



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

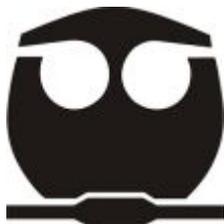
FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio de la actividad peptidoglicano hidrolasa
extracelular nativa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042**

TESIS

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

**PRESENTA:
AMARANTA ITZEL CORONA OSORIO**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesora: **Sandra Pérez Munguía**
VOCAL: Profesor: **Francisco Ruiz Terán**
SECRETARIO: Profesor: **Euclides Avila Chávez**
1er. SUPLENTE: Profesor: **Genaro Jiménez Reyes**
2°SUPLENTE: Profesora: **Amelia Farrés González-Saravia**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 300 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM. Circuito de la Investigación Científica s/n Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Sandra Pérez Munguía

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

SUSTENTANTE:

Amaranta Itzel Corona Osorio

Contenido

Lista de abreviaturas, acrónimos y símbolos	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vi
Resumen	vii
1. Introducción	1
Antecedentes	2
Enunciado problema	3
Hipótesis	3
Objetivos	3
Objetivo general	3
Objetivos particulares	3
2. Marco teórico	4
2.1 Bacterias ácido lácticas	4
2.2 Género <i>Pediococcus</i>	6
2.3 Bioconservación	7
3. Estructura del peptidoglicano	11
3.1 Peptidoglicano hidrolasas	13
3.2 Clasificación y función de las peptidoglicano hidrolasas	15
3.3 Aplicación de las peptidoglicano hidrolasas en alimentos	15
4. Proteasas	17
4.1 Clasificación de las proteasas	17
5. Métodos de purificación y concentración de proteínas	18
5.1 Precipitación de proteínas	18
5.1.1 Fraccionamiento con sulfato de amonio	19
5.1.2 Precipitación con ácido tricloroacético	20
5.2 Diálisis y ultrafiltración	21

6.	Métodos electroforéticos	22
6.1	Antecedentes históricos	22
6.2	Fundamento de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	24
6.3	Zimografía	25
7.	Métodos cromatográficos	27
7.1	Fundamento y clasificación	27
8.	Materiales y metodología	30
8.1	Preparación del medio de cultivo, inóculos y fermentación de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	31
8.1.1	Preparación del MRS modificado	31
8.1.2	Preparación de inóculos y fermentación	31
8.2	Fraccionamiento y concentración de las proteínas del sobrenadante de cultivo	32
8.3	Cuantificación de la proteína soluble por el método modificado de Lowry	32
8.4	Determinación del perfil electrofóretico por SDS-PAGE	33
8.4.1	Detección de la actividad lítica y proteolítica extracelular mediante zimografía	34
8.4.2	Límite de detección de BSA con azul de <i>Coomassie</i> R-250	35
8.5	Purificación mediante cromatografía de intercambio iónico	35
8.5.1	Preparación de las disoluciones amortiguadoras	35
8.5.2	Desarrollo del método y preparación de la muestra	35
9.	Resultados y Discusión	37
10.	Conclusiones	59
11.	Referencias bibliográficas	60

Apéndice A. Comparación del medio MRS original y MRS modificado	72
Apéndice B. Curvas de calibración de albúmina sérico bovina	73
Apéndice C. SDS-PAGE y zimografía. Formulación del gel concentrador y del gel separador	78
Apéndice D. Controles positivos para la detección de actividad lítica y proteolítica	79
Apéndice E. Límite de detección de BSA con azul de <i>Coomassie</i> R-250	80
Apéndice F. Especificaciones de la columna <i>HiPrep</i> SP FF 16/10	81

Lista de abreviaturas, acrónimos y símbolos

aa	aminoácido
Ala	alanina
Ami	dominio N-acetil-L-alanina amidasa
APS	persulfato de amonio (por sus siglas en inglés)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	bacterias ácido lácticas
BLIS	sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (por sus siglas en inglés)
BSA	albúmina sérico bovina (por sus siglas en inglés)
Gluc	dominio N-acetilglucosaminidasa
G+C	contenido de guanina más citosina
CaCl ₂	cloruro de calcio
CHAPS	sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano
CII	cromatografía de intercambio iónico
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (por sus siglas en inglés)
cm	centímetro
CMC	concentración micelar crítica
CO ₂	dióxido de carbono
EE. UU.	Estados Unidos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (por sus siglas en inglés)
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (por sus siglas en inglés)
g	gramo
Glu	ácido glutámico
Gly	glicina
GRAS	generalmente reconocidos como seguros (por sus siglas en inglés)
h	hora
HCl	ácido clorhídrico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno

kDa	kilodalton
KOH	hidróxido de potasio
Lys	lisina
M	molar
<i>m</i> -DAP	ácido <i>meso</i> -diaminopimélico
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MPa	megapascal
MRS	medio de cultivo de De Man-Rogosa-Sharpe
MWCO	corte de peso molecular (por sus siglas en inglés)
N	Normal
NaCl	cloruro de sodio
NAG	<i>N</i> -acetilglucosamina
NAM	ácido <i>N</i> -acetilmurámico
NaOH	hidróxido de sodio
NH ₃	amoníaco
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amonio
nm	nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
p22	vector de expresión
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida (por sus siglas en inglés)
PG	peptidoglicano
PGH	peptidoglicano hidrolasa
pH	potencial de hidrógeno
psi	libras por pulgada cuadrada (por sus siglas en inglés)
QPS	presunción calificada de seguridad (por sus siglas en inglés)
RNA	ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés)

r. p. m.	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
Ser	serina
Std	estándar de peso molecular
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	<i>N, N, N, N</i> -tetrametiletilendiamina
Tris-base	tris (hidroximetil) aminometano
Tritón X-100	polietilenglicol <i>ter</i> -octilfenil éter
Tween 80	monooleato de sorbitán
UF	ultrafiltración
UV	ultravioleta
V	volt
v/v	volumen/volumen
w/v	peso/volumen
°C	grado Celsius
MΩ	megaohm
μg	microgramo
μL	microlitro
μm	micra
%	por ciento
% T	contenido de acrilamida y bisacrilamida
% C	contenido de bisacrilamida

Índice de figuras

Figura 1	Árbol filogenético de las BAL de acuerdo a su secuencia de RNA ribosomal	5
Figura 2	Representación de la estructura del peptidoglicano bacteriano (A). Enlace del ácido <i>N</i> -acetilmurámico y la <i>N</i> -acetilglucosamina en la cadena de glicano y unión del tetrapéptido al ácido <i>N</i> -acetilmurámico (B)	12
Figura 3	Sitios de reconocimiento de las PGH en la pared celular de <i>Escherichia coli</i> (a) y <i>Staphylococcus aureus</i> (b)	16
Figura 4	Principio básico del mecanismo de precipitación de proteínas	18
Figura 5	Mecanismo de diálisis	21
Figura 6	Esquema general de la técnica de zimografía	26
Figura 7	Sistema de cromatografía	28
Figura 8	Principales tipos de cromatografía	29
Figura 9	Diagrama de la estrategia experimental para el estudio de la PGH extracelular de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	30
Figura 10	Perfil de proteínas por SDS-PAGE (10% T). Detección de la actividad lítica termoestable (85 °C/10 min) en medio reductor en <i>Micrococcus lysodeikticus</i> (10% T)	40
Figura 11	Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5% T). Diferentes métodos de tinción de geles de poliacrilamida	41
Figura 12	Actividad proteolítica de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 (12.5% T)	43
Figura 13	Detección de la actividad lítica termosensible en medio no reductor en <i>Micrococcus lysodeikticus</i> y <i>Listeria innocua</i> (16.5% T). Perfil de proteínas por SDS-PAGE (16.5% T)	44
Figura 14	Separación cromatográfica por intercambio catiónico	45

Figura 15	Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5% T). Comparación entre dos métodos de precipitación de proteínas	50
Figura 16	Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5% T). Fracción 70. Detección de la actividad lítica termosensible en medio no reductor en <i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> (12.5% T)	52
Figura 17	Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5% T). Pico I. Detección de la actividad lítica termosensible en medio no reductor en <i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> (12.5% T)	54
Figura 18	Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5% T). Pico II. Detección de la actividad lítica termosensible en medio no reductor en <i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> (12.5% T)	55
Figura 19	Construcción de subclonas a partir de la PGH bifuncional de 99 kDa	56
Figura B1	Curva de calibración de BSA por el método modificado de Lowry (<i>DC Protein Assay</i>)	74
Figura B2	Curva de calibración de BSA por el método modificado de Lowry	76
Figura B3	Curva de calibración de BSA por el método de Bradford (<i>Bio-Rad Protein Assay</i>)	77
Figura D1	Controles positivos de la actividad lítica y proteolítica por zimografía (12.5% T) y perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5% T)	79
Figura E1	Límite de detección de BSA por SDS-PAGE (12.5% T)	80
Figura F1	Columna <i>HiPrep SP FF 16/10</i>	81

Índice de tablas

Tabla 1	Clasificación de bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas	10
Tabla 2	Modificaciones en la cadena de glicano del peptidoglicano	14
Tabla 3	Primer fraccionamiento de las proteínas del sobrenadante de cultivo neutralizado de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	39
Tabla 4	Segundo fraccionamiento de las proteínas del sobrenadante de cultivo neutralizado de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	47
Tabla 5	Comparación entre los distintos métodos utilizados en la cuantificación de proteína de cada una de las fracciones obtenidas a partir del sobrenadante de cultivo neutralizado de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	48
Tabla 6	Estudios de biología molecular sobre las PGH recombinantes de 110 kDa y 99 kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	58
Tabla A1	Formulación del medio MRS	72
Tabla B1	Solución de Cobre-Tartrato-Carbonato para la elaboración del reactivo A	75
Tabla B2	Micrométodo para la cuantificación de proteína con el reactivo de Bradford	77
Tabla C1	Formulación del gel concentrador y del gel separador	78
Tabla F1	Especificaciones de la columna <i>HiPrep</i> SP FF 16/10	81

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad peptidoglucano hidrolasa extracelular nativa producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, potencialmente responsable de la actividad antimicrobiana observada en un sistema modelo cárnico.

La peptidoglucano hidrolasa intracelular de 99 kDa es la enzima mejor caracterizada de *P. acidilactici* ATCC 8042 y presenta un amplio espectro antimicrobiano. Sin embargo, el grupo de trabajo no ha reportado actividad lítica extracelular del microorganismo, en contraste con los recientes estudios en donde se encontró actividad lítica en los sobrenadantes concentrados de cultivo de la misma cepa contra dos microorganismos de importancia sanitaria en alimentos: *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*.

En este estudio, la actividad lítica extracelular se concentró con sulfato de amonio y se purificó por cromatografía de intercambio iónico. En la fracción semipura se detectaron dos bandas con actividad lítica termoestables sobre células de *Micrococcus lysodeikticus* (microorganismo de referencia) de 80 kDa y 14 kDa, pero no en *Listeria monocytogenes* ni en *Staphylococcus aureus*. La mayor actividad correspondió a un perfil de bandas líticas termolábiles de aproximadamente (26, 15, 14 y 13) kDa sobre *S. aureus* y en menor medida sobre *L. monocytogenes*. El bajo rendimiento de la purificación impidió la caracterización de la actividad antibacteriana.

Las subclonas de la enzima bifuncional de 99 kDa mostraron una mayor actividad lítica sobre *M. lysodeikticus*, pero sus pesos moleculares no coinciden con los encontrados en este trabajo. Por lo anterior, las PGH de bajo peso molecular serían las responsables del fenómeno de bioconservación observado en el embutido tipo salami.

1. Introducción

En los últimos años se ha presentado una marcada tendencia por el consumo de alimentos saludables, naturales, orgánicos, listos para su consumo y mínimamente procesados, que demandan desarrollar nuevas estrategias para producir alimentos seguros, libres de conservadores químicos, con vida de anaquel extendida sin la necesidad de aplicar tratamientos térmicos excesivos que pueden afectar las características organolépticas y nutricionales de los alimentos (Anany *et al.*, 2015).

La bioconservación es una estrategia útil en donde los microorganismos combaten a otros microorganismos. Con el fin de inhibir la proliferación de las células rivales los microorganismos producen una amplia gama de compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular o de naturaleza proteínica como las bacteriocinas, sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas y las peptidoglicano hidrolasas. Dichos compuestos pueden ser producidos en el alimento durante la fermentación o se pueden adicionar como extractos crudos concentrados o en su forma pura (Davidson *et al.*, 2015).

Las bacterias ácido lácticas tienen una larga historia de uso en la elaboración de alimentos fermentados por su contribución al sabor, aroma y textura, que le otorgan características únicas al producto final (De Vuyst y Leroy, 2007). Además de que por sus propiedades antimicrobianas extienden la vida útil de los alimentos, las bacterias ácido lácticas están sujetas a continua investigación debido a sus potenciales beneficios relacionados con la salud humana (Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014).

La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, aprueba el uso de las bacterias ácido lácticas o sus metabolitos para mejorar la calidad sanitaria de los alimentos ya que poseen el estatus GRAS (generalmente reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés).

Antecedentes

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 y sus sobrenadantes de cultivo ejercieron un efecto conservador en un sistema modelo cárnico a las 96 h de fermentación. Si bien, el efecto más importante se logró utilizando las células completas, se demostró actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de cultivo, neutralizados y concentrados, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Listeria innocua* ATCC 33099 mediante pruebas de difusión en agar y cuenta en placa, logrando observar el daño celular por microscopía electrónica de barrido (Llorente-Bousquets, 2008). Mediante técnicas electroforéticas, se detectó una banda de actividad lítica sobre *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 de aproximadamente 110 kDa y dos proteasas de 107 kDa y >200 kDa. Ambas actividades fueron consideradas responsables del efecto antibacteriano (Llorente-Bousquets *et al.*, 2008).

Recientemente se encontró en los sobrenadantes de cultivo concentrados de *P. acidilactici* ATCC 8042 actividad lítica contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Munguía-Villavicencio, 2015) y *L. monocytogenes* ATCC 15313 (Del Castillo-Núñez, 2017). Al no haberse encontrado, por técnicas moleculares, el gene responsable de la síntesis de pediocinas (Nes y Holo, 2000; Mora *et al.*, 2003; Llorente-Bousquets, 2008), existe la posibilidad de que la cepa de este estudio produzca sustancias extracelulares diferentes a las bacteriocinas y que la actividad antibacteriana sea debido a la acción de una peptidoglicano hidrolasa (PGH). Las PGH hidrolizan enlaces específicos del peptidoglicano, considerado el talón de Aquiles de la mayoría de las bacterias dada su naturaleza conservada, esencial y accesible (Russell *et al.*, 2011).

Lo anterior permitiría el diseño de nuevas estrategias para combatir a las bacterias causantes del deterioro y de las enfermedades transmitidas por alimentos y de manera particular, a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, incluidas en la lista de patógenos prioritarios que recientemente dio a conocer la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017).

Enunciado problema

¿Produce *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 una peptidoglicano hidrolasa extracelular?

Hipótesis

La actividad antibacteriana presente en los sobrenadantes de cultivo *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 es debido a una peptidoglicano hidrolasa.

Objetivo general

Estudiar la actividad peptidoglicano hidrolasa extracelular nativa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Objetivos particulares

- Obtener sobrenadante libre de células con actividad lítica en el microorganismo de referencia.
- Monitorear las etapas de purificación por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y la actividad lítica y proteolítica mediante zimografía.
- Comparar los resultados con los estudios de las peptidoglicano hidrolasas recombinantes reportadas para determinar si se trata de la misma proteína.
- Determinar si *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 presenta actividad proteolítica extracelular.

2. Marco teórico

2.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos cuya característica principal es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. Son Gram-positivas, no esporulados, catalasa negativo, ácido-tolerantes, aerotolerantes, usualmente cocos o bacilos no móviles con bajo contenido de guanina-citosina (G + C), a excepción de algunas especies pertenecientes a los géneros de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Carnobacterium* (Mozzi, 2016).

A este grupo pertenecen los géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* como se muestra en el árbol filogenético (Leroi, 2010; Khalid, 2011; Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014) (Figura 1).

Las BAL pueden fermentar hexosas como glucosa, manosa, galactosa o fructosa por la vía homofermentativa en la que el producto final es el ácido láctico, o la vía heterofermentativa en la que, además de ácido láctico, se produce etanol (o ácido acético) y CO₂.

La actividad antimicrobiana producida por las BAL se debe principalmente a la producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico y el ácido acético, con la consecuente disminución de pH; por la competencia por nutrientes; producción de diacetilo, CO₂, H₂O₂ y bacteriocinas, entre otros metabolitos (Koch, 2004; O'Bryan *et al.*, 2015).

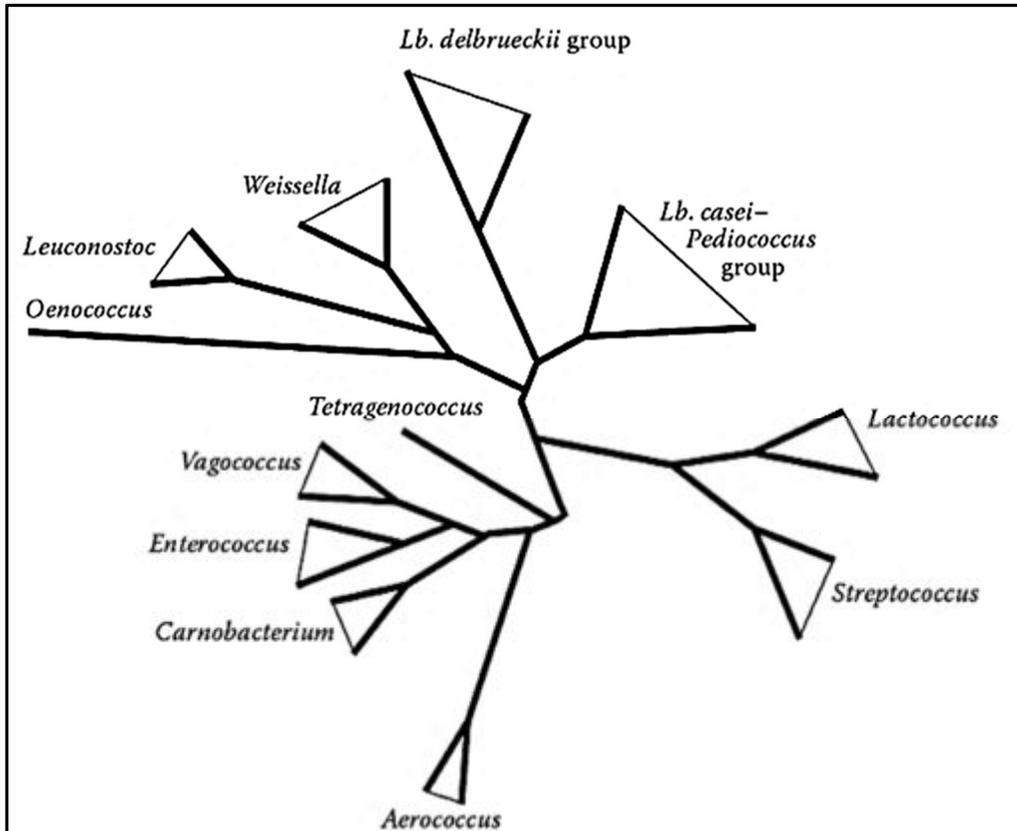


FIGURA 1. Árbol filogenético de las BAL de acuerdo a su secuencia de RNA ribosomal. Fuente: Von Wright y Axelsson, 2012.

Las BAL poseen el estatus GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros, por sus siglas en inglés) por la FDA y de QPS (Presunción Calificada de Seguridad, por sus siglas en inglés) por la Unión Europea, lo que significa que pueden utilizarse sin una previa autorización (Koch, 2004; O'Bryan *et al.*, 2015). En México está autorizado el uso de las BAL y de *Bifidobacterium*¹ para la elaboración de algunos productos lácteos fermentados como el yogurt y como cultivos iniciadores para la maduración de quesos y embutidos.

¹ Algunos autores consideran a *Bifidobacterium* en esta clasificación debido a su actividad probiótica, pero estas bacterias son genéticamente diferentes a las BAL (O'Bryan *et al.*, 2015).

2.2 Género *Pediococcus*

*Pediococcus*² (del griego *pedium*, superficie plana, y *coccus*, baya o grano) son las únicas BAL que se dividen alternadamente en dos direcciones perpendiculares para formar tétradas. Las células son invariablemente esféricas y producen ácido láctico a partir de glucosa, pero no gas (Simpson y Taguchi, 1995). Las 12 especies generalmente reconocidas son: *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus claussenii*, *Pediococcus cellicola*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus* (con dos subespecies *pentosaceus* e *intermedius*), *Pediococcus stilesii*, *Pediococcus argentinicus*, *Pediococcus ethanolidurans*, *Pediococcus lolii* y *Pediococcus siamensis* (De Vos *et al.*, 2009).

Son microorganismos no móviles, anaerobios facultativos, catalasa y bencidina negativos y su temperatura óptima de crecimiento es entre 30°C a 37°C. El pH óptimo de crecimiento es entre 6.5 a 6.0 (Holland *et al.*, 2011; Raccach, 2014). La mayoría de las especies que conforman este género (excepto *P. damnosus*) pueden crecer en presencia de entre 4% y 6.5% de NaCl. Son quimiorganotrofos y requieren ciertos microcomponentes para crecer (vitamina B₁₂, vitamina B₆ y biotina, metionina y lisina, así como magnesio, calcio, zinc y manganeso) (Raccach, 2014).

La mayoría de las pediocinas producidas por *Pediococcus* pertenecen a la clase de bacteriocinas IIa (pediocina PA-1 y pediocina Ach) y son activas contra *Listeria* (Raccach, 2014; Porto *et al.*, 2017). Las pediocinas no son muy efectivas para evitar la germinación de esporas, pero son más efectivas que la nisina en productos cárnicos, por lo que *Pediococcus* se emplea como cultivo iniciador en la elaboración de algunos embutidos como el salami y también como cultivo secundario en la maduración de algunas variedades de quesos (Danilovic *et al.*, 2011; Holland *et al.*,

² El género *Pediococcus* fue descrito por primera vez en 1884 por Wochnschre F. Balcke entre las cepas que deterioraban a la cerveza (Simpson y Taguchi, 1995).

2011; Kołożyn-Krajewska y Dolatowski, 2012). Comercializadas como ALTA® inhiben el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos (Porto *et al.*, 2017).

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 es homofermentativa, capaz de disminuir el pH en los alimentos en los que se desarrolla debido principalmente a la producción de ácido láctico, previniendo o retrasando considerablemente el desarrollo de otros microorganismos competitivos e inclusive algunos patógenos (Llorente-Bousquets, 2008). Se sabe que es una cepa no productora de bacteriocinas (Nes y Holo, 2000; Mora *et al.*, 2003; Llorente-Bousquets, 2008).

2.3 Bioconservación

Los compuestos antimicrobianos se pueden dividir en dos categorías:

- a) compuestos aislados de animales, plantas o microorganismos, por ejemplo: aceites esenciales, bacteriocinas y enzimas/proteínas como lisozima, lactoferrina, protamina y endolisinas.
- b) organismos vivos como bacterias antagonistas y bacteriófagos.

Un antimicrobiano natural debe de reunir varias características: 1) ser efectivo a bajas concentraciones, 2) barato, 3) no debe de modificar las propiedades sensoriales del producto, 4) inhibir a un amplio espectro de microorganismos causantes del deterioro y patógenos y 5) no debe de ser tóxico (Davidson *et al.*, 2015).

La bioconservación es una estrategia útil para extender la vida de anaquel de los alimentos. Con el fin de inhibir la proliferación de las células rivales, los microorganismos producen una amplia gama de compuestos. La mayor parte de las investigaciones sobre bioconservación están enfocadas en el estudio y aplicación de las bacteriocinas (Koch, 2004) y en las sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas

(BLIS³). Estos metabolitos son producidos en diferentes concentraciones dependiendo de la cepa y pueden tener efecto bactericida o sólo bacteriostático. Algunos de estos metabolitos inhiben a una amplia gama de bacterias patógenas, mientras que otras solo muestran actividad contra un número reducido de las mismas (Koch, 2004).

Las bacteriocinas son proteínas de bajo peso molecular de síntesis ribosómica. Su mecanismo bactericida varía e incluye la formación de poros en la membrana e inhibición de la síntesis del peptidoglicano (PG) (Schirru *et al.*, 2014). Se clasifican con base a sus características bioquímicas, a su termoestabilidad, presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales y acción antimicrobiana (Tabla 1) (Ahmad *et al.*, 2017).

La nisina⁴ (3.5 kDa), producida por *Lactococcus lactis* subsp., *lactis*, es el lantibiótico más conocido, es activa contra Gram positivos e inhibe la germinación de esporas de *Clostridium*. La primera preparación comercial fue hecha por Aplin y Barret en 1953. Su uso como conservador en la Industria Alimentaria fue aprobado por la FAO y la OMS en 1969, por la Unión Europea en 1983 (E 234) y adquirió el estatus GRAS por la FDA en 1988. Las cepas de *L. lactis* productoras de nisina se utilizan como cultivos iniciadores para la producción de queso⁵ Gouda -libre de nitratos- a fin de evitar el desarrollo de las esporas de *Clostridium tyrobutyricum*, además inhibe el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en queso *Cottage* y en queso *Camembert* (Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2014; O'Bryan *et al.*, 2015).

³ El acrónimo BLIS fue propuesto por Tagg y Ragland (1991) en una serie de estudios epidemiológicos sobre la propagación y supervivencia de estreptococos salivares y estafilococos en superficies como cristal, plástico, etc.

⁴ La propiedad antimicrobiana de la nisina se observó por primera vez en 1928, cuando se encontró que la inhibición de un cultivo lácteo iniciador no era causada por fagos sino por una cepa de *L. lactis* (Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2014).

⁵ La aplicación de la nisina para la conservación de productos lácteos se sugirió en 1951 a fin de evitar la hinchazón tardía del queso tipo suizo (Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2014).

Además de las bien caracterizadas bacteriocinas grado alimentario más abundantes, las de clase I (los lantibióticos, incluida la nisina) y las de clase II (incluidas las bacteriocinas antilisteriales tipo pediocina) los nuevos grupos de péptidos ofrecen oportunidades potenciales para su aplicación en alimentos (Tabla 1) (Elsser-Gravesen y Elsser-Gravesen, 2014).

TABLA 1. Clasificación de bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas.

Clase	Características generales	Subclase	Características particulares	Ejemplos
Clase I	Lantibióticos, péptidos termoestables (< 5 kDa) constituidos por 19-34 aa. Contienen residuos de aa modificados como lantioninas.	Tipo A	Péptidos elongados anfipáticos con forma de tornillo, con carga positiva.	Nisina (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>) Lacticina S (<i>Lactobacillus sake</i> L45)
		Tipo B	Péptidos globulares y compactos, con carga negativa o neutros.	Mutacina II (<i>Streptococcus mutans</i> T8)
Clase II	No-lantibióticos, péptidos termoestables (< 10 kDa) constituidos por 37-58 aa con alto contenido de glicina que no contienen aa modificados.	Clase IIa	Bacteriocinas tipo pediocinas producidas principalmente por las cepas de <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> y <i>Enterococcus</i> que tienen actividad contra <i>Listeria</i> .	Acidocina A (<i>Lactobacillus acidophilus</i> TK9201) Bavaricina A (<i>Lactobacillus sake</i> M1401) Pediocina PA-1 (<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0)
		Clase IIb	Bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos.	Lactococina G (<i>Lactococcus lactis</i>) Lactacina F (<i>Lactobacillus johnsonii</i>) Plantaricina J/K (<i>Lactobacillus plantarum</i>)
		Clase IIc	Bacteriocinas cíclicas cuyos extremos amino y carboxilo están unidos covalentemente.	Acidocina B (<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46) Gasericina A (<i>Lactobacillus gasseri</i> LA39) Uberolisina (<i>Streptococcus uberis</i> 42)
		Clase II d	Péptidos lineales de un solo componente, tipo no pediocina.	Lacticina Z (<i>Lactococcus lactis</i> QU14) Carnobacteriocina A (<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A) Enterocina Q (<i>Enterococcus faecium</i> L50) Helveticina J (<i>Lactobacillus helveticus</i> 481) Enterolisina A (<i>Enterococcus faecalis</i>) Lactococina 972 (<i>Lactococcus lactis</i> IPLA) Lisostafina (<i>Staphylococcus simulans</i> subsp. <i>staphylolyticus</i>)
Clase III	Proteínas termolábiles (> 30 kDa).		Mayormente producidas por el género <i>Lactobacillus</i> .	
Clase IV	Proteínas con modificaciones postraduccionales.		-	Lacestrepsina (<i>Streptococcus lactis</i>) Lactocina 27 (<i>Lactobacillus helveticus</i> LS18)

Adaptado de Kaškonienė *et al.*, 2017.

3. Estructura del peptidoglicano

La pared celular le confiere a la célula su forma y protección frente a la presión osmótica. La estructura superficial de las bacterias contienen compuestos únicos (ácido murámico, α , ϵ -ácido diaminopimélico⁶, D-aminoácidos, ácidos teicoicos, etc.) (Madigan *et al.*, 2009). Aunque se conocen más de 100 variaciones en la composición química del peptidoglicano (PG) de las bacterias (mureína⁷) esencialmente su estructura es la misma (Hammond *et al.*, 1984; Labischinski y Maidhof, 1994).

El PG es un heteropolímero constituido por cadenas lineales de hasta 200 unidades repetidas del disacárido de *N*-acetilglucosamina (NAG) y el ácido *N*-acetilmurámico (NAM), unidos mediante el enlace glicosídico $\beta(1\rightarrow4)$, y por pequeñas cadenas entrecruzadas de oligopéptidos (Figura 2A). El lactilo del NAM está unido a un tetrapéptido de composición conservada: L-alanina (L-Ala), ácido D-glutámico (D-Glu), ácido diaminopimélico (DAP) y D-alanina (D-Ala) (Figura 2B). Los tetrapéptidos unen a dos cadenas de glicano adyacentes para formar la estructura característica del PG (Tortora *et al.*, 2007; Vollmer *et al.*, 2008; Madigan *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2016).

Sólo el análisis detallado del PG de un amplio número de bacterias ha revelado variaciones importantes en su composición química. El ácido *meso*-diaminopimélico (*m*-DAP) se encuentra en todas las bacterias Gram negativas y en algunas Gram positivas (por ejemplo, en *Listeria* y *Bacillus*), pero la mayoría de los cocos Gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Streptococcus*

⁶ El ácido diaminopimélico, es un aminoácido dibásico y dicarboxílico, es precursor de la lisina (Vollmer *et al.*, 2008).

⁷ La pseudomureína de las arqueobacterias está constituida por *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetiltalosaminurónico unidos mediante enlaces $\beta(1\rightarrow3)$ (Hammond *et al.*, 1984).

faecium, *Leuconostoc mesenteroides*) poseen L-lisina (L-Lys) y otras especies contienen L-ornitina, L-ácido diaminobutírico o L-homoserina (Hammond *et al.*, 1984). El residuo del *m*-DAP permite la formación de un enlace peptídico directo (3→4), entre el ε-amino libre de un péptido y el carboxilo de la D-Ala de un segundo péptido, en la mayoría de las bacterias Gram negativas, o un puente interpeptídico constituido por uno o hasta siete residuos de aa (Gly, L-Ala, L- o D-Ser, D-Asx⁸, L- o D-Glu, entre otros) (Vollmer *et al.*, 2008; Madigan *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2016).

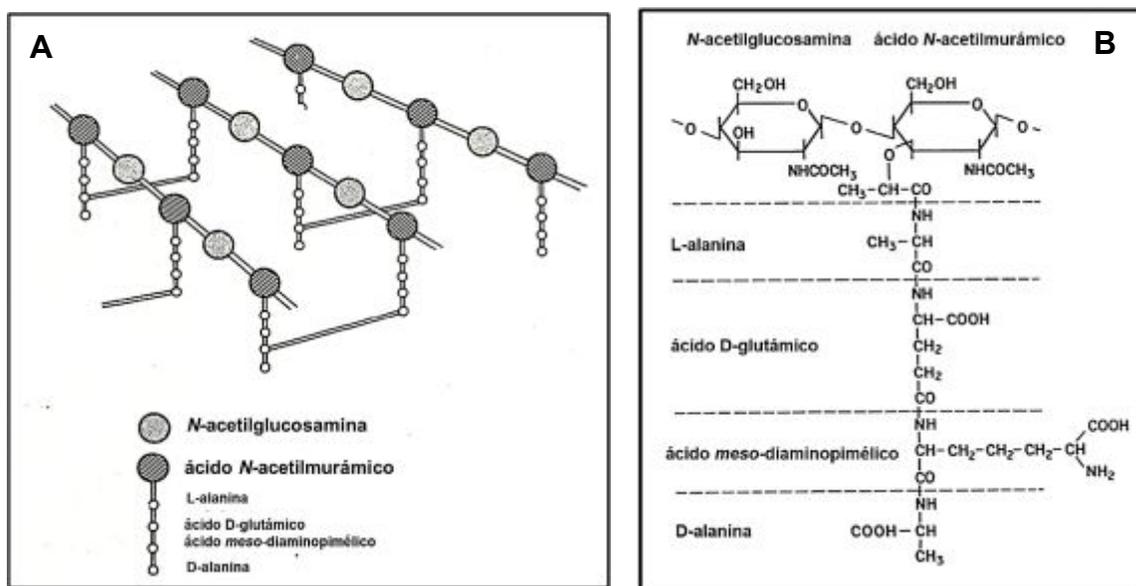


FIGURA 2. Representación de la estructura del peptidoglicano bacteriano **(A)**. Enlace del ácido *N*-acetilmurámico y la *N*-acetilglucosamina en la cadena de glicano y unión del tetrapéptido al ácido *N*-acetilmurámico **(B)**. Adaptado de Hammond *et al.*, 1984.

El D-Glu del tetrapéptido del NAM está unido a la L-Ala mediante su α-amino, pero unido al *m*-DAP mediante el γ-carboxilo, quedando libre el α-carboxilo en varias especies, como amida en *S. aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium perfringens* y *Lactobacillus plantarum* o formando un enlace peptídico con un

⁸ Asx hace referencia al ácido aspártico o a la asparagina (Vollmer *et al.*, 2008).

residuo de glicina en *Micrococcus lysodeikticus* [L-Ala- γ -(α -D-Glu-Gly)-L-Lys-D-Ala] (Vollmer *et al.*, 2008).

Aproximadamente el 20% de los tetrapéptidos del NAM participan en el entrecruzamiento en *E. coli* y hasta el 90% en *S. aureus* (Hammond *et al.*, 1984). Debido a que en *S. aureus* las cadenas de glicano son cortas, el alto grado de entrecruzamiento, mediante puentes de cinco residuos de glicinas, le permite contar con una estructura funcional. El puente interpeptídico de pentaglicina es un componente único del PG de *S. aureus* y, por tanto, el sustrato específico para la lisostafina, una de las PGH más conocidas (Szweda *et al.*, 2012).

Una característica notable del PG de *Listeria* es su similitud con el de las bacterias Gram negativas como *E. coli*. La desacetilación parcial de los residuos del NAG es otra característica del PG de *Listeria* (Bierne y Cossart, 2007).

Las principales modificaciones de la cadena de glicano son: *N*-desacetilación, *O*-acetilación y *N*-glicosilación (Tabla 2) (Vollmer, 2008). La pérdida de la susceptibilidad de *S. aureus* a la lisozima⁹ es debido a la *O*-acetilación del C₆ de los residuos del NAM (Vollmer, 2008).

3.1 Peptidoglicano hidrolasas

Las bacterias poseen varias enzimas que pueden degradar su propia pared celular y la de otros microorganismos (Lortal *et al.*, 1997). La autólisis es un proceso complejo que involucra a glicosidasas y peptidasas que se clasifican con el nombre genérico de peptidoglicano hidrolasas (Chapot-Chartier, 1996). Las PGH hidrolizan enlaces específicos del PG (Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014).

⁹ Alexander Fleming describió una sustancia capaz de lisar suspensiones de *Micrococcus lysodeikticus* (ahora conocido como *Micrococcus luteus*) y la nombra lisozima (Fleming, 1922).

TABLA 2. Modificaciones en la cadena de glicano del peptidoglicano.

Modificación	Características	Especie (porcentaje de modificación)
N-desacetilación	Esta modificación se puede presentar en los residuos de NAM y NAG. Algunas bacterias patógenas como <i>S. pneumoniae</i> , <i>L. monocytogenes</i> o <i>B. anthracis</i> desacetilan el PG. La desacetilación de la NAG genera resistencia a la lisozima.	<i>Bacillus cereus</i> (NAG: 77%; NAM 50%) <i>Listeria monocytogenes</i> (NAG: ND) <i>Micrococcus lysodeikticus</i> (NAM: ND)
O-acetilación	Esta modificación solo ocurre en el residuo del NAM y consiste en la presencia de un grupo acetilo adicional en el C6 para formar 2,6-N, O-diacetil-ácido murámico. Las cepas patógenas de <i>Staphylococcus</i> resistentes a la lisozima presentan un determinado grado de O-acetilación y las cepas no patógenas que no presentan esta modificación son sensibles a la lisozima.	<i>Bacillus cereus</i> (24.7%) <i>Lactobacillus acidophilus</i> (60-70%) <i>Micrococcus lysodeikticus</i> (ND) <i>Staphylococcus aureus</i> (35-90%)
N-glicosilación	Sustitución del acetato en el ácido murámico por un residuo glicolato (la diferencia entre ambos residuos es un hidroxilo extra). Este fenómeno fue descrito por primera vez en <i>Mycobacterium smegmatis</i> donde se observó que la cepa es hipersensible a la lisozima y a los β-lactámicos ¹⁰ . También se presenta en algunas especies de los géneros <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , etc.	-

ND: No determinado

Adaptado de Vollmer, 2008.

¹⁰ Los β-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) son sustancias antimicrobianas que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana (Labischinski y Maidhof, 1994).

3.2 Clasificación y función de las peptidoglicano hidrolasas

Las PGH participan en aspectos fundamentales de la fisiología bacteriana: procesos de ensamblaje y des-ensamblaje del PG, renovación y reciclaje del PG, separación de las células hijas durante la división celular, reorganización del sáculo del PG que determina la forma celular, ensamblaje de los organelos celulares superficiales, en los procesos de autólisis, esporulación y germinación, resucitación de células inactivas, formación de biopelículas y lisis de la célula bacteriana durante la competencia entre especies bacterianas (Firdich y Gaynor, 2013; Najjari *et al.*, 2015). Las PGH más conocidas son: (1) las β -*N*-acetilmuramidasa que hidrolizan el enlace glicosídico entre el NAM y la NAG (2) las β -*N*-acetilglucosaminidasas que hidrolizan el enlace glicosídico entre el NAG y la NAM, (3) la *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa que hidroliza el enlace amida formado entre el carboxilo del lactoilo del NAM y el α -amino de la L-Ala y (4) las peptidasas (endopeptidasas y carboxipeptidasas) que hidrolizan los enlaces peptídicos del tetrapéptido o de los puentes interpeptídicos (Figura 3) (Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014; Sharma *et al.*, 2016).

3.3 Aplicación de las peptidoglicano hidrolasas en alimentos

La lisozima es una de las PGH más estudiadas a nivel mundial, es uno de los pocos antimicrobianos que está aprobado en EE. UU., y en muchos países europeos (E1105). La lisozima tiene actividad muramidasa ya que hidroliza los enlaces β (1 \rightarrow 4) entre el C1 del NAM y el C4 de la NAG (Voet *et al.*, 2007) (Figura 3a-1). La lisozima es más activa contra bacterias Gram-positivas donde el PG es accesible, pero no tiene efecto contra bacterias Gram-negativas debido al menor contenido de PG (de 5% al 10%) y a la presencia de lipopolisacáridos en la membrana externa que bloquea el acceso a la enzima (Davidson *et al.*, 2015). Adicionalmente las modificaciones en la estructura del PG aumentan la resistencia a la lisozima. La acetilación del residuo del NAM en *S. aureus* previene la unión efectiva de la lisozima al PG. Es activa contra especies de *Bacillus*, *Micrococcus* y *Clostridium* así como contra algunas cepas de *L. monocytogenes* y

Lactobacillus sp. El principal uso de la lisozima de la clara de huevo de gallina es la prevención del abombamiento de los quesos maduros, causado principalmente por *Clostridium tyrobutyricum* y en el control de la actividad bacteriana en vinos. Se están explorando nuevas aplicaciones, por ejemplo, la prolongación de la vida útil de la cerveza que no recibe un tratamiento de pasteurización (Callewaert *et al.*, 2011).

La lisostafina (27 kDa) es una glicil-glicina endopeptidasa (Figura 3b-6) secretada por *Staphylococcus simulans* subsp., *staphylolyticus* (Fedorov *et al.*, 2003). Es activa contra la mayoría de las especies de *Staphylococcus*. Recientemente se reportó que la lisostafina posee dos actividades líticas extra: una endo- β -*N*-acetilglucosaminidasa y una *N*-acetil-muramil-L-alanina amidasa (Kumar, 2008). La lisostafina se utiliza como agente terapéutico en casos de mastitis en vacas; también se ha observado su efecto conservador en alimentos como la leche, la mayonesa y la carne de cerdo molida, reduciendo las cuentas de *S. aureus* en los mismos (Szweda *et al.*, 2007).

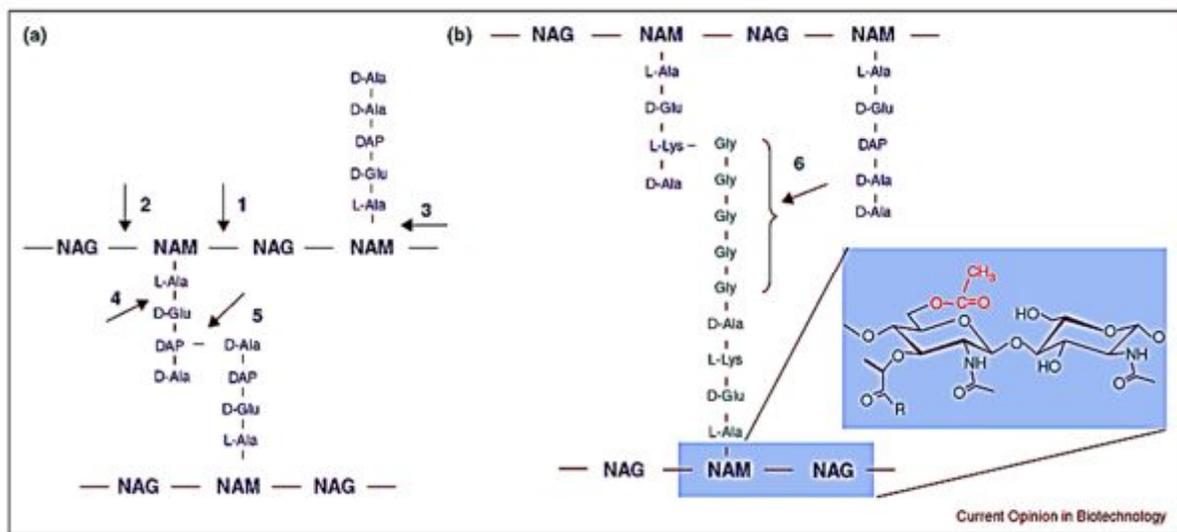


FIGURA 3. Sitios de reconocimiento de las PGH en la pared celular de *Escherichia coli* (a) y *Staphylococcus aureus* (b). Nomenclatura: β -*N*-acetilmuramidasa (1); β -*N*-acetilglucosaminidasas (2); *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (3); peptidasas (4-6). Fuente: Callewaert *et al.*, 2011.

4. Proteasas

Las proteasas participan en la mayor parte de los aspectos nutricionales, fisiológicos y de regulación metabólica de la célula. El rol más importante es el de la nutrición microbiana, donde las proteasas extracelulares¹¹ degradan proteínas insolubles e hidrolizan los polipéptidos en péptidos y hasta aminoácidos, los cuales son accesibles a la célula (Ward *et al.*, 2009).

Generalmente, las proteasas producidas por microorganismos son constitutivas o parcialmente inducibles e influenciadas por los componentes del medio, tales como la variación en la relación carbono/nitrógeno, la presencia de algunos azúcares fácilmente metabolizables (como la glucosa) e iones metálicos. La síntesis de proteasas también se ve regulada por la fuente de nitrógeno. Otros factores físicos como la aeración, densidad del inóculo, pH, temperatura de incubación, afectan también el tipo y actividad de las proteasas producidas (Álvarez *et al.*, 2006).

Entre los efectos positivos que proveen las proteasas en el procesamiento de los alimentos se encuentran aquellos aspectos relacionados con el valor nutricional y las propiedades funcionales de los alimentos e incluyen una mejor digestibilidad, modificación de la textura y generación de sabores, aumento de la capacidad antioxidante o la reducción de compuestos alergénicos (Tavano, 2013).

4.1 Clasificación de las proteasas

Las proteasas microbianas se clasifican en base a su modo de acción y mecanismo biocatalítico (Ward *et al.*, 2009). Dependiendo de su sitio de acción, se dividen en dos

¹¹ El sistema proteolítico más conocido de las BAL es el de *Lactococcus sp.*, el cual está compuesto por una proteinasa extracelular, sistemas de transporte de péptidos y peptidasas intracelulares (Guédon *et al.*, 2001).

grandes grupos: exoproteasas y endoproteasas, éstas últimas se clasifican en cuatro familias¹²: serina, aspártico, cisteína/tiol y metaloproteasas (Ward *et al.*, 2009; Oropeza *et al.*, 2015).

5. Métodos de purificación y concentración de proteínas

5.1 Precipitación de proteínas

La precipitación de proteínas es ampliamente utilizada como un procedimiento de aislamiento simple y eficiente en la recuperación de proteínas. Las proteínas pueden ser precipitadas induciendo modificaciones con respecto al pH, la fuerza iónica, la constante dieléctrica y la temperatura (Figura 4) (Léonil *et al.*, 1994).

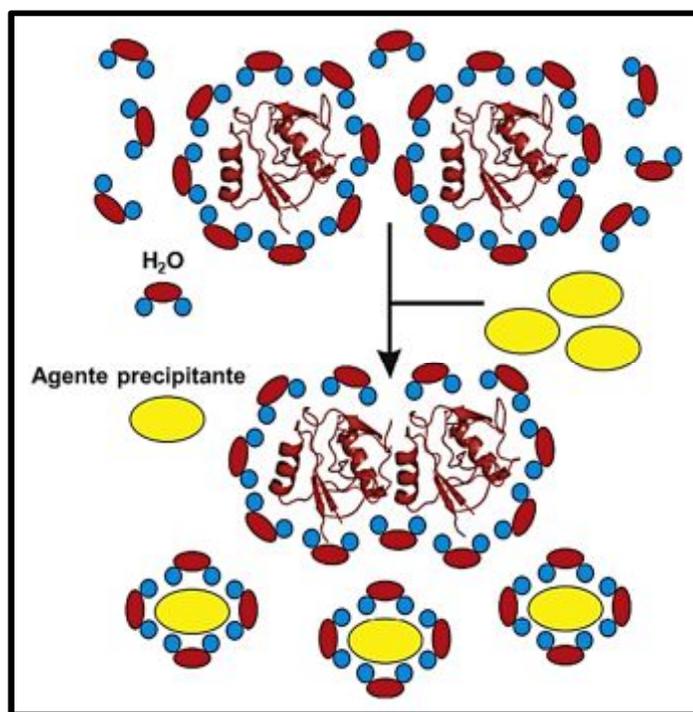


FIGURA 4. Principio básico del mecanismo de precipitación de proteínas. Adaptado de Novák y Havlíček, 2013.

¹² Los nombres toman en cuenta el aminoácido iónico o metal presente en el sitio activo (Ward *et al.*, 2009).

5.1.1 Fraccionamiento con sulfato de amonio (*salting-out*)

La solubilidad de las proteínas globulares aumenta con la adición de sal (< 0.15 M), en un proceso denominado *salting-in*. A concentraciones de sal más altas, la solubilidad de la proteína generalmente disminuye, llevando a la precipitación. Este proceso se denomina *salting-out* (Green y Hughes, 1955). Las sales que reducen la solubilidad de las proteínas también tienden a aumentar la estabilidad de la conformación nativa, mientras que los iones utilizados en el método de *salting-in* son usualmente desnaturizantes (Wingfield, 2001).

El mecanismo de *salting-out* se basa en la solvatación preferencial debido a la exclusión de la sal de la capa de agua asociada a la superficie de la proteína (capa de hidratación). La capa de hidratación, típicamente de 0.3 g a 0.4 g de agua por gramo de proteína, participa en el mantenimiento de la solubilidad y el correcto plegamiento de la conformación nativa de las proteínas (Wingfield, 2001). Existen tres principales interacciones proteína-agua: la hidratación iónica entre las cadenas laterales con carga formal, formación de puentes de hidrógeno entre los grupos polares y el agua y mediante interacciones hidrofóbicas (Wingfield, 2001).

En la interacción hidrofóbica, la configuración libre de las moléculas de agua se reduce en la proximidad de los residuos apolares. Este ordenamiento de las moléculas de agua da como resultado una pérdida de entropía y, por lo tanto, es energéticamente desfavorable (Wingfield, 2001). Cuando se añade sal a la disolución, aumenta la tensión superficial del agua, dando como resultado una interacción hidrofóbica mayor entre la proteína y el agua. La proteína disminuye su área superficial en un intento de minimizar el contacto con el disolvente, manifestándose inicialmente el plegamiento y posteriormente la auto-asociación que conduce a la precipitación. Tanto el plegamiento como la precipitación liberan el agua unida, incrementando la entropía del sistema y haciendo que estos procesos sean energéticamente favorables (Wingfield, 2001).

La solubilidad de las proteínas en disoluciones amortiguadoras depende de la distribución de los residuos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos en la superficie de la proteína. Los residuos hidrofóbicos predominan en el núcleo de las proteínas globulares, pero algunos se encuentran en la superficie. Las proteínas que tienen alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos en la superficie tienen baja solubilidad en un disolvente acuoso (Novák y Havlíček, 2013).

El *salting-out* separa las proteínas que se agregan fácilmente de aquellas que son muy solubles, haciendo de este método un buen paso inicial de purificación para proteínas solubles (Duong-Ly y Gabelli, 2014). La precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es uno de los métodos más utilizados para promover las interacciones hidrofóbicas (McCue, 2014).

5.1.2 Precipitación con ácido tricloroacético

El ácido tricloroacético (TCA) es considerado el agente más eficiente para precipitar proteínas a partir de disoluciones diluidas (Novák y Havlíček, 2013), es un ácido relativamente débil que no hidroliza los enlaces peptídicos (Koontz, 2014).

La precipitación de proteínas con TCA es un método de preparación de muestras muy popular, para electroforesis monodimensional y bidimensional, debido a que remueve sales, polisacáridos y desnaturaliza proteasas endógenas (Nandakumar *et al.*, 2003).

La pérdida de la solubilidad de las proteínas en función de la concentración de TCA se puede describir como una curva en forma de U. El valor máximo de insolubilidad se alcanza a concentraciones de TCA cercanas al 15%, quedando en solución péptidos de entre 2 a 22 aminoácidos, urea y amoníaco (ISO 17997-2, 2004).

La agregación hidrofóbica de las proteínas es el mecanismo dominante (Novák y Havlíček, 2013), debido a que la adición de TCA interrumpe los puentes de hidrógeno. Este método presenta varios inconvenientes: (1) desnaturaliza a las proteínas; (2) la

concentración de proteína inicial debe ser $\geq 5 \mu\text{g/mL}$; (3) no es útil para todas las proteínas (Koontz, 2014) y (4) el precipitado es extremadamente ácido, por lo que es necesario eliminar y neutralizar el TCA residual, ya que afecta en la separación electroforética (Novák y Havlíček, 2013).

5.2 Diálisis y ultrafiltración

La diálisis es un método de separación de compuestos a través de una membrana en función del tamaño de poro específico (MWCO, por sus siglas en inglés) (Figura 5). Esta técnica es el método de separación más popular para la remoción de solutos de bajo peso molecular de regiones de alta concentración a regiones de baja concentración de acuerdo con la ley del flujo de Fick (Evans *et al.*, 2009).

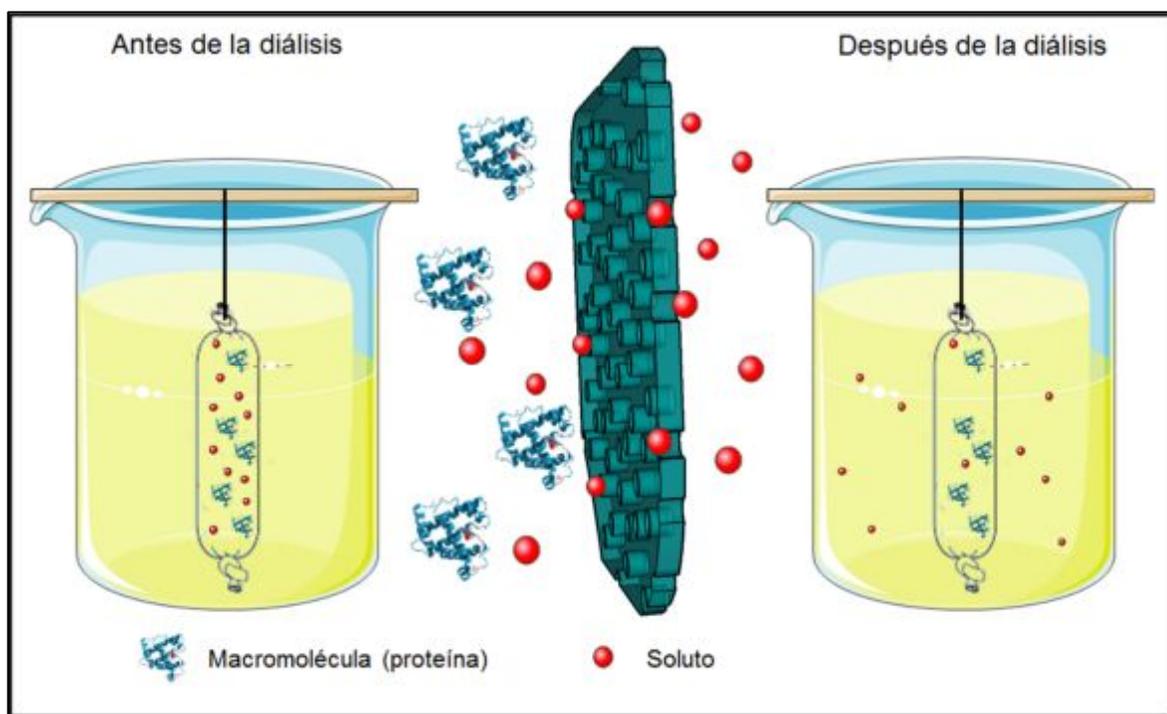


FIGURA 5. Mecanismo de diálisis. Adaptado de: Evans *et al.*, 2009.

La ultrafiltración (UF) es un método de separación física que emplea una barrera o membrana semipermeable para separar y concentrar el producto deseado (Evans *et al.*, 2009). Las membranas de UF son adecuadas para la concentración de productos biológicos, ya que pueden operar a bajas temperaturas minimizando el grado de desnaturalización y/o degradación de los productos biológicos lábiles (Evans *et al.*, 2009).

El uso más común de la UF en los procesos biotecnológicos es en la concentración de proteínas, intercambio de soluciones amortiguadoras y desalado, remoción de virus y clarificación de productos (Alele y Ulbricht, 2016).

6. Métodos electroforéticos

6.1 Antecedentes históricos

Los métodos de electroforesis se han diversificado considerablemente desde mediados del siglo pasado y nuevos métodos y aplicaciones aún siguen en desarrollo como la electroforesis de bioafinidad, electroforesis capilar, *electroblotting*, isotacoforesis, electroforesis en gel de campo pulsado y electroforesis preparativa (Vesterberg, 1989).

En el siglo XX se realizaron una serie de lentas aportaciones teóricas y prácticas que sentaron las bases para el posterior desarrollo de la técnica. Friedrich Kohlrausch fue capaz de describir el proceso de migración electroforética de una serie de iones y sus concentraciones relativas. Esta aportación resultó de gran utilidad para el análisis de iones de mayor tamaño y especialmente de proteínas (Santarén, 2004).

En 1930 Arne Wilhelm Kaurin Tiselius publicó su Tesis Doctoral “El método del frente móvil en el estudio de electroforesis de proteínas” en la que se presentaba una nueva técnica para examinar algunas propiedades físicoquímicas de estas macromoléculas. Los experimentos fueron llevados a cabo en un tubo de cuarzo en forma de U en cuyo

interior las proteínas se movían libremente y sus frentes de avance se detectaban y fotografiaban utilizando luz ultravioleta. Tiselius fue capaz de describir cuatro frentes móviles en el análisis de suero de sangre correspondiente a la albúmina y a la α -, β - y γ -globulina (Santarén, 2004).

A partir de 1950, tras las contribuciones de Wieland y Fischer se comenzó a utilizar el papel filtro como medio de soporte. Uno de los primeros geles que se utilizaron para la separación de proteínas fueron los constituidos por almidón, resultando esencial el trabajo de Smithies, sin embargo, seguía presentando muchos inconvenientes por lo que posteriormente se prefirió el uso de poliacrilamida como soporte (Santarén, 2004).

Davis y Ornstein introdujeron la electroforesis discontinua en 1964, la cual permitía concentrar las proteínas en bandas muy estrechas antes de iniciar el proceso de separación. Tres años después, Shapiro, Viñuela y Maizel describieron la relación entre la movilidad electroforética de las proteínas en un gel de poliacrilamida en presencia del detergente iónico dodecil sulfato de sodio (SDS) y su peso molecular. Este trabajo fue retomado por Weber y Osborn en 1969, quienes determinaron el peso molecular de las proteínas graficando el logaritmo del peso molecular de proteínas de peso molecular conocido en función de su movilidad electroforética (Garfin, D. 1995).

Laemmli (1970) incorporó SDS al 0.1% en las disoluciones amortiguadoras usadas por Ornstein y Davis, y además empleó un paso desnaturizante en la preparación de muestra al someterla a tratamiento térmico y adicionando un agente desnaturizante (2-mercaptoetanol al 5%). Para visualizar las proteínas en el gel después de la electroforesis inicialmente se utilizó Azul de Bromofenol y Negro Amido, que fueron rápidamente sustituidos por el Azul Brillante de *Coomassie*¹³ (tipo R y G) (Smejkal, 2006).

¹³ El nombre de *Coomassie* se debe a la conmemoración de la ocupación de la ciudad de Coomassie (actualmente Kumasi en Ghana) por las fuerzas británicas en 1896 durante la Cuarta Guerra Anglo-Ashanti (Merril, 1990).

6.2 Fundamento de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La electroforesis es la migración de solutos iónicos hacia el cátodo o ánodo, en función de su carga y peso molecular bajo la influencia de un campo eléctrico continuo (García, 2000).

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del SDS. Los complejos proteína-SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón que adquieren una carga formal negativa. Dado que la relación carga/masa es constante, las distintas proteínas se pueden separar en un gel fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (Reynolds y Tanford 1970).

La técnica de SDS-PAGE posee un alto poder de resolución. Lo anterior se deriva del uso de un sistema electroforético discontinuo, formado de dos geles de distinta porosidad, concentración y pH, en el que las proteínas primero se compactan (en el gel superior o concentrador) y luego las separan (en el gel inferior o separador) (Garfin, 1995).

Cuando se aplica una diferencia de potencial, los iones Tris y las proteínas con un alto contenido de residuos de aminoácidos básicos migran hacia el cátodo. Los iones cloruro en el gel, las proteínas aniónicas en la muestra y los iones glicinato del amortiguador migran hacia el ánodo. Mientras los iones cloruro se mueven fuera de la muestra, se crea una región de baja conductividad detrás de ellos. Con los iones cloruro en el frente y los iones glicinato en la parte posterior, las proteínas se ubican entre ellos. En la interfase de los geles de apilamiento y resolución, la proteína experimenta un retraso en su velocidad debido al restrictivo tamaño de poro del gel de resolución y comienzan a separarse por tamizado molecular (Garfin, 1995; García, 2000).

6.3Z zimografía

La zimografía¹⁴ es una técnica utilizada en el estudio de las enzimas hidrolíticas basada en la degradación de sus sustratos (Figura 6). Los análisis zimográficos permiten separar a las proteínas de acuerdo con su peso molecular seguido de la detección de la actividad enzimática (Strating y Clarke, 2001).

El uso de zimogramas en los cuales el peptidoglicano de la pared celular bacteriana es incorporado dentro de un gel de resolución de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), ha permitido la identificación de varias PGH. Para la actividad proteolítica el método está basado en un gel de SDS-PAGE impregnado con un sustrato proteínico el cual es degradado por las proteasas renaturalizadas durante el periodo de incubación (Leber y Balkwill, 1997).

Después de la electroforesis, los geles son transferidos a una solución renaturalizante con el fin de remover el detergente y permite el plegamiento de las enzimas separadas. La detección de la actividad se observa como zonas claras sobre un fondo oscuro (Strating y Clarke, 2001).

Con el método de zimografía en gel se puede obtener información sobre las formas enzimáticas específicas o sobre la actividad proteolítica potencial, los pesos moleculares y la presencia de complejos covalentes o fragmentos de enzimas potencialmente activos en muestras biológicas complejas. Varias proteinasas son secretadas como zimógenos¹⁵ inactivos con un dominio propeptídico¹⁶ inhibidor.

¹⁴ La zimografía fue introducida en 1978 para el estudio de los activadores del plasminógeno (Vandooren *et al.*, 2013).

¹⁵ Un zimógeno, también denominado proenzima, es un precursor inactivo de una enzima (Voet *et al.*, 2007).

¹⁶ A las proteínas inactivas que son activadas al removerles segmentos de la cadena se les denomina proproteínas y a los segmentos removidos propéptidos (Voet *et al.*, 2007).

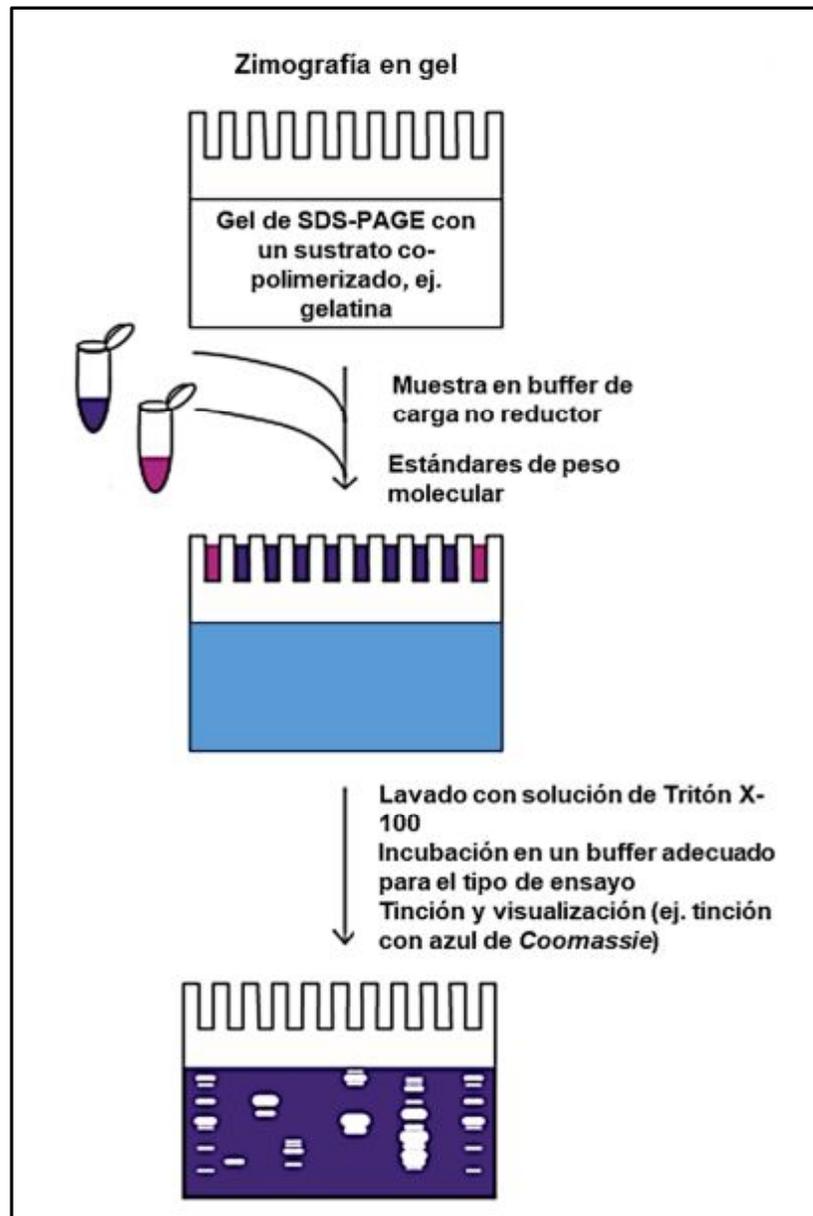


FIGURA 6. Esquema general de la técnica de zimografía. Adaptado de Vandooren *et al.*, 2013.

7. Métodos cromatográficos

7.1 Fundamento y clasificación

La cromatografía¹⁷ es un método de separación diferencial en la que los componentes de una muestra interactúan entre la fase estacionaria y la fase móvil. En la mayoría de las aplicaciones, la fase estacionaria consiste en partículas esféricas que se encuentran empacadas dentro de una columna. La mezcla de proteínas se introduce en la fase móvil y eluyen a través de la columna, aquellas proteínas con mayor afinidad por la fase estacionaria eluirán más lento que las proteínas atraídas a la fase móvil, alcanzando así la separación (Figura 7). La recolección de muestra se realiza en pequeños volúmenes, llamados fracciones, de modo que se conserva la separación lograda por la columna.

Las fracciones se analizan individualmente para determinar la presencia de la proteína de interés (Roe, 1995; Grant, 2016).

Los resultados de una cromatografía se pueden representar mediante la construcción de un cromatograma, que es un gráfico de la cantidad de muestra que eluye de la columna en función del volumen, el tiempo o la fracción (Grant, 2016).

¹⁷ El proceso de cromatografía fue descubierto por Mikhaili Tswett en 1903 (Voet *et al.*, 2007).

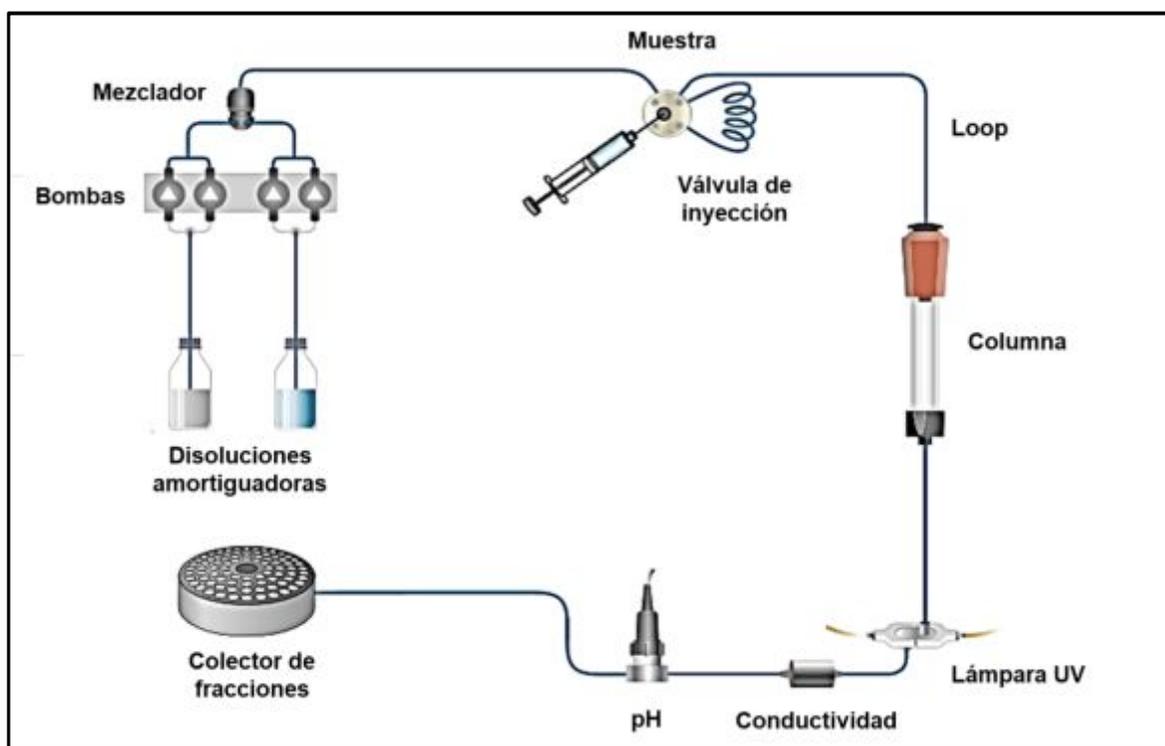


FIGURA 7. Sistema de cromatografía. Adaptado de *GE Healthcare*, 2010a.

La purificación de proteínas se realiza en escalas de microgramos y miligramos en laboratorios de investigación, a kilogramos y toneladas a nivel industrial. La eficiencia obtenida por los enfoques de purificación basados en procesos de bioafinidad ha revolucionado la purificación de proteínas, y en la actualidad muchas proteínas se pueden purificar de forma fácil y eficiente (*GE Healthcare*, 2010b).

Algunas proteínas pueden ser difíciles de purificar en una forma activa y estable, por ejemplo, proteínas integrales de membrana, complejos proteínicos inestables, proteínas expresadas como agregados insolubles y proteínas con modificaciones postraduccionales (*GE Healthcare*, 2010b).

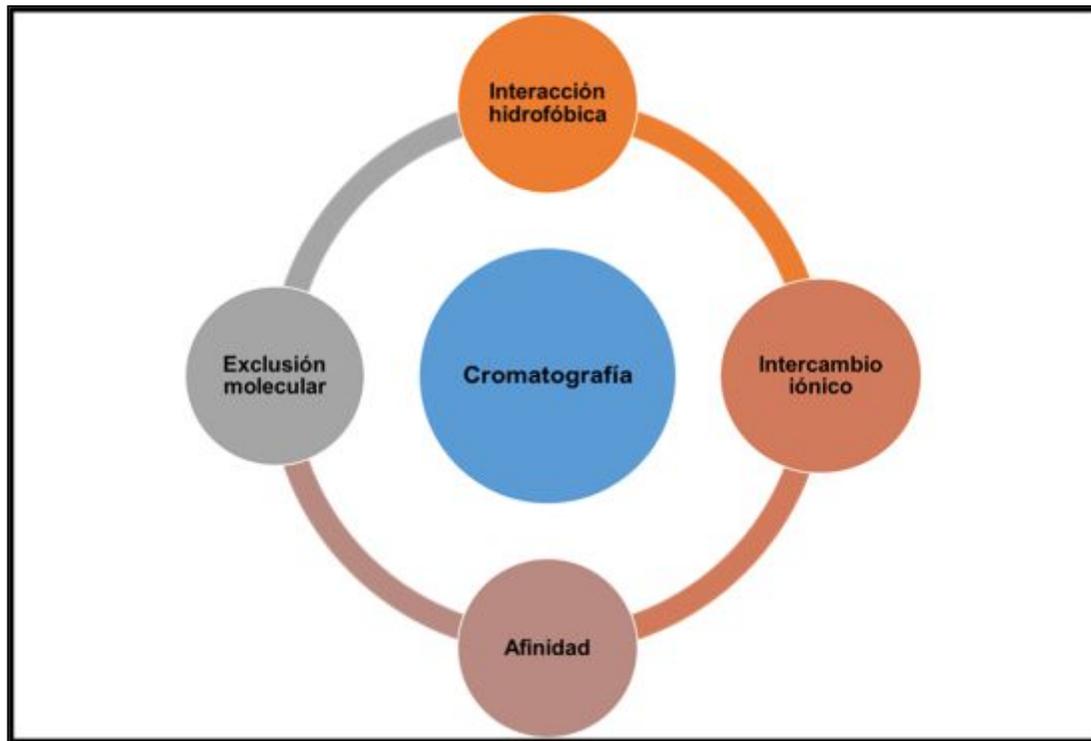


FIGURA 8. Principales tipos de cromatografía. Adaptado de Voet *et al.*, 2007.

8. Materiales y Metodología

En la Figura 9 se muestra el diagrama general de la estrategia experimental.

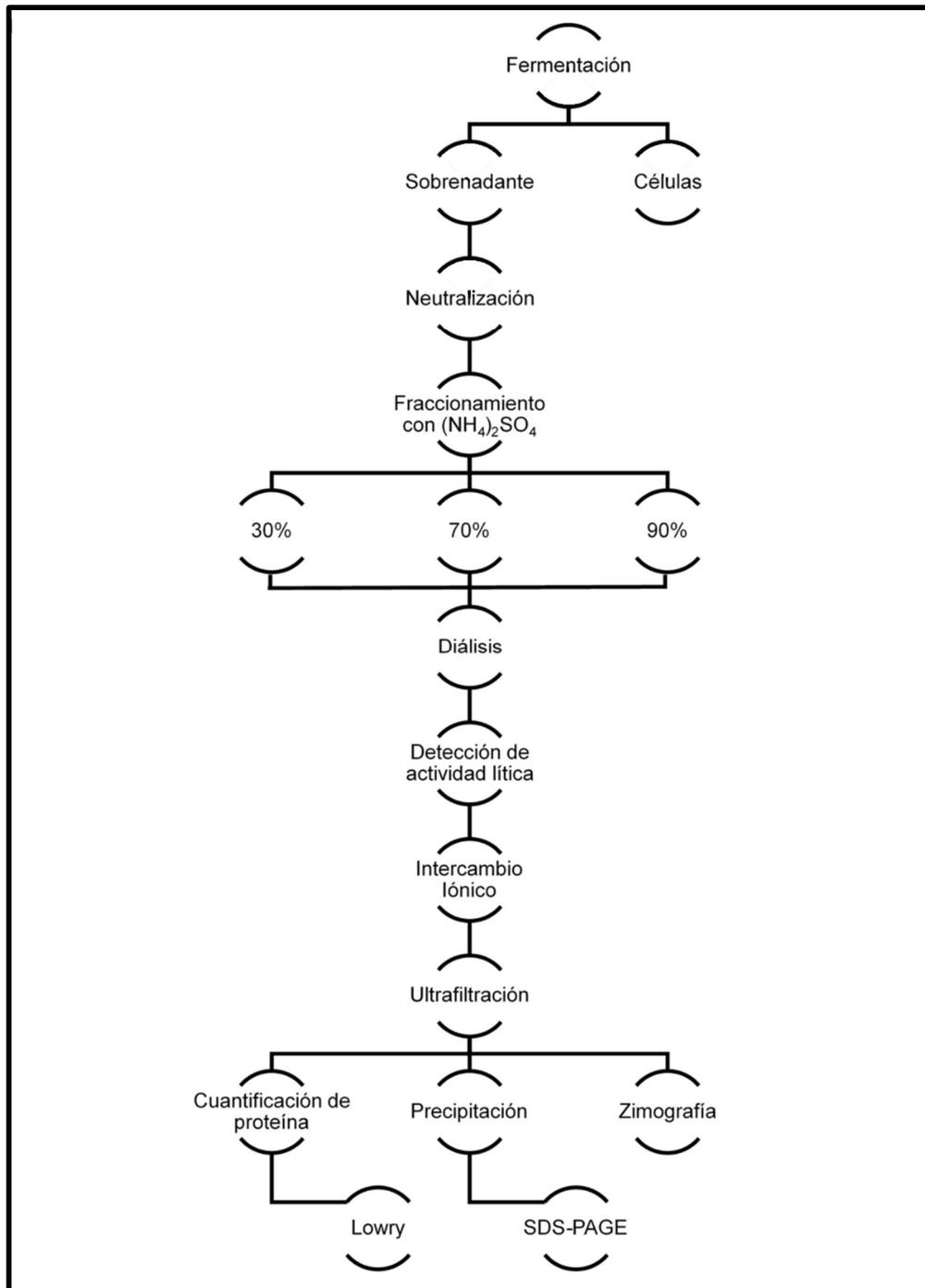


FIGURA 9. Diagrama de la estrategia experimental para el estudio de la PGH extracelular de *P. acidilactici* ATCC 8042.

8.1 Preparación de medio de cultivo, inóculos y fermentación de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

8.1.1 Preparación del medio MRS modificado

La cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 fue obtenida de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. La fermentación se realizó de acuerdo con Llorente-Bousquets (2008).

Se preparó el medio de cultivo MRS modificado (apéndice A) en un matraz *Fernbach* con capacidad de 2.5 L y se esterilizó a 121 °C/15 min (Autoclave *Yamato Sterilizer SM300*). La sacarosa y el ácido ascórbico se manejaron aparte. La sacarosa se disolvió en 60 mL de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121 °C/15 min. La solución de ácido ascórbico se esterilizó por microfiltración utilizando una unidad de filtración de tamaño de poro de 0.22 µm (*Millex GS, Millipore*) y se adicionó al resto de la preparación al igual que la sacarosa bajo condiciones estériles (Campana de Flujo Laminar, *ADLER*).

8.1.2 Preparación de inóculos y fermentación

Para el preinóculo se tomó una asada de la cepa *P. acidilactici* ATCC 8042 en agar MRS y se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de MRS modificado estéril, y se incubó a 30 ± 2 °C durante 24 h a 120 r.p.m. (Incubadora con agitación, *New-Brunswick*). Transcurrido este tiempo se inoculó con 1% del preinóculo un segundo matraz Erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de MRS modificado y se incubó a las mismas condiciones durante aproximadamente 12 h. Este cultivo fue utilizado para inocular al 2% el matraz *Fernbach* con un volumen de trabajo de 1 L que se incubó 8 h sin agitación a 30 ± 2 °C (Horno de convección, Modelo DX-300, *Yamato*).

Al término de la fermentación, el cultivo de *Pediococcus* se centrifugó a 10,000 r.p.m., durante 30 min a 4 °C (Centrífuga, Mo. J2-MC, *Beckman-Coulter*, CA, EE. UU.). Al

sobrenadante se le determinó el pH (*pH Meter*, Mo. Φ 390, *Beckman-Coulter*), la densidad óptica (*BioSpectrometer Kinetic*, *Eppendorf*, Alemania) y se neutralizó con una disolución estéril de NaOH 0.1 N.

8.2 Fraccionamiento y concentración de las proteínas del sobrenadante de cultivo

Como se mencionó previamente, los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 presentaron actividad lítica contra microorganismos de interés en el alimento, razón por la cual se trabajó únicamente con el sobrenadante y no con la fracción celular.

Las proteínas del sobrenadante se fraccionaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La adición de sal se realizó en forma de lluvia, en baño de hielo, con agitación mecánica de 220 r.p.m., (Agitador PC-420D, *Corning*, México) a fin de alcanzar 30%, 70% y 90% de saturación de la sal.

El material insoluble se recuperó por filtración y centrifugación a 10,000 r.p.m., durante 30 min a 4 °C (Centrífuga, Mo. J2-MC, *Beckman-Coulter*). El precipitado de cada fracción se disolvió en una disolución amortiguadora de Tris (20 mM) – ácido cítrico (10 mM), pH 5.0 y se dializó toda la noche a baja temperatura (*Multiple dialyzer*, *Pope Scientific, Inc.*, EE. UU.), utilizando una membrana de diálisis con capacidad para permear moléculas menores a 12 kDa (*Sigma Chemical, Co.*, EE. UU.).

8.3 Cuantificación de la proteína soluble por el método modificado de Lowry

Se determinó, por triplicado, la concentración de proteína soluble de cada fracción utilizando el método modificado de Lowry (*DC™ Protein Assay*, *Bio-Rad Laboratories*, CA, EE. UU.) por espectrofotometría (*BioSpectrometer Kinetic*, *Eppendorf*) y una disolución de 2 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA) (*Sigma Chemical*) como

estándar de la curva de calibración (apéndice B). La pureza de la BSA se determinó a partir del valor de absorbancia a 280 nm (*BioDrop DUO*, Reino Unido).

8.4 Determinación del perfil electroforético por SDS-PAGE

Las proteínas de cada fracción se precipitaron con TCA al 20% (w/v) en una proporción 1:1. El precipitado se disolvió utilizando una solución de urea 8 M y 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato (CHAPS) al 4% (w/v) y el volumen mínimo necesario de NaOH 0.1 N para neutralizar la muestra (Nandakumar *et al.*, 2003), a la que se le adicionó un volumen equivalente de la disolución amortiguadora de muestra [Tris-HCl 0.0625 M (pH 6.8), SDS (2% w/v), glicerol (10% v/v), 2-mercaptoetanol (5% v/v) y azul de bromofenol (0.001% w/v)] (Laemmli, 1970). Las muestras se calentaron a 85 °C durante 10 min a 300 r.p.m. (*Thermomixer Comfort, Eppendorf*).

Las proteínas de la fracción al 70% de saturación se precipitaron utilizando la técnica de metanol-cloroformo, la cual consistió en tomar 400 µL de muestra y adicionar 600 µL de cloroformo, 150 µL de metanol y 450 µL de agua desionizada. La muestra se centrifugó a 4 °C durante 3 min a 14,000 r.p.m. (Centrífuga 5430R, *Eppendorf*). Se recuperó el sobrenadante, se le adicionaron 600 µL de metanol y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones. Se decantó el sobrenadante y se evaporó el metanol residual a 30 °C (*Thermomixer Comfort, Eppendorf*). El *pellet* se resuspendió en 40 µL de la disolución amortiguadora de muestra.

Se aplicó una diferencia de potencial de 100 V (*PowerPac™ HV Power Supply, Bio-Rad*) a geles de poliacrilamida para la concentración (4 %T, 2.6 %C) y separación (10% T, 12.5% T y 16.5% T, 2.6% C) de las proteínas (*Mini-PROTEAN™ Tetra Cell, Bio-Rad*) (apéndice C).

Los geles se tiñeron con: azul de *Coomassie R-250 (Bio-Rad)* (apéndice E), azul de *Coomassie G-250 (Bio-Rad)*, azul de *Coomassie Bio-Safe™ (Bio-Rad)* y nitrato de

plata/ácido (Heukeshoven y Dernick, 1985). Para eliminar el exceso de colorante se empleó una disolución de ácido acético:metanol:agua (1:5:4) y se conservaron en una disolución acuosa de glicerol al 10% (v/v).

8.4.1 Detección de la actividad lítica y proteolítica extracelular mediante zimografía

Se prepararon geles a diferentes concentraciones de poliacrilamida (10% T, 12.5% T y 16.5% T; 2.6% C) adicionados con 0.2% (w/v) de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.) como sustrato para detectar la actividad lítica (Leclerc y Asselin, 1989) y gelatina de bovino tipo B al 0.1% (w/v) (*Sigma Chemical*) (García-Carreño *et al.*, 1993) como sustrato para detectar la actividad proteolítica. Como controles positivos de las actividades lítica y proteolítica se utilizó lisostafina 5.0 µg/µL (*Sigma-Aldrich*) y de tripsina 0.004 µg/µL (*Research Organics*, EE. UU.), respectivamente (apéndice D).

Para la renaturalización de la PGH, se realizaron dos lavados con agua desionizada durante 30 min cada uno a 40 r.p.m., con agitación orbital (*Labnet International*, USA) y posteriormente se mantuvo el gel en una disolución amortiguadora de Tris-HCl (25 mM, pH 7.0) con Tritón X-100 (*Sigma-Aldrich*) al 1% (w/v) a 30 °C durante toda la noche. El gel se tiñó con azul de metileno (*Sigma-Aldrich*) al 0.1% (w/v) en KOH 0.01% (w/v) y se removió el colorante con agua destilada.

Para la renaturalización de la proteasa, el gel se lavó con una disolución de Tritón X-100 al 2.5% (w/v) en agua desionizada, durante 1 hora con agitación orbital a 40 r.p.m., y se incubó en una disolución amortiguadora de Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), CaCl₂ (5 mM), NaCl (200 mM) a 30 °C durante 24 h. El gel se tiñó y destiñó, como en SDS-PAGE, utilizando azul de *Coomassie* R-250.

Se utilizó un fotodocumentador (*Gel Doc™ XR+ Imaging System*, *Bio-Rad*) controlado por el *software Image Lab™* (ver 3.0) para la adquisición de las imágenes de los perfiles

proteínicos y zimogramas, así como para la estimación de los pesos moleculares utilizando estándares de peso molecular conocido (*SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio-Rad*).

8.4.2 Limite de detección de BSA con azul de Coomassie R-250

Se determinó a partir de la curva de calibración de BSA. Se tomó una alícuota de 100 μ L de cada punto de la curva y se le añadió un volumen equivalente de la disolución amortiguadora de muestra. Las muestras se calentaron a 85 °C durante 10 min a 300 r.p.m. (*Thermomixer Comfort, Eppendorf*). Se aplicó una diferencia de potencial de 100 V (*PowerPac™ HV Power Supply, Bio-Rad*) a geles de poliacrilamida para la concentración (4 %T, 2.6 %C) y separación (12.5% T, 2.6% C) de las proteínas (*Mini-PROTEAN™ Tetra Cell, Bio-Rad*) (apéndice C). El gel se tiñó con azul de *Coomassie R-250* (apéndice E).

8.5 Purificación mediante cromatografía de intercambio iónico

8.5.1 Preparación de las disoluciones amortiguadoras

Se preparó el amortiguador de equilibrio (Tris (20 mM) – ácido cítrico (10 mM), pH 5.0) y de elución (Tris (20 mM) – ácido cítrico (10 mM), pH 5.0, 1 M NaCl) de la columna. Las disoluciones amortiguadoras se filtraron utilizando una membrana de celulosa de 47 mm, 0.45 μ m (*Agilent, Alemania*) y se degasificaron durante 10 min (*Ultrasonic Cleaner, Cole-Parmer*).

8.5.2 Desarrollo del método y preparación de la muestra

La fracción proteínica con actividad lítica se microfiltró (0.22 μ m; *Millex GS*) y se inyectó a una columna preempacada catiónica (*HiPrep SP FF 16/10, GE Healthcare, EE. UU.*)

(apéndice F). Se seleccionó el volumen del *loop*, el tamaño de fracción, el flujo y el tipo de gradiente (*GE Äkta Prime Plus*, Reino Unido).

Los tubos correspondientes a las fracciones no retenida (NR) y retenida (R) a la columna se ultrafiltraron (*Amicon Ultra-15*, 10 kDa, *Millipore*) a 4 °C durante 30 min a 5,000 r.p.m. (*Centrífuga 5430R*) para concentrar y eliminar el exceso de sal. El proceso se repitió hasta que la muestra redujo 10 veces su volumen inicial y se realizaron tres lavados con el amortiguador Tris (20 mM) – ácido cítrico (10 mM), pH 5.0, bajo las condiciones previamente descritas.

Se determinó la concentración de proteína soluble por el método modificado de Lowry y se obtuvo el perfil electroforético por SDS-PAGE. Los ensayos de actividad lítica y proteolítica se llevaron a cabo conforme a lo indicado anteriormente.

9. Resultados y Discusión

El medio MRS es comúnmente utilizado en el cultivo de las especies de *Lactobacillus* (De Man *et al.*, 1960). De acuerdo con Herrera y Sacristán (1993) es indistinto utilizar sacarosa o glucosa y para esta cepa de *Pediococcus*, el ácido ascórbico es un requerimiento especial, ya que el crecimiento de la bacteria es proporcional a la concentración del ácido hasta 1.5 g/L. También se encontró que la combinación de fuentes de nitrógeno permite un mayor crecimiento de la cepa y la adición del *Tween* 80 permite un crecimiento más homogéneo (Herrera y Sacristán, 1993) y modifica la permeabilidad de la membrana (Stanbury *et al.*, 1995).

Transcurridas 8 h de fermentación, el sobrenadante de cultivo (SN) alcanzó un valor de pH de 6.1 y la densidad óptica fue de 1.2 a 600 nm. El valor de pH coincide con el trabajo de Llorente-Bousquets (2008) pero la turbidez fue mayor debido a que se partió de un inóculo al 2% (v/v). El valor de turbidez se aproxima al reportado por Del Castillo-Núñez (2017) a las 8 h de crecimiento (1.13 a 600 nm). El SN se neutralizó con el fin de descartar el efecto del ácido láctico producido durante la fermentación.

En el primer fraccionamiento al 30% (w/v) de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la proteína ascendió a la superficie además de precipitar, por lo que para su recuperación fue necesario filtrar antes de centrifugar. Green y Hughes (1955) mencionan que a bajas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ el *pellet* flota en lugar de sedimentarse. Este fenómeno se lleva a cabo cuando la proteína contiene lípidos o está rodeada de algún detergente que disminuye su densidad y es característico de las proteínas de membrana que son más hidrofóbicas (Burgess, 2009). Debido a lo anterior, las proteínas se solubilizaron en los lavados con acetona, necesarios para eliminar el TCA, por lo que no se detectaron bandas de proteína en esa fracción (Figura 10).

En la fracción del 70% (w/v) de saturación de la sal se recuperó el 51% de proteína a una concentración de 20.63 mg/mL. En la fracción del 90% (w/v) de saturación de la sal se recuperó el 26% de proteína a una concentración de 14.21 mg/mL.

Se detectó una banda tenue de actividad PGH en el SN. En la fracción del 30% (w/v) y la de 90% (w/v) de saturación no se detectó actividad (Figura 10).

La actividad PGH se concentró en la fracción del 70% (w/v) de saturación (figura 10), observándose dos bandas termoestables de aproximadamente 110 kDa y 80 kDa sobre células de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, microorganismo indicado como sustrato de referencia en pruebas de actividad lítica por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés), por lo que se continuo con la purificación por cromatografía de intercambio catiónico. Se obtuvieron dos fracciones de interés, lo que quedo retenido a la columna (R) y lo que no interaccionó con la fase estacionaria (NR) (Figura 14). Los resultados del fraccionamiento de las proteínas del sobrenadante de cultivo neutralizado se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3. Primer fraccionamiento de las proteínas del sobrenadante de cultivo neutralizado de *P. acidilactici* ATCC 8042.

Etapa	muestra A	$_{750\text{ nm}}$	proteína soluble* (mg/mL)	FD	mg/mL	volumen (mL)	proteína (mg)	rendimiento (%)
Cultivo	MC _d	0.31	1.34	5	6.72	500	3362	-
		0.32	1.36					
		0.31	1.33					
	SN _d	0.22	0.94	5	4.74	464	2201	100
		0.22	0.95					
		0.22	0.96					
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ y diálisis	30%	0.19	0.80	-	0.79	3.6	3	0.1
		0.19	0.79					
		0.18	0.78					
	70%	0.25	1.06	20	20.63	54	1114	51
		0.23	0.99					
		0.24	1.05					
90%	0.34	1.45	10	14.21	40	568	26	
	0.32	1.37						
	0.34	1.44						
CII fracción NR	NR	0.31	1.32	20	26.90	1.3	35	2
		0.32	1.35					
		0.32	1.36					
CII fracción R	8	-	-	60	76.22	0.9	69	3
		0.29	1.26					
		0.30	1.28					
	9	-	-	20	24.81	0.45	11	1
		0.28	1.21					
		0.30	1.27					
10	-	-	-	0.66	0.63	0.3	0.01	
	0.15	0.66						
	0.14	0.61						

Abreviaturas: **M C_d**: Medio de cultivo dializado; **SN_d**: sobrenadante de cultivo neutralizado y dializado; **CII**: Cromatografía de intercambio iónico; **NR**: No Retenido; **R**: Retenido. **C.V. < 3.4 %** *DC Protein Assay (Bio-Rad). *Curva de calibración de BSA (apéndice B).

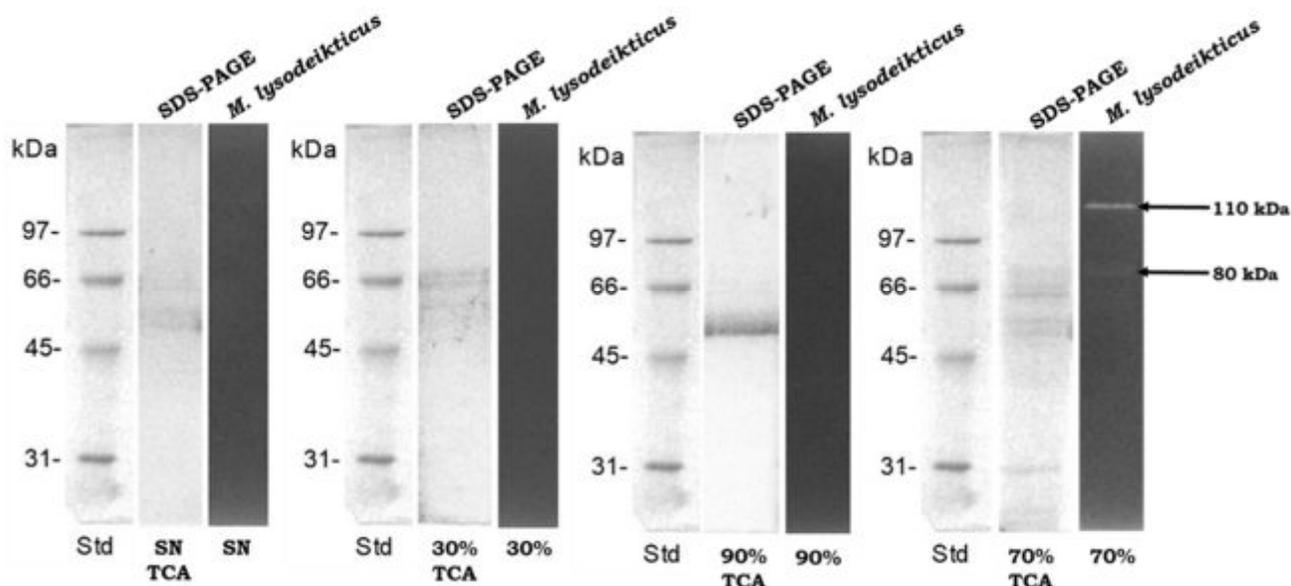


FIGURA 10. Perfil de proteínas por SDS-PAGE (10% T). Muestras: marcadores de bajo peso molecular (Std) (*Bio-Rad*); sobrenadante neutralizado, dializado y precipitado con TCA (SN TCA); fraccionamiento al 30% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dializada y precipitada con TCA (30% TCA); fraccionamiento al 70% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dializada y precipitada con TCA (70% TCA); fraccionamiento al 90% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dializada y precipitada con TCA (90% TCA). **Detección de la actividad lítica termoestable (85 °C/10 min) en medio reductor en *Micrococcus lysodeikticus* (10% T).** Incubación en amortiguador Tris-HCl (25 mM, pH 7.0, 30 °C, 24 h). *Gel Doc™ XR+ Imaging System* (*Bio-Rad*).

En los perfiles de proteína correspondientes al SN TCA y a 30% TCA (Figura 10), no se aprecian bandas de proteína, a comparación del perfil de la fracción al 90% TCA.

Una de las razones que podrían influir en la no detección de bandas, sería que la concentración de proteína de la muestra se encuentre por debajo del límite de detección

del azul *Coomassie* R-250 que, bajo las condiciones de trabajo empleadas, fue de 750 ng BSA (apéndice E) o a la sobrestimación de la concentración de proteína por la interferencia del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sin embargo, la proporción de muestra:amortiguador, durante la diálisis fue de 1:100.

En los perfiles de proteínas obtenidos con los distintos métodos de tinción con azul de *Coomassie* y nitrato de plata (Figura 11), se observó que el gel con las bandas más definidas fue el de la fracción al 70% que se tiñó con azul de *Coomassie* G-250 (Figura 11D). En esta fracción se aprecian dos bandas de muy baja abundancia de aproximadamente 97 kDa y 112 kDa. Con tinción de plata se puede apreciar una banda de alto peso molecular (PM) (Figura 11A), que podría corresponder a la proteasa extracelular termoestable reportada previamente por Llorente-Bousquets *et al.* (2008).

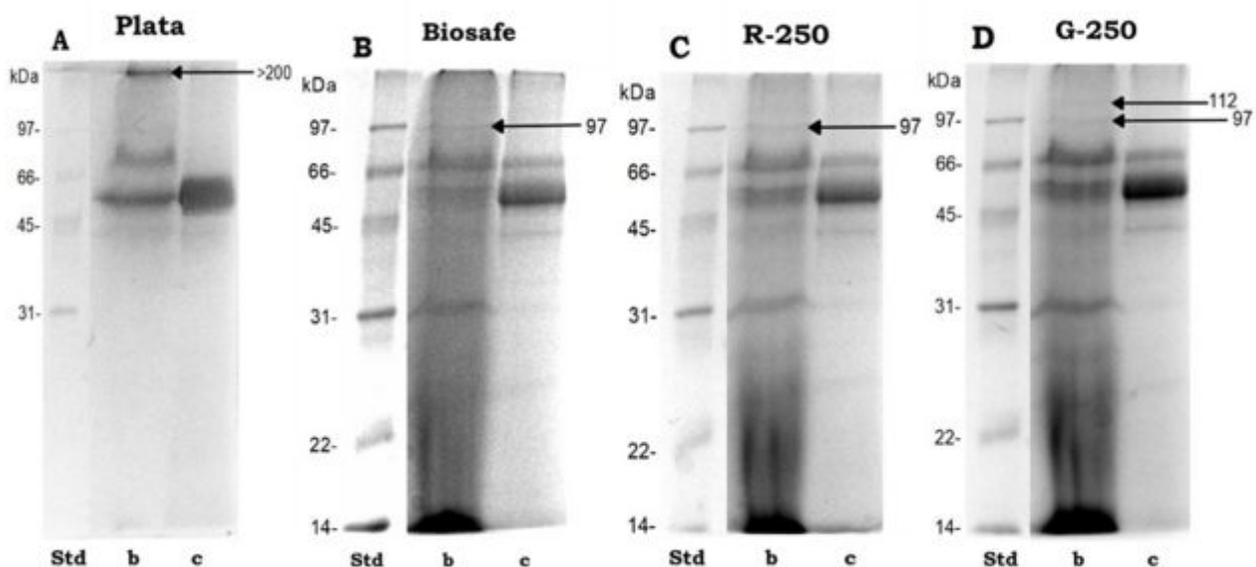


FIGURA 11. Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5% T). Diferentes métodos de tinción de geles de poliacrilamida. Mismas condiciones que en la Figura 10. Muestras: marcadores de bajo peso molecular (Std) (*Bio-Rad*); 70% TCA (b) y 90% TCA (c). *Gel DocTM XR+ Imaging System* (*Bio-Rad*).

El azul de *Coomassie* en su estado micelar no penetra al gel, lo que repercute favorablemente en la sensibilidad de la tinción, sin embargo, tanto la tinción como la cuantificación de proteínas dependen de las interacciones electrostáticas (entre los residuos de aminoácidos básicos y el colorante) e hidrofóbicas (entre los residuos de aminoácidos aromáticos o mediante la formación del complejo SDS-proteína con el colorante) (Smejkal, 2006). Estudios han demostrado una correlación significativa entre la intensidad del color de las bandas y el número de residuos de lisina, histidina y arginina presentes en la proteína de interés (Tal *et al.*, 1985). Con base en lo anterior, es posible que la muestra contenga un bajo contenido de residuos básicos.

La tinción con plata es un método de alta sensibilidad que al igual que la tinción con azul de *Coomassie* requiere de un medio ácido (Merril, 1990). Debido a que la reducción del ion plata ocurre en la superficie del gel, la reproducibilidad de la tinción depende del tiempo y número de lavados del gel con agua. Los aldehídos utilizados modifican covalentemente a las proteínas lo que hace que la tinción sea incompatible con espectrometría de masas. Si bien se puede omitir la adición del glutaraldehído, el formaldehído es indispensable para la reducción (Smejkal, 2006), por lo que se decidió utilizar para las demás tinciones azul de *Coomassie*.

La banda de 110 kDa puede tratarse de la banda de 112 kDa observada en el perfil electroforético (Figura 11D). Esta banda de 110 kDa coincide con lo reportado anteriormente por Llorente-Bousquets (2008) y por Munguía-Villavicencio (2015).

Se realizaron ensayos de actividad proteolítica para corroborar que no hubiera una proteasa interfiriendo en la obtención del perfil de proteínas. Se encontraron dos bandas de >200 kDa en la fracción de 70% y 90% (Figura 12).

De acuerdo con Contreras-Cruz (2013), los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 no presentaron actividad lítica y proteolítica bajo ninguna de las condiciones de ensayo utilizando MRS comercial. La producción de proteasas se favoreció ante la

limitación de nutrientes, debido a que la fuente de carbono ejerce represión catabólica inhibiendo la síntesis de estas enzimas. Esto concuerda con la baja actividad proteolítica extracelular de *P. acidilactici* detectada en gelatina. La concentración de tripsina que se requirió para visualizar la banda de actividad fue de 0.004 µg/mL (apéndice F).

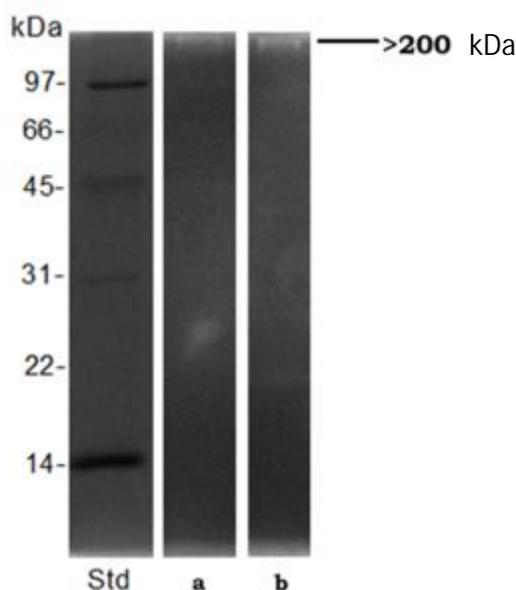


FIGURA 12. Actividad proteolítica de *P. acidilactici* A TCC 80 42 (12.5% T). Muestras: marcadores de bajo peso molecular (Std) (*Bio-Rad*); fraccionamiento al 70% de saturación en condiciones no reductoras (a); fraccionamiento al 90% de saturación en condiciones reductoras (b). Incubación en amortiguador Tris-HCl (50 mM), CaCl₂ (5 mM) y NaCl (200 mM), pH 8.0, 96 h, 37 °C. *Gel Doc™ XR+ Imaging System* (*Bio-Rad*).

En un segundo ensayo de actividad PGH en zimogramas al 16.5% T, a partir de muestras que no sufrieron el tratamiento térmico, se detectaron 3 bandas de actividad lítica sobre células de *Micrococcus lysodeikticus* de 110 kDa, 70 kDa y 26 kDa, y 4 bandas más definidas en geles con células de *Listeria innocua* de 110 kDa, 70 kDa, 28 kDa y 26 kDa (Figura 13).

La banda de 110 kDa es más intensa en el gel de *M. lysodeikticus* en comparación con el gel de *L. innocua*, lo que podría indicar que la enzima es más afín al microorganismo de referencia. Por el contrario, las bandas de actividad lítica de menor peso molecular en *L. innocua* son más intensas y sólo se logra apreciar una banda en *M. lysodeikticus*. Si bien, el número e intensidad de las bandas líticas dependen del tipo de pared celular usada como sustrato en la elaboración de los geles (Leclerc y Asselin, 1989), mediante zimografía no es posible determinar el tipo de actividad PGH.

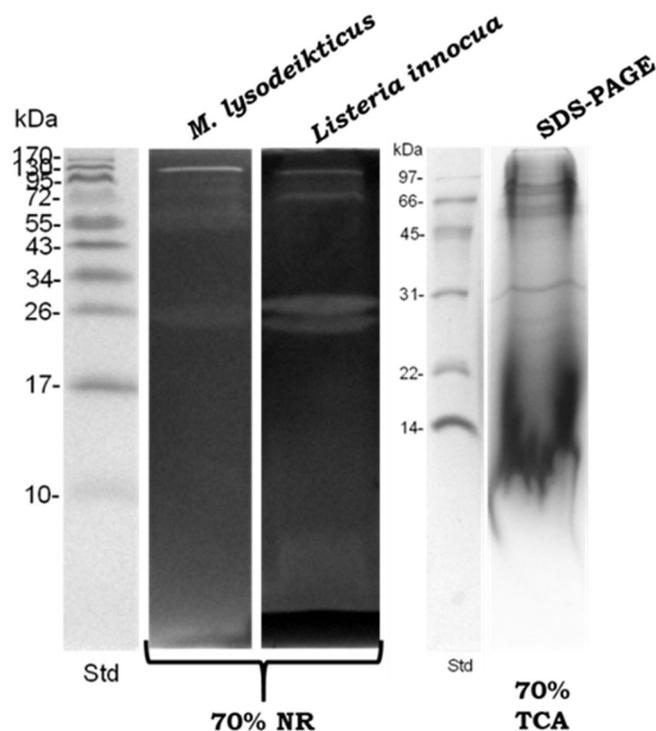


FIGURA 13. Detección de la actividad lítica termosensible en medio no reductor en *Micrococcus lysodeikticus* y *Listeria innocua* (16.5% T). Muestras: marcadores de peso molecular preteñidos (Std) (*Fermentas*), fraccionamiento al 70% de saturación (70% NR). Incubación en amortiguador Tris-HCl (pH 7.0, 30 °C, 24 h). **Perfil de proteínas por SDS-PAGE (16.5% T).** Muestras: 70% TCA y marcadores de bajo peso molecular (Std) (*Bio-Rad*). *Gel DocTM XR+ Imaging System* (*Bio-Rad*).

En el cromatograma (Figura 14) se puede apreciar la separación de la muestra desalada al 70% mediante la cromatografía de intercambio catiónico; se observa un primer pico que eluye sin NaCl, el cual corresponde a la fracción que no interacciona con la columna (NR) y en la que no se detectó actividad lítica. La mayor altura del primer pico puede deberse a que esta fracción contiene compuestos coloridos que también pueden absorber en la región ultravioleta del espectro. Los siguientes dos picos, de menor abundancia, eluyen a concentraciones superiores del 65% de NaCl, las proteínas presentan una carga positiva (pH menor de su punto isoeléctrico) y actividad lítica.

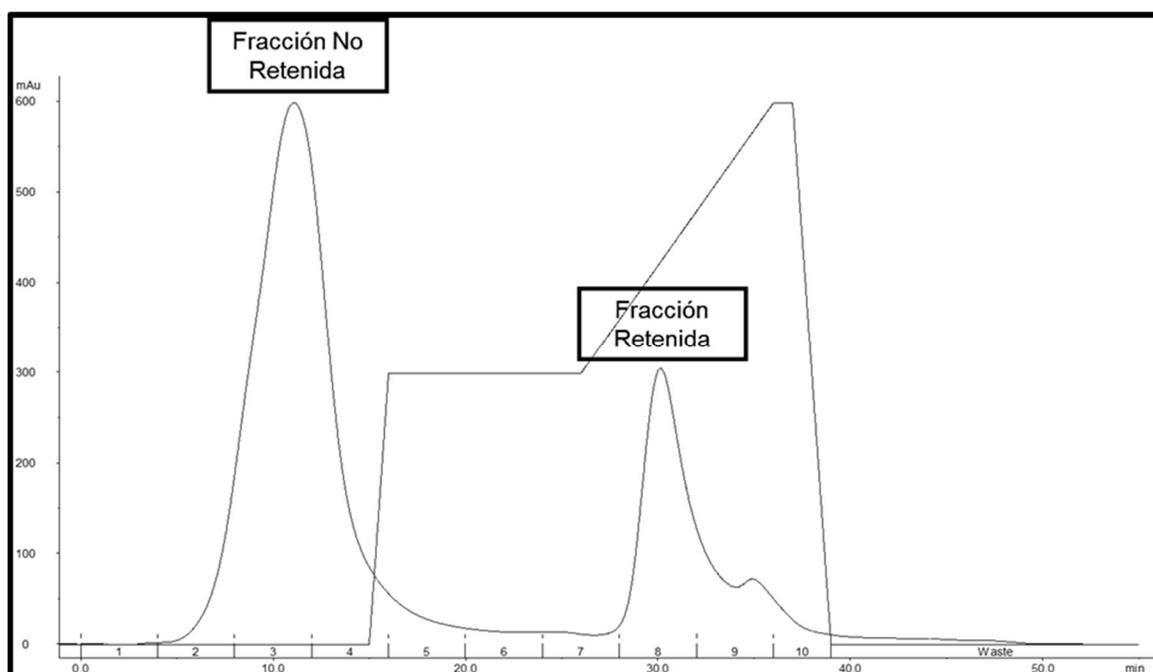


FIGURA 14. Separación cromatográfica por intercambio catiónico.

Columna: *HiPrep SP FF 16/10 (GE Healthcare)*; muestra: 70% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y desalada; volumen de la muestra: 5 mL; flujo: 1.5 mL/min; detección: 254 nm. Perfil de elución: 0 min: 0% B; 15 min: 0% B; 16 min: 50% B; 26 min: 50% B; 26 min: 100% B; 37 min: 100% B; 39 min; 0% B; 60 min: 0% B. *GE Äkta Prime Plus*, Reino Unido.

Se realizó un segundo fraccionamiento (Tabla 4) a partir del resto del sobrenadante (314 mL), que se neutralizó y se fraccionó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30%, 70% y 100%. La cuantificación de proteína se realizó mediante el método modificado de Lowry y Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*). Los resultados de ambos métodos se compararon incluyendo la medición a 280 nm (Tabla 5).

En la fracción del 70% se logró recuperar el 73% de proteína a una concentración de 24.89 mg/mL (Tabla 4). La actividad PGH se concentró en esta fracción (Figura 16).

En la fracción del 100%, se recuperó el 40% de la proteína a comparación del primer ensayo en que se logró recuperar un 26% de proteína.

TABLA 4. Segundo fraccionamiento de las proteínas del sobrenadante de cultivo neutralizado de *P. acidilactici* ATCC 8042.

Etapa	muestra	A ₇₅₀ nm	proteína soluble* (mg/mL)	FD	mg/mL	volumen (mL)	proteína (mg)	rendimiento (%)
Cultivo	MC _d	0.22	0.53					
		0.21	0.52	10	5.25	500	2624	
		0.22	0.52					
	SN _d	0.16	0.38					
		0.16	0.37	10	3.79	314	1190	100
		0.17	0.39					
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ y diálisis	30%	0.24	0.59					
		0.24	0.60	2	1.19	35	41	3
		0.24	0.59					
	70%	0.25	0.62					
		0.25	0.61	40	24.89	35	871	73
		0.26	0.64					
100%	0.31	0.77						
	0.31	0.78	20	15.47	31	480	40	
	0.30	0.77						
CII Fracción NR	NR	0.28	0.69					
		0.28	0.69	50	34.50	3.5	121	10
		0.27	0.68					
CII Fracción R	I	0.32	0.81					
		0.32	0.80	30	23.99	5.4	130	11
		0.31	0.87					
	II	0.25	0.63					
		0.25	0.61	10	6.36	2.1	13	1
		0.27	0.67					

Abreviaturas: **M C_d**: Medio de cultivo dializado; **SN_d**: sobrenadante de cultivo neutralizado y dializado; **CII**: Cromatografía de intercambio iónico; **NR**: No Retenido; **R**: Retenido; **I**: pico cromatográfico I; **II**: pico cromatográfico II. **C.V. < 4%**. *Curva de calibración de BSA por el método modificado de Lowry (Peterson, 1977) (apéndice B).

TABLA 5. Comparación entre los distintos métodos utilizados en la cuantificación de proteínas de cada una de las fracciones obtenidas a partir del sobrenadante de cultivo neutralizado *P. acidilactici* ATCC 8042.

Muestra	A _{280 nm}	Lowry modificado (mg/mL)	Bradford (mg/mL)
SN _d	5.40	3.79	0.07
30%	1.76	1.19	0.25
70%	14.24	24.89	0.74
NR	18.60	15.47	1.26
I	7.64	23.99	ND
II	2.84	6.36	ND
100%	23.43	34.50	0.13

Abreviaturas: SN_d: sobrenadante de cultivo neutralizado y dializado; **NR**: No Retenido. I: pico cromatográfico I; II: pico cromatográfico II. **ND**: No determinado.

El método de Bradford se basa en la interacción entre el azul de *Coomassie* G-250 y los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente la arginina, en donde se produce un cambio en el color de rojo a azul y un desplazamiento hipsocrómico de las bandas espectrales de 465 a 595 nm (Bradford, 1976). Los métodos de Lowry y 280 nm se basan en la cuantificación de los aminoácidos tirosina y triptófano.

La baja concentración de proteína por Bradford se relaciona con la baja detección de bandas por el azul de *Coomassie* en SDS-PAGE. Se podría pensar que en ambas determinaciones interfiere el *Tween* 80, es decir, el complejo detergente-proteína compete con el reactivo de Bradford; también interfiere con el método modificado de Lowry y la tinción con plata.

La concentración micelar crítica (CMC) del *Tween* 80 (0.01 mM) indica que tan fuerte se une un detergente a las proteínas y además determina si puede ser removido por diálisis (Von Jagow *et al.*, 2003). En este caso el detergente no es dializable y al no ser removido afectó las lecturas de todas las determinaciones de proteína.

Munguía-Villavicencio (2015) reportó una concentración de proteína en el sobrenadante concentrado 10X por el método de Bradford de 3.24 mg/mL a las 8 h de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 y para Del Castillo-Núñez (2017) la concentración de proteína soluble en el sobrenadante de cultivo correspondió a 0.045 mg/mL. Ambos autores encontraron actividad lítica en los sobrenadantes concentrados 10X, tal y como se utilizó para la formulación de los embutidos tipo salami, contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*, respectivamente.

En este trabajo se obtuvo una concentración 0.07 mg/mL en el sobrenadante no concentrado a las 8 h de crecimiento, dicho valor se aproxima a lo reportado por Del Castillo-Núñez (2017).

Se realizó una comparación entre dos métodos para concentrar proteínas: precipitación con metanol:cloroformo (1:4) utilizada previamente por Munguía-Villavicencio (2015) y precipitación con TCA (20% w/v). La técnica de metanol-cloroformo fue la que permitió observar con una mayor definición los perfiles electroforéticos de la muestra del 70% (Figura 15a) ya que este método está indicado para precipitar proteínas de medios líquidos en presencia de lípidos y detergentes (Wessel y Flügge, 1984), lo que podría explicar porque se obtuvieron bandas más definidas con este método a diferencia de la precipitación con TCA (Figura 15b) que utilizó Llorente-Bousquets (2008).

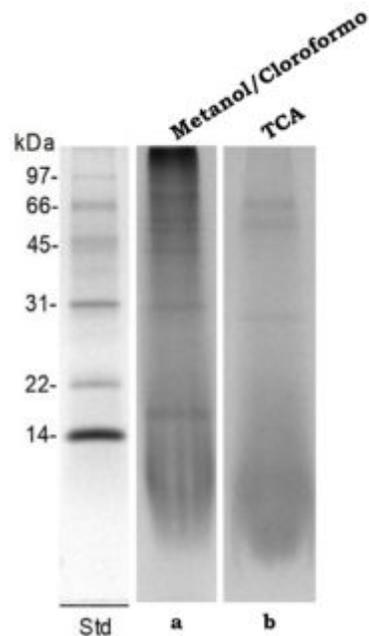


FIGURA 15. Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5% T). Comparación entre dos métodos de precipitación de proteínas. Muestras: marcadores de bajo peso molecular (Std) (*Bio-Rad*); fraccionamiento al 70% de saturación y precipitada con una mezcla de metanol-cloroformo en condiciones reductoras (a); fraccionamiento al 70% de saturación y precipitada con TCA al 20% (w/v) en condiciones reductoras (b). *Gel Doc™ XR+ Imaging System* (*Bio-Rad*).

Como se observa en la Figura 15, la precipitación con disolventes fue el método con mejores resultados, ya que en este perfil es donde se aprecian un mayor número de bandas a comparación del obtenido por precipitación con TCA.

Posteriormente, se realizó un ensayo de actividad lítica empleando tres distintos sustratos de manera simultánea, el microorganismo de referencia y dos microorganismos relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos: *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

En la Figura 16, se muestra el perfil de proteínas de la fracción de 70% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, así como la actividad lítica en los distintos tipos de sustratos evaluados.

En el perfil de proteínas (SDS-PAGE) se observan 5 bandas de proteína de aproximadamente: 80 kDa, 60 kDa, 55 kDa, 28 kDa y 17 kDa. En cuanto a los ensayos zimográficos, en el correspondiente a *M. lysodeikticus* se aprecian 3 bandas de aproximadamente: 110 kDa, 70 kDa y 26 kDa. En los geles de *S. aureus* y *L. monocytogenes* la banda más definida es de aproximadamente 26 kDa y se puede observar que dicha banda presenta actividad lítica contra los tres microorganismos ensayados (Figura 16). También se observa un perfil de bandeo por debajo de 17 kDa detectado en los geles de *S. aureus*.

Estudios de autólisis de algunas cepas de *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, aisladas de diferentes alimentos fermentados, mostraron un perfil de actividad PGH característico en ambas especies a partir de extractos proteínicos (Mora *et al.*, 2003); en dicho estudio se observó una banda de 116 kDa, la cual fue detectada después de 1 h a 2 h de la renaturalización del gel (perfil primario). También se observaron un conjunto de bandas adicionales de entre 110 kDa y 45 kDa, las cuales fueron detectadas posteriormente entre las 12 h a 18 h de la renaturalización de gel (perfil secundario) y en el que no estuvo involucrada la degradación proteolítica de la banda principal (Mora *et al.*, 2003).

Con base a lo anterior, y a que se comprobó que hay una baja actividad proteolítica en el sobrenadante, las bandas de bajo peso molecular corresponderían a bandas de actividad propias de *P. acidilactici* ATCC 8042; además se detecta la banda de 110 kDa (con y sin tratamiento térmico) en *M. lysodeikticus*.

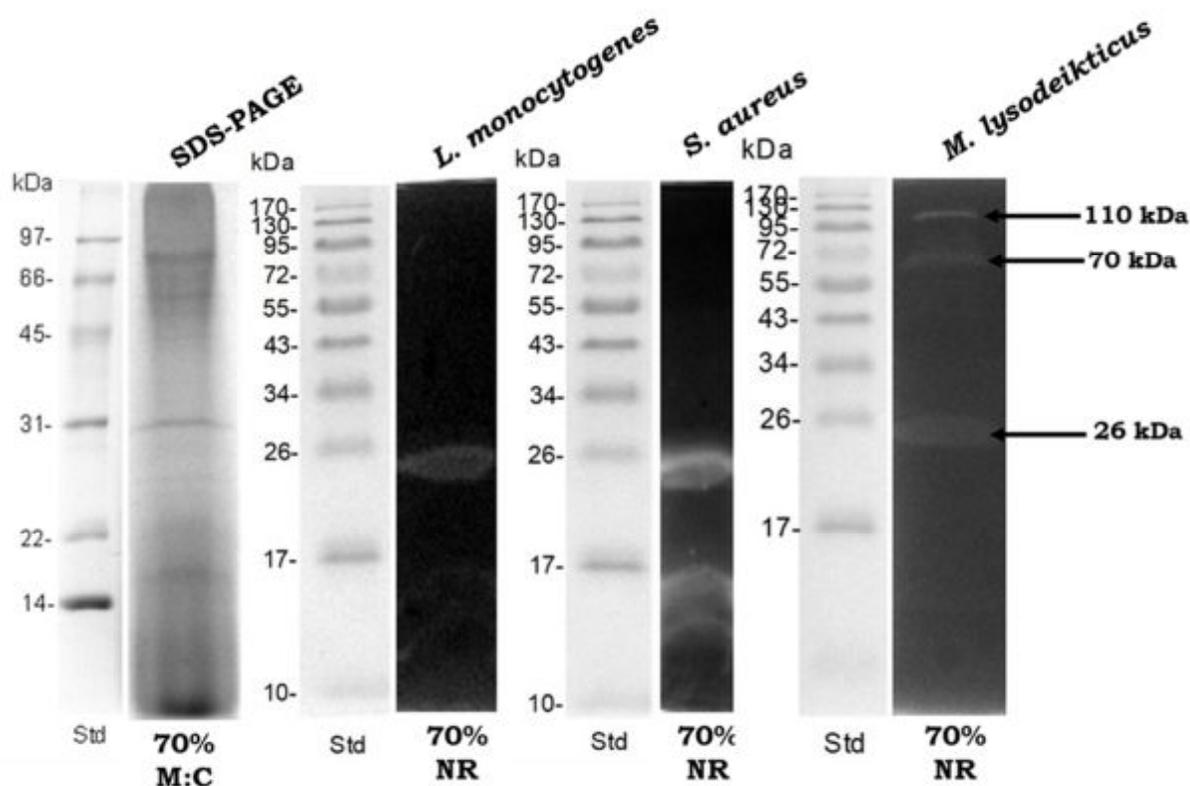


FIGURA 16. Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5% T). Fracción 70. Muestras: marcadores de bajo peso molecular (Std) (*Bio-Rad*); fraccionamiento al 70% de saturación y precipitada con una mezcla de metanol:cloroformo en condiciones reductoras correspondientes (70%, M:C). **Detección de la actividad lítica termosensible en medio no reductor (NR) en *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (12.5% T).** Muestras: marcadores de peso molecular preteñidos (Std) (*Fermentas*); fraccionamiento al 70% de saturación (70% NR). Incubación en amortiguador Tris-HCl (pH 7.0, 30 °C, 24 h). *Gel Doc™ XR+ Imaging System* (*Bio-Rad*).

Cabe resaltar que en este trabajo las bandas de menor peso molecular corresponden a un perfil primario, ya que son las primeras bandas líticas que se observan (entre las 3 h y 5 h de incubación) en *S. aureus* sin necesidad de teñir el gel con azul de metileno.

Se determinó que las bandas de bajo peso molecular son termosensibles y que posiblemente su actividad depende de algún enlace disulfuro, razón por la cual no se habían detectado en el primer ensayo de actividad lítica (Figura 10), ya que la muestra utilizada para ese ensayo fue sometida a un tratamiento térmico en condiciones reductoras en el gel al 10% T.

Se sugiere que las bandas de alto peso molecular pueden tener actividad PGH tipo *N*-acetilmuramidasa o *N*-acetilglucosaminidasa, ya que solo reconocieron la pared *M. lysodeikticus*. Vollmer (2008) menciona que hay modificaciones en el peptidoglicano de algunos microorganismos, como es el caso de la *O*-acetilación del C₆ de los residuos del NAM en *S. aureus* o la *N*-desacetilación del NAG en *L. monocytogenes*. Debido a estas modificaciones, los microorganismos no son susceptibles a enzimas como la lisozima, la cual tiene actividad tipo muramidasa.

Se ha demostrado que algunas especies bacterianas, que incluyen *E. coli*, *E. hirae* y *B. subtilis*, poseen más de una PGH que hidroliza el mismo enlace (Shockman y Höltje, 1994), este podría ser el caso de la banda de proteína de 26 kDa.

En los perfiles correspondientes a los picos I y II (Figura 17 y 18, respectivamente), provenientes de la columna de intercambio catiónico, la mayor actividad lítica correspondió a un perfil de bandas termolábiles de aproximadamente (26, 15, 14, y 13) kDa sobre *S. aureus* y en menor medida sobre *L. monocytogenes*, y se detectó la de 14 kDa en el microorganismo de referencia tras un tiempo prolongado de incubación.

En cuanto a los perfiles de proteína, la única banda que se aprecia con claridad es la correspondiente a 14 kDa en el perfil del pico I (Figura 17, carril SDS-PAGE). Las bandas

de bajo peso molecular son relevantes debido a que muestran un importante efecto lítico contra los dos microorganismos patógenos utilizados.

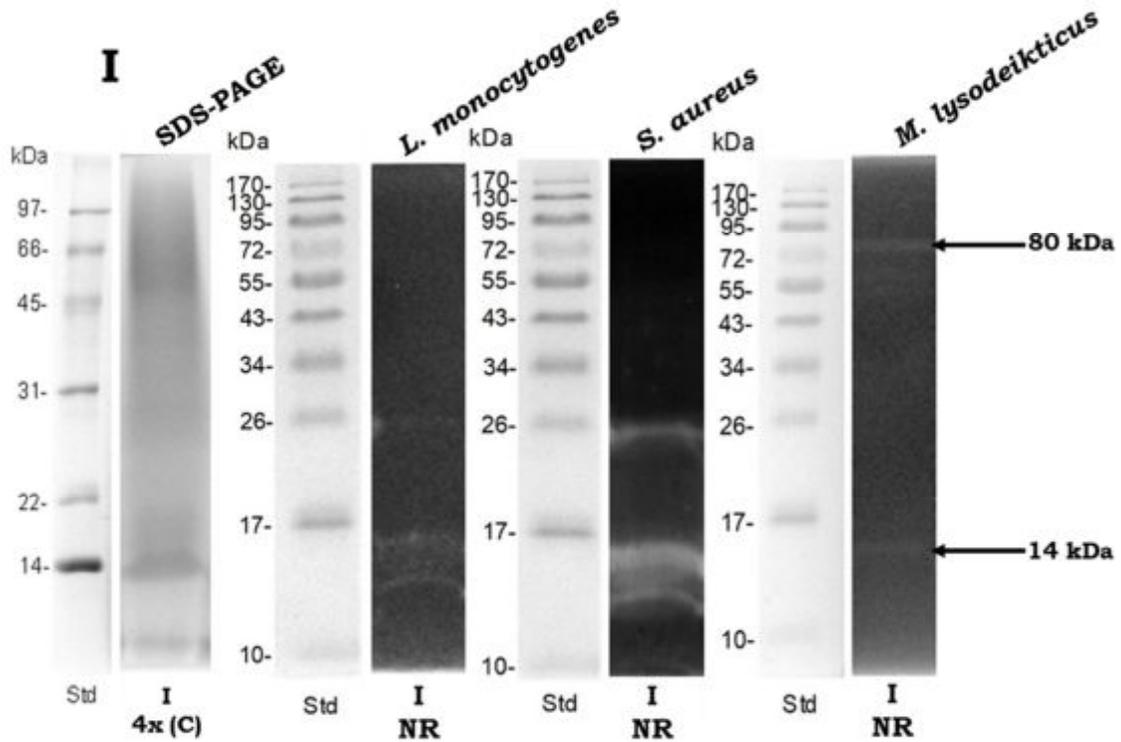


FIGURA 17. Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5% T). Pico I. Muestras: marcadores de bajo peso molecular (Std) (*Bio-Rad*); pico I ultrafiltrado en condiciones reductoras. **Detección de la actividad lítica termosensible en medio no reductor (NR) en *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (12.5% T).** Muestras: marcadores de peso molecular preteñidos (Std) (*Fermentas*); pico I ultrafiltrado (I NR). Incubación en amortiguador Tris-HCl (pH 7.0, 30 °C, 24 h). *Gel DocTM XR+ Imaging System* (*Bio-Rad*).

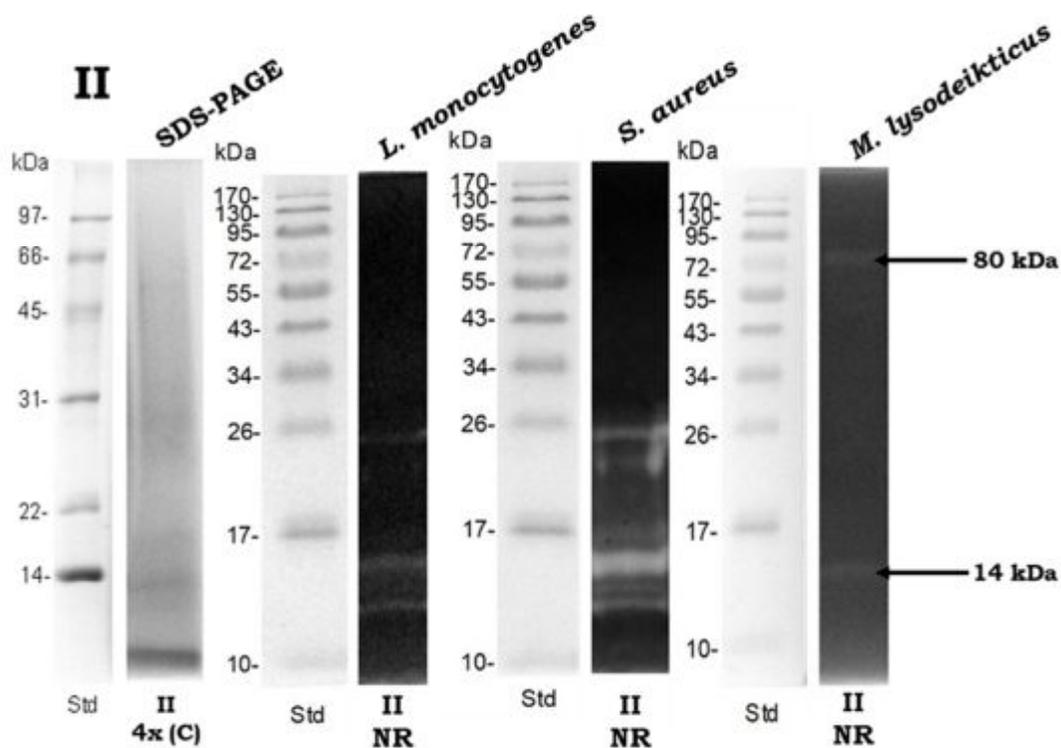


FIGURA 18. Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5 % T). Pico II. Muestras: marcadores de bajo peso molecular (Std) (*Bio-Rad*); pico II ultrafiltrado en condiciones reductoras (II 4x(C)). **Detección de la actividad lítica termosensible en medio no reductor (NR) en *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (12.5% T).** Muestras: marcadores de peso molecular preteñidos (Std) (*Fermentas*); pico II ultrafiltrado (II NR). Incubación en amortiguador Tris-HCl (pH 7.0, 30 °C, 24 h). *Gel DocTM XR+ Imaging System* (*Bio-Rad*).

Recientemente se localizó en la membrana celular de *P. acidilactici* ATCC 8042 una PGH de 99 kDa con dos regiones conservadas de *N*-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa y *N*-acetilglucosaminidasa y otra PGH de 110 kDa de función desconocida. La fracción proteínica concentrada, conteniendo ambas enzimas, fue capaz de inhibir el desarrollo de *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* (García-Cano et al., 2011).

En el trabajo de Ortega-Escobar (2017) se evaluó la actividad bifuncional de la PGH de 99 kDa por medio de técnicas moleculares. Se obtuvieron 6 subclonas que contenían los dominios catalíticos de la enzima (dominio *N*-acetil-L-alanina amidasa y dominio *N*-acetilglucosaminidasa) y regiones intermediarias entre dichos dominios (Figura 19).

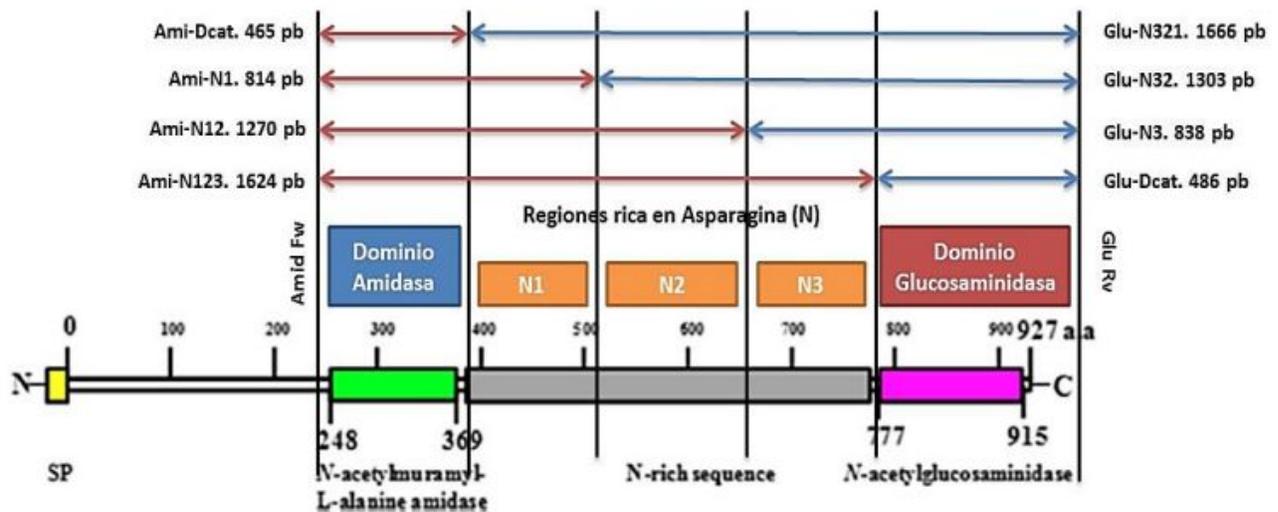


FIGURA 19. Construcción de subclonas a partir de la PGH bifuncional de 99 kDa. Fuente: Campos-Gómez, 2015.

Se encontró que las subclonas del dominio *N*-acetil-L-alanina amidasa que contenían al menos dos regiones de la región intermediaria, la cual es rica en asparaginas, presentaban actividad lítica en el microorganismo de referencia, a comparación de las subclonas que solo contenían el dominio catalítico. Las bandas de actividad, pertenecientes tanto a la fracción citosólica como a los restos celulares, tuvieron pesos moleculares de 65 kDa, 51 kDa y 35 kDa. También se realizaron zimogramas a partir del sobrenadante de cultivo concentrado 200 veces por UF, sin embargo, no se encontraron bandas de actividad lítica.

Del estudio de biología molecular se desprende que para detectar actividad lítica se requiere de al menos un dominio catalítico y una de las regiones intermedias. De presentarse un procesamiento autocatalítico y que los fragmentos puedan traslocar la membrana, entonces estos podrían ser responsables del fenómeno de bioconservación, pero no hay coincidencia con los pesos moleculares encontrados en este estudio, lo que demuestra que se trata de proteínas diferentes.

Por su parte, la proteína de 110 kDa ha sido clonada y se había reportado que era un transportador tipo ABC (Matamoros, 2013). Sin embargo, Barbosa-González (2018) obtuvo una enzima recombinante activa que actúa como muramidasa y que tiene efecto contra diversos patógenos. En estos estudios ha sido consistente encontrar productos termolábiles que podrían ser de degradación y otras proteínas que conservan pesos moleculares específicos y que retienen actividad antimicrobiana, con un espectro diferente al de la enzima íntegra.

En la Tabla 6 se enlistan los estudios realizados sobre las PGH recombinantes de *P. acidilactici* ATCC 8042 correspondientes a las bandas de 110 kDa y 99 kDa.

En este trabajo se demostró la actividad lítica en el sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042. Se desconoce el mecanismo por el cual las PGH detectadas se transportan y llegan al sobrenadante, sin embargo, en la industria biotecnológica se persigue la obtención de proteínas extracelulares ya que al disminuir el número de etapas de purificación se puede obtener un mejor rendimiento a menor costo.

TABLA 6. Estudios de biología molecular sobre las PGH recombinantes de 110 kDa y 99 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042.

Banda/Subclona	Actividad	Vector	Expresión	Zimograma (microorganismo)	PM (kDa)	Localización (proteína recombinante)	Referencia
110 kDa	Transportador tipo ABC	pET-22b(+)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>M. lysodeikticus</i>	101	-	Matamoros-Ortega, 2013.
			<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	<i>S. aureus</i>	80 28 25	Sobrenadante	
99 kDa	<i>N</i> -acetilmuramidasa	pET-19b(+)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>M. lysodeikticus</i>	100	Sobrenadante	García-Cano, 2013.
99 kDa	<i>N</i> -acetilmuramidasa	pET-22b	<i>E. coli</i> XL-1 Blue	<i>M. lysodeikticus</i>	70	Fracción celular	Campos-Gómez, 2013.
Subclona p22Ami123	<i>N</i> -acetilmurami- <i>L</i> -alanina amidasa	pET-22b	<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS	<i>M. lysodeikticus</i>	65	Citosol y restos celulares	Campos-Gómez, 2015.
Subclona p22GluN3					31		
Subclona p22GluN32	<i>N</i> -acetilglucosaminidasa	pET-22b	<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS	<i>M. lysodeikticus</i>	51	Citosol	Campos-Gómez, 2015.
Subclona p22GluN321					65		
Subclona p22GluN3	<i>N</i> -acetilglucosaminidasa	pET-22b	<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS	<i>M. lysodeikticus</i>	35	Citosol y restos celulares	Ortega-Escobar, 2017.
Subclona p22GluN32					51		
Subclona p22GluN321					65		

Abreviaturas: **p22:** vector de expresión; **Ami:** dominio *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa; **Gluc:** dominio *N*-acetilglucosaminidasa; **N1, N2 o N3:** región intermediaria que abarca la subclona.

10. Conclusiones

Se obtuvo el sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con actividad antimicrobiana.

Se recuperó el 50% de la proteína en la fracción desalada correspondiente al 70% de saturación con sulfato de amonio. Tras evaluar en zimogramas, se detectaron en esta fracción dos bandas de actividad peptidoglicano hidrolasa extracelular termoestable, cuyos pesos moleculares son de aproximadamente 110 kDa y 80 kDa y baja actividad proteolítica.

En la fracción semipura, la mayor actividad lítica correspondió a un perfil de bandas termolábiles de aproximadamente (26, 15, 14, y 13) kDa sobre *S. aureus* ATCC 13565 y en menor medida sobre *L. monocytogenes* ATCC 15313 y sólo se logró apreciar la de 14 kDa en el microorganismo de referencia.

Al compararse los pesos moleculares de las bandas líticas extracelulares detectadas en este trabajo con las proteínas líticas recombinantes se encontró que no hay coincidencia, por lo que se tratan de proteínas diferentes.

Las PGH de bajo peso molecular serían las responsables del fenómeno de bioconservación observado en el embutido tipo salami.

11. Referencias bibliográficas

1. Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M., Alzohairy, M.A., Al-Karaawi, M.A. y Siddiqui, M.U. 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49, 1-11.
2. Alele, N. y Ulbricht, M. 2016. Membrane-based purification of proteins from nanoparticle dispersions: influence of membrane type and ultrafiltration conditions. *Separation and Purification Technology*, 158, 171-182.
3. Álvarez, V.M., von der Weid, I., Seldin, L. y Santos, A.L.S. 2006. Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 625-630.
4. Anany, H., Brovko, L.Y., El Arabi, T., Griffiths, M.W. 2015. Bacteriophages as antimicrobials in food products: applications against particular pathogens. En: T.M. Taylor. Ed. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Cambridge: Woodhead Publishing, 69-87.
5. Barbosa, G. P.A. 2018. Caracterización de la actividad antimicrobiana de la proteína recombinante de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 de 110 kDa. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.
6. Bierne, H. y Cossart, P. 2007. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 377-397.
7. Bio-Rad Laboratories Inc. DC™, *Protein Assay Instruction Manual* [En línea] (Actualizado al 2016).
Disponible en:
http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9005.pdf [Último acceso el 14 de septiembre de 2016].
8. Bio-Rad Laboratories Inc. Bio-Rad *Protein Assay* [En línea] (Actualizado al 2017).
Disponible en:

http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf [Último acceso el 03 de noviembre de 2017].

9. Burgess, R.R. 2009. Protein precipitation techniques. En: R. Burgess y M. Deutscher. Eds. *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, 331-342.
10. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
11. Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C.W. y Lavigne, R. 2011. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 164-171.
12. Campos-Gómez, M.A. 2013. Clonación y expresión de la peptidoglucano hidrolasa de 99 kDa producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
13. Campos-Gómez, M.A. 2015. Caracterización molecular de la peptidoglucano hidrolasa bifuncional de 99 kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM.
14. Chapot-Chartier, M.P. 1996. Les autolysins des bactéries lactiques. *Lait*, 76, 91–109.
15. Chapot-Chartier, M. P. y Kulakauskas, S. 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1-23.
16. Contreras-Cruz, M. 2013. Efecto del medio de cultivo en la producción de enzimas de interés biotecnológico por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
17. Danilovic, B., Jokovic, N., Petrovic, L., Veljovic, K., Tolinacki, M. y Savic, D. 2011. The characterization of lactic acid bacteria during the fermentation of an artisan Serbian sausage (Petrovska Klobasa). *Meat Science*, 88, 668-674.
18. Davidson, P.M., Cekmer, H.B., Monu, E.A. y Techathuvanan, C. 2015. The use of natural antimicrobials in food: an overview. En: T.M. Taylor. Ed. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Cambridge: Woodhead Publishing, 1-27.

19. Del Castillo-Núñez, Y.A. 2017. Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio del sobrenadante de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Tesis de maestría. FES-Cuautitlán, UNAM.
20. De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23; 130-135.
21. De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A. y Hei, K. 2009. Genus III. *Pediococcus*. En: P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer y W.B. Whitman. Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer, 513–532.
22. De Vuyst, L. y Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.
23. Duong-Ly, K.C. y Gabelli, S.B., 2014. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. En: J. Abelson, M. Simon y A. Pyle. Eds. *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, 85-94.
24. Elsser-Gravesen, D. y Elsser-Gravesen, A. 2014. Biopreservatives. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 143, 29-49.
25. Evans, D.R.H., Romero, J.K. y Westoby, M. 2009. Concentration of proteins and removal of solutes. En: R. Burgess y M. Deutscher. Eds. *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, 97-120.
26. Fedorov, T.V., Surovtsev, V.I., Pletnev, V.Z., Borozdina, M.A. y Guse, V.V. 2003. Purification and some properties of lysostaphin, a glycyglycine endopeptidase from the culture liquid of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Biochemistry*, 68, 61-65.
27. Fridrich, E. y Gaynor, E.C. 2013. Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 767-778.
28. Fleming, A. 1922. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London*, 93(653), 306-317.

29. 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.
30. García-Cano, I., Velasco-Pérez, L., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Mendoza-Hernández, G., Llorente-Bousquets, A. y Farrés, A. 2011. Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 607-615.
31. García-Carreño, F.L., Dimes, L.E. y Haard, N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214, 65-69.
32. García, M.H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-41.
33. Garfin, D. 1995. Electrophoretic methods. En: J. Glasel y M.P. Deutscher. Eds. *Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research*. California: Academic Press, 53-109.
34. GE Healthcare, 2010a. *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Principles and Methods* [En línea] (Actualizado al 2016).
Disponible en:
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/SigmaAldrich/General_Information/1/ge-ion-exchange-chromatography.pdf [Último acceso el 24 de noviembre de 2016].
35. GE Healthcare, 2010b. *Strategies for Protein Purification* [En línea] (Actualizado al 2017).
Disponible en:
http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Strategies%20for%20Protein%20Purification.pdf [Último acceso el 10 de noviembre del 2017].
36. Grant, G.A. 2016. Isolation/Purification of proteins. En: R.A. Bradshaw y P.D. Stahl. Eds. *Encyclopedia of Cell Biology*. Massachusetts: Elsevier, 66-74.

37. Green, A.A. y Hughes, W.L. 1955. Protein solubility on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in Enzymology*, 1, 67-90.
38. Guédon, E., Renault, P., Dusko, S. y Delorme, C. 2001. Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3614-3622.
39. Hammond, S.M., Lambert, P.A. y Rycroft, A.R. 1984. The peptidoglycan layer. En: S.M. Hammond, P.A. Lambert y A.R. Rycroft. Eds. *The Bacterial Cell Surface*. Washington: Kapitan Szabo Publishers, 1-28.
40. Herrera, C. y Sacristán, M.S. 1993. Crecimiento de *Pediococcus acidilactici* bajo diferentes condiciones y medios de cultivo. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
41. Heukeshoven, J. y Dernick, R. 1985. Simplified method for silver staining in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6, 103-112.
42. Holland, R., Crow, V. y Curry, B. 2011. *Pediococcus spp.* En: J.W. Fuquay. Ed. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London: Academic Press, 149-152.
43. ISO 17997-2, 2004. Milk-Determination of casein-nitrogen content-Part 2: Direct method.
44. Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbraitė-Survilienė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., Malakauskas, M. y Maruška, A. 2017. Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 1323-1335.
45. Khalid, K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.
46. Koch, A.G. 2004. Biopreservation. En: W.K. Jensen, C. Devine y M. Dikeman. Eds. *Encyclopedia of Meat Sciences*, London: Elsevier, 68-74.
47. Kołożyn-Krajewska, D. y Dolatowski, Z. 2012. Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*, 47, 1761-1772.

48. Koontz, L. 2014. TCA precipitation. En: J.N. Abelson, M.I. Simon y A.M. Pyle. Eds. *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, 3-10.
49. Kumar, J.K. 2008. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 555-561.
50. Labischinski, H. y Maidhof, H. 1994. Bacterial peptidoglycan: overview and evolving concepts. En: J.M. Ghuyssen y R. Hakenbeck. Eds. *Bacterial Cell Wall*. Amsterdam: Elsevier, 23-38.
51. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
52. Leber, T.M. y Balkwill, F.R. 1997. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry*, 249, 24-28.
53. Leclerc, D. y Asselin, A. 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 749-753.
54. Léonil, J., Mollé, D., Bouhallab, S. y Henry, G. 1994. Precipitation of hydrophobic peptides from tryptic casein hydrolysate by salt and pH. *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 591-595.
55. Leroi, F. 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27, 698-709.
56. Llorente-Bousquets, A. 2008. Caracterización de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.
57. Llorente-Bousquets, A., Pérez-Munguía, S. y Farrés, A. 2008. Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 694-699.
58. Lortal, S., Valence, F., Bizet, C. y Maubois J.L. 1997. Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species. *Research in Microbiology*, 148, 461-474.

59. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. y Clark, D.P. 2009. *Brock Biología de los microorganismos*. 12a Ed. Madrid: Pearson Educación, 74-77.
60. Matamoros-Ortega, S.C. 2013. Identificación de la actividad lítica de la proteína similar a transportador ABC en *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM.
61. McCue, J.T. 2014. Use and application of hydrophobic chromatography for protein purification. En: J. Abelson, M. Simon y A. Pyle. Eds. *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, 51-65.
62. Merrill, C. 1990. Gel-Staining Techniques. En: M.P. Deutscher. Ed. *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, 477-488.
63. Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M.G., Senini, L. y Manachini, P.L. 2003. Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 561-570.
64. Mozzi, F. 2016. Lactic Acid Bacteria. En: B. Caballero, P. Finglas y F. Toldra. Eds. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press, 501-508.
65. Munguía-Villavicencio, P.M. 2015. Evaluación de la actividad antagónica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 sobre la expresión de algunos factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Tesis de maestría. FES-Cuautitlán, UNAM.
66. Nandakumar, M.P., Shen, J., Raman, B. y Marten, M.R. 2003. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research*, 2, 89-93.
67. Najjari, A., Amairi, H., Chaillou, S., Mora, D., Boudabous, A., Zagorec, M. y Ouzari, H. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of peptidoglycan hydrolases of *Lactobacillus sakei*. *Journal of Advanced Research*, 7, 155-163.
68. Nes, I.F. y Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, 55, 50-61.
69. Novák, P. y Havlíček, V. 2013. Protein extraction and precipitation. En: P. Ciborowski y J. Silberring. Eds. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*. Great Britain: ELSEVIER, 79-90.

70. O'Bryan, C.A., Crandall, P.G. Ricke, S.C. y Ndahetuye, J.B. 2015. Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: types and mechanisms of action. En: T.M. Taylor. Ed. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Cambridge: Woodhead Publishing, 117-136.
71. Organización Mundial de la Salud, 2017. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [En línea] (Actualizado al 2017).
Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/> [Último acceso el 28 de septiembre de 2017].
72. Oropeza, D., Kurz, L. y Wilkesman, J. 2015. Zimografía de actividad calpaína en fuentes cárnicas como criterio de calidad. *Revista Científica*, 25(1), 19-26.
73. Ortega-Escobar, A.I. 2017. Actividad antimicrobiana de enzimas recombinantes generadas a partir de una proteína bifuncional producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
74. Patton, W.F. 2001. Detecting proteins in polyacrylamide gels and on electroblot membranes. En: S.R. Pennington y M.J. Dunn. Eds. *Proteomics*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 65-86.
75. Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-356.
76. Porto, M.C., Kuniyoshi, T.M., Azevedo, P.O.S., Vitolo, M. y Oliveira, R.P.S. 2017. *Pediococcus* spp.: an important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 361-374.
77. Raccach, M. 2014. *Pediococcus*. En: C.A. Batt y M.L. Tortorello. Eds. *Encyclopedia of Food Microbiology*. London: Academic Press, 1-5.
78. Reynolds, J.A. y Tanford, C. 1970. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66, 1002-1007.

79. Roe, S. 1995. Separation based on structure. En: E.L.V. Harris y S. Angal. Eds. *Protein purification methods: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 175.
80. Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W. y Mougous, J.D. 2011. Type IV secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 475, 343-347.
81. Santarén, J.F. 2004. De la tesis doctoral de Tiselius a la proteómica: setenta y cinco años de electroforesis de proteínas. *Arbor CLXXVII*, 698, 259-284.
82. Schirru, S., Favaro, L., Mangia, N.P., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., Fancello, F., Gombossy, B.D., de Souza, R.P. y Todorov, S.D. 2014. Comparison of bacteriocins production from *Enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimized commercial MRS medium. *Annals of Microbiology*, 64, 321-331.
83. Sharma, A.K., Kumar, S., Harish, K., Dhakan, D.B. y Sharma, V.K. 2016. Prediction of peptidoglycan hydrolases – a new class of antibacterial proteins. *BMC Genomics*, 17,411-422.
84. Shockman, G.D. y Høltje, J.V. 1994. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. En: J.M. Ghuyssen y R. Hakenbeck. Eds. *Bacterial Cell Wall*. Amsterdam: Elsevier, 131-166.
85. Simpson, W.J. y Taguchi, H. 1995. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. En: B.J.B. Wood y W.H. Holzapfel. Eds. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 125-164.
86. Smejkal, G.B. 2006. Proteins staining in polyacrylamide gels. En G.B. Smejkal y A. Lazarev. Eds. *Separation Methods in Proteomics*. London: Taylor & Francis, 439-452.
87. Stanbury, P.F., Whitaker, A. y Hall, S.J. 1995. Media for industrial fermentations. En: P.F. Stanbury, A. Whitaker y S.J. Hall. Eds. *Principles of Fermentation Technology*. Great Britain: Butterworth Heinemann, 93-122.
88. Strating, H. y Clarke, A. 2001. Differentiation of bacterial autolysins by zymogram analysis. *Analytical Biochemistry*, 291, 149-154.

89. Szweda, P., Kotłowski, R., Łacka, I. y Synowiecki, J. 2007. Protective effect of lysostaphin from *Staphylococcus simulans* against growth of *Staphylococcus aureus* in milk and some other food products. *Journal of Food Safety*, 27, 265-274.
90. Szweda, P., Schielmann, M., Kotłowski, R., Gorczyca, G., Zalewska, M. y Milewski, S. 2012. Peptidoglycan hydrolases-potencial weapons against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1157-1174.
91. Tagg, J.R. y Ragland N.L. 1991. Applications of BLIS typing to studies of the survival on surfaces of salivary *streptococci* and *staphylococci*. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 339-342.
92. Tal, M. Silberstein, A. y Nusser, E. 1985. Why does Coomassie Brilliant Blue R interact with different proteins, *The Journal of Biological Chemistry*, 260(18), 9976-9980.
93. Tavano, O.L. 2013. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
94. Tortora, G.J., Funke, B.R. y Case. C.L. 2007. *Introducción a la Microbiología*. 9a Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 85-86.
95. Vandooren, J., Geurts, N., Martens, E., Van den Steen, P.E. y Opdenakker, G. 2013. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods*, 10(3), 211-220.
96. Vesterberg, O. 1989. History of electrophoretic methods. *Journal of Chromatography*, 480, 3-19.
97. Voet, D., Voet, J.G. y Pratt, C.W. 2007. *Fundamentos de Bioquímica*. 2a Ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 101-107, 332-340, 351.
98. Vollmer, W. 2008. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 287-306.
99. Vollmer, W., Blanot, D. y de Pedro, M.A. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 149-167.
100. Von Jagow, G., Link, T.A. y Schägger, H. 2003. Purification strategies for membrane proteins. En: H. Schägger. Ed. *Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide*. USA: Elsevier, 1-18.

101. Von Wright, A. y Axelsson, L. 2012. Lactic acid bacteria: an introduction. En: S. Lahtinen, A.C. Ouwehand, S. Salminen y A. Von Wright. Eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Florida: CRC Press, 1-16.
102. Ward, O.P., Rao, M.B. y Kulkarni, A. 2009. Proteases production. En: M. Schaechter. Ed. *Encyclopedia of Microbiology*. California, Academic Press, 495-511.
103. Wessel, D. y Flügge, U.I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138, 1141-1443.
104. Wingfield, P.T. 2001. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 3, 1-10.

Apéndice A. Comparación del medio MRS original y el medio MRS modificado

Ingrediente	MRS original ¹⁸	MRS modificado ¹⁹
	g L ⁻¹	g L ⁻¹
Peptona proteosa	10.0	10.0
Extracto de carne	10.0	10.0
Extracto de levadura	5.0	5.0
Glucosa	20.0	-
Sacarosa	-	10.0
Monooleato de sorbitán (<i>Tween 80</i>)	1.0	1.0
Citrato de amonio	2.0	2.0
Acetato de sodio	5.0	5.0
Sulfato de manganeso	0.05	0.05
Fosfato dipotásico	2.0	2.0
Sulfato de magnesio	0.2	0.1
Ácido ascórbico	-	1.0
Agua destilada c.b.p.	1 L	1 L

¹⁸ De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23,130-135.

¹⁹ Llorente-Bousquets, A. 2008. Caracterización de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.

Apéndice B. Curvas de calibración de albúmina sérico bovina

Método modificado de Lowry (Bio-Rad *DC Protein Assay*)

La determinación se realiza en tubos de ensayo utilizando una alícuota de 25 μL de agua como blanco de la reacción.

Reactivo A (Solución alcalina de tartrato de cobre)

Reactivo B (Reactivo de Folin)

1. Diluir la disolución estándar de BSA a fin de cubrir un intervalo de concentración de 0.1 mg/mL a 2.0 mg/mL.
2. Tomar una alícuota de 25 μL de cada concentración y adicionarlos a un tubo de ensayo
3. Adicionar 125 μL del reactivo A. Agitar.
4. Adicionar 1 mL de reactivo B. Agitar.
5. Esperar 15 min.
6. Medir la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

Determinación de proteína por el método modificado de Lowry
(*DC Protein assay*)

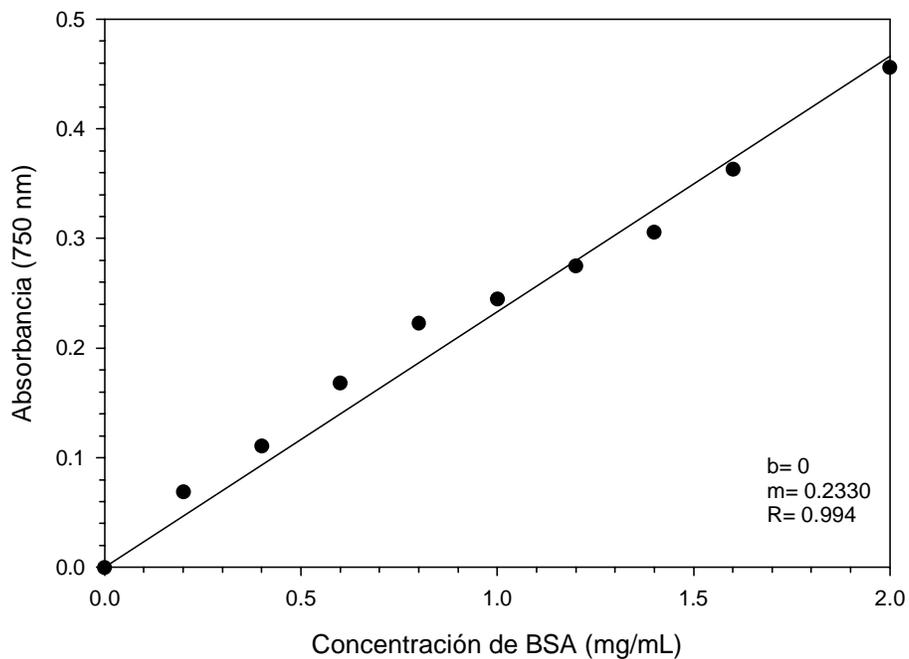


FIGURA B1. Curva de calibración de BSA por el método modificado de Lowry
(*DC Protein Assay*).

Método modificado de Lowry (Peterson, 1977)

La determinación se realiza en tubos de ensayo utilizando una alícuota de 50 μ L de agua como blanco de la reacción.

Reactivo A

a) 50 mL de la solución Cobre-Tartrato-Carbonato (CTC) (Tabla B1).

Tabla B1. Solución de Cobre-Tartrato-Carbonato para la elaboración del reactivo A.

Reactivo	Concentración (por ciento)
Sulfato de cobre	0.1%
Tartrato de sodio	0.2%
Carbonato de sodio	10.0%

b) 50 mL de NaOH 0.8 N.

c) 50 mL de agua destilada.

La solución A puede almacenarse hasta dos meses a temperatura ambiente.

Reactivo B

Diluir (1:10) el reactivo de Folin con agua destilada

1. Diluir la disolución estándar de BSA a fin de cubrir un intervalo de concentración de 0.1 mg/mL a 2.0 mg/mL.
2. Tomar una alícuota de 50 μ L de cada concentración y adicionarlos a un tubo de ensayo.
3. Adicionar 800 μ L del reactivo A. Agitar.
4. Adicionar 500 μ L de reactivo B. Agitar.
5. Esperar 15 min.
6. Medir la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

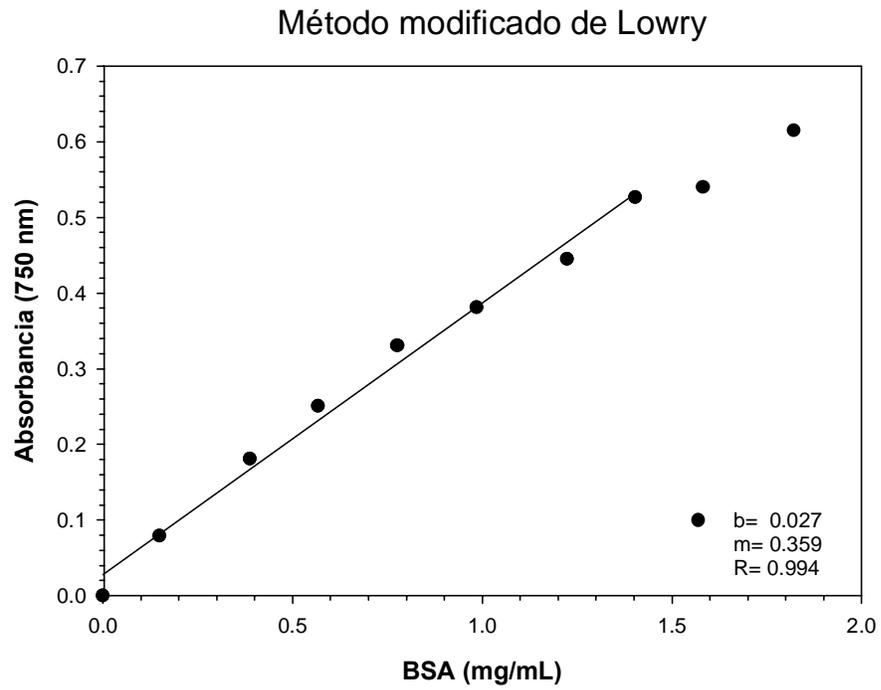


FIGURA B2. Curva de calibración de BSA por el método modificado de Lowry.

Micrométodo de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*)

Tabla B2. Micrométodo para la cuantificación de proteína con el reactivo de Bradford

Tubo	Azul de Coomassie G-250 (µL)	Solución stock de BSA (µL)	µg/mL
Blanco	200	800	0.00
1	200	800	3.97
2	200	800	5.43
3	200	800	6.86
4	200	800	8.57
5	200	800	9.82
6	200	800	11.07
7	200	800	12.75
8	200	800	14.63

Bio-Rad Protein Assay

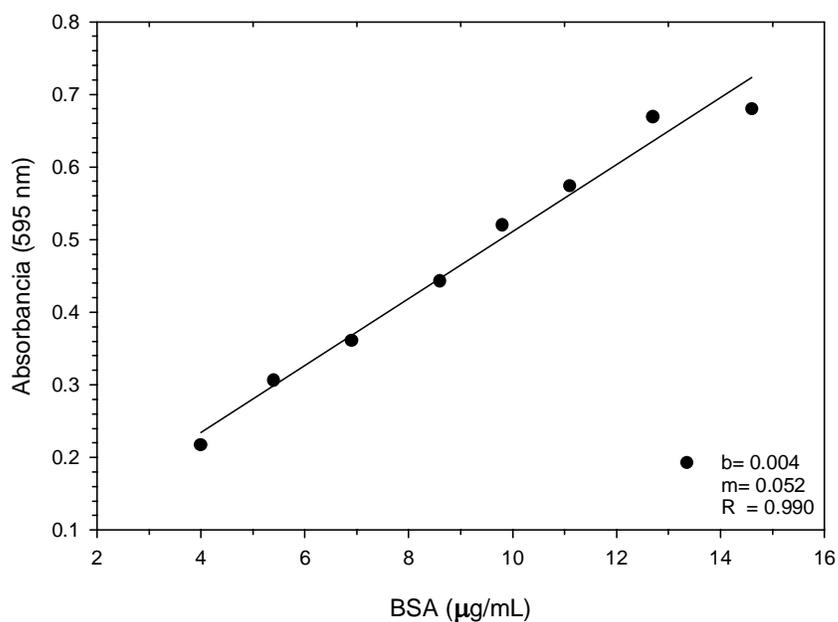


FIGURA B3. Curva de calibración de BSA por el método de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*).

Apéndice C. SDS-PAGE y zimografía. Formulación del gel concentrador y del gel separador

	CONCENTRADOR (mL)		SEPARADOR (mL)			
	4% T	10% T	12.5% T	16.5% T	Zimograma PGH	Zimograma Proteasa
					12.5% T	12.5% T
Agua	3.04 x 2	4.01	3.18	1.84	2.68	2.18
B 4X-C (pH 6.8)	2.50	-	-	-	-	-
B 4X-S (pH 8.8)	-	2.60	2.60	2.60	2.60	2.60
Células	-	-	-	-	0.50	
Gelatina	-	-	-	-	-	1.00
Acrilamida (30% T, 2.6% C)	1.36	3.33	4.16	5.50	4.16	4.16
APS	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Volumen final	10	10	10	10	10	10

Apéndice D. Controles positivos para detección de actividad lítica y proteolítica

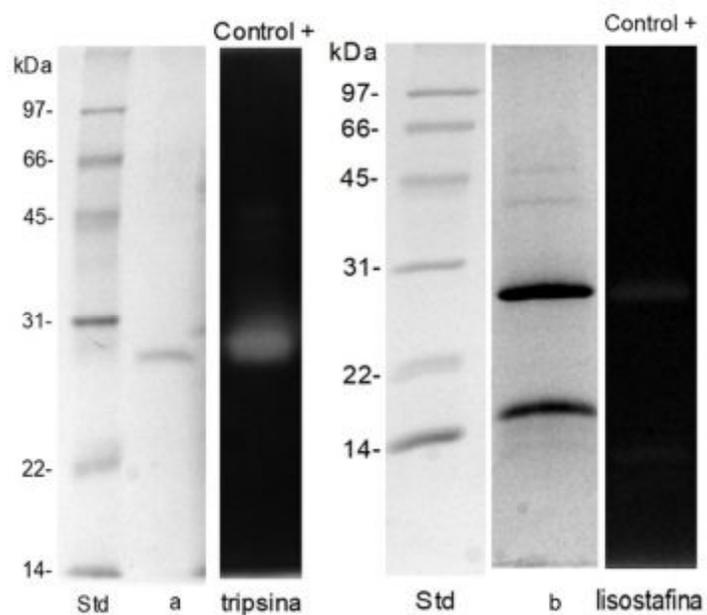


FIGURA D1. Controles positivos para actividad lítica y proteolítica por zimografía (12.5% T). Muestras: tripsina en condiciones no reductoras (a); lisostafina en condiciones no reductoras (b). **Perfil de proteínas por SDS-PAGE (12.5 %T).** Muestras: marcadores de peso molecular (Std) (*Bio-Rad*); tripsina en condiciones reductoras (a); lisostafina en condiciones reductoras (b). *Gel DocTM XR+ Imaging System (Bio-Rad)*.

Apéndice E. Límite de detección de BSA con azul de *Coomassie* R-250

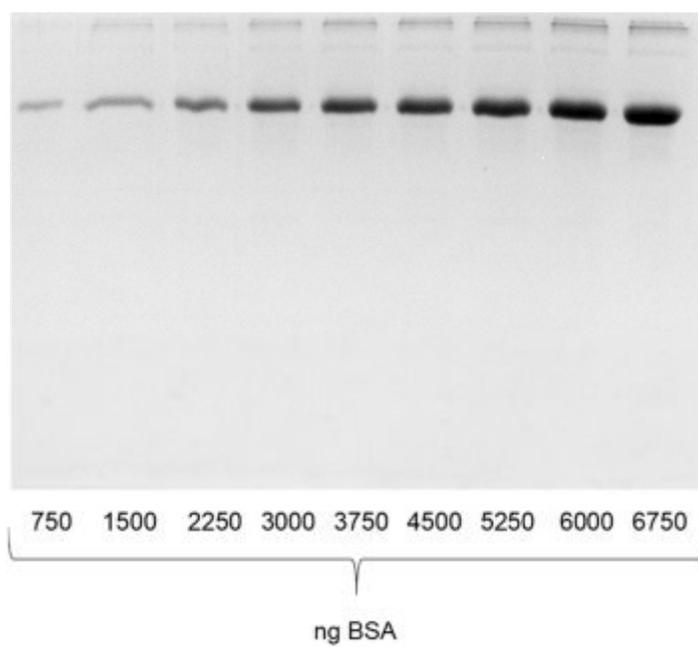


FIGURA E1. Límite de detección de BSA por SDS-PAGE (12.5%T). *Gel DocTM XR+* Imaging System (Bio-Rad).

Apéndice F. Especificaciones de la columna *HiPrep SP FF 16/10*.

Tabla F1. Especificaciones de la columna *HiPrep SP FF 16/10* (*GE Healthcare*)

Características de la columna	
Dimensiones de la matriz	16 x 100 mm
Volumen de la matriz	20 mL
Peso de la matriz	100 mm
Intervalo de flujo máximo	2 mL/min – 10 mL/min
Condiciones de almacenamiento	4 a 30 °C, 20% etanol
Presión máxima sobre la matriz empacada durante la operación	1.5 bar, 0.15 MPa, 22 psi
Medio	
Tamaño de partícula	90 µm
Tipo de intercambiador	Fuertemente catiónica
Matriz	6% agarosa altamente entrecruzada
Grupo cargado	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
pKa del grupo cargado	2.0 - 2.5
Capacidad iónica	(0.18-0.25) mmol H ⁺ /mL medio
pH a corto plazo	3 - 14
pH de trabajo	4 - 13
pH a largo plazo	4 - 13
Estabilidad Química	amortiguadores acuosos comúnmente utilizados, NaOH hasta 1 M, urea 8 M, hidrocloreuro de guanidina 6 M, Etanol hasta 70%, ácido acético hasta 1 M e isopropanol hasta 30%.
Evitar	Agentes oxidantes y detergentes y buffers catiónicos.
Columna	
Diámetro interno	16 mm
Material de la columna	Polipropileno
Volumen total	20 mL



Figura F1. Columna *HiPrep SP FF16/10* (*GE Healthcare*).