



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRODUCCIÓN DE PROTEASAS POR *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* ATCC 8042

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en ciencias

PRESENTA:
MARIANA CONTRERAS CRUZ

TUTOR PRINCIPAL
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA.
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO SEPTIEMBRE, 2020



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.

PRODUCCIÓN DE PROTEASAS POR *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI*
ATCC 8042

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Vocal: Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Vocal: Dr. Eleazar Martínez Barajas

Vocal: Dr. Edith Ponce Alquicira

Secretario: Dr. Francisco Ruiz Terán

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

Se recibió apoyo económico del programa PAIP 5000-9095, Facultad de Química.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del CONACYT, además se recibió apoyo económico por parte del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para asistir al XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1 Alimentos fermentados.....	7
2.2 Productos cárnicos fermentados.....	8
2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL).....	9
2.4 Compuestos con aportes organolépticos.....	10
2.5 Efecto del medio de cultivo en el metabolismo microbiano.....	11
2.6 Estados de estrés y sustancias producidas por microorganismos.....	12
2.7 Respuestas de estrés en bacterias ácido lácticas.....	13
2.8 Enzimas de interés en BAL.....	14
2.9 Sistemas proteolíticos en BAL.....	17
3. ANTECEDENTES.....	19
3.1 Género <i>Pediococcus</i>	19
3.2 Actividad proteolítica en <i>Pediococcus pentosaceus</i>	19
3.3 Actividad proteolítica de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.....	20
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVOS.....	26
5.1 Objetivo general.....	26
5.2 Objetivos particulares.....	26
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1 Plan de trabajo.....	27
6.2 Material biológico.....	27
6.3 Determinación de proteína de los distintos medios de cultivo utilizados en reportes anteriores.....	28
6.4 Condiciones de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.....	28
6.4.1 Medios de cultivo usados.....	29
6.5 Determinación del perfil proteínico y de la actividad proteolítica por zimogramas.....	31
Perfil proteínico.....	31
Actividad proteolítica en zimogramas.....	32
6.6 Actividad caseinolítica en cajas Petri con agar / leche descremada.....	32
6.7 Cuantificación de proteína.....	32
6.8 Determinación de actividad proteolítica específica sobre diferentes sustratos por medio de técnicas espectrofotométricas.....	33
Método para determinar actividad proteolítica contra caseína y hemoglobina.....	33
Método para determinar actividad proteolítica contra elastina.....	33
Método para determinar actividad proteolítica contra colágeno.....	33
Método para determinar actividad proteolítica contra gelatina.....	34
Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS/MS).....	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35

7.1 Validación de metodologías para la determinación de actividad proteolítica.....	35
7.2 Determinación de proteína de los distintos medios de cultivo utilizados.	36
7.3 Cinéticas de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> en los distintos medios de cultivo.....	38
7.4 Determinación del perfil proteínico por SDS PAGE y de la actividad proteolítica por zimograma.....	41
7.5 Actividad caseinolítica en cajas Petri con agar / leche descremada.	51
7.6 Actividad proteolítica sobre diferentes sustratos determinada por técnicas espectrofotométricas.	54
7.7 Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS/MS).	58
8. CONCLUSIONES.....	61
9. PERSPECTIVAS.....	62
10. BIBLIOGRAFÍA.....	63

1. RESUMEN.

La fermentación es una tecnología que utiliza el crecimiento y las actividades metabólicas de los microorganismos para la conservación y transformación de los materiales alimenticios. En los procesos de fermentación industrializados el uso de cultivos iniciadores es común, entre los cuales se encuentran los cultivos de bacterias ácido lácticas. *Pediococcus acidilactici* es un microorganismo iniciador ampliamente usado en productos cárnicos fermentados, y contribuye en la aceleración de la maduración y en la producción de aromas y sabores debido a la producción de distintos metabolitos, como proteasas y lipasas.

En nuestro grupo de trabajo se identificó que la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 produce 8 proteasas con masas moleculares en un intervalo entre los 40 y 200 kDa, mientras que en el genoma de la cepa están anotadas 13 proteasas y 24 peptidasas putativas. Se ha reportado que, durante la fase logarítmica de crecimiento, *P. acidilactici* ATCC 8042 presentó actividad extracelular proteolítica de >200 kDa y otra de 107 kDa (Llorente, 2008), y también se reportó una proteasa adherida a membrana de 60 kDa, tipo metaloproteasa. En trabajos más recientes Casales-Cabrera (2012) reportó una proteasa citosólica con un peso molecular de 97 kDa, mientras que Vendramín, en el 2013, reportó la producción de una proteasa de 120 kDa. Todas las actividades proteolíticas antes reportadas se encontraron cuando el microorganismo se hizo crecer en un medio MRS, modificado para la producción de enzimas con actividad antibacteriana, y se observó que su producción es susceptible a las condiciones de crecimiento. En el 2013, en un intento por evaluar el efecto del medio de cultivo en la producción de enzimas de interés biotecnológico, Contreras-Cruz evaluó 7 medios de cultivos distintos, demostrando que existe un efecto del medio de cultivo en la producción de estas enzimas; sin embargo, no se pudo atribuir el efecto a alguna fuente de nutriente específica.

El objetivo de este trabajo fue establecer qué proteasas produce *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, tras determinar las condiciones de producción en medio MRS (Oxoid), así como cuantificar la actividad proteolítica en esta cepa, y su actividad contra distintos sustratos.

Se evaluaron las técnicas para determinar actividad proteolítica por zimografía con caseína y gelatina como sustrato, además de la hidrólisis de caseína en cajas Petri con agar / leche descremada, probando distintas fracciones celulares de una bacteria ácido láctica reconocida por su producción de un amplio número de enzimas proteolíticas, concluyendo que las técnicas

usadas son capaces de detectar proteólisis en una BAL.

Se determinó que el medio MRS comercial (Oxoid) era el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de la bacteria y para observar actividad proteolítica. Se establecieron las condiciones para la producción de proteasas, y se determinó que la mayor producción de proteínas y proteasas se da a las 14 horas de crecimiento. Se observaron bandas de actividad contra gelatina con pesos de 180 kDa y 100 kDa en células enteras, 100 kDa en restos celulares, una de más de 200 kDa en sobrenadante y una de 180 kDa en el citosol. Al realizar zimogramas con caseína como sustrato, sólo es posible observar una banda de 100 kDa en restos celulares. Las proteasas tuvieron mayor afinidad por sustratos previamente hidrolizados o de menor tamaño, como la elastina y la gelatina, y se observó que *Pediococcus acidilactici* tiene la capacidad de hidrolizar caseína y hemoglobina en muy poca proporción.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Alimentos fermentados.

La fermentación es el proceso por el que los sustratos, típicamente alimentos y bebidas, se convierten en productos, como resultado del crecimiento y de las actividades metabólicas de los microorganismos endógenos o exógenos (Batt, 2016). La fermentación es una de las tecnologías más antiguas de procesamiento de alimentos conocida por el hombre, ya que los primeros registros de la fabricación de productos fermentados con leche, carne y vegetales como materia prima datan del año 6000 a.C.

Los procesos de fermentación pueden ser tan simples que impliquen un solo sustrato como componente (por ejemplo, leche) y un microorganismo (por ejemplo, *Lactococcus lactis*), hasta ser una mezcla compleja de sustratos y una serie de microorganismos. La microbiota compleja que está presente en la materia prima y la naturaleza dinámica de la población en el momento de la fermentación, contribuyen al producto final (Batt, 2016).

En los procesos industrializados, el uso de cultivos iniciadores es común. Un cultivo iniciador puede ser definido como un preparado microbiológico de un gran número de células, de al menos un microorganismo, que es adicionado a la materia prima de manera intencional para su fermentación (Caplice y Fitzgerald, 1999). Los cultivos iniciadores deben ser capaces de crecer a las temperaturas de fermentación y condiciones de actividad de agua (a_w) del alimento, así como generar enzimas que permitan la producción de metabolitos de interés (Fernandes, 2009).

La fermentación de un alimento se puede llevar a cabo por hongos filamentosos, levaduras o bacterias; los cuales convierten los carbohidratos fermentables en metabolitos tales como ácidos orgánicos, etanol y dióxido de carbono. Este proceso no sólo incrementa la vida de anaquel y la seguridad microbiológica de un producto, sino también hace a algunos alimentos más digeribles (Caplice y Fitzgerald, 1999).|

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores en la producción de alimentos fermentados. En procesos estandarizados estos cultivos generalmente están diseñados para cumplir con los requerimientos de seguridad alimentaria,

vida de anaquel extendida por propiedades antimicrobianas naturales (Reis *et al.*, 2012), efectividad tecnológica y criterios de viabilidad económica (Ammor y Mayo, 2007); además los productos finales del catabolismo de carbohidratos y de las rutas biosintéticas contribuyen al sabor, aroma y textura del alimento que le dan características únicas al producto final (Caplice y Fitzgerald, 1999).

2.2 Productos cárnicos fermentados.

Los productos cárnicos fermentados son productos tradicionales que tienen una larga historia y un valor gastronómico inestimable. Los principales microorganismos involucrados en la fermentación de carne son las BAL, seguidas por los estafilococos coagulasa negativos, *Micrococcus* y *Enterobacteriaceae*, y dependiendo del producto, algunas especies de levaduras y mohos, que juegan un papel en la maduración de la carne.

La conservación se logra con una combinación de fermentaciones y el descenso del a_w , con técnicas como la deshidratación y adición de sal (Aro *et al.*, 2010). En la preparación de productos cárnicos, la fermentación de los carbohidratos es realizada por cultivos iniciadores adicionados o por la microbiota de la carne en procesos tradicionales. Existen dos tecnologías de elaboración: la fermentación rápida y la fermentación extendida, cuyas diferencias son las condiciones de fermentación. La fermentación rápida se lleva a cabo a altas temperaturas (≥ 32 °C) mientras que la extendida se lleva a cabo a una temperatura ≥ 24 °C. En función de estos procesos se han desarrollado cultivos iniciadores. En el caso de la fermentación rápida (10-16 h), los cultivos iniciadores deben ser muy eficientes en la producción de ácido láctico, lo que se traduce en una pérdida de actividad metabólica después de que el pH disminuye con rapidez, y que generalmente limita la producción de aromas y sabores.

Pediococcus acidilactici es un ejemplo típico de un organismo de fermentación rápida, por tener una temperatura de crecimiento óptima mayor, por su producción de lactato homofermentativa y por su actividad proteolítica. En fermentaciones más prolongadas, dos de los cultivos iniciadores más importantes son *Staphylococcus carnosus* y *S. xylosus*, por su capacidad para retrasar la rancidez a través de la descomposición del peróxido y por la formación de color por la reducción de nitratos (Candogan *et al.*, 2008).

En la fermentación extendida se lleva a cabo un periodo de "maduración" de entre 3 y 5 días en los que los cultivos iniciadores contribuyen al desarrollo de aromas y sabores por medio de actividad lipolítica y proteolítica (Kezban *et al.*, 2008).

La fermentación de carne produce una serie de cambios físicos, bioquímicos y microbianos en el producto a base de músculo, causados por actividades enzimáticas endógenas y microbianas. Estos cambios incluyen: acidificación (catabolismo de carbohidratos), la solubilización y gelificación de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas, la degradación de proteínas y lípidos, la reducción de nitrato en nitrito, formación de nitrosomioglobina y la deshidratación (Ojha *et al.*, 2015).

La proteólisis, que es una de las reacciones bioquímicas principales en los productos cárnicos, es catalizada tanto por enzimas endógenas como por enzimas microbianas, sin embargo, el conocimiento de este proceso durante la fermentación de productos cárnicos es muy limitado (Candogan *et al.*, 2009).

2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL).

Las BAL constituyen un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporulantes, catalasa negativas, desprovistas de citocromos, anaerobias pero aerotolerantes, exigentes nutricionalmente, tolerantes a pH ácido, estrictamente fermentativas, producen ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos. Son asociadas normalmente con hábitats ricos en nutrientes como varios productos alimenticios, pero algunas son miembros comunes del microbioma humano. Los géneros que se incluyen dentro de esta descripción general de las BAL son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* y el género *Bifidobacterium* (Leroi, 2010).

Los géneros que están sujetos a aplicaciones en la industria alimentaria para el desarrollo de alimentos fermentados son principalmente *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* (productos lácteos, carne, verduras, cereales), *Lactococcus* (productos lácteos), *Leuconostoc* (verduras, productos lácteos), *Oenococcus* (vino), *Pediococcus* (verduras, carne), *Streptococcus* (productos lácteos) y *Weissella* (Burgain *et al.*, 2014).

Entre las BAL se pueden distinguir dos rutas metabólicas para la fermentación de carbohidratos: la glucólisis (ruta de Embden-Meyerhof-Parnas) resulta casi exclusivamente en la producción de ácido láctico como producto final, este tipo de metabolismo es llamado la ruta de fermentación homoláctica. La segunda es la ruta del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa que resulta en cantidades significativas de otros productos finales como etanol, acetato y CO₂ además de ácido láctico. Este tipo de metabolismo es llamado fermentación heteroláctica (Salminen *et al.*, 2004).

Estas bacterias son los microorganismos más usados en la producción de salchichas fermentadas (Ammor y Mayo, 2007), ya que generan suficiente cantidad de ácido láctico para disminuir el pH inicial de la carne de 6 hasta valores de 4.8 a 5 en un corto tiempo (Benito *et al.*, 2004). Además, las enzimas proteolíticas de las BAL desempeñan un papel importante en la degradación de proteínas y péptidos, ya que generan la liberación de aminoácidos libres, los cuales contribuyen al sabor de estos productos (Benito *et al.*, 2007).

2.4 Compuestos con aportes organolépticos.

Los productos finales del catabolismo de carbohidratos, como lo son el ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, diacetilo, proteasas, peptidasas y etanol, contribuyen no sólo a la conservación de los alimentos, sino también al sabor, aroma y textura del alimento, ayudando así a dar propiedades únicas al producto.

Por ejemplo, durante la fermentación de carne, el pH desciende debido a la producción de ácido láctico, provocando la coagulación de las proteínas, confiriendo textura al producto (Ravyts *et al.*, 2012).

La fermentación también puede reducir la toxicidad del sustrato, como se ha visto en fermentación de vegetales, o incrementar la calidad nutricional cuando hay un aumento de la digestibilidad (Caplice y Fitzgerald, 1999).

En el caso particular de las BAL, su principal contribución para la generación de sabor es la producción de grandes cantidades de ácido láctico y la producción de compuestos de sabor de bajo peso molecular (péptidos, aminoácidos libres, aldehídos, ácidos orgánicos y aminas), derivados de la proteólisis de la carne (Ojha, 2015).

En particular, la degradación de valina, leucina e isoleucina en aldehídos ramificados, ácidos y alcoholes se ha relacionado con los aromas de alimentos cárnicos fermentados. Con base en lo anterior, la adición de proteasas exógenas ha sido el método más estudiado para el aumento de la proteólisis en salchichas fermentadas y para acelerar la maduración y el desarrollo de sabores (Aro *et al.*, 2010).

Las enzimas proteolíticas endógenas de la carne, en particular las parecidas a la catepsina-D son las responsables de la proteólisis y la formación de péptidos durante la fermentación, mientras que las enzimas microbianas ayudan en la liberación de oligopéptidos durante las etapas tardías de maduración. En los lactobacilos se han observado exopeptidasas que contribuyen, en conjunto con aminopeptidasas, a la generación de aminoácidos libres que contribuyen al sabor (Leroy *et al.*, 2006).

Para las bacterias ácido lácticas, el sistema proteolítico más estudiado hasta este momento es el de *Lactococcus lactis*; sin embargo, se ha reportado la existencia de muchas otras BAL con sistemas de proteasas complejos. Ejemplificando lo anterior está *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, en el cual se han detectado diversas actividades de proteasa en fracciones celulares distintas (Granados-Pérez, 2009; Casales-Cabrera, 2012; Vendramín, 2012). Sin embargo, hasta este momento no se han podido determinar las condiciones de cultivo para su producción, o el sistema proteolítico completo del microorganismo.

2.5 Efecto del medio de cultivo en el metabolismo microbiano.

El crecimiento celular y la acumulación de productos del metabolismo están fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales inorgánicas. Las condiciones que afectan el metabolismo y multiplicación de los microorganismos incluyen nutrientes, agua, pH, inhibidores, oxígeno, temperatura y tiempo.

Por ejemplo, las bacterias prosperan en diferentes hábitats, y el pH del medio ambiente afecta su crecimiento, por lo que es la base para clasificarlas en acidófilos (pH 1-3), alcalófilos (pH 10-13) y neutrófilos (pH 5.5-9). Por dicha diversidad, la homeostasis del pH en el metabolismo bacteriano es crítica por las siguientes razones. Primero, porque la estructura/función de las

macromoléculas biológicas, especialmente las proteínas, depende del pH. Segundo, porque el pH, como cualquier otra concentración de metabolitos celulares, puede afectar la cinética y fuerza termodinámica de reacciones químicas que involucran protones como metabolitos. Finalmente, debido a que los cambios de pH afectan severamente el metabolismo energético, siempre que la fuerza motriz del protón sea la principal fuente de potencial electroquímico para la síntesis de ATP (Sánchez-Clemente *et al.*, 2018).

Un ejemplo de cómo afecta el pH a la acumulación de productos del metabolismo de las bacterias, se puede observar en estudios de la producción de antimicrobianos por distintas BAL. Algunos estudios han reportado que las condiciones de pH modulan en gran medida la producción de metabolitos antifúngicos y antimicrobianos, demostrando ser altamente sensibles a este. Además, se demostró que el efecto del pH está relacionado con muchos factores como el sustrato, el período de incubación, la temperatura y la aparición de microflora competidora (Dalié *et al.*, 2010).

Toda célula microbiana debe ser capaz de obtener una fuente de nutrientes de su ambiente, para así sintetizar los componentes celulares necesarios para su supervivencia. Esta capacidad depende de los sistemas enzimáticos que el organismo produzca, de acuerdo con su código genético (Chan *et al.*, 2002).

2.6 Estados de estrés y sustancias producidas por microorganismos.

El término estrés se refiere a cualquier factor o condición que afecte el crecimiento o supervivencia microbiana. Hay reporte de algunos microorganismos que son capaces de sobrevivir a condiciones ambientales presumiblemente letales debido a un fenómeno de adaptación a este estado.

La capacidad de responder rápidamente es esencial para la supervivencia; las respuestas bacterianas al estrés se basan en la expresión coordinada de genes que alteran diferentes procesos celulares y actúan en conjunto para aumentar la tolerancia bacteriana al estrés.

Una vez que los microorganismos detectan el factor de estrés, sigue una respuesta adaptativa o de protección, la cual incrementa la tolerancia del organismo a la condición estresante que impide su desarrollo. Este fenómeno es ocasionalmente descrito como adaptación.

Casos de la respuesta adaptativa son, por ejemplo, que algunas bacterias sean capaces de modificar la fluidez de su membrana o alterar la estructura de las proteínas de su pared celular. A nivel molecular, la respuesta al estrés incluye modificaciones transcripcionales que conducen a la síntesis de proteínas reguladoras. La regulación resultante puede llevar a la síntesis de otras proteínas que hagan frente al estrés impuesto. Las respuestas microbianas al estrés pueden producir lo siguiente (Yousef y Juneja, 2003):

- Producción de proteínas que reparen el daño, mantengan la célula o eliminen el agente de estrés.
- Aumento transitorio de la resistencia o tolerancia a factores nocivos.
- Transición de la célula a un estado latente, como por ejemplo la formación de esporas o a un estado viable no cultivable.
- Evasión de las defensas del organismo hospedero.
- Mutaciones adaptativas.

2.7 Respuestas de estrés en bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas, como todos los microorganismos, se ven afectadas por el medio ambiente que las rodea y reaccionan dinámicamente a cambios en las condiciones externas. Las BAL desarrollaron mecanismos de defensas contra el estrés que les permiten resistir condiciones severas y cambios ambientales repentinos (van de Guchte *et al.*, 2002).

En su interacción con los alrededores, usan múltiples sistemas para la detección y adaptación a condiciones de estrés, que pueden incluir exposición a temperaturas extremas, o estrés generado por el crecimiento de la célula en si, como la producción de metabolitos ácidos y agotamiento de nutrientes (Hosseini *et al.*, 2015).

2.8 Enzimas de interés en BAL.

Proteasas.

El término proteasa surgió a finales del siglo XVIII, y las enzimas con esta actividad también se conocen como peptidasas. Son enzimas que son capaces de hidrolizar proteínas escindiendo enlaces peptídicos. La especificidad de las enzimas está regulada por la naturaleza de los aminoácidos y otros grupos funcionales (Aromáticos y alifáticos o contenido de grupos sulfuro) que están cerca al enlace peptídico donde son hidrolizados (Sumantha *et al.*, 2006).

El mecanismo de catálisis en serín-proteasas ocurre de la siguiente manera:

- 1) Formación del complejo enzima y sustrato.
- 2) Activación del carbonilo mediante un ácido general y activación de una molécula de agua mediante una base general.
- 3) Protonación del grupo amina saliente e hidrólisis del enlace peptídico liberando el péptido y la enzima.

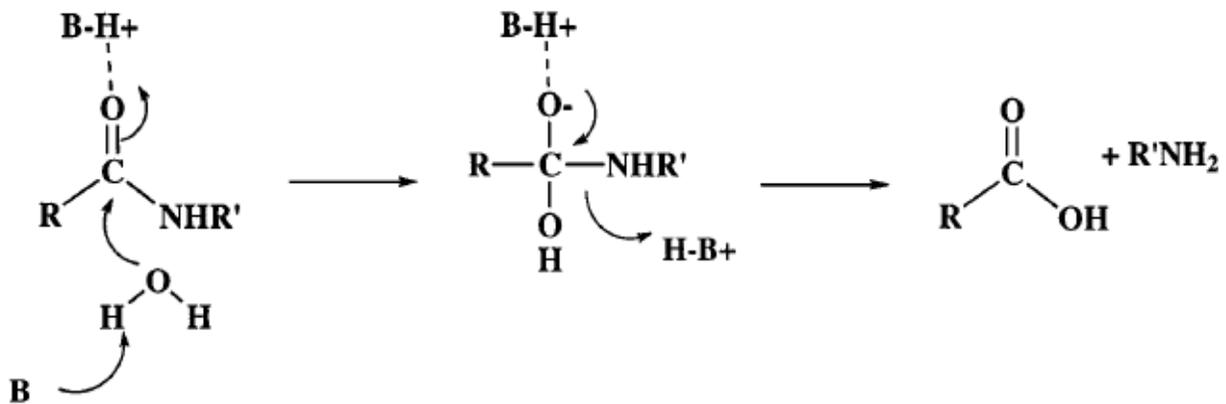


Figura 1. Esquema de la catálisis de la hidrólisis de péptidos en serín-proteasas. (Tomado de Hedstrom, 2002)

Las proteasas no cumplen fácilmente con el sistema de nomenclatura de las enzimas debido a su gran diversidad de acción y estructura. Este tipo de enzimas se pueden clasificar con base en tres criterios principales:

- 1) Su origen, ya sea animal, vegetal, bacteriano o fúngico.
- 2) La acción catalítica que posean.
- 3) La naturaleza de su sitio catalítico.

Dependiendo de su acción catalítica, pueden dividirse en dos grupos (Figura 2): Proteinasas o endopeptidasas, que son capaces de cortar internamente la cadena polipeptídica para producir largos fragmentos; y las exopeptidasas, que actúan cerca del final de la cadena polipeptídica para liberar residuos de aminoácidos. A su vez las exopeptidasas se clasifican si escinden desde el extremo N terminal o desde el extremo C terminal, y se identifican como aminopeptidasas o carboxipeptidasas respectivamente (Bergmann y Ross, 1936; Adler-Nissen, 1993).

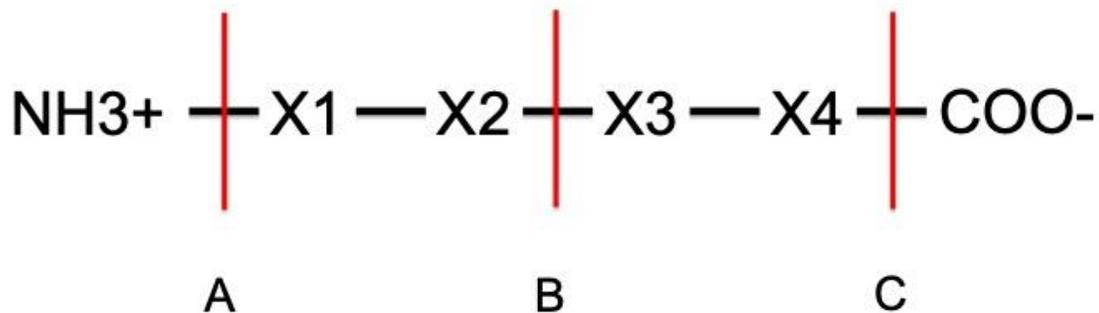


Figura 2. Clasificación de las proteasas dependiendo de su acción catalítica. Sitio de corte A) Aminopeptidasa, exopeptidasa que corta en el extremo amino. Sitio de corte B) Endopeptidasa. Sitio de corte C) Carboxipeptidasa, exopeptidasa que corta en el extremo carboxilo (Gonzales y Robert-Baudouy, 1996).

Teniendo en cuenta, principalmente, la estructura terciaria de la proteína y la naturaleza de su sitio catalítico, las proteasas se dividen en serín-proteasas, aspartil-proteasas, metalproteasas y cisteín-proteasas (Tavano, 2013).

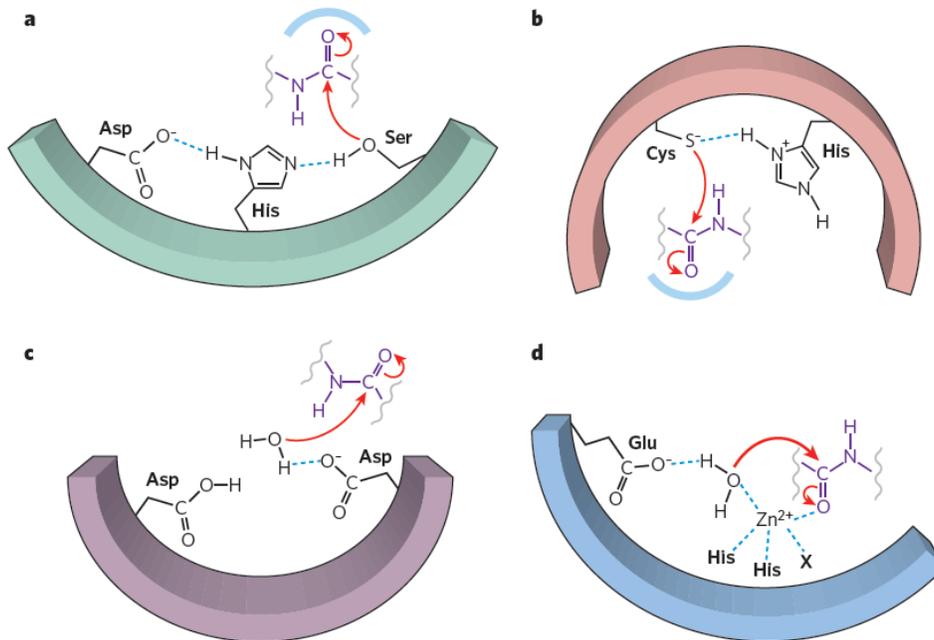


Figura 3. Esquema del mecanismo de acción de los cuatro tipos de proteasas clasificadas por su sitio catalítico. a) serín-proteasas; b) cisteín-proteasas; c) aspartil-proteasas; d) metaloproteasa (Tomado de Erez *et al.*, 2009).

Las proteasas son explotadas en varios procesos industriales, como el tratamiento de pieles, procesos farmacéuticos, textiles, en síntesis orgánica, tratamiento de aguas residuales, alimentos y otras industrias (Bhunia *et al.*, 2013).

En el campo de los productos lácteos y cárnicos se pueden alcanzar muchos efectos positivos en los productos finales con el uso de proteasas específicas, como lo es cambiar las propiedades nutricionales, obtención de proteínas funcionales y bioactivas, mejora de la digestibilidad, modificaciones a la calidad sensorial (por ejemplo, textura o sabor), la mejora de la capacidad antioxidante o la reducción de compuestos alergénicos. En el caso de los alimentos fermentados, la proteólisis es uno de los fenómenos más importantes ya que genera péptidos y aminoácidos con distintas funciones que van desde ser precursores de compuestos de sabor y aroma hasta péptidos con actividad antimicrobiana (Tavano, 2013).

Las bacterias ácido lácticas son conocidas por poseer una gran variedad de enzimas proteolíticas que las hacen capaces de utilizar las proteínas como una fuente de nitrógeno para garantizar su crecimiento. Generalmente las proteasas producidas por microorganismos son constitutivas o parcialmente inducibles y fuertemente influenciadas por los componentes del

medio de cultivo, como la variación en la relación carbón/nitrógeno, presencia de iones metálicos y de algunos azúcares de fácil metabolismo, como la glucosa (Álvarez *et al.*, 2006).

Hay reportes que ponen en evidencia lo anterior; por ejemplo, Álvarez y colaboradores analizaron dos perfiles proteolíticos extracelulares de *Paenibacillus polymyxa* SCE2 y la influencia del medio de cultivo en su producción, cultivando a las cepas de interés en cinco medios distintos. Los resultados mostraron patrones de secreción de proteasas heterogéneos cuya expresión era dependiente del medio de cultivo (Álvarez *et al.*, 2006). Sepahy y Jabalameli (2011) reportaron que la producción de una proteasa por *Bacillus* sp. CR 179 variaba significativamente dependiendo de la fuente de carbono que se usara. En ese mismo trabajo se evaluaron distintas velocidades de agitación, las cuales se ha encontrado que influyen en la homogeneidad alcanzada en los matraces donde se lleva a cabo el crecimiento y también en la disponibilidad de nutrientes.

Uno de los aspectos más importantes de las enzimas es su estabilidad y un buen rendimiento catalítico, sin embargo, uno de los principales inconvenientes de las proteasas es su inestabilidad en pH alcalino y temperaturas altas (Bhunja *et al.*, 2013).

2.9 Sistemas proteolíticos en BAL.

Lactococcus lactis es la primera bacteria ácido láctica y la segunda bacteria Gram-positiva más extensamente estudiada en lo que se refiere a su genética, fisiología y biología molecular. El sistema proteolítico de *L. lactis* fue investigado a profundidad y hoy existe un modelo completo de la degradación de la caseína, el transporte, la degradación de los péptidos derivados de caseína, y la regulación de este sistema, debido a que la proteólisis celular juega un rol crítico en el control de calidad de los polipéptidos y en varios circuitos regulatorios.

La producción de proteasas depende enteramente del microorganismo y del origen de este; se ha observado que sólo pocas cepas contienen un sistema proteolítico completo que sea capaz de llevar a cabo la hidrólisis de caseína hasta aminoácidos. En cultivos lácteos la mayoría de las veces sólo se cuenta con una o dos cepas capaces de hidrolizar la caseína a oligopéptidos y de ellos depende enteramente la supervivencia de los otros microorganismos que no son capaces de utilizar moléculas tan grandes como fuente de nitrógeno.

El primero paso para la utilización de la caseína por las BAL se lleva cabo por proteinasas extracelulares (CEP), adheridas a la pared celular y que son las responsables de la ruptura de caseína en oligopéptidos (Pastar *et al.*, 2001) (Figura 4), los cuales son trasladados por sistemas transportadores de oligopéptidos (sistema Opp) (Doeven *et al.*, 2005), hasta el interior de la célula donde las peptidasas intracelulares hidrolizan los diferentes oligopéptidos en aminoácidos libres (Savijoki *et al.*, 2006).

De acuerdo con esto, el sistema proteolítico de las BAL comprende tres componentes principales (Mengjin *et al.*, 2010):

- Proteinazas adheridas a la pared celular. Inician la degradación de la caseína extracelular a oligopéptidos.
- Transportadores de péptidos. Transportan los péptidos generados por las proteinasas hacia el interior de la célula. Las proteínas Opp pertenecen a una super familia altamente conservada de transportadores tipo ABC que median la captación de péptidos derivados de caseína.
- Peptidasas intracelulares. Después de que los péptidos derivados de la caseína son absorbidos por las células estos son degradados por la acción concertada y parcialmente superpuesta de las peptidasas con especificidades diferentes en péptidos más pequeños y aminoácidos libres.

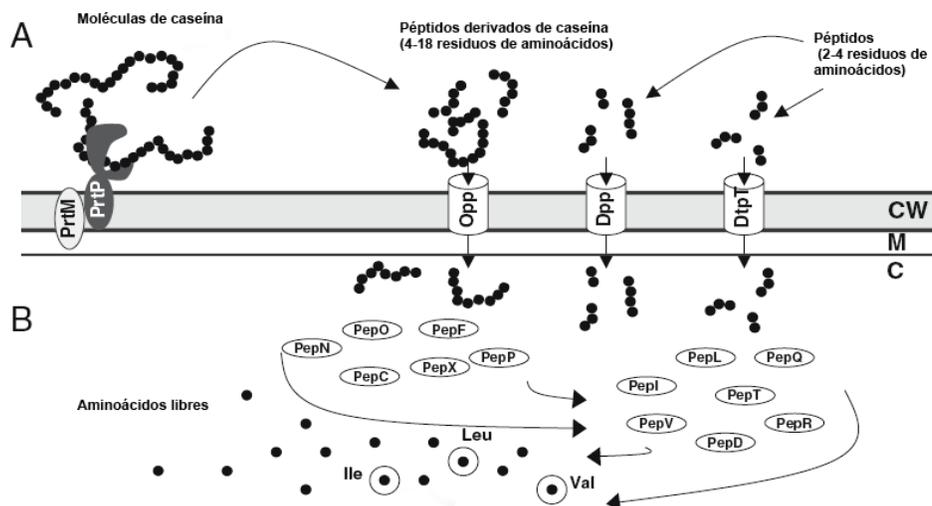


Figura 4. Presentación simplificada de la función y regulación del sistema proteolítico de *Lactococcus* durante la degradación de caseína. A) Espacio extracelular; B) Espacio Intracelular (Citoplasma); CW) Pared celular, M) membrana celular y C) Citoplasma (Tomado de Savijoki *et al.*, 2006).

3. ANTECEDENTES.

3.1 Género *Pediococcus*.

El género *Pediococcus* fue descrito por primera vez por Wochnschre F. Balcke en 1884. Está constituido por bacterias Gram-positivas de la familia *Lactobacillaceae*, cocos no móviles (1.0-2.0 μ M de diámetro), catalasa negativa que se dividen en ángulo recto en dos planos, lo que resulta en una morfología de tétrada.

Este género requiere de compuestos complejos de nitrógeno, por lo tanto, no son capaces de utilizar las sales de amonio como única fuente de nitrógeno o reducir los nitratos a nitritos. Van desde especies aeróbicas hasta microaerófilas, fermentan la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y forman ya sea D- o L-lactato sin la producción de dióxido de carbono. Crecen a 30 °C, la temperatura óptima de crecimiento es de 25-40 °C, con un máximo de 52 °C y se destruyen por calentamiento a 72 °C por 10 min. El pH óptimo del medio de crecimiento es de 6.0-6.5 (Holt *et al.*, 1999 y Carr *et al.*, 2002).

Las especies pertenecientes a este género son: *P. acidilactici*, *P. argentinus*, *P. cellicola*, *P. clausenii*, *P. damnosus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. lolii*, *P. parvalus*, *P. pentosaceus*, *P. siamensis* y *P. stilesii* (Holland *et al.*, 2011).

Las especies más utilizadas comercialmente como cultivos iniciadores son *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*. Éstas participan en la fermentación de vegetales y carnes, en ensilados y en la producción de quesos; además han sido utilizados como probióticos o promotores de crecimiento biológico en alimentación animal (Mckay y Baldwin, 1990). Específicamente en la fermentación de productos cárnicos o lácteos, la actividad proteolítica que tienen estas bacterias resulta fundamental para garantizar el crecimiento en los sustratos específicos.

3.2 Actividad proteolítica en *Pediococcus pentosaceus*.

Se ha reportado el uso de cepas de *Pediococcus pentosaceus* como cultivo iniciador en la producción de quesos debido a que contribuye a acelerar la maduración, y la producción de aromas y sabores. Evidencia de lo anterior se presenta en aislados de esta cepa de quesos madurados, que presentan actividad de aminopeptidasa, proteasa intracelular, dipeptidasa,

dipeptidil aminopeptidasa y aminopeptidasa. Estas actividades son sugerentes de que la cepa contribuye a la proteólisis y el desarrollo de sabor en quesos en virtud de la actividad de su sistema proteolítico (Vafofoulou-Mastrojiannaki *et al.*, 1994).

3.3 Actividad proteolítica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Con la finalidad de comprender la función de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en la fermentación de productos cárnicos, se ha estudiado su capacidad de hidrolizar proteínas. Se ha reportado que, durante la fase logarítmica de crecimiento, presentó actividad extracelular proteolítica de >200 kDa y otra de 107 kDa al hacerse crecer en medio MRS sin agitación (Llorente, 2008) (Figura 5A). La proteasa extracelular >200 kDa es una metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} que se mantiene activa en un intervalo de pH de 4.5 a 11 y en un amplio intervalo de temperatura (de 25 a 92 °C) siendo la óptima a 37 °C (Granados-Pérez, 2009). También se reportó una proteasa adherida a membrana de 60 kDa, tipo metaloproteasa, producida en medio MRS a 30 °C y con agitación a 120 rpm (Figura 5 B).

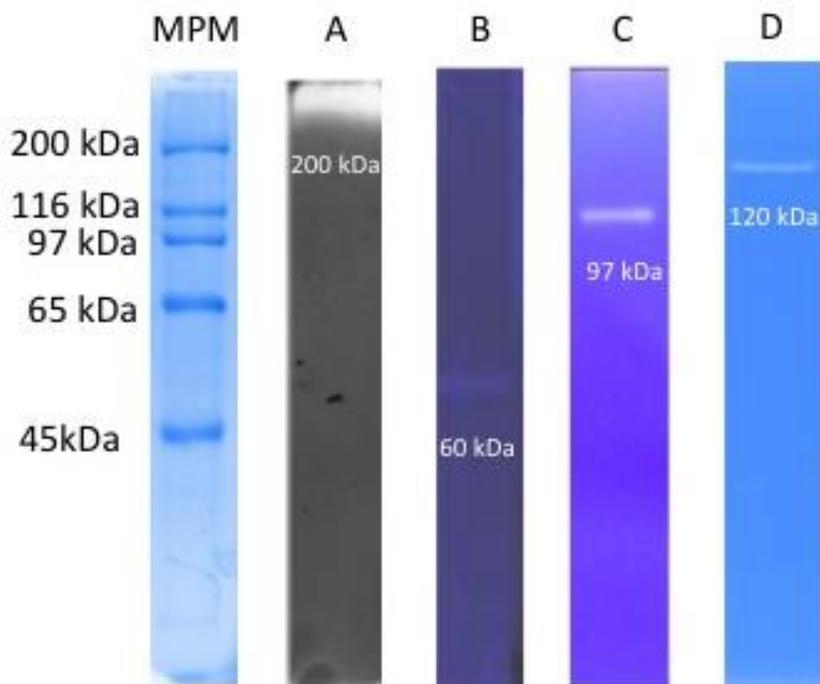


Figura 5. Bandas de actividad gelatinolítica de proteasas producidas por *P. acidilactici* ATCC 8042 reportadas en trabajos anteriores. El carril MPM) es un marcador de alto peso molecular, el carril A) muestra la proteasa de 200 kDa reportada por Llorente en 2008; el carril B) muestra una proteasa de 60 kDa reportada por Granados-Perez en 2009; el carril C) muestra la proteasa de 97 kDa reportada por Casales en 2012 y el carril D) muestra la Proteasa 120 kDa de Vendramín, 2013.

En otro trabajo Casales-Cabrera (2012) reportó una proteasa citosólica que se produce durante la fase logarítmica de crecimiento, que alcanza una máxima producción a las 8 h, con un peso molecular de 97 kDa (Figura 5C) y tuvo mayor actividad contra gelatina, aunque también presentó actividad contra caseína y colágeno. Esta enzima fue más activa a pH alcalinos y resultó estable en un intervalo de temperaturas entre 37 y 60 °C. Puesto que es inhibida por el PMSF, probablemente se trata de una serín-proteasa.

Vendramín en el 2013 reportó la producción de una proteasa de 120 kDa (Figura 5D) cuando se hacía crecer a esta cepa en medio TSB sin agitación, esta enzima proteolítica tiene actividad sobre colágeno y caseína y es estable desde 37 a 60 °C y en un intervalo de pH de 7 a 10. Su actividad se incrementa en presencia de CaCl_2 a una concentración 10 mM y se puede considerar como una serín-proteasa debido a que es inhibida por PMSF.

Es importante mencionar que todas las actividades proteolíticas antes reportadas, a excepción de la proteasa reportada por Vendramín, se encontraron cuando el microorganismo se hizo crecer en un medio MRS modificado, diseñado para la producción de enzimas con actividad antibacteriana.

En un intento por evaluar el efecto del medio de cultivo en la producción de enzimas de interés biotecnológico como peptidoglucano hidrolasas y proteasas, Contreras-Cruz (2013) realizó la evaluación de 7 medios de cultivos distintos, a dos velocidades de agitación (0 y 250 rpm), para estudiar el efecto sobre la actividad de proteasa de las fracciones de células y sobrenadantes contra gelatina como sustrato; los resultados se muestran en la Tabla 1.

El trabajo de Contreras-Cruz (2013) demostró que sí existe un efecto del medio de cultivo en la producción de estas enzimas; sin embargo, no se pudo atribuir el efecto a una sola fuente de nutriente, ya que entre los medios de cultivo había varias diferencias en las fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas.

Tabla 1. Producción de enzimas proteolíticas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en diferentes medios y condiciones de aireación reportadas en un trabajo anterior (Contreras-Cruz, 2013).

Medio	Fracción celular		Fracción extracelular	
	Agitación 250 rpm	Estático	Agitación 250 rpm	Estático
MRS	ND	<u>120 kDa</u>	ND	ND
APT	<u>120 kDa</u>	ND	ND	<u>66 kDa y 100 kDa</u>
CGB	ND	ND	ND	ND
TSB	ND	<u>120 kDa</u>	<u><60 kDa y 110 Da</u>	ND
M17	ND	<u>40 kDa</u>	<u>200 kDa</u>	ND
TSB + Tween 80	--	ND	ND	ND
M17 + Glucosa	--	<u>100 KDa</u>	ND	ND

ND: actividad no detectada, --: actividad no determinada

Con la intención de conocer qué proteasas se pueden encontrar dentro del genoma de *P. acidilactici*, en el presente trabajo se realizó una búsqueda *in-silico* en la base de datos del NCBI. Se encontraron proteasas y peptidasas putativas en el genoma de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, de las cuales se calculó la masa molecular. Además, por medio de un software en línea llamado PSORTb V3:0 (Wagner *et al.*, 2010) se dio una predicción de la sublocalización celular de estas proteínas (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Análisis *in-silico* de proteasas reportadas en el genoma de *P. acidilactici* ATCC 8042 por medio del software PSORTb V3:0.

Tipo	Residuos de aminoácidos	Localización	Peso Molecular (kDa)
Cisteín proteasa Prp de procesamiento ribosomal	108	No predecible	11.86
Subunidad HslV de proteasa dependiente de ATP	184	Citoplasma	19.93
Metaloproteasa intramembrana de la familia CPBP	202	Membrana citoplasmática	23.39
Metaloproteasa intramembrana de la familia CPBP	215	Membrana citoplasmática	23.79
Serín proteasa intramembrana de la familia romboide	229	Membrana citoplasmática	24.65
Metaloproteasa de la familia de la matrixina	231	No predecible	25.63
Metaloproteasa zinc HtpX	298	Membrana citoplasmática	32.5
Subunidad ClpX que se une a ATP de proteasa Clp dependiente de ATP	418	Citoplasma	45.86
Metaloproteasa RIP RseP	420	Membrana citoplasmática	45.94
Subunidad HslU ATPasa de proteasa dependiente de ATP	470	Citoplasma	52.7
Subunidad que se une a ATP de proteasa Clp dependiente de ATP	704	Citoplasma	78
Subunidad que se une a ATP de proteasa Clp dependiente de ATP	735	Citoplasma	81.74
Subunidad que se une a ATP de proteasa Clp dependiente de ATP	823	Citoplasma	91.56

Tabla 3. Análisis *in-silico* de peptidasas reportadas en el genoma de *P. acidilactici* ATCC 8042 por medio del software PSORTb V3:0.

Tipo	Residuos de aminoácidos	Localización	Peso Molecular
Peptidasa señal II	150	Membrana citoplasmática	16.97
Peptidasa señal I	192	Pared celular	21.87
Subunidad ClpP proteolítica de endopeptidasa Clp dependiente de ATP	197	Citoplasma	21.51
L,D-Transpeptidasa	224	No predecible	25.13
Prepilina peptidasa	236	Membrana citoplasmática	26.77
Aminopeptidasa metionil tipo I	260	Citoplasma	28.49
Proteína de la familia peptidasa específica para prolina	304	Citoplasma	34.86
Proteína de la familia de aminopeptidasa P	364	Citoplasma	40.58
Peptidasa T	414	Citoplasma	46.55
Carboxipeptidasa D-alanil-D-alanina	415	Membrana citoplasmática	45.2
Peptidasa de la familia M20	441	Citoplasma	48.73
Peptidasa de la familia C1	448	Citoplasma	51.75
Proteína de la familia L,D-transpeptidasa	457	No predecible	49.57
Dipeptidasa de la familia C69	459	No predecible	51.42
Dipeptidasa PepV	466	Citoplasma	50.9
Dipeptidasa de la familia C69	468	No predecible	53.08
Dipeptidasa de la familia C69	472	No predecible	53.47
Dipeptidasa de la familia C69	475	Citoplasma	54.32
Dipeptidasa de la familia C69	476	Citoplasma	53.49
Oligoendopeptidasa F	600	Citoplasma	68.04
Metalopeptidasa de la familia M13	637	Citoplasma	72.08
Proteína de la familia FtsH/Yme1/Tma metalopeptidasa dependiente de ATP	694	Membrana citoplasmática	75.66
Dipeptidil-peptidasa Xaa-Pro	818	Extracelular	93.02
Metalopeptidasa de la familia M1	844	Citoplasma	95.43

Hasta el momento, de forma experimental, el grupo de trabajo ha reportado un total de 8 bandas con actividad proteolítica de diferentes masas, en un intervalo entre los 40 y los 200 kDa en distintas fracciones celulares (Figura 5 y Tabla 1). El análisis *in silico* de las proteínas de *P. acidilactici* ATCC 8042 muestra que existen mínimo 13 proteasas y 24 peptidasas con diferentes funciones y localizaciones dentro del genoma de *P. acidilactici* ATCC 8042, todas con un peso menor a los 100 kDa.

De acuerdo con los resultados previos, se ha observado que la producción de las diferentes proteasas se ve influenciada por el medio de cultivo y las condiciones de producción, sin embargo, no se han podido identificar los factores específicos que ejercen una posible inducción en el microorganismo; por lo que tampoco se ha podido determinar las condiciones de cultivo para una mayor producción de estas enzimas. Además de lo anterior, es importante mencionar que los autores reportaron distintos problemas para replicar los resultados obtenidos en los experimentos para determinar actividad proteolítica.

En los trabajos anteriores no se probó la actividad de las proteasas sobre diferentes sustratos, si bien dichos datos permitirían obtener más información al respecto de su actividad proteolítica y su posible papel en la fermentación de cárnicos.

Es por lo anterior que el análisis detallado de la producción de enzimas proteolíticas, el efecto del medio de cultivo sobre su producción, el incremento en sus niveles de producción, así como el conocimiento de los sustratos sobre los que actúan, son temas que quedan por explorar.

4. HIPÓTESIS.

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 produce más de una enzima proteolítica y el medio de cultivo incide en la producción de estas.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

- Identificar la producción de proteasas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en un medio de cultivo definido que permita su estudio, para así contribuir a la elucidación del sistema proteolítico.

5.2 Objetivos particulares.

- Evaluar el posible efecto del medio de cultivo en la producción de proteasas por *P. acidilactici* ATCC 8042.
- Determinar las condiciones de cultivo que permitan la producción de proteasas de manera reproducible por *P. acidilactici* ATCC 8042.
- Evaluar las metodologías existentes para la determinación de actividad proteolítica en *P. acidilactici* ATCC 8042.
- Identificar actividad proteolítica de diferentes fracciones celulares por medio de zimografía.
- Cuantificar la actividad proteolítica de enzimas producidas por *P. acidilactici* ATCC 8042 sobre diferentes sustratos por técnicas espectrofotométricas
- Purificar e identificar las bandas por LC/MS para su correlación con la información genómica.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Plan de trabajo.

En la Figura 6 se muestra el diagrama general del plan de trabajo para el cumplimiento de los objetivos.

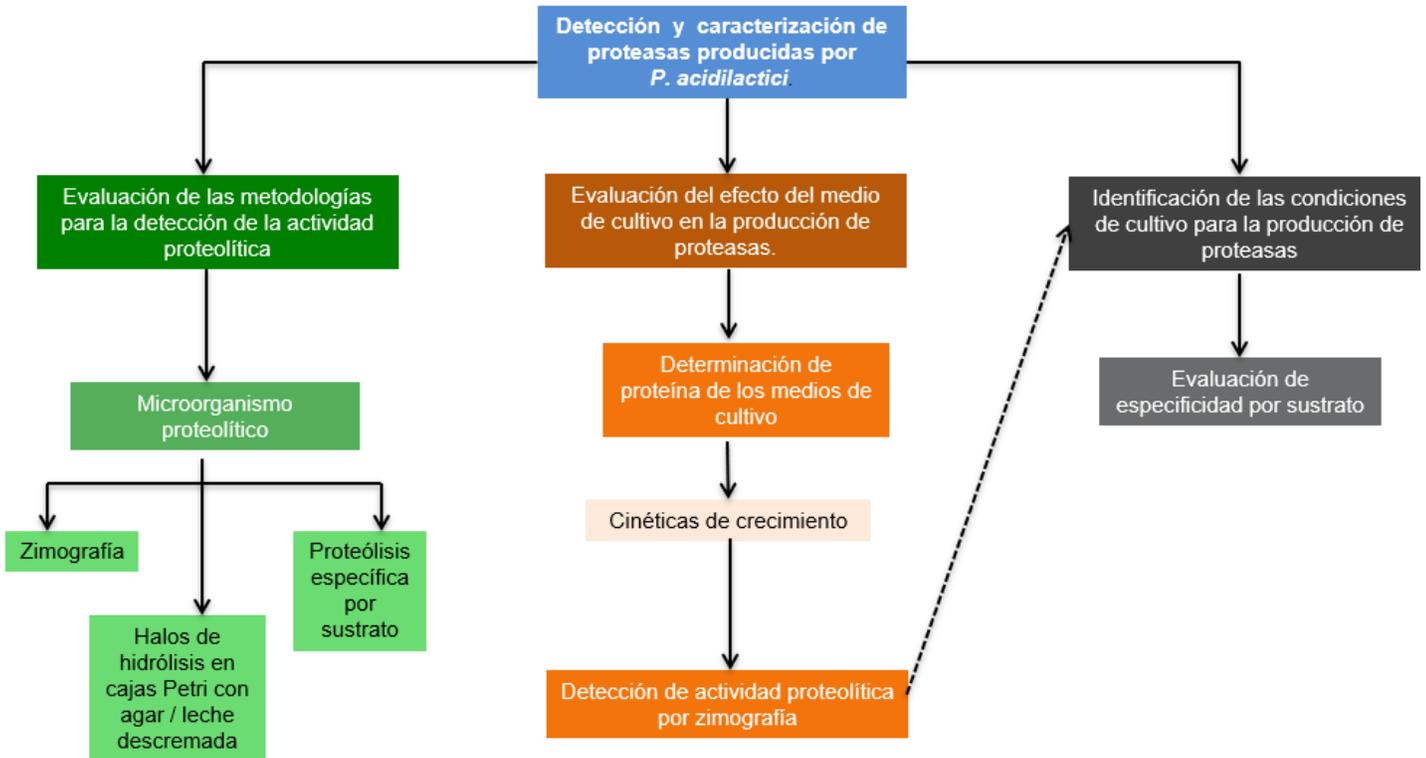


Figura 6. Diagrama general de trabajo.

6.2 Material biológico.

P. acidilactici ATCC 8042 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC por sus siglas en inglés): The Global Bioresource Center, E.U. A.

L. casei se obtuvo del cepario de la Facultad de Química, UNAM, México.

Las células se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales con esferas de vidrio perforadas y en caldo MRS modificado y MRS (Oxoid) respectivamente (DeMan Rogosa and Sharp, Oxoid) con glicerol (80-20 % v/v)

6.3 Determinación de proteína de los distintos medios de cultivo utilizados en reportes anteriores.

Para determinar la cantidad de nitrógeno total en los medios de cultivo deshidratados (MRS, APT, TSB, M17 y CGB) se pesaron entre 0.1 y 0.2 g de muestra y se introdujeron en un tubo Kjeldahl, se agregaron 0.15 g de sulfato de cobre prehidratado, 2.5 g de sulfato de sodio y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. La muestra se sometió a digestión en un digestor Kjeldahl (micro digestor Kjeldahl Mod. DGMK-630) y después a destilación colocando en un tubo la muestra diluida con 10 mL de agua destilada y 40 mL de NaOH al 36 %. Se colocó en el equipo de destilación y el destilado se recolectó en un matraz con 50 mL con H₃BO₃ al 4 % y unas gotas de indicador rojo de metilo 0.1 %. Se tituló el exceso de ácido con una solución de NaOH 0.1 N y se calculó de esta manera el porcentaje de nitrógeno total. El contenido de nitrógeno se expresa como porcentaje en masa de nitrógeno por 100 gramos de medio de cultivo deshidratado.

6.4 Condiciones de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042.

Se realizaron pre-inóculos de la cepa adicionando 2 esferas de vidrio perforadas de *P. acidilactici* conservada a -20 °C por cada 20 mL de medio de cultivo a evaluar, la composición de todos los medios se muestra en las tablas 4, 5 y 6. (MRS modificado (medio de control), MRS1, MRS2, MRS3, MRS4, MRS5, MRS (Oxoid), CGB control, CGB1, CGB2 y CGB3). El pre-inóculo se incubó a 30 °C por 24 h; sin agitación (Precision Gravity Convection Incubator Modelo 4). Posteriormente se realizó una resiembra del pre-inóculo adicionando 1 % de este a un matraz de 50 mL con 20 mL de medio, se incubó por 12 h bajo las mismas condiciones utilizadas para el pre- inóculo.

A 450 mL de medio fresco se adicionaron 4.5 mL del cultivo incubado por 12 h (inóculo al 1 % v/v) y se incubaron bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura que se mencionaron anteriormente. Se tomaron alícuotas de 50 mL a las 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 24 h de crecimiento a las cuales se les midió la densidad óptica a una absorbancia de 600 nm (BIOMATE 3 Thermo Fisher Scientific Spectrophotometer) y el pH con un potenciómetro HANNA HI 4211. Se graficó densidad óptica y pH en función del tiempo. Cada alícuota que se tomó, se centrifugó a 8,500 rpm durante 15 min a 4 °C (primo R Biofuge Heraeus) para poder separar células de sobrenadante.

6.4.1 Medios de cultivo usados.

El medio MRS modificado (que es el medio MRS control en la Tabla 5) es el medio en el que, en trabajos anteriores, se reportó la producción de enzimas proteolíticas por *P. acidilactici*.

A partir de la composición del medio MRS modificado, se hicieron cambios en los nutrientes, modificando las fuentes de nitrógeno. En el medio MRS1 se eliminaron todas las fuentes de nitrógeno para determinar la capacidad del microorganismo de crecer sin fuentes de nitrógeno. En el medio MRS2 solo se incluyó citrato de amonio, para de esta manera determinar el efecto en el crecimiento y la producción de proteasas con sólo fuentes inorgánicas de nitrógeno. En el medio MRS3 se dejó solo al extracto de levadura como fuente de nitrógeno, que es una fuente orgánica de nitrógeno y la cual se ha reportado tener influencia en la producción de ciertos metabolitos (Mazzoli *et al.*, 2014 y Varela *et al.*, 1996) y en el medio MRS 4 se agregó al extracto de carne y a la peptona proteosa como fuente de nitrógeno (fuente orgánica).

Para el medio CGB se hicieron las siguientes modificaciones en las fuentes de nitrógeno: en el CGB1 se eliminaron todas las fuentes de nitrógeno, en el CGB2 se incluyó citrato de amonio y extracto de levadura como fuente de nitrógeno y para el CGB3 se usó bactotripton y citrato de amonio como fuente de nitrógeno. Estos cambios se hicieron con el fin de determinar un posible efecto en el crecimiento y la producción de proteasas dependiendo la fuente orgánica de nitrógeno (extracto de levadura o bactotripton).

Tabla 4. Composición del medio MRS (Oxoid) utilizado en el crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

MRS(OXOID)	
Ingrediente	g/L
Extracto de carne	8
Peptona proteosa	10
Extracto de levadura	4
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
Fosfato de potasio dibásico	2
Tween 80	1
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Glucosa	20

Tabla 5. Modificaciones a la composición del medio MRS para el estudio del efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de proteasas (✓ Indica la presencia del nutriente y ✗ su ausencia).

Nutriente	g/L	MRS control	MRS1	MRS2	MRS3	MRS4
Extracto de carne	10	✓	✗	✗	✗	✓
Peptona proteosa	10	✓	✗	✗	✗	✓
Extracto de levadura	5	✓	✗	✗	✓	✗
Acetato de sodio	5	✓	✓	✓	✓	✓
Citrato de amonio	2	✓	✗	✓	✓	✓
Fosfato de potasio dibásico	2	✓	✓	✓	✓	✓
Tween 80	1	✓	✓	✓	✓	✓
Sulfato de magnesio	0.1	✓	✓	✓	✓	✓
Sulfato de manganeso	0.25	✓	✓	✓	✓	✓
Sacarosa	10	✓	✓	✓	✓	✓
Ácido ascórbico	1.5	✓	✓	✓	✓	✓

✓ Nutriente presente en el medio ✗ Nutriente suprimido del medio.

Tabla 6. Modificaciones a la composición del medio CGB para el estudio del efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de proteasas (✓ Indica la presencia del nutriente y ✗ su ausencia).

Nutriente	g/L	CGB control	CGB1	CGB2	CGB3
Citrato de amonio	2	✓	✗	✓	✓
Extracto de levadura	5	✓	✗	✓	✗
Bactotripton	20	✓	✗	✗	✓
Glucosa	10	✓	✓	✓	✓
Fosfato de potasio dibásico	2	✓	✓	✓	✓
Tween 80	0.05	✓	✓	✓	✓
Sulfato de magnesio	0.1	✓	✓	✓	✓
Sulfato de manganeso	0.05	✓	✓	✓	✓

✓ Nutriente presente en el medio ✗ Nutriente suprimido del medio.

Tabla 7. Tabla comparativa de nutrientes de los dos medios MRS utilizados para el cultivo de *P. acidilactici*.

MRS (OXOID)		MRS modificado	
Ingrediente	g/L	Ingrediente	g/L
Extracto de carne	8	Extracto de carne	10
Proteosa peptona	10	Proteosa peptona	10
Extracto de levadura	4	Extracto de levadura	5
Acetato de sodio	5	Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2	Citrato de amonio	2
Fosfato de potasio dibásico	2	Fosfato de potasio dibásico	2
Tween 80	1	Tween 80	1
Sulfato de magnesio	0.2	Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05	Sulfato de manganeso	0.25
Glucosa	20	Sacarosa	10
		Ácido Ascórbico	1.5

6.5 Determinación del perfil proteínico y de la actividad proteolítica por zimogramas.

Perfil proteínico.

Para determinar el perfil proteínico de las muestras de células y sobrenadantes se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 %. Se prepararon los geles con los reactivos necesarios para su elaboración (Bis-acrilamida 30 %, Tris-HCl 2 M pH 8.8, SDS 10 %, H₂O, TEMED y APS 10 %) (Manual Bio-Rad).

Se ajustó la densidad óptica a 600 nm a un valor de $3 \pm .05$ de las muestras de células obtenidas con buffer de trabajo (Tris-HCl 100 mM pH 8), con el fin de colocar en el gel la cantidad de células más similar posible. Se tomó 1 mL de esta resuspensión de células y se centrifugó a 8,500 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 30 µL de buffer de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, 2 % SDS, 2.5 % glicerol y 0.5 % de azul del bromofenol).

Para obtener la fracción citosólica, 10 mL de la suspensión de células se sometieron a sonicación, para después centrifugar a 8500 rpm durante 15 minutos y así separar el citosol y los restos celulares. La muestra de citosol se preparó tomando 30 µL de la muestra y adicionando 5 µL de buffer de carga. Para los restos celulares se tomó el pellet de 1 mL de

muestra sonicada y se la adicionaron 30 μ L de buffer de carga. Las muestras de sobrenadante se prepararon tomando 30 μ L de cada muestra y adicionado 5 μ L de buffer de carga.

Después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada en agitación suave durante 30 min, se tiñó con azul de Coomassie (0.1 % Coomassie R-250, 45 % de metanol, 10 % de ácido acético glacial y 45 % agua v/v) durante 12 h en agitación suave y finalmente el gel se sumergió en solución desteñidora (10 % metanol, 10 % ácido acético glacial y 80 % agua desionizada v/v). El peso molecular de las bandas de proteína fue determinado por la comparación con marcadores de alto peso molecular (Bio-Rad, 161-0303).

Actividad proteolítica en zimoqramas.

Se prepararon geles desnaturalizantes con 0.1 % m/v de gelatina o caseína como sustrato proteínico. Se sometieron a electroforesis y se lavaron con 50 mL de agua desionizada en agitación suave durante 30 min, posteriormente se lavaron por 30 min en una solución de tritón 2.5 %. Se incubaron a 37 °C con buffer de renaturalización (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, CaCl₂ 5 M, NaCl 200 mM) por un periodo de 12-16 h con agitación suave (50 rpm). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y la actividad proteolítica fue identificada como una zona clara en contra de un fondo azul al ser desteñidos (Lantz y Ciborowski, 1994).

6.6 Actividad caseinolítica en cajas Petri con agar / leche descremada.

Se preparó una solución al 1.0 % de leche descremada con 1% de agar y se vació en cajas Petri, para lo cual se esterilizó en autoclave por separado la leche descremada a 121° C por 3 minutos. En el medio ya solidificado se realizaron pozos de 8 mm de diámetro para verter la muestra, en cada pozo se colocaron 150 μ L de muestra.

Los halos de inhibición se midieron y la actividad se reportó como mm de hidrólisis por miligramo de proteína.

6.7 Cuantificación de proteína.

Se determinaron las concentraciones de proteína de las muestras obtenidas por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas Epoch de BioTek. Se colocaron 160 μ L de cada muestra en un pozo de la microplaca limpio y seco. Se adicionaron 40 μ L de reactivo de Bradford concentrado y se homogenizó la muestra. Luego se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Las mediciones se realizaron por

triplicado. Se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) (Bradford et al., 1976).

6.8 Determinación de actividad proteolítica específica sobre diferentes sustratos por medio de técnicas espectrofotométricas.

La actividad proteolítica se determinó por medio de técnicas espectrofotométricas. Se utilizaron diferentes sustratos proteínicos con la finalidad de evaluar la afinidad por sustrato.

Método para determinar actividad proteolítica contra caseína y hemoglobina.

Se determinó mediante el método de Kunitz (1947), empleando como sustrato caseína y hemoglobina al 1%. Para realizar la medición de la actividad proteolítica se prosiguió de la siguiente manera; en un baño a temperatura de 37 °C, se colocaron los tubos de ensayo conteniendo 1.9 mL de caseína para su incubación durante 10 min. Se agregó 0.1 mL de la preparación enzimática y se dejó actuar durante 1 hora. La reacción se detuvo adicionando 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Simultáneamente se corrió un testigo al que se adicionó primero el TCA y al final la preparación enzimática. Al término de la reacción los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 minutos.

Finalmente, los productos de la hidrólisis enzimática que se encontraba en el sobrenadante: aminoácidos libres y péptidos pequeños, se determinaron mediante absorbancia en un espectrofotómetro a 280 nm, ajustando el aparato con un blanco de 2 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.6 y 3 mL de TCA al 5%. El ensayo se realizó por triplicado. Una unidad de actividad enzimática se definió como un cambio en la absorbancia de 0.01 por unidad de tiempo de la reacción por miligramo de proteína total.

Método para determinar actividad proteolítica contra elastina.

La actividad sobre elastina fue determinada con el sustrato Elastin-Congo Red (Elastin Products) en una concentración de 5 mg/ml resuspendido en buffer de trabajo 50 mM Tris-HCl pH 7.6. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 2 h en agitación controlada. El cálculo de las unidades de actividad específica se hizo con base en una hora de la reacción. Ésta se detuvo a 4°C por 10 min y luego se centrifugó en refrigeración (Centrifuga Biofuge PRIMO R) a 8,500 rpm. Las unidades de solubilización de la elastina se determinaron midiendo la absorbancia del sobrenadante a 495 nm (Kessler *et al.*, 1997).

Método para determinar actividad proteolítica contra colágeno.

Se utilizó el sustrato proteínico del colágeno Hide Powder Azure (Sigma) en una concentración

de 5 mg/mL. Este es insoluble en agua y está unido covalentemente al colorante Remazol azul brillante; cuando el sustrato es hidrolizado por una proteasa, se libera el colorante y el medio se tiñe de color azul (Rinderknecht *et al.*, 1968). La metodología usada fue la misma que para determinar actividad elastinolítica.

Método para determinar actividad proteolítica contra gelatina.

El ensayo se basa en el uso de gelatina succinilada como sustrato y la medición de aminas primarias expuestas por la hidrólisis del sustrato por actividad proteolítica. La gelatina se trata con anhídrido succínico para bloquear todos los grupos amino libres de la proteína. La hidrólisis de los enlaces peptídicos por el ataque proteolítico expone las aminas primarias, que se detectan al reaccionar con el ácido 2,4,6- trinitrobenzen sulfónico (TNBS) (Sigma Aldrich) que produce una reacción colorida que se puede leer a una longitud de onda de 450 nm y, que es directamente proporcional a la actividad gelanolítica (Baragi *et al.*, 2000).

La actividad sobre gelatina se determinó con la gelatina succinilada en una concentración de 200 µg/mL, resuspendida en 50 mM buffer de boratos pH 8.5. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 1 hora. Una vez transcurrido dicho tiempo se agregaron 50 µl de una solución de TNBS a 0.03% y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. La densidad óptica de cada reacción se determinó a una longitud de onda de 450 nm con un lector de microplacas (Epoch Biotek).

Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Las muestras se analizaron por LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem), técnica que permite identificar proteínas a partir del espectro de masas de su huella peptídica e incluso secuenciar *de novo* estos péptidos. Este análisis se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química; en un espectrómetro de masas modelo Synapt G2S, con tiempo de vuelo acoplado a un cromatógrafo de líquidos modelo nanoACQUITY, ambos de marca WATERS. La muestra fue digerida con tripsina porcina y ionizada por electrospray.

Las secuencias de los péptidos se analizaron mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center of Biotechnology Information) para encontrar regiones de similitud con secuencias de otras proteínas reportadas en la base de datos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Validación de metodologías para la determinación de actividad proteolítica.

En este trabajo se pretende avanzar en el conocimiento de la producción de proteasas por *Pediococcus acidilactici*, para así contribuir a la elucidación de su sistema proteolítico.

Tal como se estableció en la sección de antecedentes, los resultados de trabajos previos presentaron variaciones que expusieron la necesidad de analizar la metodología usada para determinar actividad proteolítica del microorganismo de estudio; por lo tanto, en el presente trabajo se evaluaron las técnicas para detectar este tipo de actividad enzimática en bacterias ácido lácticas en específico.

Los microorganismos productores de proteasas por excelencia son los pertenecientes al género *Bacillus*; sin embargo, para estas pruebas se buscó una bacteria ácido láctica productora de proteasas con una mayor similitud a *Pediococcus acidilactici*. En la Figura 7 se muestra un árbol filogenético mostrando las posiciones relativas de algunas bacterias ácido lácticas, basándose en secuencias parciales del gen ADNr 16s (Mandal *et al.*, 2011). Debido a su similitud con *P. acidilactici*, la bacteria que se eligió fue *Lactobacillus casei*, cuya actividad proteolítica se ha descrito en varios reportes (Savijoki *et al.*, 2006; Tafti *et al.*, 2013; y Capra *et al.*, 2014); además en los genomas completos de varias cepas de este microorganismo se han reportado hasta 27 proteasas y 46 peptidasas que le permiten el crecimiento en medios con una sola fuente de nitrógeno, como la leche.

A lo largo de las pruebas para determinar la actividad proteolítica de *P. acidilactici*, se usó como microorganismo de referencia a *L. casei*. En los resultados expuestos en las secciones 7.4 a 7.6 de este apartado se muestran los resultados para ambos microorganismos.

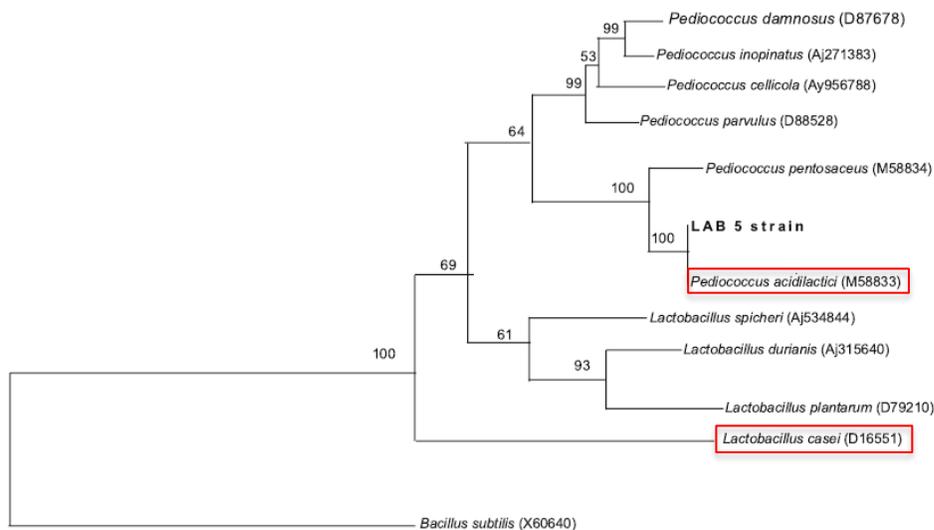


Figura 7. Árbol filogenético que relaciona distintas BAL por medio de secuencias del gen 16S (Tomado de Mandal *et al.*, 2011).

7.2 Determinación de proteína de los distintos medios de cultivo utilizados.

En reportes anteriores se ha observado que algunas fuentes de nitrógeno pueden provocar un aumento en el crecimiento de ciertos microorganismos, otras pueden afectar sólo en la producción de compuestos antibacterianos y algunas incluso en ambos (Sepahy y Jabalameli, 2011).

Algunos autores han reportado que las BAL son propensas a responder a los cambios en la disponibilidad de nitrógeno mediante la regulación de sus sistemas proteolíticos para así asegurar un equilibrio de nitrógeno apropiado para la célula. Se ha sugerido incluso que di- y tri-péptidos con residuos hidrofóbicos actúan como moléculas efectoras en la regulación transcripcional del sistema Opp, el cual regula el transporte de oligopéptidos en la célula bacteriana, influyendo de esta manera en todo el sistema proteolítico de *L. lactis*.

En un estudio más reciente, la expresión de seis unidades transcripcionales fue reprimida desde 5 hasta 150 veces después de la adición de un hidrolizado de caseína al medio, que contenía 80% de péptidos y 20% de aminoácidos libres, y se incrementó su actividad cuando las células se encontraban en un medio en condiciones limitadas de fuente de nitrógeno.

Como los mencionados, numerosos estudios han demostrado el efecto de inhibición por fuentes de nitrógeno en la expresión y producción de metabolitos proteolíticos (Savikoji *et al.*, 2006).

Tomando en cuenta esto, en el presente trabajo se decidió determinar la concentración de nitrógeno de los medios de cultivo usados en el grupo de trabajo para cultivar a *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con anterioridad; para así poder comprobar si esto es un factor que incide en la producción de proteasas por el microorganismo en estudio.

La determinación de concentración de nitrógeno total arrojó que el medio con mayor concentración de nitrógeno fue el medio CGB, seguido por los medios TSB, M17, APT y, por último, MRS (Figura 8). El medio MRS fue el que presentó menor concentración de nitrógeno, a pesar de que fue desarrollado para permitir el crecimiento de bacterias exigentes nutricionalmente (Oxoid Microbiology Products. Dehydrated Culture Media: MRS agar, 2019).

Para comenzar a estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de proteasas se eligieron dos medios, el de mayor y el de menor concentración de nitrógeno; para que, de esta manera, la modificación en las cantidades de nitrógeno fuera más sencilla. Estos dos medios fueron MRS y CGB.

Para el medio CGB se hicieron dos variaciones; al medio CGB1 se le quitaron todas las fuentes de nitrógeno para evaluar si el microorganismo era capaz de crecer en estas condiciones, del medio CGB2 se eliminó la bacto triptona y del medio CGB3 se eliminó el extracto de levadura como fuente de nitrógeno (Tabla 6).

Del medio MRS se hicieron 4 variantes: el medio MRS1 que no contiene fuente de nitrógeno, el MRS2 que sólo contiene citrato de amonio como fuente de nitrógeno, para evaluar el efecto de una fuente inorgánica; el medio MRS3 que no contiene extracto de carne ni peptona proteosa y el MRS4 que no contiene extracto de levadura (Tabla 5).

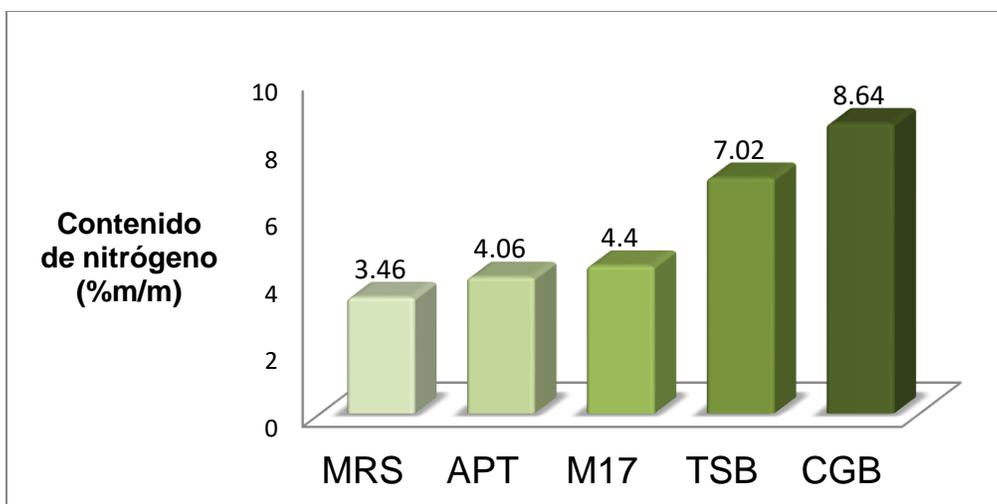


Figura 8. Contenido de nitrógeno total de los medios de cultivo anteriormente utilizados para el crecimiento de *P. acidilactici*. El contenido de nitrógeno se expresa en % m/m.

7.3 Cinéticas de crecimiento de *P. acidilactici* en los distintos medios de cultivo.

Una vez elegidos los medios de cultivo con los que se trabajaría, se procedió a realizar cinéticas de crecimiento de *P. acidilactici*.

La cepa no fue capaz de crecer en medio MRS1 y MRS2, lo que indica que no es capaz de crecer sin fuente de nitrógeno ni con sólo una fuente inorgánica de nitrógeno. A partir de este resultado, se puede afirmar que *P. acidilactici* requiere fuentes orgánicas complejas en el medio para su desarrollo.

Para las demás variaciones del medio MRS, el crecimiento celular fue bajo. El valor de densidad óptica a las 24 horas de crecimiento fue de 0.72 en medio MRS control (Figura 9), 0.49 en el medio MRS3 (5 g/L de extracto de levadura) y 0.58 en el medio MRS4 (10g/L de extracto de carne y 10 g/L de peptona proteosa).

El extracto de levadura es un concentrado de la porción soluble en agua de células de *Saccharomyces cerevisiae* que han sido autolizadas. El extracto de levadura es básicamente una mezcla de aminoácidos y péptidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos (Bridson y Weissfeld, 1970). De acuerdo con el fabricante (Sigma- Aldrich®) contiene una cantidad ≥ 10 % de nitrógeno total.

El extracto de carne se elabora a partir de carne con bajo contenido en grasas y tendones, y se considera que complementa las propiedades nutricionales de la peptona al aportar minerales, fosfatos y fuentes de energía y aquellos factores esenciales que faltan en la peptona (Bridson y Weissfeld, 1970). De acuerdo con el fabricante (Sigma- Aldrich®) contiene una cantidad de 11.5-12.5 % de nitrógeno total.

La peptona proteosa son proteínas de origen animal que han sido hidrolizadas bajo diferentes condiciones de digestión en péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres. De acuerdo con el fabricante (BD Biosciences®) contiene una cantidad del 10-15.5% de nitrógeno total.

Considerando los porcentajes de nitrógeno total que contienen las tres fuentes de nitrógeno orgánico y sus correspondientes concentraciones en los medios, se observa que el crecimiento obtenido es proporcional a la cantidad de nitrógeno presente en el medio, indicando que el microorganismo requiere mayores cantidades de nitrógeno disponible para su desarrollo.

Los valores de densidad óptica obtenidos son bajos comparados con el crecimiento obtenido, por ejemplo, en un medio comercial; esto puede ser reflejo de un estado de estrés en la bacteria, debido probablemente a la falta de nutrimentos óptimos.

Se puede observar en las gráficas de las cinéticas de crecimiento que no presentan la curva de crecimiento sigmoidea característica en las bacterias ácido lácticas, sin embargo, si se observan las tres fases de crecimiento Lag, Log y estacionaria. Las fases son más marcadas en el medio MRS control (Figura 9).

En el medio CGB control la densidad óptica final fue de 2.44, *P. acidilactici* no fue capaz de crecer en el medio CGB1 (sin fuente de nitrógeno), y la densidad óptica final para los medios CGB2 (5 g/L de extracto de levadura) y CGB3 (20 g/L bactotripton) fue de 1.44 y 1.68 respectivamente.

La bactotripton es un hidrolizado pancreático de caseína de origen animal y contiene $\geq 12\%$ de nitrógeno total. Considerando el porcentaje de nitrógeno total y la relación de bactotripton a extracto de levadura, que es 4:1, nuevamente se observa que el crecimiento en los medios CGB fue proporcional a la cantidad de nitrógeno total contenida en el medio.

En las gráficas de crecimiento en medio GCB se observa evidencia de crecimiento diauxico por la existencia de dos fases Log o exponenciales separadas por una fase estacionaria corta a la mitad de la gráfica. Este tipo de crecimiento se da cuando una bacteria crece en presencia de sustratos diferentes que pueden ser usados como fuentes de carbono o nitrógeno. Este tipo de comportamiento es más marcado en el medio CGB control.

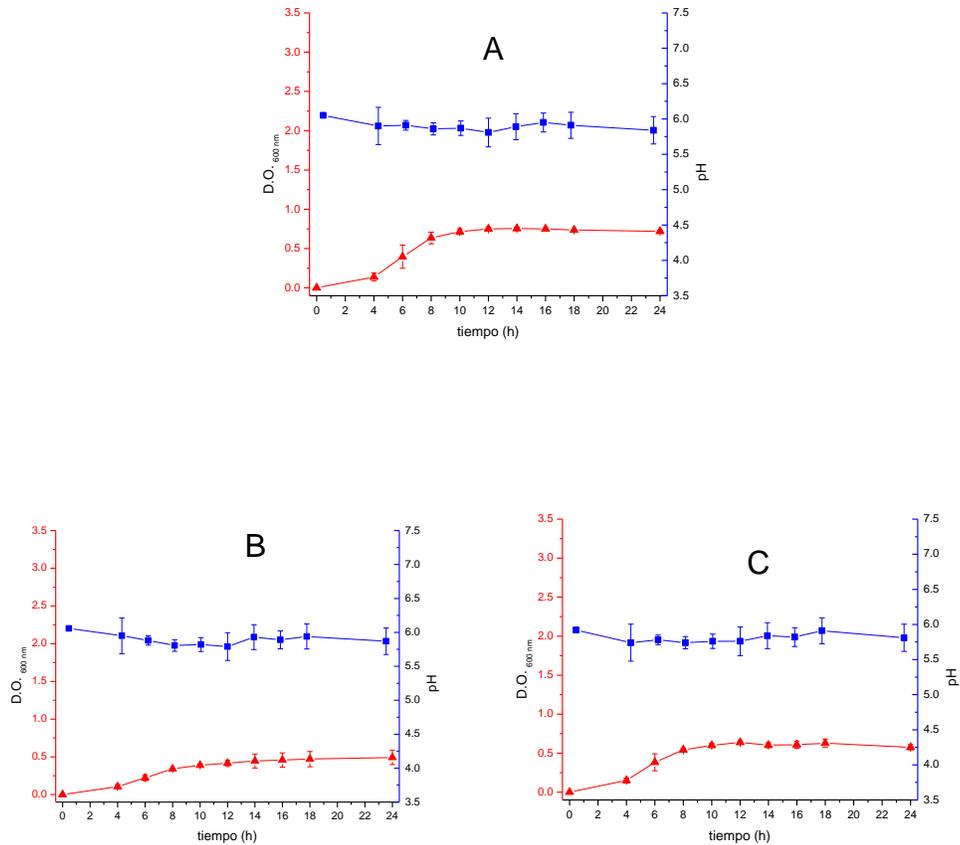


Figura 9. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* en medio A) MRS control, B) MRS3 y C) MRS4. Las líneas azules representan el descenso de pH del medio de cultivo (■) a lo largo del tiempo, mientras que las líneas rojas representan el aumento de la densidad óptica medida a 600 nm (▲) a lo largo del tiempo.

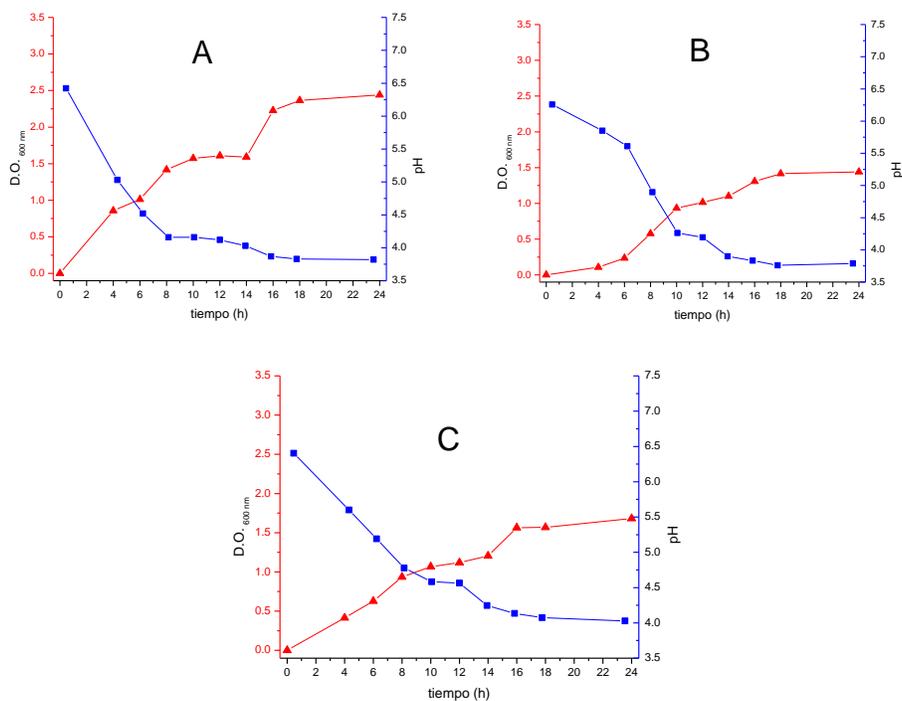


Figura 10. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* en medio A) CGB control, B) CGB2 y C) CGB3. Las azules representan el descenso de pH del medio de cultivo (■) a lo largo del tiempo, mientras que las líneas rojas representan el aumento de la densidad óptica medida a 600 nm (▲) a lo largo del tiempo.

Una vez analizadas las curvas de crecimiento en los medios, se decidió hacer pruebas de actividad proteolítica a las 14 horas de crecimiento porque en este tiempo, en la mayoría de los medios, se alcanzaba la fase estacionaria de crecimiento en etapa temprana. Además, como se demuestra en pruebas posteriores, es al tiempo de crecimiento que se presenta mayor producción de proteasas.

7.4 Determinación del perfil proteínico por SDS PAGE y de la actividad proteolítica por zimograma.

Antes de determinar el perfil proteínico y la actividad proteolítica de *P. acidilactici*, se hizo la evaluación de la técnica con *L. casei*. Para probar la actividad proteolítica de *L. casei*, se obtuvieron distintas fracciones celulares de cultivos cosechados a las 14 horas de crecimiento, se determinó su perfil proteínico por SDS-PAGE y su actividad proteolítica por zimogramas con gelatina y caseína como sustrato.

L. casei mostró actividad contra gelatina y caseína. La fracción celular muestra actividades gelatinolíticas a los 40, 55, 70 y 150 kDa (Figura 11).

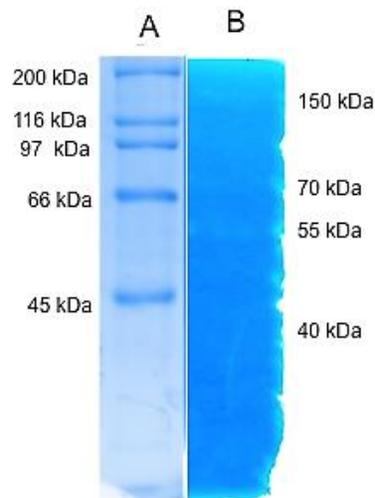


Figura 11. Zimograma de actividad proteolítica contra gelatina de la fracción celular de *L. casei*. En el carril A) se muestra el marcador de alto peso molecular y en el carril B) se muestra la actividad gelatinolítica de la fracción celular de *L. casei*

Con esta prueba se pretendía evaluar la técnica de zimografía para actividad proteolítica en un microorganismo altamente proteolítico. Una vez que se estableció que la técnica era adecuada para determinar proteólisis, se procedió a determinar el perfil proteínico de *P. acidilactici*.

En la figura 12 se muestra el perfil proteínico para las fracciones celulares de *P. acidilactici* obtenidas en los medios MRS control, MRS3 y MRS4 a las 8, 14 y 24 horas de crecimiento.

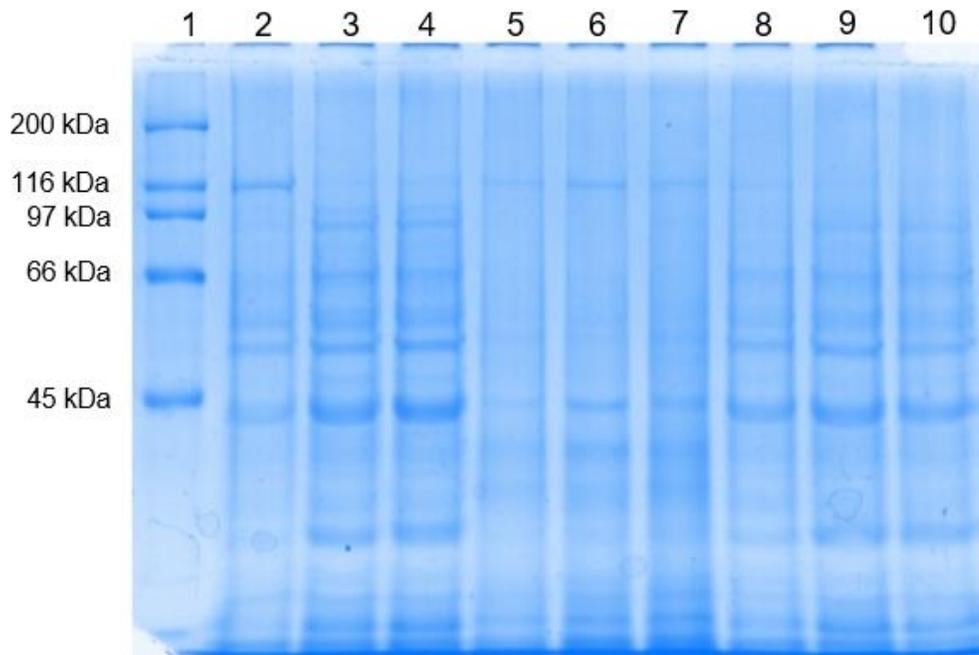


Figura 12. Perfil proteínico obtenido por SDS PAGE para las fracciones celulares de *P. acidilactici* desarrollado en los medios MRS control, MRS3 y MRS4 a diferentes horas de crecimiento. El carril 1) muestra el marcador de alto peso molecular, el carril 2) corresponde al perfil proteínico en MRS control a las 8h, el carril 3) corresponde al perfil proteínico en MRS control a las 14h, el carril 4) corresponde al perfil proteínico en MRS control a las 24h, el carril 5) corresponde al perfil proteínico en MRS3 a las 8h, el carril 6) corresponde al perfil proteínico en MRS3 a las 14h, el carril 7) corresponde al perfil proteínico en medio MRS1 a las 24h, el carril 8) corresponde al perfil proteínico en MRS4 a las 8h, el carril 9) corresponde al perfil proteínico en MRS4 a las 14h y el carril 10) corresponde al perfil proteínico en MRS4 a las 24h.

En la Figura 12 se observa una menor producción de proteínas en el medio MRS3 que es el medio de cultivo que tiene sólo una fuente de nitrógeno (extracto de levadura). Esto se puede observar en los carriles 5, 6 y 7. Estos resultados se repiten en el gel con la fracción extracelular.

En el gel de actividad proteolítica contra gelatina de la fracción extracelular, se observó una banda de más de 200 kDa para el tiempo 14 en medio MRS control (Figura 13) y otra de 180 kDa en la fracción celular (Figura 17). Esta fue la única condición en la que apareció esta banda. Por tanto, es necesaria la presencia de las tres fuentes de nitrógeno: extracto de levadura, extracto de carne y peptona proteosa en el medio para la producción de las bandas a las 14 h.

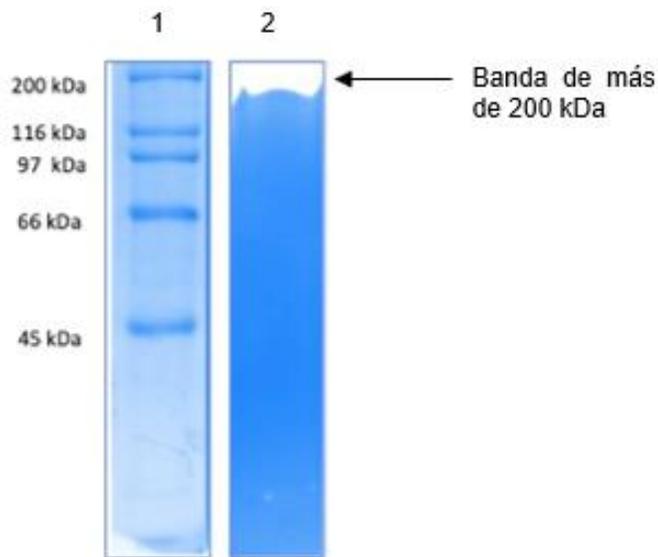


Figura 13. Zimograma de actividad proteolítica contra gelatina de la fracción extracelular de *P. acidilactici* crecido en medio MRS control. El carril 1) muestra el marcador de alto peso molecular y el carril 2) muestra la actividad proteolítica de la fracción extracelular de *P. acidilactici* a las 14 h de crecimiento en medio MRS control.

La fracción celular del medio MRS3 (5 g/L de extracto de levadura) presentó dos bandas de actividad proteolítica a las 14 h (Figura 14) de aproximadamente 108 y 122 kDa (ImageLab BioRad). Esta fue la única fracción celular que presentó actividad.

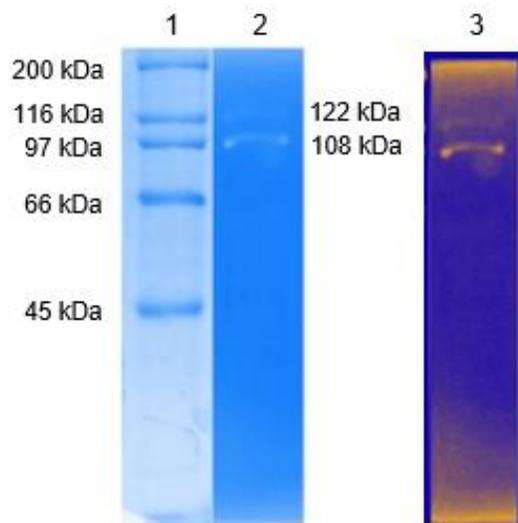


Figura 14. Zimograma de actividad proteolítica contra gelatina de la fracción celular de *P. acidilactici* crecido en medio MRS3. El carril 1) muestra el marcador de alto peso molecular y el carril 2) muestra la actividad proteolítica de la fracción celular de *P. acidilactici* a las 14 h de crecimiento en medio MRS3. El Carril 3) es una edición de la imagen con el fin de apreciar las bandas de actividad.

Para el medio CGB se observa un mayor número de proteínas en los perfiles proteínicos cuando el medio CGB tiene extracto de levadura y peptona proteosa (CGB control), y hay un número menor de bandas de proteína en las variaciones CGB1, CGB2 y CGB3.

Cuando se determinó la actividad proteolítica de la fracción extracelular, se observó una banda de menos de 45 kDa y un barrido descendente a las 14 horas de crecimiento (Figura 15), en el medio CGB3 (20 g/L de bactotripton).

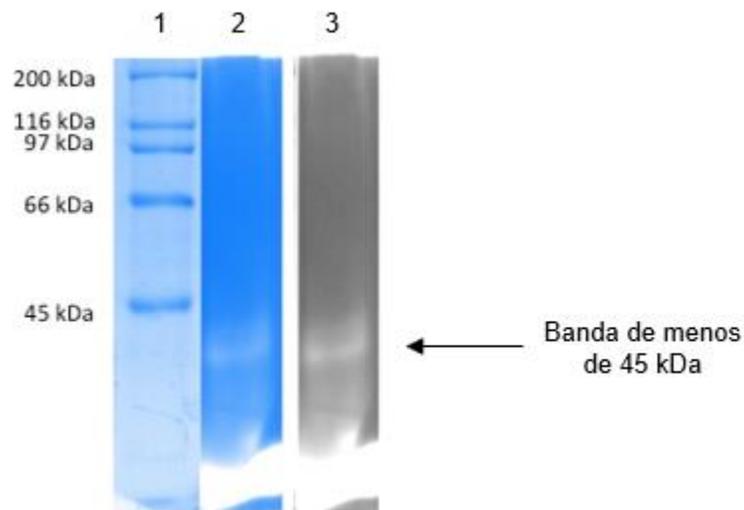


Figura 15. Zimograma de actividad proteolítica contra gelatina de la fracción extracelular de *P. acidilactici* crecido en medio CGB3. El carril 1) muestra el marcador de alto peso molecular y el carril 2) muestra la actividad proteolítica de la fracción extracelular de *P. acidilactici* a las 14 h de crecimiento en medio CGB3. El Carril 3) es una edición de la imagen con el fin de apreciar las bandas de actividad.

La diferencia entre el medio CGB3 y el CGB control, es la ausencia del extracto de levadura; por lo que la falta de este componente podría estar incidiendo en la producción de enzimas con actividad lítica.

De acuerdo con Bridson y Weissfeld (1970), el extracto de levadura es una importante fuente de aminoácidos, conteniendo principalmente ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, alanina, y leucina. La ausencia de alguno de los péptidos y aminoácidos que proporciona el extracto de levadura podría repercutir en la necesidad de la bacteria de producir enzimas de actividad proteolítica para asegurar su desarrollo.

Los resultados obtenidos hasta el momento comprueban que sí existe un efecto de los nutrientes en la producción de enzimas con actividad gelatinolítica. Por ejemplo, existe un efecto de la fuente nitrógeno, que en medio MRS provoca que a menor concentración de nitrógeno se produzcan dos bandas a distintos pesos en la fracción celular y que sólo cuando el medio contiene todas las fuentes de nutriente se produzca una enzima extracelular.

Es posible que *P. acidilactici*, como otras bacterias ácido lácticas, produzca una enzima extracelular para poder degradar las proteínas presentes en el medio de cultivo (Savijoki et al., 2006), y posteriormente poder transportarlas dentro de la célula.

Por otro lado, en el medio CGB se observa que cuando se limita la fuente de nitrógeno, quitando el extracto de levadura del medio, la bacteria es capaz de producir enzimas con capacidad para degradar gelatina.

Es importante señalar que, en la práctica experimental del presente trabajo, se tuvieron dificultades técnicas con la reproducibilidad de los experimentos, ya que la producción de las proteasas era muy sensible a cambios tales como la temperatura ambiental, uso de diferentes básculas para pesar los medios de cultivo, los matraces usados, etc.; lo que nos llevó a concluir que su producción está influenciada por una multiplicidad de factores que dificulta su estudio.

Además, la bacteria no tuvo un buen crecimiento en los medios de cultivo usados, lo que se puede relacionar al uso de medios de cultivo que probablemente eran restrictivos. Por esto se consideró que las proteasas observadas hasta el momento no eran enzimas producidas en condiciones estándar de producción, es decir, no eran proteasas de producción basal que normalmente se presentarían en un producto cárnico fermentado.

Con base en lo anterior, y en la necesidad de contar con un medio de cultivo que permitiera un mayor crecimiento, se determinó que era necesario estandarizar la producción de proteasas, usando un solo medio definido para continuar con su estudio y posible identificación.

Por las razones antes establecidas, se buscó un medio de cultivo que estuviera reportado como óptimo para el crecimiento de bacterias exigentes nutricionalmente y permitiera que la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se desarrollara adecuadamente.

Se probaron los medios MRS comercial (Oxoid), APT, CGB comercial, TSB y M17; y diferentes velocidades de agitación y se encontró que, tomando la formulación del medio MRS comercial (Oxoid) en condición estática se logra obtener una cinética de crecimiento de carácter sigmoide de *P. acidilactici* que alcanza una densidad óptica final de 3.44 (Figura 16).

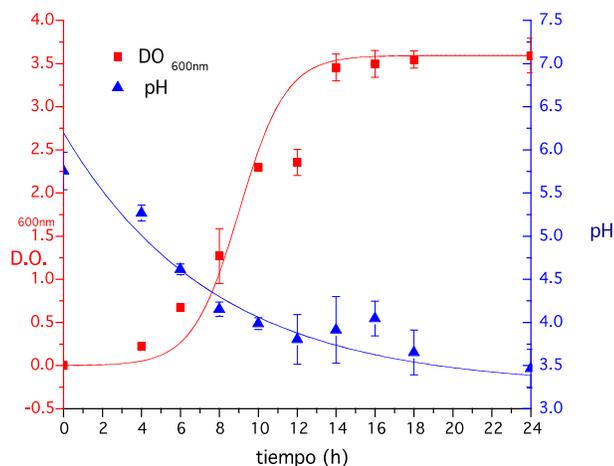


Figura 16. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* en medio MRS (Oxoid). Las líneas azules representan el descenso de pH del medio de cultivo (\blacktriangle) a lo largo del tiempo, mientras que las líneas rojas representan el aumento de la densidad óptica medida a 600 nm (\blacksquare) a lo largo del tiempo.

La diferencia entre el medio MRS (Oxoid) y el MRS modificado es una mayor cantidad de extracto de carne y de extracto de levadura, menor cantidad de sulfato de magnesio, mayor cantidad de sulfato de manganeso y que como fuente de carbono tiene sacarosa en lugar de glucosa (Tabla 7).

Todas las proteasas encontradas antes del presente trabajo se habían identificado cuando se hacía crecer a *P. acidilactici* ATCC 8042 en medio MRS modificado. Dicho medio se usaba para identificar actividad de peptidoglucano hidrolasas en la bacteria y llevó a la identificación de otras actividades de interés biotecnológico.

En la búsqueda de establecer las condiciones de producción de enzimas con actividad proteolítica, se decidió trabajar con ambos medios MRS (Oxoid) y MRS modificado.

Ya que se obtuvo el crecimiento adecuado para determinar actividad proteolítica se separaron 4 fracciones a las 14 horas de crecimiento: fracción celular, fracción extracelular, restos celulares

obtenidos por sonicación y fracción citosólica. Las fracciones fueron colocadas en geles de gelatina (Figura 17) y fueron comparados con las fracciones obtenidas en MRS modificado.

Se observa que cuando la BAL crece durante 14 h en medio MRS (Oxoid) es capaz de producir una banda de 180 kDa, y además otra de 100 kDa que permanece en los restos celulares. En la fracción extracelular se mantiene la banda >200 kDa y en citosol se encuentra también, aunque en menor intensidad, la de 180 kDa. Mientras que en el medio MRS modificado se observó la banda de 180 kDa en células enteras, la cual se mantuvo en citosol. La enzima de más de 200 kDa del sobrenadante también estuvo presente.

Como la mayor producción de enzimas con actividad proteolítica se observó en el medio MRS (Oxoid), a 29° C y sin agitación, se estableció que éstas serían las condiciones de crecimiento para continuar el estudio de la producción de proteasas por *P. acidilactici*.

Una vez establecido lo anterior, se prosiguió a probar la actividad caseinolítica por zimogramas en geles de acrilamida con caseína 0.1% embebida. Con caseína como sustrato, en lugar de gelatina, se observó en los zimogramas una banda de aproximadamente 100 kDa para la fracción de células enteras.

En la Tabla 8 se muestra un compendio de las bandas encontradas en diferentes medios de cultivo, así como las características de los medios.

Tabla 8. Bandas de actividad proteolítica contra gelatina de fracciones celulares de *P. acidilactici* cultivado en distintos medios de cultivo.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DEL MEDIO	FRACCIÓN	PESO MOLECULAR
MRS modificado	Medio MRS no comercial, con todas las fuentes de nitrógeno (extracto de carne, peptona proteosa y extracto de levadura)	Células enteras	180 kDa
		Extracelular	Mayor de 200 kDa
		Citosol	180 kDa
MRS (Oxoid)	Medio MRS comercial con todas las fuentes de nitrógeno.	Células enteras	100 y 180 kDa
		Restos celulares	100 kDa
		Extracelular	Mayor de 200 kDa
		Citosol	180 KDa
MRS3	Medio MRS no comercial, (solo extracto de levadura como fuente de nitrógeno).	Celular	108 y 122 kDa.
CGB3	Medio CGB no comercial (solo bactotripton y citrato de amonio como fuente de nitrógeno)	Extracelular	Menor de 45 kDa y barrido descendente

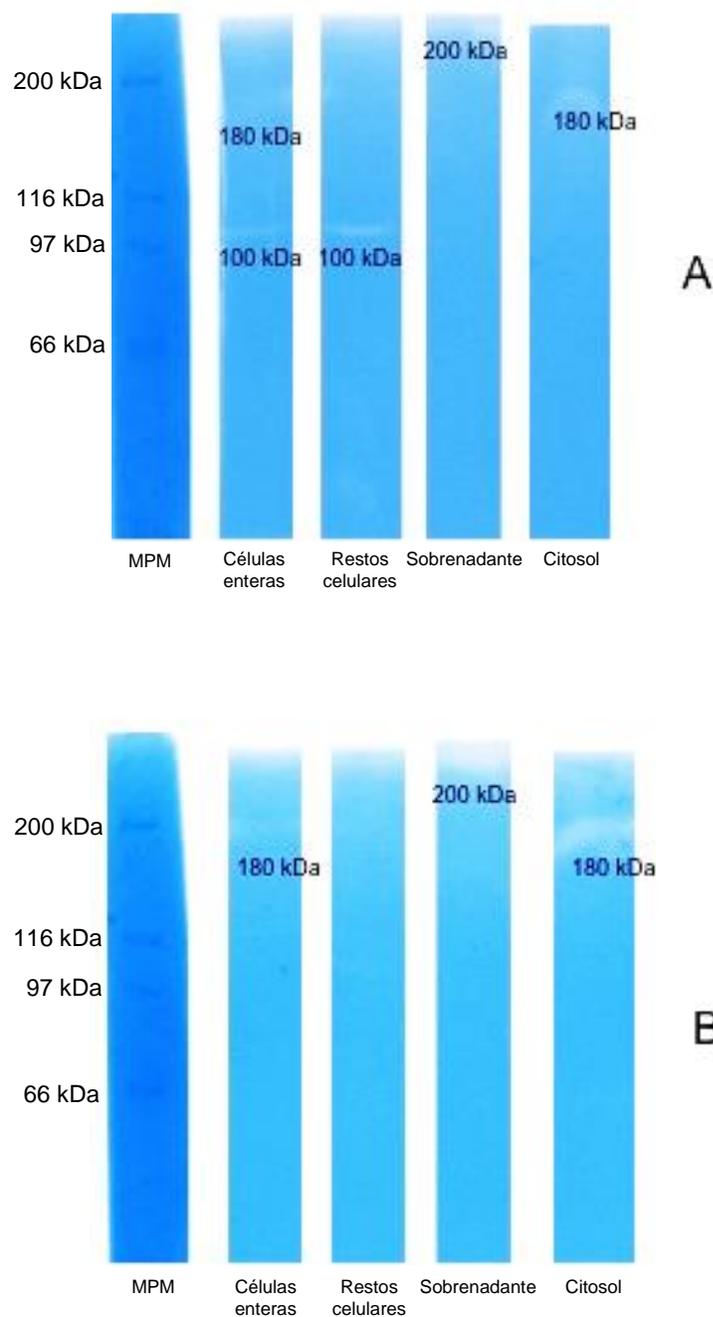


Figura 17. Zimogramas de actividad proteolítica contra gelatina de cuatro diferentes fracciones celulares de *P. acidilactici* cultivado en medio MRS (Oxoid) y MRS modificado. El conjunto de carriles A) muestra las bandas con actividad proteolítica de las fracciones celulares obtenidas en medio MRS Oxoid, mientras que el conjunto de carriles B) muestra las bandas con actividad proteolítica de las fracciones celulares obtenidas en medio MRS modificado

7.5 Actividad caseinolítica en cajas Petri con agar / leche descremada.

Se evaluó la técnica de actividad caseinolítica en cajas Petri con agar / leche descremada con distintas fracciones celulares de cultivos de *L. casei* cosechados a las 14 horas de crecimiento. La fracción celular mostró halos de hidrólisis de leche descremada en cajas (Figura 18).

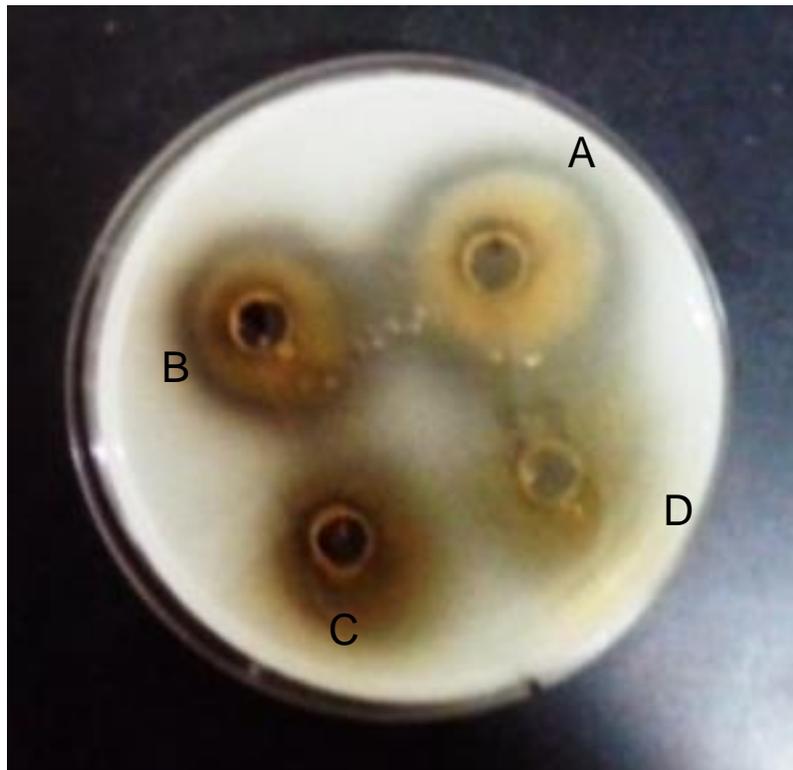


Figura 18. Caja con agar / leche descremada que muestran halos de hidrólisis producidos por diferentes fracciones celulares de *L. casei*. A) Células enteras, B) Restos celulares, C) Sobrenadante y D) Citosol.

Se observó alrededor de los pozos en los que se colocaron células enteras y restos celulares, algunos halos color amarillo opaco. Después de varias repeticiones, se determinó que eran causados por la misma densidad del material biológico.

Una vez evaluada la técnica con el microorganismo de referencia, y determinado que la prueba si permite la identificación de halos de hidrólisis en el sustrato, se procedió a determinar la actividad proteolítica de *P. acidilactici*.

Todas las fracciones se colocaron en cajas con agar / leche descremada. A las 12 h sólo la fracción extracelular presentó un halo de hidrólisis. Hasta las 36 h la fracción celular y los restos celulares también presentaron actividad (Figura 19).

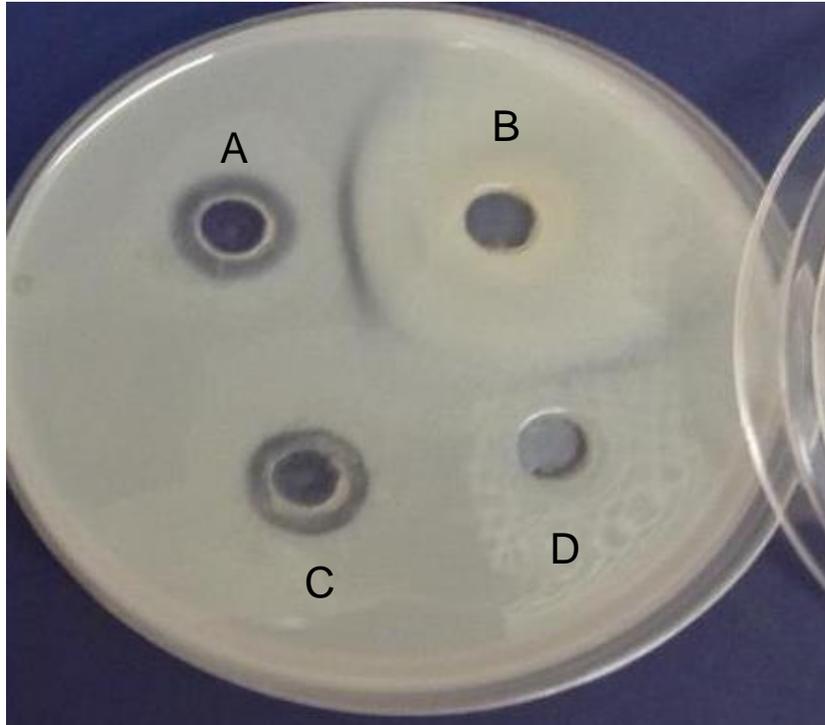


Figura 19. Caja con agar / leche descremada que muestra halos de hidrólisis producidos por diferentes fracciones celulares de *Pediococcus acidilactici* a las 36 h de crecimiento. A) Células enteras, B) Sobrenadante, C) Restos celulares y D) Citosol.

En torno al pozo donde se colocó la fracción extracelular (Figura 19 B) se observó un precipitado blanco rodeado a su vez por un halo de hidrólisis. Con base en esta observación, se decidió descartar que dicho halo fuera efecto del pH sobre el sustrato de caseína.

Para descartar el efecto del pH, se colocó el sobrenadante a las 14 horas de crecimiento con el pH ajustado a diferentes valores (Figura 20) y se observó que, en todos los casos, con excepción del pH 9, se presentaba este precipitado. Como blanco se colocó en un pozo medio MRS (Oxoid) sin crecimiento, el cual no presentó ningún halo.

Tomando en cuenta que el punto isoeléctrico promedio de la caseína es 4.6, se esperaría que el precipitado se observara a un pH entre 5 y 6, sin embargo, se observa que el halo se reduce a pH más básico.

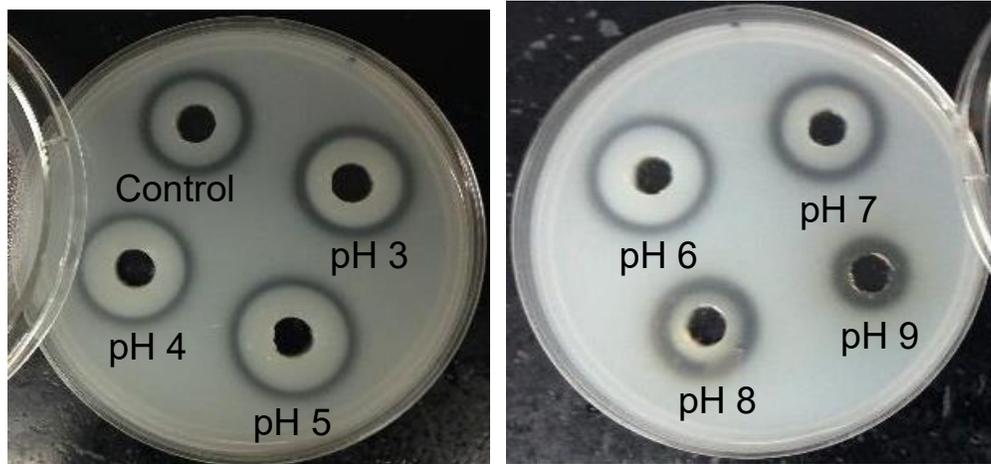


Figura 20. Caja con agar / leche descremada que muestra halos de hidrólisis producido por el sobrenadante de *P. acidilactici* a las 14 horas de crecimiento en medio MRS, ajustado a diferentes valores de pH.

Se realizó de nuevo el experimento, colocando las distintas fracciones celulares de *P. acidilactici* a las 14 h de crecimiento, pero en esta ocasión se registró el avance de la hidrólisis cada dos horas, hasta alcanzar 24 h de observación.

En las imágenes (Figura 21) se observa que el precipitado aumenta conforme avanza el tiempo, lo que nos indica que este color opaco, rodeado de un halo de hidrólisis corresponde al sobrenadante difundiéndose por el agar.

En el medio MRS (Oxoid) se registró una proteasa extracelular de más de 200 KDa, que además se ha reportado en trabajos anteriores por tener una alta actividad proteolítica. Es en esta misma fracción donde se observa el mayor halo de hidrólisis en las cajas Petri con agar / leche descremada.

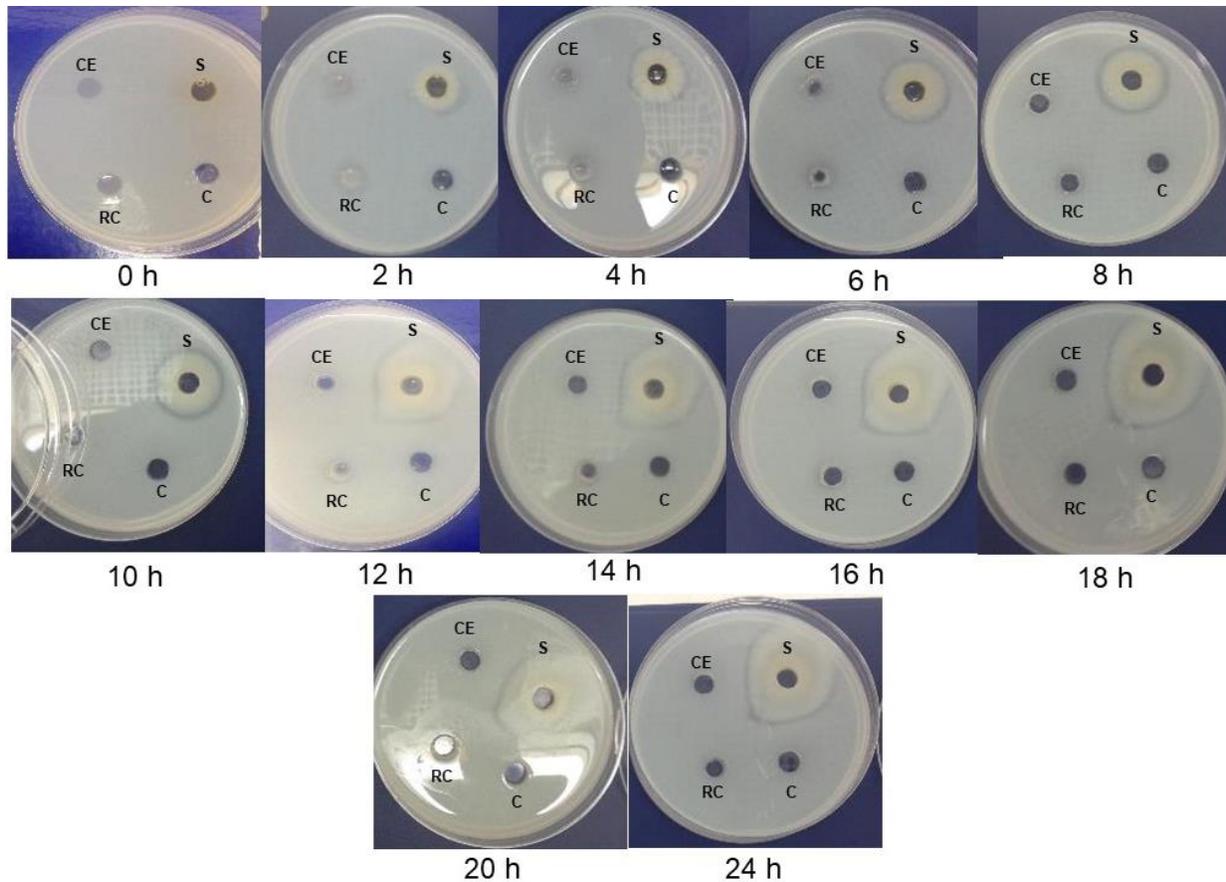


Figura 21. Cajas con agar / leche descremada que muestran halos de hidrólisis producidos por diferentes fracciones celulares de *P. acidilactici* a diferentes horas de crecimiento. CE: Células enteras, RC: Restos celulares, S: Sobrenadante y C: Citosol.

7.6 Actividad proteolítica sobre diferentes sustratos determinada por técnicas espectrofotométricas.

Para evaluar la metodología usada, se determinó la actividad proteolítica con métodos espectrofotométricos de fracciones celulares de *L. casei* contra caseína, hemoglobina, elastina, colágeno y gelatina. Los resultados se presentan comparados con *P. acidilactici* (Figura 22, 23, 24 y 25).

Una vez evaluado el método espectrofotométrico, se procedió a probar la actividad proteolítica de *P. acidilactici* contra distintos sustratos (caseína, gelatina, elastina, colágeno y hemoglobina) de cada una de las fracciones celulares. Dado que cada actividad se determina por la absorbancia a distintas longitudes de onda, no es posible comparar la cantidad de actividad

que resulta entre sustratos. Por lo tanto, como una medida de referencia, las gráficas muestran la actividad de *Pediococcus acidilactici* contra la actividad de *Lactobacillus casei*.

En la Figura 22 se observa la actividad contra caseína de las diferentes fracciones celulares. En todos los casos *L. casei* tiene mayor actividad. Este resultado era previsible, pues la caseína es el sustrato natural de *L. casei*, mientras que *Pediococcus acidilactici* no es conocido por su capacidad de hidrolizar caseína. No obstante su menor actividad, *P. acidilactici* presentó actividad en todas las fracciones, siendo el sobrenadante el que tiene mayor capacidad de hidrólisis. Lo anterior concuerda con lo observado en las cajas con agar / leche descremada y cuya actividad se puede atribuir a la banda de más de 200 kDa que se observó en los geles de gelatina.

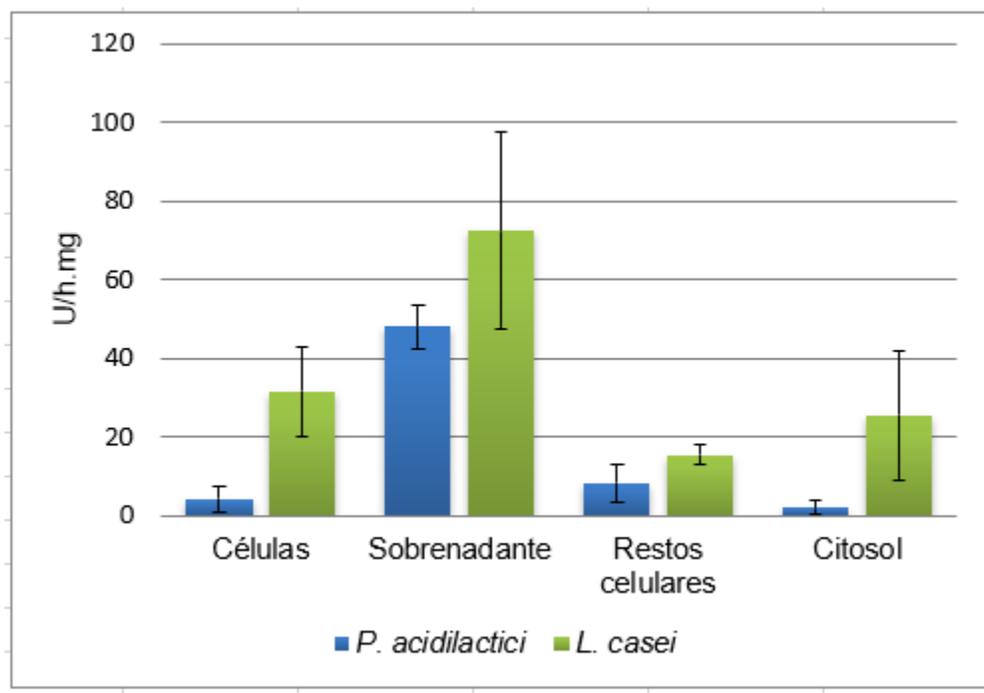


Figura 22. Ensayo espectrofotométrico para determinar la actividad proteolítica contra caseína de *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus casei*. Actividad expresada como U/h.mg proteína.

Para la hemoglobina (Figura 23) de nuevo es *L. casei* el que tiene una mayor actividad proteolítica. La fracción citosólica de *P. acidilactici* presentó alta actividad y el sobrenadante no presentó actividad contra hemoglobina. Este sustrato se utilizó por ser uno de los más reportados para medir actividad de proteasa; aunque no es un sustrato común de las BAL.

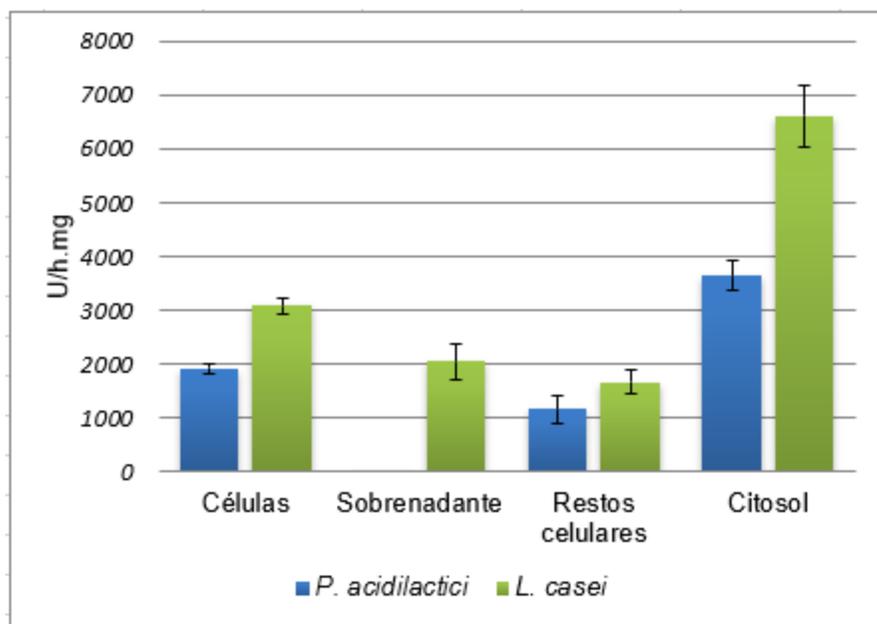
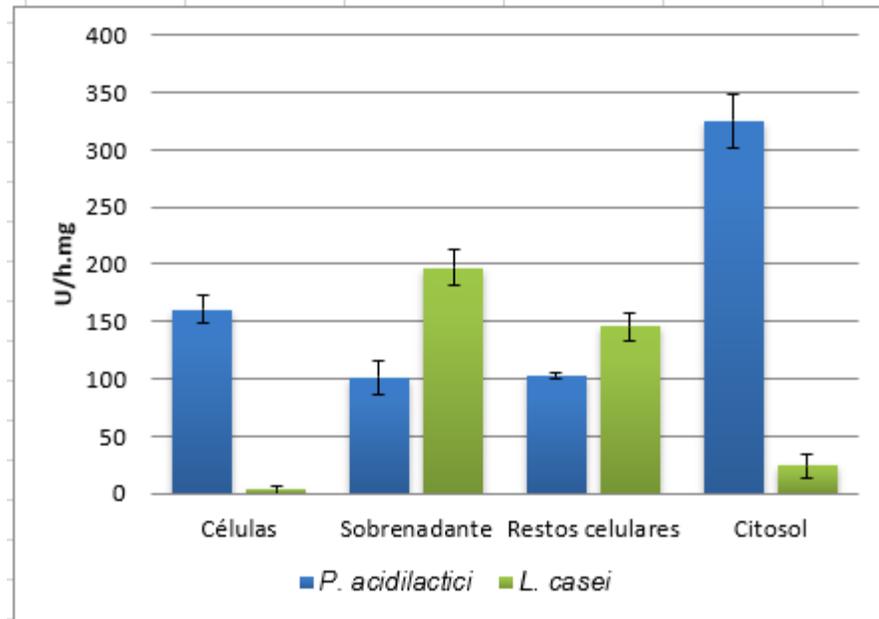


Figura 23. Ensayo espectrofotométrico para determinar la actividad proteolítica contra hemoglobina de *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus casei*. Actividad expresada como U/h.mg proteína.

La determinación contra elastina muestra que todas las fracciones de *Pediococcus* tienen actividad, pero que el citosol es el que tiene mayor capacidad de hidrolizar elastina; mientras que para colágeno la actividad en las fracciones es baja a excepción del citosol (Figura 24). Estos dos sustratos son las proteínas presentes en un producto cárnico, donde podemos encontrar a *P. acidilactici*; y la diferencia entre ellos radica en su composición de aminoácidos: mientras que el colágeno es rico en hidroxiprolina, glicina e hidroxilisina, la elastina es rica en alanina, lisina, glicina, valina y prolina. Otra diferencia importante es el tamaño de ambas moléculas, mientras que el colágeno tiene un peso molecular aproximado de 300 kDa, la elastina pesa aproximadamente 70 kDa.

Con los resultados observados, podemos inferir que las proteasas que produce *Pediococcus acidilactici* ATCC 4082 tienen la capacidad de hidrolizar proteínas de menor tamaño como elastina. Esto concuerda con la evidencia de los eventos de proteólisis en productos cárnicos; en los que las proteínas de mayor tamaño son degradadas con enzimas endógenas de la carne, las cuales generan oligopéptidos que pueden ser utilizados por la microbiota presente y que de otra manera su crecimiento se vería impedido por su incapacidad de degradar a mayor velocidad proteínas grandes.

A



B

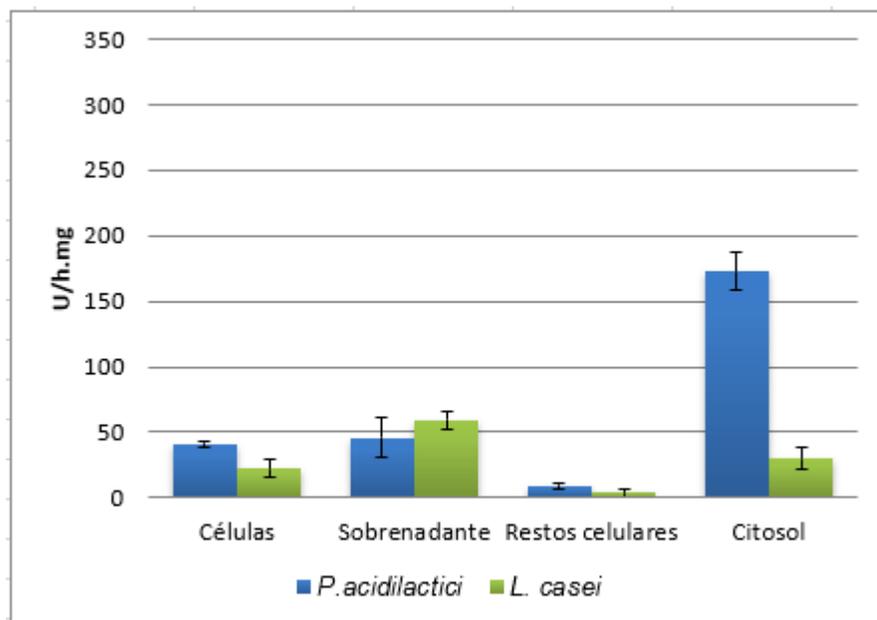


Figura 24. Ensayo espectrofotométrico para determinar la actividad proteolítica contra A) elastina y B) colágeno de *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus casei*. Actividad expresada como U/h.mg proteína.

En la Figura 25 se muestra la actividad de las fracciones contra gelatina. Este es el único sustrato en el que *Pediococcus* muestra mayor actividad que *Lactobacillus*. La fracción celular y la de restos celulares tienen mucho mayor actividad que el citosol y el sobrenadante. Este resultado tiene relación con los zimogramas, en los que las bandas de 100 kDa son las que muestran mayor intensidad y no son tan sensibles al proceso de renaturalización con tritón.

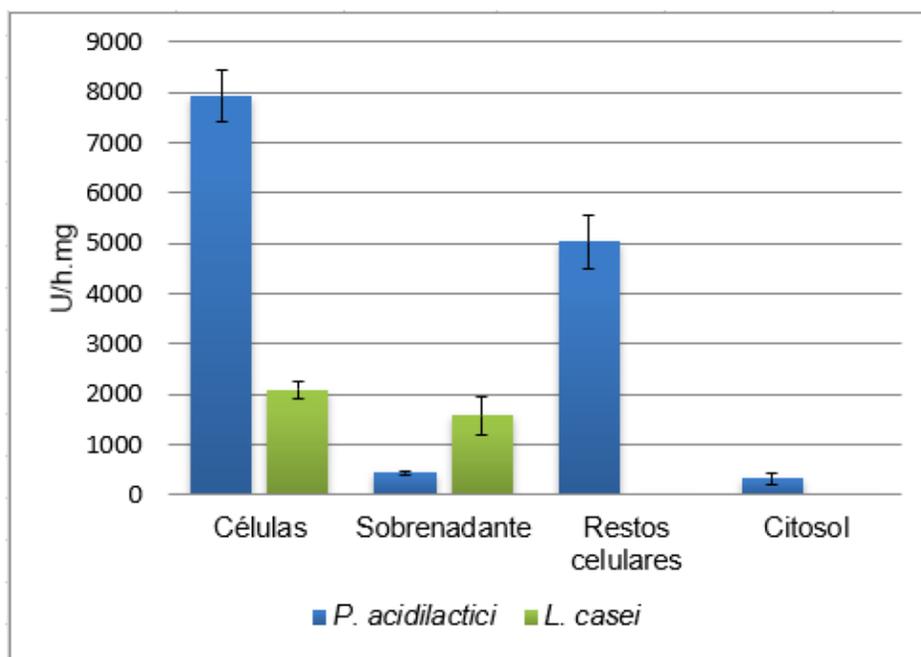


Figura 25. Ensayo espectrofotométrico para determinar la actividad proteolítica contra gelatina de *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus casei*. Actividad expresada como U/h.mg proteína.

7.7 Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Finalmente, una vez evaluadas las técnicas para determinar actividad proteolítica y estandarizadas las condiciones de producción, se pretendió identificar al menos una de las bandas observadas en los perfiles proteínicos y zimogramas.

Al observar que la banda de 100 kDa se observaba en los zimogramas contra caseína y contra gelatina, se decidió mandarla a identificar por espectrometría de masas LC-MS/MS a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química. Sin embargo, el péptido de mayor tamaño no tuvo coincidencias significativas con alguna proteasa reportada.

El péptido de mayor tamaño tuvo un porcentaje de identidad de 9% con una proteína de 48.21 kDa reportada en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 como una proteasa tipo IV con actividad de lisil endopetidasa (Figura 26). Este porcentaje de identidad es muy bajo por lo cual no se puede asegurar que se trate de esta proteína o esté relacionada de alguna manera.

```

1  MHKRTYLNAC  LVLALAAGAS  QALAAPGASE  MAGDVAVLQA  SPASTGHARF  ANPNAAISAA
61  GIHFAAPPAR  RVARAAPLAP  KPGTPLQGVG  GLKTATPEID  LTTLEWIDTP  DGRHTARFPI
121 SAAGAASLRA  AIRLETHSGS  LPDDVLLHFA  GAGKEIFEAS  GKDLVNRPY  WSPVIEGDTL
181 TVELVLPANL  QPGDLRLSVP  QVSYFADSLY  KAGYRDGFGA  SGSCEVDAVC  ATQSGTRAYD
241 NATAAVAKMV  FTSSADGGSY  ICTGTLLNNG  NSPKRQLFWS  AAHCIEDQAT  AATLQTIWFY
301 NTTQCYGDAS  TINQSVTVLT  GGANILHRDA  KRDTLLELK  R  TTPAGVFYQ  GWSATPIANG
361 SLGHDIHHR  GDAKKYSQGN  VSAVGVTYDG  HTALTRVDWP  SAVVEGGSSG  SGLLTVAGDG
421 SYQLRGGLYG  GPSYCGAPTS  QRNDYFSDFS  GVYSQISR  YF  AP

```

Figura 26. Secuencia de la proteasa tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Los péptidos identificados por LC-MS/MS de la banda de 100 kDa con actividad proteolítica producida por *P. acidilactici* se encuentran remarcados.

En un nuevo intento por identificar las bandas de actividad, se corrió un zimograma con mayor cantidad de proteína de las células enteras y de los restos celulares y se mandaron a identificar la banda de 100 kDa y 6 bandas por debajo de este peso molecular (Figura 27).

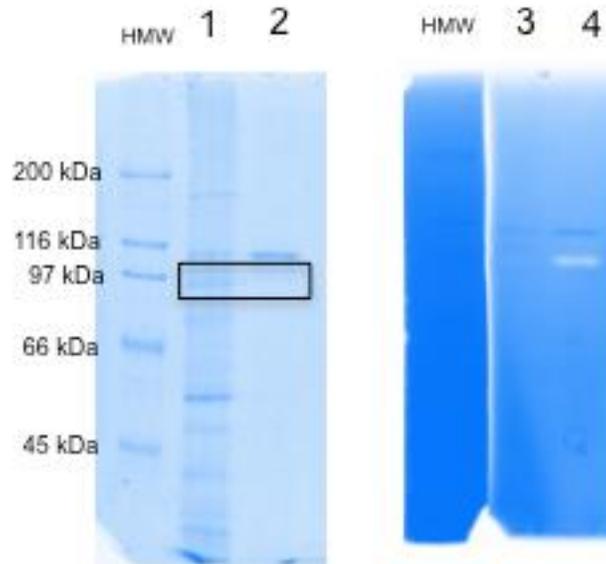


Figura 27. Carril 1 y 2) son el SDS PAGE de la fracción celular y restos celulares de *P. acidilactici*. El Carril 3 y 4) muestran los Zimogramas de actividad caseinolítica de la misma fracción celular y restos celulares de *P. acidilactici*. Dentro del recuadro se observan las 6 bandas por debajo del peso que se mandaron a identificar

Sin embargo, a pesar de esta estrategia, ninguno de los péptidos obtenidos tuvo un porcentaje de identidad significativo con alguna proteína reportada en la base de datos de la NCBI que nos ayudara a identificar la proteína.

Este resultado para obtener la secuencia de la proteasa se puede deber a que el paso de digestión con tripsina probablemente fue muy agresivo y generó péptidos muy pequeños que no son identificables.

Otra posibilidad es que al cortar la banda de proteína en el gel SDS-PAGE, esta no correspondía a la que presentaba la actividad en el zimograma, debido a variaciones en la migración de los geles. A pesar de que se intentó eliminar esta posibilidad al cortar bandas debajo de la de 100 kDa, no se descarta esta posibilidad.

8. CONCLUSIONES.

- Cuando se cultiva *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en medio MRS (Oxoid) a 25 °C por 14 horas, esta produce dos bandas de actividad contra gelatina de 180 kDa y 100 kDa en células enteras, una de 100 kDa en restos celulares, una mayor de 200 kDa en sobrenadante y una de 180 kDa en citosol.
- Se observó que la fuente de nitrógeno usada en el medio de cultivo incide en la producción de enzimas con actividad proteolítica. En particular, la ausencia o presencia de extracto de levadura incidió en la producción de estas enzimas.
- Se evaluaron las técnicas para determinar la actividad proteolítica por medio de zimogramas de gelatina y caseína, así como la actividad caseinolítica en cajas con agar / leche descremada con un conocido microorganismo proteolítico. Dichas metodologías permitieron identificar la presencia de actividad proteolítica, por lo que pueden ser usadas para determinar la actividad en *P. acidilactici* ATCC 8042.
- A las 14 h de crecimiento, el sobrenadante presentó actividad en cajas con agar / leche descremada, mientras que las células enteras y los restos celulares presentaron actividad después de las 36 h.
- Se cuantificó la actividad proteolítica de enzimas producidas por *P. acidilactici* ATCC 8042 sobre caseína, gelatina, elastina, colágeno y hemoglobina. En general, *Pediococcus acidilactici* muestra una actividad proteolítica menor a la de *Lactobacillus casei*; sin embargo, su actividad es significativa y podría participar activamente en la producción de productos cárnicos hidrolizando sustratos que previamente hayan sido objeto de una proteólisis por enzimas endógenas de la carne o por otros microorganismos.
- Se observó que las proteasas producidas tienen una mayor afinidad por sustratos pequeños como la elastina. Su actividad contra colágeno es poca, pero se ve incrementada contra gelatina lo que confirma su capacidad de hidrolizar moléculas de menor tamaño.

9. PERSPECTIVAS.

A partir de los estudios y discusiones presentados en este trabajo, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones:

Ahora que se han definido las condiciones en las que podemos identificar varias bandas de actividad proteolítica en la bacteria, se debe insistir en la identificación de las bandas. Esto nos ayudará a relacionarlas con las proteasas putativas en el genoma de la bacteria y a poder contribuir en la elucidación del sistema proteolítico. En la medida que podamos identificar las proteínas podremos investigar más al respecto de su función en la fermentación de alimentos.

En segundo lugar, se debe profundizar en el efecto de las fuentes de nitrógeno en la producción de enzimas proteolíticas. Para esto es necesario el uso de medios químicamente definidos, de manera que la fuente de nitrógeno, y la composición de aminoácidos que presenta se pueda conocer y así poder definir los factores que influyen en la producción de enzimas con la capacidad de hidrolizar proteínas. En estas condiciones, estudios del proteoma de la bacteria podrían ser de gran ayuda para definir los efectos.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Adler-Nissen J. (1993) Enzymes in food processing. Third edition. Academic Press.
- 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.
- Ammor M. A. y Mayo B. (2007) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausages production: An update. *Meat Science*. 76:138-146.
- Aro J. M., Nyam-Osor P., Truji K., Shimada K., Fukushima M. y Sekikawa M. (2010) The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry*. 119:279-285.
- Balcke J. 1884. Über häufig vorkommende Fehler in der Bierbereitung. *Wochenschrift für Brauerei*. 1:181-1184.
- Baragi V. M., Shaw B. J., Renkiewicz R. R., Kuipers P. J., Welgus H. G., Mathrubutham M., Cohen J. R. y Rao S. K. (2000) A versatile assay for gelatinases using succinylated gelatin. *Matrix Biology*. 19(3):267-273.
- Batt A. C. (2016) Microbiology of fermentations. *Reference module in food science*. 1-2.
- Benito M.J., Rodríguez M., Martín A., Aranda E. y Córdoba J.J. (2004) Effect of the fungal protease EPg222 on the sensory characteristics of dry fermented sausage “salchichón” ripened with commercial starter cultures. *Meat Science*. 67:497-505.
- Benito M.J., Martín A., Aranda E., Pérez-Nevado F., Ruiz-Moyano S. y Córdoba M.G. (2007) Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Journal of Food Science*. 76:193-201.
- Bergmann M. y Ross W. (1936) On proteolytic enzymes. The enzymes of papain and their activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 114:717-726.
- *BD Biosciences. Animal-Origin Peptones: BD Bacto Proteose Peptone*, https://www.bdbiosciences.com/ds/ab/others/Proteose_Peptone_No_2_3_4.pdf, 2020.
- Bhunia B., Basak B., Mandal T., Bhattacharya P. y Dey A. (2013) Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70 kDa). *International Journal of Biological Macromolecules*. 54:1-8.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.

- Bridson E. Y. y Brecker A. (1970) *Methods in Microbiology*. Editorial Norris and Ribons. Vol. 3A. Academic Press, Londres.
- Burgain J., Scher J., Francius G., Borges F., Corgneau M., Revol-Junelles A. M., Cailliez-Grimal C. y Gaiani C. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*. 213: 21-35.
- Candogan K., Kartika S., Wardlaw B. F. y Acton J. C. (2008). Type of bacterial starter culture, aging and fermentation effects on some characteristics of inoculated beef sausages. *European Food Research and Technology*. 227:1651-1661.
- Candogan K., Wardlaw F. B. y Acton J. C. (2009). Effect of starter culture on proteolytic changes during processing of fermented beef sausages. *Food Chemistry*. 116:731-737.
- Caplice E. y Fitzgerald G. (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50:131-149.
- Capra M. L., Tibaldo M. M., Vinderola G., Reinhemier J. A. y Quiberoni A. (2014) Technological and probiotic characterization of *Lactobacillus casei* / *paracasei* strains and their phage-resistant mutants. *International Dairy Journal*. 37:1 39-47.
- Casales-Cabrera G. X. (2012) Localización y caracterización de la actividad proteolítica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, Ciudad de México.
- 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, Ciudad de México.
- Carr F. J., Chill D. y Maida N. (2002) The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28:281-370.
- Chan L., Bai J., Cai Z. y Ouyang F. (2002) Optimization of a culture medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of biotechnology*. 83:27-34.
- Dalié D. K. D., Deschamps A. M. y Richard-Forget F. (2010) Lactic acid bacteria- Potencial for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*. 21:370-380.
- Doeven M. K., Kok J. y Poolman B. (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*. 57:640–649.
- Erez E., Fass D. y Bibi E. (2009) How intermembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*. 459:371-378.

- Fernandes R. (2009) Microbiology handbook: Meat Products. Ed. RSC Publishing. pp 150-151.
- Gonzales T. y Robert-Baudouy J. (1996) Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiology Reviews*. 18(3):19-344.
- Granados-Pérez E. A. (2009) Caracterización de la actividad proteolítica extracelular de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM, Ciudad de México.
- Hedstrom L. (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*. 102(12):4501-4523.
- Holland R., Crow V. y Curry B. (2011) Lactic acid bacteria / *Pediococcus spp.* *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd Edition. pp 149-152.
- Holt J. G., Noel R., Krieg P., Sneath H. A., Stanley J. T. y Williams T. (1999) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. Lippincott Williams. 9th Edition.
- Hosseini M. N., Altaf H. M. y Lorraine B. M. (2015) Stress responses in probiotic *Lactobacillus casei*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55(6):740-749.
- Kessler E., Safrin M., Abrams W.R., Rosenbloom J., Ohman D.E. (1997) Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *Journal of Biological Chemistry*. 272(15):9884-9889.
- Kezban C., Suhendra K., Wardlaw F. B. y Acton J. C. (2008) Type of bacterial starter culture, aging and fermentation effects on some characteristics of inoculated beef sausages. *European Food Research and Technology*. 221:1651-1661.
- Kunitz M. (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *Journal of General Physiology*. 30(4):291-310.
- Lantz M. S. y Ciborowski P. (1994) Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods in Enzymology*. 235:563-94.
- Leroi F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*. 27:698-709.
- 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.
- Leroy F., Verluyten J. y De Vuyst L. (2006) Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 106:270-285.
- Mandal V., Sen S.K. y Mandal N.C. (2011) Isolation and characterization of pediocin NV 5 producing *Pediococcus acidilactici* LAB 5 from Vacuum-Packed Fermented Meat Product. *Indian Journal of Microbiology*, 51(1):22-29.

- Mazzoli R., Bosco F., Mizrahi I., Bayer e. A. y Pessione E. (2014) Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnol Adv.* 32(14):1216-1236.
- McKay L. L. y Baldwin K. A. (1990) Application for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 87:3-14.
- Mengjin L., Jumamurat B., Bernadet R., Arjen N. y Roland S. (2010) The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics.* 11(36):1-15.
- Muñoz-Tamayo R., Groot J., Bakx E., Wierenga P., Gruppen H., Zwietering M. y Sijtsma L. (2011) Hydrolysis of β -Casein by the cell-envelope-located PI-type protease of *Lactococcus lactis*: A modelling approach. *International Dairy Journal.* 21:755-762.
- Ojha K. S., Perry J. P., Duffy G., Beresford T. y Tiwari B. K. (2015) Technological advances for enhancing quality and safety of fermented meat products. *Trends in Food Science & Technology.* 44:105-116.
- Oxoid Microbiology Products. *Dehydrated Culture Media: MRS agar*, http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0361&org=82&c=UK&lang=EN, 2019.
- Pastar I., Tonic I., Golic N., Kojic M., van Kranenburg R., Kleerebezem M., Topisirovic L. y Jovanovic G. (2001) Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Applied and Environmental Microbiology.*69(10):5802-5811.
- Ravyts F., De Vust L. y Leroy F. (2012) Bacterial diversity and functionalities in food fermentations: A review. *Engineering in Life Sciences.* 4:356-367.
- Reis J. A., Paula A.T., Casarotti S.N. y Penna A. L. B. (2012) Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. *Food Engineering Reviews.* 4:124-140.
- Rinderknecht H., Geokas M. C., Silverman P. y Haverback B. J. (1968) A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clinica Chimica Acta.* 21(2):197-203.
- Salminen S., Von Wright A. y Ouwehand A. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. 3rd edition. Marcel Dekker. pp 19,20, 22-24, 37,38,389-395.
- Sánchez-Clemente R., Igeño M. I., Población a. G., Guijo M.I., Merchán F. y Blasco R. (2018) Study of pH Changes in Media during Bacterial Growth of Severla Environmental Strains. *Proceedings – Open access journal.* 2:1297.
- Savijoki K., Ingmer H. y Varmanen P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 71:394-406.

- Sepahy A. y Jabalameli L. (2011) Effect of culture conditions on the production of an extracellular protease by *Bacillus sp.* isolated from soil sample of Avizan Jungle Park. *Enzyme Research*. 2011: 219628.
- Sigma-Aldrich Products - 09182 - Yeast Extract, https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/09182?lang=es®ion=MX&cm_sp=Insite-caRecBlock_recBlock_gruCrossEntropy--recBlock5-4, 2020.
- Stankhe L. (1999) Volatiles produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausage minces Part I: Collection and identification. *Meat Science*. 32:357-364
- Sumantha A., Larroche C. y Pandley A. (2006) Microbiology and industrial biotechnology of food grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology*. 44:211-220.
- Tafti G. A., Peighamardoust D. H. y Hejazi M. A. (2013) Biochemical characterization and technological properties of predominant *Lactobacilli* isolated from East-Azarbaijan sourdoughs (Iran). *International Food Research Journal*. 20(6):3293-3298.
- Tavano O. L. (2013) Protein hydrolysis using proteases: An important tool for biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic*. 90:1-11.
- Varela H., Ferrari M. D., Belobrajdic L., Weyrauch R. y Loperena L. (1996) Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. *World J Microbiol Biotechnol*. 12(6):643-645.
- Van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D. y Maguin E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82:187-216.
- Vafopoulou-Mastrojiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E. y Tzanetakis S. (1994) Proteinase, peptidase and esterase activity of crude cell-free extracts of *Pediococcus pentosaceus* isolated from cheese. *LWT-Food Science and Technology*. 27(4):342-346.
- Vendramín A. S. (2012). Caracterización del sistema proteolítico de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.
- Yousef A. E. y Juneja V.J. (2003) Microbial stress adaptation and food safety. *CRC Press*, pp. 3-6.
- Yu N.Y., Wagner J. R., Laird M. R., Melli G., Rey S., Lo R., Dao P., Sahinalp S.C., Ester M., Foster L. J. y Brinkman F. S. L. (2010) PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes, *Bioinformatics*. 26:1608-1615.