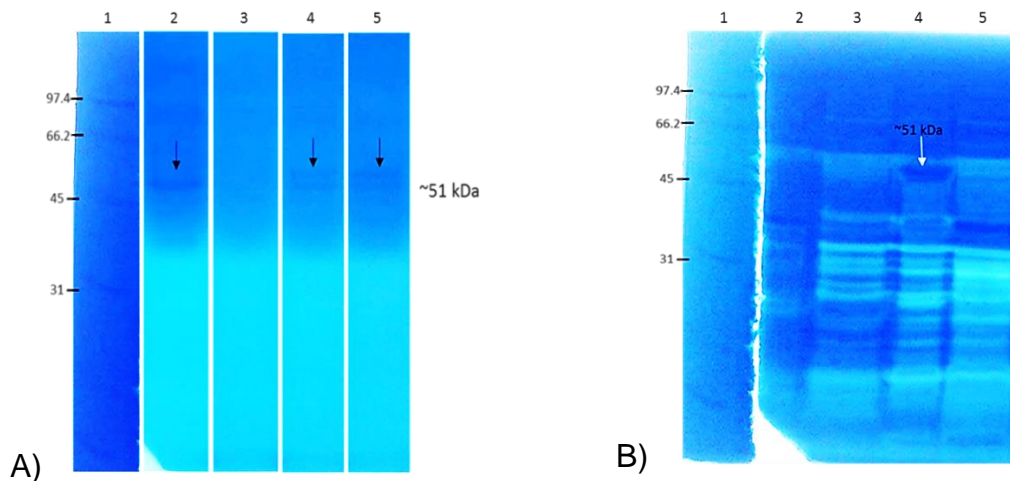


Figura 25. A) Zimograma contra *S. aureus*. Subclona GluN32. Carril 1, marcador de bajo peso molecular; carril 2, citosol; carril 3, sobrenadante; carril 4, restos celulares; carril 5, restos celulares. **B)** Zimograma contra *L. innocua*. Subclona GluN32. Carril 1, marcado de bajo peso molecular; carril 2, sobrenadante; carril 3, citosol; carril 4, restos celulares; carril 5, restos celulares dil 1:10.

No se encontró actividad contra *L. paracasei*, incluso la enzima de interés se marca en bandas a las altura de 51 kDa (inciso A figura 24). Se puede observar actividad lítica a menos de 31 kDa, esto se debe a que la muestra no está pura y el método es muy sensible. No hay actividad en zimograma contra *E. faecalis* para todas las fracciones recolectadas de la muestra GluN3N2 del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa (inciso B figura 24).

El gel en el que el microorganismo blanco es *S. aureus* se puede ver una banda de color azul intenso (inciso A figura 25), ésta puede ser la proteína de interés en citosol y restos celulares (carriles 1, 3 y 4), además la actividad lítica está por debajo de 45 kDa. La actividad contra *L. innocua* se observan bandas de actividad, sin embargo, en el carril 3 donde se cargaron restos celulares se puede observar una banda intensa de la proteína sin actividad, en el resto del gel se ven bandas de actividad que puede corresponder a otras proteínas propias de la cepa de expresión *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS, por una posible modificación postraduccional o por degradación de la proteína de interés (inciso B figura 25) [Mora *et al*, 20003].

7 Conclusiones

Se evaluaron diversas condiciones de lisis y se decidió trabajar con el buffer Tris-HCl pH=8 con una temperatura de 4°C después de agregar el inductor, debido a que se obtiene mayor concentración de proteína en la fracción citosólica y mayor actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus*.

Las clonas que tuvieron mayor actividad en la prueba espectrofotométrica con sustrato específico fueron las que sólo contenían el dominio catalítico, sin embargo, las que tuvieron mayor actividad en zimograma fueron las que contenían por lo menos dos partes de la región intermedia por lo que se puede inferir que la región intermedia rica en asparaginas juega un papel importante en la actividad, favoreciendo la interacción entre el peptidoglucano y el sitio catalítico.

Se seleccionaron las subclonas p22AmiN123 y p22GluN32 para determinación del espectro antimicrobiano al ser las que mostraron mayor actividad lítica en zimogramas.

Por el método de difusión en agar se encontró actividad antimicrobiana de la subclona p22GluN3N2, del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa, contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* y de la subclona p22AmiN123, del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa, contra *L. paracasei* y *E. faecalis*. Cuando se mezclaron ambas enzimas hubo un aumento en la actividad contra las bacterias ácido lácticas (*L. paracasei* y *E. faecalis*) lo que sugiere que el dominio de *N*-glucosaminidasa, aunque por sí sólo no tiene efecto contra éstas, si tiene un impacto sobre las mismas. La mezcla de ambas enzimas comparada con la enzima recombinante completa de 99 kDa tiene el mismo espectro, a excepción de que ésta última también tiene actividad contra *P. acidilactici*.

8 Bibliografía

- Anzengruber, J., Courtin, P., Claes, I. J. J., Debreczeny, M., Obinger, C., Vanderleyden, J., & Schäffer, C. (2014). Biochemical characterization of the major N -acetylmuramidase from *Lactobacillus buchneri*, *Microbiology* 160(08), 1807–1819.
- Appendinia P., Hotchkissb J., (2002) Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3 Ž2002. 113_126.
- Barbosa P. (2015) Diseño y validación de un método zimográfico para la caracterización de una enzima con actividad de N-acetilglucosaminidasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Bourgeois, I., Camiade, E., Biswas, R., Courtin, P., Gibert, L., Pons, J., & Pestel-caron, M. (2008). Characterization of AtlL , a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N -acetylglucosaminidase and N -acetylmuramoyl- L -alanine amidase activities. *FEMS Microbiology Letters*. 290: 105-113
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
- Briers Y., Lavigne R. (2015). Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiology Review*. 10 (3): 377-390.
- Bychowska, A., Theilacker, C., Czerwicka, M., Marszewska, K., Huebner, J., Holst, O., Kaczyn, Z. (2011). Chemical structure of wall teichoic acid isolated from *Enterococcus faecium*. *Carbohydrate Research* 346, 2816–2819.
- Campos M. (2015) Caracterización molecular de la peptidoglucano hidrolasa bifuncional de 99 kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM, México D.F.

- Callewaert L., Walmagh M., Michels C., Lavigne R. (2011) Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*. 22: 164-171.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal* 14, 273–285.
- de Pedro, M. A., & Cava, F. (2015). Structural constraints and dynamics of bacterial cell wall architecture. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), 1–10.
- Clarke, A. J. (2014). Chemical biology of peptidoglycan acetylation and deacetylation. *Bioorganic Chemistry*, 54, 44–50.
- Frirdich, E., & Gaynor, E. C. (2013). Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 16(6), 767–778.
- García P., Rodríguez L., Rodríguez A., Martínez B. (2010) Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology*. 21:373-382
- García-Cano I. (2013) Peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042: Detección, localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- García-Cano I., Serrano-Maldonado C., Olvera-García M., Delgado E., Peña C., Mendoza G., Quirasco M. (2014) Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT - Food Science and Technology*. 59: 26-34.
- García-Cano I., Velasco-Pérez L., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Mendoza-Hernández G., Llorente-Bousquets A., Farrés A. (2011) Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology*. 111: 607-615.
- García-Cano I., Campos-Gómez M., Contreras-Cruz M., Serrano-Maldonado E., González-Canto A., Peña-Montes C., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Farrés A. (2015) Expression, purification, and characterization

of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-015-6593-2.

- Guan R., Roychowdhury A., Ember B., Kumar S., Boons G., Mariuzza R. (2004) Structural basis for peptidoglycan binding by peptidoglycan recognition proteins. *PNAS*. 101(49): 17168-17173.
- Hayhurst, E. J., Kailas, L., Hobbs, J. K., & Foster, S. J. (2008). Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14603–8.
- Hussain, A.M., Daniel, R.C.W. & Frost, A.J. (1992). The bactericidal effect of N-acetyl- β -D-glucosaminidase on bacteria. *Veterinary Microbiology*, 32, 75-80.
- Jaglic Z., Desvaux M., Weiss A., Nesse L., Meyer R., Demnerova K., Schmidt H., Giaouris E., Sipailiene A., Teixeira P., Kacaniova M., Riedell C., Knøchel S. (2014) Surface adhesins and exopolymers of selected food borne pathogens. *Microbiology* 160, 2561-2582.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., & Bron, P. A. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 199–230.
- Kumariya, R., Sood, S. K., Rajput, Y. S., Saini, N., & Garsa, A. K. (2015). Increased membrane surface positive charge and altered membrane fluidity leads to cationic antimicrobial peptide resistance in *Enterococcus faecalis*. *BBA - Biomembranes*, 1848(6), 1367–1375.
- Leclerc, D., & Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrilamide gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 749-753.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science Technology* 15, 67-78.
- Lilie, H., Schwarz, E., & Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 497–501.

- Maria-Neto, S., de Almeida, K. C., Macedo, M. L. R., & Franco, O. L. (2015). Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: from the surface to deep inside. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848(11), 3078–3088.
- McKee, T., y McKee J.R. (2003). *Bioquímica: La base molecular de la vida*. Madrid: Editorial Mc Graw Hill. 861 p.p.
- Mellroth, P., Steiner, H. (2006). PGRP-SB1: An N –acetylmuramoyl L-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochemical and Biophysical Communications* 350, 994–999.
- Mora D., Musacchino F., Fortina M. G., Senini L., Manachini P.L. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 94, Issue 4, Pages 561-570.
- Münch, D., & Sahl, H. G. (2015). Structural variations of the cell wall precursor lipid II in Gram-positive bacteria - Impact on binding and efficacy of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(11), 3062–3071.
- Nelson, D., Cox M. 2005. *Principios de Bioquímica*. Lehninger. 4ª edición. Omega. 1264 pp.
- Olvera-García M., Serrano-Maldonado C. y Maricarmen Quirasco (2015). Detección de Proteínas con Actividad Antibacteriana Producidas por Bacterias Ácido. *BioTecnología*, Vol. 19 No. 1 http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2015_1/acidolacticas.pdf (Consultado 26/09/2015).
- Rodríguez-Alegría M. E., Castillo-Rosales E. (2014). Enzimas aplicadas en procesos industriales. *Revista Digital Universitaria* ISSN: 1607 - 6079 | Publicación mensual diciembre. Recuperado de <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96/> (Consultado 20/11/2016).

- Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A. 2004. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3ª edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos. 635 pp.
- Sanla-Ead N., Jangchud A., Chonhenchob V., Suppakul P. (2012). Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films. *Packaging Technology and Science* DOI: 10.1002/pts.952
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303–310.
- Suckling, C.J., Gibson, C.L. y Pitt, A.R. (1998). Enzyme Chemistry: Impact and applications. Londres: Blackie Academic & Professional.
- Talon, R., Leroy, S., & Champanelle, S. (2014). Fermented Meat Products and the Role of Starter Cultures. *Encyclopedia of Food Microbiology* Elsevier ,Second Edition, Vol. 1, 870-874..
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., & Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 28, 1–8.
- Voet, D., Voet, J.G., y Pratt, C.(2013). Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular. Madrid: Editorial Médica Panamericana
- Vollmer W., Joris B., Charlier P. and Foster S. (2008a) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32: 259–286.
- Vorácková, I., Suchanová, S., Ulbrich, P., Diehl, E.E., y Ruhlml, T. (2011). Purification of proteins containing zinc finger using Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Protein Expression and Purification*, 79(1), 88-95.
- Zhang, X. (2012). Diversity analysis of peptidoglycan hydrolases in lactic acid bacteria and their phages. *International Dairy Journal*, 25(1), 60–65.
- Yokoi, K., Sugahara, K., Iguchi, A., Nishitani, G., Ikeda, M., Shimada, T., Kodaira, K. (2008). Molecular properties of the putative autolysin Atl WM

encoded by *Staphylococcus warneri* M: Mutational and biochemical analyses of the amidase and glucosaminidase domains. *Gene*, 416, 66–76.

- Yuan C., Yang L. (2002) Determination of lysozyme activities in a microplate format. *Analytical Biochemistry* 310, 223-224.
- Zhang, X. (2012). Diversity analysis of peptidoglycan hydrolases in lactic acid bacteria and their phages. *International Dairy Journal*, 25(1), 60–65.