



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Efecto de la composición del medio de cultivo en la  
producción de peptidoglucano hidrolasas y proteasas  
secretadas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042**

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

**PRESENTA  
MAYRA ALBARRÁN CORTÉS**



**Ciudad Universitaria, CDMX.**

**AÑO 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Profesora: **Amelia Farrés González-Saravia**

**VOCAL:** Profesora: **Sandra Pérez Munguía**

**SECRETARIO:** Profesora: **Gloria Díaz Ruiz**

**1er. SUPLENTE:** Profesor: **Euclides Ávila Chávez**

**2do. SUPLENTE:** Profesor: **Miquel Gimeno Seco**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

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

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

**M. en C. Sandra Pérez Munguía**

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Dra. Amelia Farrés González-Saravia**

## **SUSTENTANTE:**

---

**Mayra Albarrán Cortés**

## INDICE DE CONTENIDO

## página

Índice de cuadros	v
Índice de figuras	vi
Lista de términos abreviados y símbolos	viii
Resumen	ix
Antecedentes	xi
Justificación	xii
Hipótesis	xiv
Objetivo General	xiv
Objetivos Particulares	xiv
1. Marco teórico	1
1.1. Bioconservación	1
1.1.1. Bacterias ácido-lácticas	2
1.1.1.1. Aspectos generales	2
1.1.1.2. Efecto antagónico de las BAL	3
1.2. <i>Pediococcus</i>	3
1.2.1. Características generales	3
1.3. Medio de cultivo De Man, Rogosa y Sharpe	5
1.4. Producción de peptidoglucano hidrolasas y proteasas de interés biotecnológico	8
1.4.1. Peptidoglucano hidrolasas	8
1.4.2. Proteasas	11
2. Metodología	14
2.1. Materiales y métodos	15
2.1.1. Reactivos y estándares	15
2.1.2. Medios de cultivo	15
2.1.3. Material biológico	15
2.1.4. Caracterización de la cepa	16
2.2. Preparación del medio de cultivo, inóculo y fermentación de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	16

2.2.1. Preparación del medio de cultivo	16
2.2.2. Activación de la cepa	16
2.2.3. Preparación del inóculo	17
2.2.4. Fermentación	17
2.2.5. Obtención del sobrenadante de cultivo	17
2.2.5.1. Cuantificación de los azúcares reductores	17
2.2.5.2. Cuantificación de los azúcares totales	17
2.2.5.3. Cuantificación de proteína soluble	18
2.2.5.4. Concentración de las proteínas por ultrafiltración	18
2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y zimografía	18
2.3.1. Preparación de la muestra	18
2.3.2. Preparación de geles de poliacrilamida	18
2.3.3. SDS-PAGE	19
2.3.4. Detección de la actividad lítica y proteolítica por zimografía	19
2.3.5. Detección de actividad proteolítica y lítica mediante difusión en agar	20
3. Resultados y análisis de resultados	22
4. Conclusiones	48
5. Perspectivas	50
6. Bibliografía	51
Apéndice A. Determinación de carbohidratos reductores por DNS	56
Apéndice B. Determinación de proteína soluble por Lowry	58
Apéndice C. Determinación de la actividad de la tripsina mediante la técnica de difusión en agar	59
Apéndice D. Actividad de la lisozima sobre <i>M. lysodeikticus</i> mediante la técnica de difusión en agar	61

<b>Índice de Cuadros</b>	<b>página</b>
Cuadro 1.1. Medio mínimo para <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	5
Cuadro 1.2. Composición química del caldo MRS original y comercial	7
Cuadro 2.1. Formulación del gel concentrador y del gel separador para SDS-PAGE y zimografía	19
Cuadro 3.1. Fermentación de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 en MRS <sub>Sac</sub>	23
Cuadro 3.2. Fermentación de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 en MRS <sub>Glu</sub>	23
Cuadro 3.3. Composición de los medios de cultivo reformulados (MRFs) y resultados de las fermentaciones	30
Cuadro 3.4. Efecto de la composición del medio de cultivo en la fermentación de <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	34
Cuadro 3.5. Fermentación de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 en MRS <sub>Mod</sub>	42
Cuadro C1. Actividad de la tripsina sobre caseinato de calcio por difusión en agar en pozo	59
Cuadro C2. Actividad de la tripsina sobre caseinato de calcio por difusión en agar en disco	59
Cuadro D1. Actividad de la lisozima sobre células de <i>M. lysodeikticus</i> ATCC 4698 por difusión en agar	61

<b>Índice de Figuras</b>	<b>página</b>
Figura 1.1. Representación de la topografía de la pared celular de <i>S. aureus</i>	9
Figura 1.2. Localización de los enlaces que hidrolizan las peptidoglucano hidrolasas en la pared de la célula bacteriana	11
Figura 2.1. Diagrama general de la estrategia experimental	14
Figura 2.2. Distribución de los pozos en la caja de Petri para el ensayo de la actividad enzimática	21
Figura 3.1. Pureza del cultivo de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	22
Figura 3.2. Zimografía sobre células de <i>M. lysodeikticus</i> ATCC 4698	24
Figura 3.3. Actividad lítica de los sobrenadantes de cultivo	25
Figura 3.4. Perfil proteínico y actividad proteolítica de los sobrenadantes de cultivo semipurificados de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	27
Figura 3.5. Efecto de la fuente de nitrógeno en la fermentación de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 y en la actividad enzimática extracelular	30
Figura 3.6. Comparación de color de los medios de cultivo formulados en el laboratorio y comerciales, y sus barridos espectrales correspondientes	37
Figura 3.7. Efecto del tipo de peptona sobre la actividad extracelular de los sobrenadantes de cultivo de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 en MRS <sub>Mod</sub>	38
Figura 3.8. Comparación de la actividad proteolítica sobre caseína de los sobrenadantes de cultivo	41
Figura 3.9. Curva de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 en medio MRS <sub>Mod</sub> bajo condiciones estáticas a 30 °C	43
Figura 3.10. Actividad enzimática extracelular de la curva de	

crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 en MRS <sub>Mod</sub> por zimografía	44
Figura 3.11. Evaluación de la pureza del cultivo <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 a las 35 h de fermentación	45
Figura 3.12. Perfil proteínico de la curva de crecimiento de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 en MRS <sub>Mod</sub>	46
Figura A1. Recta de calibración de glucosa	56
Figura B1. Recta de calibración de albúmina sérico bovina (BSA)	58
Figura C1. Actividad de la tripsina sobre caseinato por difusión en agar	60
Figura D1. Actividad de la lisozima sobre células liofilizadas de <i>M. lysodeikticus</i> ATCC 4698 por difusión en agar	62

## Lista de términos abreviados y símbolos

Ala	alanina
Asx	ácido aspártico o asparagina
BAL	bacterias ácido-lácticas
BP	bacto peptona
BSA	albúmina sérica bovina, por sus siglas en inglés
m-DAP	ácido meso-diaminopimélico
DNS	ácido dinitrosalicílico, por sus siglas en inglés
D.O.	densidad óptica
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
Glu	ácido glutámico
Gly	glicina
GRAS	generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés
LD	límite de detección
Lys	lisina
MRF	medio de cultivo MRS reformulado
MRS	medio de cultivo De Man, Rogosa y Sharpe
MRS <sub>Mod</sub>	medio de cultivo MRS modificado
MW	peso molecular, por sus siglas en inglés
MWCO	corte de peso molecular, por sus siglas en inglés
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	ácido N-acetilmurámico
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida, por sus siglas en inglés
PG	peptidoglucano
PGH	peptidoglucano hidrolasa
PP	proteosa peptona
PS	perfil secundario de lisis
SDS	dodecil sulfato de sodio, por sus siglas en inglés
Ser	serina
SN	sobrenadante de cultivo
TCA	ácido tricloroacético, por sus siglas en inglés
Tris-base	tris (hidroximetil) aminometano
<i>Triton X-100</i>	polietilenglicol <i>ter</i> -octilfenil éter
<i>Tween 80</i>	mono oleato de polioxietilen sorbitán
UF	ultrafiltración
% T	contenido de acrilamida y bisacrilamida
% C	contenido de bisacrilamida
MΩ	megaohmio

## Resumen

El grupo de trabajo ha demostrado que *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 utilizado como iniciador y sus sobrenadantes de cultivo ejercieron un efecto de bioconservación en embutidos cárnicos tipo salami. Se detectó actividad peptidoglucano hidrolasa (PGH) y no pediocinas como responsables de este fenómeno. Adicionalmente, se ha reportado la producción de proteasas en el caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) que pueden degradar las proteínas de la leche y en el que también se ha detectado la actividad PGH. Por lo anterior, se modificó la composición del medio MRS para estudiar el efecto de la fuente de carbono y de nitrógeno en la producción de proteasas y PGHs secretadas por *P. acidilactici* ATCC 8042.

En una primera etapa se realizó la comparación de los medios formulados con glucosa y sacarosa bajo las mismas condiciones de cultivo de la cepa empleadas en estudios anteriores. Se determinó el crecimiento del microorganismo, el pH, la concentración de carbohidratos, la concentración de proteína y la actividad enzimática extracelular mediante zimografía y difusión en agar, a un determinado tiempo de fermentación. Posteriormente, se evaluó el contenido y tipo de la fuente de nitrógeno, así como la concentración del extracto de levadura y el extracto de carne, sobre el crecimiento de la bacteria y actividad enzimática, tanto lítica como proteolítica. Finalmente, se seleccionó la formulación para obtener la curva de crecimiento de la cepa y poder establecer el tiempo de producción de las enzimas secretadas por la cepa.

La actividad PGH de los sobrenadantes de cultivo se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) empleando células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, como sustrato estándar. Se encontró que la hidrólisis de la pared celular fue independiente de la fuente de carbono (glucosa o sacarosa), del hidrolizado de proteína (bactopeptona o proteosa peptona) y de la adición o no de detergente (*Tween* 80). Se detectaron

3 bandas líticas con un peso molecular promedio de 30 kDa, 77 kDa y 140 kDa, que fueron estables al calor. Varias bandas adicionales fueron detectadas en un intervalo de peso molecular de entre 45 kDa a 83 kDa después de 60 h de renaturalización o cuando se concentraron los sobrenadantes por ultrafiltración. Sin embargo, sólo la PGH de 30 kDa mostró actividad sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 13565. Se detectó una proteasa de aproximadamente 25 kDa con actividad caseinolítica cuando el medio se formuló con proteosa peptona y otra de 18 kDa con bactopectona. No se detectó actividad proteolítica cuando se sustituyó la glucosa del medio MRS por sacarosa ni se detectó el perfil secundario de bandas líticas.

Con la reducción de hasta un 50 % de los principales componentes del medio (MRS<sub>Mod</sub>), con respecto a la formulación del medio comercial, se alcanzó una menor densidad celular, pero fue adecuada para detectar tanto la actividad lítica como la proteolítica con una significativa disminución del color de los sobrenadantes de cultivo. La menor producción de pigmentos vía reacción de Maillard fue importante dada su reconocida actividad antimicrobiana.

Se detectaron las tres PGHs en la fase exponencial de la curva de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 en el MRS<sub>Mod</sub>: las bandas de 77 kDa y de 30 kDa, a las 4 h de cultivo, y la de 140 kDa hasta las 7 horas de cultivo. La proteasa de 25 kDa fue detectada en la fase exponencial tardía del crecimiento que correspondió a las 10 h de fermentación con el consumo del 50 % de glucosa y un valor de pH 4.5. Después de que el microorganismo alcanzó su máximo crecimiento, no se observaron cambios morfológicos de las células por microscopía óptica y fueron cultivables agar MRS (Difco) al final de la curva de crecimiento (35 h).

El perfil secundario de lisis podría potencializar la actividad bacteriolítica de la cepa ante la falta de nutrientes u otras condiciones desfavorables. La degradación de las PGHs por proteasas puede contribuir con las bandas de bajo peso molecular, que retienen actividad lítica, observadas en los zimogramas con *S. aureus*.

## Antecedentes

*Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 es una bacteria ácido láctica (BAL) que, además de ser un cultivo iniciador, posee actividad antimicrobiana: dos enzimas líticas, localizadas en la fracción de proteínas adheridas a la membrana celular, de 99 kDa y 110 kDa por SDS-PAGE, inhibieron el crecimiento de *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* (García Cano y col., 2011). Se reportó la banda de 110 kDa como transportador tipo ABC (Matamoros, 2013), pero recientemente se le redefinió como una muramidasa de amplio espectro antimicrobiano (Barbosa, 2018). En la fracción semipurificada de los sobrenadantes de cultivo se detectaron dos PGHs de 110 kDa y 80 kDa, pero la mayor actividad observada sobre *S. aureus* y *L. monocytogenes* correspondió a bandas líticas de bajo peso molecular (Corona, 2018).

Se detectaron dos proteasas extracelulares, una termoestable de >250 kDa y una gelatinasa sensible al calor de aproximadamente 107 kDa, en la fase exponencial de la curva de crecimiento de la cepa en el caldo MRS formulado en el laboratorio con sacarosa (Llorente y col., 2008). Posteriormente, al evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de proteasas se encontró un desarrollo limitado de la cepa, posiblemente porque fue sometida a un estado de estrés por la restricción de nutrientes. Sin embargo, cuando se empleó el MRS comercial se detectó una gelatinasa de 200 kDa y actividad caseinolítica en el sobrenadante de cultivo por difusión en agar (Contreras, 2020).

*P. acidilactici* ATCC 8042 produce dos enzimas extracelulares, peptidoglucano hidrolasa y proteasa, a las que se les considera responsables del efecto antibacteriano de los sobrenadantes de cultivo provenientes de MRS modificado. Sin embargo, hasta ahora no se ha logrado identificar por secuenciación a ninguna enzima extracelular producida ni se conoce el efecto de la actividad proteolítica sobre la actividad antimicrobiana observada.

## Justificación

Las PGHs hidrolizan enlaces específicos del peptidoglucano, considerado el talón de Aquiles de la mayoría de las bacterias dada su naturaleza conservada, esencial y accesible (Russell y col., 2011). Las PGHs al igual que las bacteriocinas se han propuesto como sustitutos potenciales de compuestos antimicrobianos en la industria de alimentos. Como posibles bioconservadores, las PGHs extracelulares producidas por las BAL son más importantes que las localizadas en la membrana o intracelulares, porque pueden ser producidas en el alimento durante la fermentación o se pueden emplear los extractos crudos concentrados o en su forma pura.

La secuenciación del genoma de *P. acidilactici* ATCC 8042 reveló que es una bacteria potencialmente autolítica (Cho y col., 2019). La actividad autolítica está ampliamente distribuida en las BAL y la tasa de autólisis depende de la cepa, por lo que su expresión o actividad debe estar estrictamente regulada. Uno de los mecanismos de regulación de la actividad autolítica es mediante la proteólisis de las PGHs (Holtje, 1995). Aunque está reportado que *Pediococcus acidilactici* posee proteasas, dipeptidasas y aminopeptidasas intracelulares (Bhowmik y Marth, 1990), a la fecha hay pocos estudios sobre la actividad proteolítica, no obstante que el genoma de esta especie revela al menos 60 peptidasas y proteasas que aún no han sido bioquímicamente caracterizadas (Attri y col., 2018).

Una menor actividad proteolítica de *Lactobacillus* (Ledesma y col., 1977; Hebert y col., 2000) y la menor producción de compuestos antimicrobianos producidos por *Enterococcus faecium* en caldo MRS (Schirru y col., 2013), medio rico en aminoácidos y péptidos, resalta la necesidad de restringir el contenido de glucosa y aminoácidos en la formulación del medio por su efecto represor en la síntesis de proteasas y bacteriocinas.

Un medio de cultivo óptimo para la producción de proteasas permitiría establecer su posible relación con la actividad lítica observada. Este estudio aportará conocimiento a los sistemas proteolíticos de las BAL, por su importante contribución en la generación de sabores y aromas y en la textura de los productos cárnicos fermentados.

## **Hipótesis**

La modificación en la formulación del medio de cultivo MRS afectará a la producción de las enzimas secretadas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

## **Objetivo General**

Modificar la composición del medio MRS para estudiar el efecto de la fuente de carbono y de nitrógeno en la producción de proteasas y peptidoglucano hidrolasas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

## **Objetivos Particulares**

- Evaluar el efecto de los hidrolizados de proteína, proteosa peptona y bacto peptona, sobre el crecimiento y producción de proteasas y peptidoglucano hidrolasas extracelulares.
- Obtener la fracción proteínica de los sobrenadantes de cultivo de la cepa para caracterizar sus perfiles proteínicos por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
- Detectar la actividad proteolítica y lítica mediante electroforesis en gel y por difusión en agar.
- Modificar la composición del medio de cultivo para incrementar la producción de las enzimas extracelulares.
- Obtener la curva de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en el medio MRS optimizado para conocer el tiempo de producción de las proteínas con actividad enzimática extracelular.

## **1. Marco Teórico**

### **1.1. Bioconservación**

La conservación de los alimentos utilizando su microbiota natural o controlada y/o sus productos antibacterianos se ha denominado bioconservación, para diferenciarlo de la conservación empleando compuestos químicos (Stiles, 1996). Las BAL pueden ejercer un efecto bioprotector o inhibidor contra otros microorganismos como resultado de un crecimiento competitivo, con lo que también se busca extender la vida útil e incrementar la seguridad sanitaria de los alimentos (Stiles, 1996; Vignolo y col., 2008).

Las BAL son cultivos bioprotectores por excelencia: forman parte de la microflora endógena, se han utilizado para la producción de alimentos fermentados que durante cientos de años han formado parte de la dieta, no existe ninguna indicación de que representen un riesgo para la salud del consumidor y dominan naturalmente la microbiota de muchos alimentos durante su almacenamiento (Stiles, 1996). La mayoría de las BAL poseen el estatus GRAS por la FDA de Estados Unidos. Por su parte, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha otorgado la Presunción Calificada de Seguridad a 44 cepas (Koutsoumanis y col., 2021).

Los alimentos fermentados son aquellos obtenidos a través del crecimiento microbiano y conversiones enzimáticas de sus componentes. Aunque puedan estar presentes enzimas de plantas, animales u otras fuentes, su actividad es insuficiente para que el alimento o bebida pueda ser considerado fermentado (Marco y col., 2021). A nivel industrial la producción de alimentos fermentados está basado en el uso de cultivos iniciadores, siendo su principal función la rápida acidificación de la materia prima.

Un proceso de fermentación controlado ofrece ventajas organolépticas, tecnológicas, nutricionales y de promoción de la salud (Leroy y De Vuyst, 2004; Bintsis, 2018). La actividad metabólica deseada y la acción antimicrobiana

establecen la distinción entre los cultivos iniciadores y los cultivos bioprotectores, respectivamente (Vignolo y col., 2008).

### **1.1.1. Bacterias ácido-lácticas**

#### **1.1.1.1. Aspectos generales**

Las BAL son un importante grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza que reúnen características fisiológicas, morfológicas y metabólicas similares. En términos generales, son cocos o bacilos Gram-positivo, con bajo contenido de guanina y citosina (G + C), no producen esporas ni son móviles, oxidasa, catalasa y bencidina negativos, ácido y aire tolerantes, carecen de citocromos y producen ácido láctico como único o principal producto de su metabolismo (Stiles y Holzapfel, 1997; Carr y col., 2002; Khalid, 2011, Bintsis, 2018).

Este grupo está constituido por 6 familias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*. La clasificación más reciente incluye 40 géneros, siendo los más importantes: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*. Además de los mencionados predominan: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Sauer y col., 2017).

Las BAL utilizan dos vías metabólicas para la producción de energía: (1) mediante glucólisis (o vía Embden-Meyerhof-Parnas) producen casi exclusivamente ácido láctico como producto final y (2) la vía del 6-fosfogluconato (o pentosa fosfocetolasa o la derivación de hexosa monofosfato) generando cantidades equimolares de dióxido de carbono, ácido acético o etanol, además del ácido láctico (Kandler, 1983).

### **1.1.1.2. Efecto antagónico de las BAL**

La capacidad antimicrobiana es una característica deseable en las BAL. La actividad antagonista contra bacterias puede ser causada por exclusión competitiva, modulación inmunitaria, estimulación de los sistemas de defensa del huésped, producción de moléculas de señalización que desencadenan cambios en la expresión génica, así como la producción de compuestos antimicrobianos (Mozzi y col., 2015).

Los ácidos láctico y acético son los principales compuestos antimicrobianos producidos por las BAL. La acidificación del medio evita o reduce el crecimiento de otros grupos de microorganismos responsables del deterioro de alimentos, así como de algunos de los principales patógenos. Algunas BAL producen peróxido de hidrógeno, diacetilo y reuterina. Los dipéptidos cíclicos (dicetopiperazinas), 3-fenil lactato e hidroxi derivados de los ácidos grasos son reconocidos antifúngicos (Leroy y De Vuyst, 2004; Stoyanova y col., 2012). Las bacteriocinas, sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (BLIS, por sus siglas en inglés) y las enzimas que pueden degradar su propia pared celular, y la de otros microorganismos, son antimicrobianos de naturaleza proteínica.

## **1.2. *Pediococcus***

### **1.2.1. Características generales**

*Lactobacillus* y *Pediococcus* pertenecen a la familia *Lactobacillaceae*, si bien de los bacilos se cuenta con un importante registro en investigación básica, aplicación en alimentos fermentados y como probióticos, algunas especies de ambos géneros muestran una importante tolerancia al etanol (12 %), al cloruro de sodio (10 %) y pueden desarrollarse a  $\text{pH} \leq 4.5$ , en un amplio intervalo de temperatura (de 10 °C a 45 °C). Todas estas características deseables para su aplicación biotecnológica (Bosma y col., 2017).

Los miembros del género *Pediococcus* se describen como cocos que crecen en un plano y se dividen en ángulos rectos para formar tétradas. Las especies son genéticamente diversas, sus células son redondas (de 0.6 µm a 1.0 µm), no móviles, homofermentativos y anaerobios facultativos. Sus colonias, lisas, redondas y de color blanco-grisáceo, varían de 1.0 mm a 2.5mm de diámetro (Raccach, 2014).

Se conocen 12 especies del género: *P. acidilactici*, *P. argentinus*, *P. cellicola*, *P. clausenii*, *P. damnosus*, *P. etanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. siamensis*, *P. lolii* y *P. stilesii*. Fermentan los carbohidratos por la vía glucolítica y producen DL-lactato sin la producción de dióxido de carbono excepto *P. clausenii*. Son catalasa y oxidasa negativo, pero algunas cepas de *P. pentosaceus* pueden mostrar actividad pseudocatalasa, especialmente cuando el medio contiene bajo contenido de carbohidratos. Todas las especies pueden fermentar a la fructosa y a la celobiosa. La maltosa es fermentada por todas las especies excepto *P. acidilactici*, *P. clausenii*, *P. lolii*, *P. siamensis* y *P. parvulus*. La sacarosa no es fermentada por *P. clausenii*, *P. lolii*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. siamensis* y *P. stilesii*, siendo variable la utilización de la lactosa (Dicks y Endo, 2014).

*Pediococcus* requiere fuentes complejas de nitrógeno para crecer, por lo que no puede utilizar sales de amonio como única fuente de nitrógeno ni reducir los nitratos a nitritos (Carr y col., 2002; Franz y col., 2014). Requieren de vitamina B<sub>12</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, biotina, metionina y lisina, así como magnesio, calcio, zinc y manganeso (Raccach, 2014). Particularmente *Pediococcus acidilactici*, el principal cultivo iniciador empleado en productos cárnicos, crece en forma óptima a 30 °C, con un máximo tolerable a 50 °C (Bosma y col., 2017). De acuerdo con Deguchi y Morishita (1992), la cepa ATCC 8042 es auxótrofa en 16 aminoácidos, 5 vitaminas, uracilo y xantina (Cuadro 1.1.).

**Cuadro 1.1.**Medio mínimo para *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

nutriente	g/L	nutriente	g/L	nutriente	g/L
D-glucosa	20	L-aspartato	0.2	L-serina	0.1
acetato de sodio	10	L-asparagina		L-tirosina	0.1
citrato de sodio	10	L-cisteína		L-valina	0.1
cloruro de amonio	3	ácido L-glutámico	0.2	tiamina	
citrato de amonio		glicina	0.1	riboflavina	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	L-histidina	0.1	piridoxal	0.01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	L-iso-leucina	0.1	ácido D-pantoténico	0.001
NaCl	0.0	L-leucina	0.1	ácido nicotínico	0.001
	1			ácido fólico	
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.5	L-lisina	0.1	ácido <i>p</i> -aminobenzoico	0.0002
MnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.0	L-metionina	0.1		
	5			D-biotina	0.0000
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.0	L-fenilalanina	0.1		1
	2			adenina	
<i>Tween</i> 80		L-prolina	0.1	uracil	0.01
L-alanina		L-treonina	0.1	xantina	0.01
L-arginina	0.1	L-triptófano	0.1		

Fuente: Deguchi y Morishita, 1992.

**1.3. Medio de cultivo De Man, Rogosa y Sharpe**

Las bacterias requieren un ambiente adecuado para crecer. El ambiente bioquímico lo constituye el medio de cultivo que contiene las cantidades apropiadas de nutrientes. Particularmente las BAL no pueden desarrollarse en medios minerales suplementados con una sola fuente de carbono, demandan aminoácidos, nucleótidos y vitaminas para su crecimiento por su limitada capacidad biosintética (Hayek y col., 2019). Normalmente los medios para el desarrollo de las BAL contienen carbohidratos fermentables, fuente primaria de carbono y energía, varias fuentes de nitrógeno (peptonas, extracto de levadura, extracto de carne o proteína de suero lácteo) por su aporte de aminoácidos, péptidos, bases nitrogenadas, minerales, vitaminas y amortiguadores de pH (Hayek y col., 2019).

El medio De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) fue desarrollado para soportar el crecimiento de *Lactobacillus* (De Man y col., 1960). En el Cuadro 1.2. se muestra la composición química del caldo MRS original y de diferentes marcas comerciales. La composición del MRS es similar al agar Rogosa (peptona de caseína, extracto de levadura, glucosa, mono oleato de polioxietilen sorbitán, fosfato ácido de potasio, citrato de amonio, acetato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de hierro, ácido acético glacial y agar; pH 5.4; (Rogosa y col., 1951), pero el pH es mayor al no incluir ácido acético, reducir la cantidad de acetato en el medio y sustituir el fosfato ácido de potasio por fosfato dibásico de potasio. El citrato de amonio y el acetato de sodio, así como el ácido acético y el sulfato ferroso en el agar Rogosa actúan como inhibidores de *Streptococcus* y otros microorganismos contaminantes. El extracto de levadura es un autolisado de *Saccharomyces*, soluble en agua y reconocida fuente de vitaminas del complejo B, minerales y proteínas. El extracto de carne es una mezcla de proteínas, aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos y vitaminas solubles que favorecen el desarrollo de algunas cepas de *Lactobacillus* (De Man y col., 1960).

El mono oleato de polioxietilen sorbitán (*Tween* 80), introducido por Briggs en 1953, reduce la tensión superficial y aporta el oleato necesario para el desarrollo de ciertas cepas de *Lactobacillus* (Corcoran y col., 2007). El fosfato de potasio y el acetato de sodio amortiguan el pH. El sulfato de manganeso y el sulfato de magnesio se incluyen en los medios de cultivo para las BAL a nivel traza. El *Tween* 80, citrato, acetato y manganeso son necesarios para el desarrollo de la mayoría de los *Lactobacillus* estudiados por De Man y col., (1960).

El medio MRS es también adecuado para el desarrollo de *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus* y *Pediococcus*, pero no soporta el crecimiento de todas las BAL ni de algunos probióticos (Corcoran y col., 2007; Hayek y col., 2019).

**Cuadro 1.2.**  
Composición química del caldo MRS original y comercial

Ingrediente (g/L)	original <sup>1</sup>	Comercial				
		Oxoid	Sigma-Aldrich	Merck	Neogen	BD Difco
<b>Peptona</b>						
peptona de Oxoid	10	10	10	-	-	-
peptona de caseína	-	-	-	10	-	-
peptona de tejido animal	-	-	-	-	10	-
proteosa peptona No. 3	-	-	-	-	-	10
Extracto de carne	10	8	8	8	10	10
Extracto de levadura	5	4	4	4	5	5
Glucosa	20	20	20	20	20	20
Acetato de sodio	5	5	5	5	5	5
<i>Tween 80</i>	1	1	1	1	1	1
Citrato de amonio	2	2	2	2	2	2
Fosfato dipotásico	2	2	2	2	2	2
Sulfato de magnesio	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
Sulfato de manganeso	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05
<b>pH final</b>	6.2 – 6.6	6.5	6.5	5.7	6.5	6.5

<sup>1</sup>: De Man y col., 1960.

Difco™ produce enzimas de alta calidad, tejidos y extractos de glándulas para ayudar a la digestión desde finales de 1895. La bacto peptona (BP), hidrolizado de proteína que contiene aminoácidos, minerales y otros nutrientes de bajo peso molecular que promueven la proliferación celular, fue introducida al mercado en 1914 para la formulación de medios de cultivo. La pancreatina, pepsina, papaína, ficina, bromelina y otras proteasas de origen microbiano son utilizadas para la producción de peptonas. De igual forma la bacto proteosa peptona (PP) es un hidrolizado obtenido de tejidos animales, que no coagula con el calor y precipita en

una solución saturada de sulfato de amonio, fue originalmente elaborado para la producción de la toxina de *Corynebacterium diphtheriae* y otras toxinas bacterianas.

#### **1.4. Producción de peptidoglucano hidrolasas y proteasas de interés biotecnológico**

##### **1.4.1. Peptidoglucano hidrolasas**

La identificación, regulación y coordinación de las proteínas involucradas en la hidrólisis y la síntesis del peptidoglucano (PG), ha sido clave para entender importantes procesos fisiológicos, específicamente la elongación y división celular (Lee y Huang, 2013).

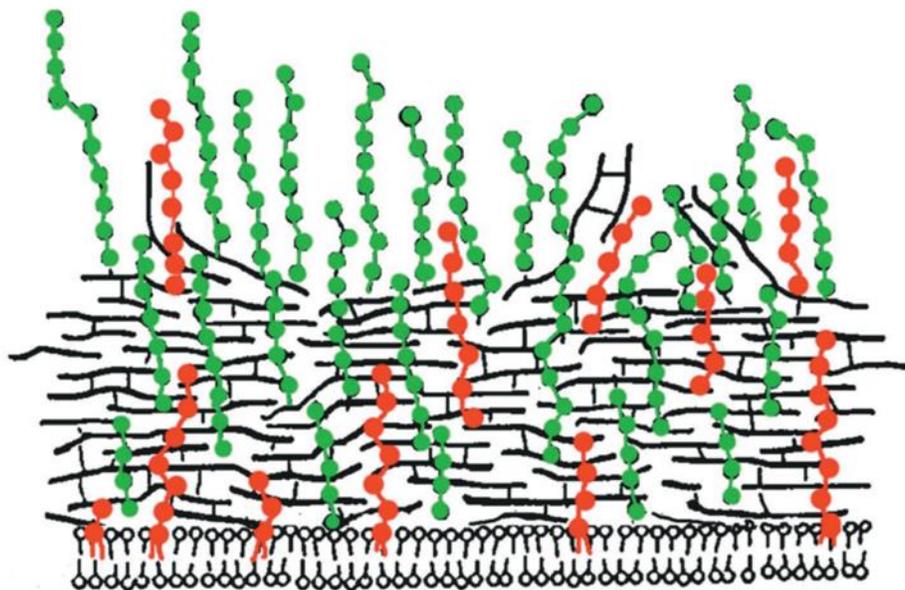
El PG, junto con los ácidos teicoicos forman una red o matriz polianiónica responsable de la elasticidad, porosidad y electrostática de la envoltura celular, que controla el “tráfico” de iones, nutrientes, proteínas y antibióticos, regulación de autolisinas y en cierta medida es responsable de la unión de las proteínas de la pared (Neuhaus y Baddiley, 2003). El PG es responsable de la rigidez y la forma de las células bacterianas protegiéndolas del estrés osmótico. Su estructura se ha estudiado con gran interés para investigar la acción de los antibióticos y los mecanismos de resistencia a los antibióticos, susceptibilidad a los bacteriófagos, comportamiento serológico, respuesta inmune, así como para la identificación y clasificación de las bacterias (Schumann, 2011).

El PG es un heteropolímero reticulado por oligopéptidos de las paredes celulares de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero no de las arqueobacterias. El PG, esencial para mantener la forma e integridad celular, está constituido por cadenas de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM) unidos por enlaces  $\beta$  (1→4).

El lactilo del NAM forma un enlace amida con un tetrapéptido de composición conservada: L-alanina (L-Ala), ácido D-glutámico (D-Glu), ácido meso-

diaminopimélico (m-DAP) o L-lisina (L-Lys) y D-alanina (D-Ala) (Fig. 1.1.). El m-DAP se encuentra en todas las bacterias Gram-negativas y en algunas Gram-positivas. El  $\epsilon$ -amino libre del m-DAP o el de la L-Lys permite la formación de un enlace peptídico directo (3→4) con el carbonilo de la D-Ala. De esta forma se unen dos cadenas de glicano adyacentes o se pueden formar puentes interpeptídicos constituidos por uno y hasta siete residuos de aminoácidos (Gly, L-Ala, L- o D-Ser, D-Asx, L- o D-Glu, entre otros) (Vollmer y col., 2008).

Particularmente las cadenas de los ácidos teicoicos que forman la pared celular de *S. aureus* están dispuestas perpendicularmente y la mitad se encuentra en una región denominada capa "esponjosa". Las cadenas del PG son cortas, pero su alto grado de entrecruzamiento, mediante puentes peptídicos constituidos por cinco residuos de glicina, le permite contar al patógeno con una estructura funcional (Fig. 1.1.). La lisostafina, una de las PGHs más estudiadas, actúa específicamente sobre la pentaglicina (Szweda y col., 2012).

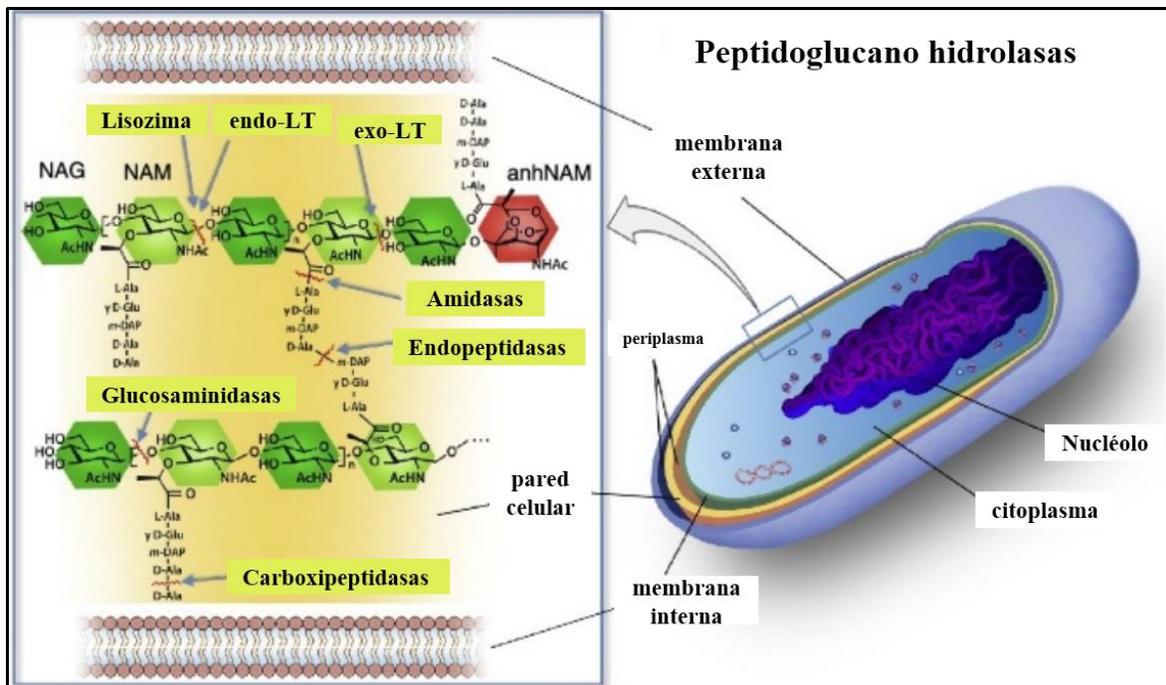


**Figura 1.1. Representación de la topografía de la pared celular de *S. aureus*.** Peptidoglucano: líneas negras; ácido teicoico: círculos verdes; ácido lipoteicoico: círculos rojos; membrana celular: bicapa lipídica. Adaptado de Neuhaus y Baddiley, 2003.

Las bacterias poseen varias enzimas que pueden degradar su propia pared celular y la de otros microorganismos (Lortal y col., 1997). La autólisis es un proceso complejo que involucra tanto a glicosidasas como peptidasas, reconocidas genéricamente como peptidoglucano hidrolasas (PGHs) que se clasifican de acuerdo al enlace covalente que hidrolizan (Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014; Sharma y col., 2016).

- N-acetil-  $\beta$ -D-muramidasa (N-acetilmuramidasa o muramidasa o lisozima), hidroliza el enlace glicosídico entre el N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina.
- N-acetil-  $\beta$ -D-glucosaminidasa (glucosaminidasa), hidroliza el enlace glicosídico entre la N-acetilglucosamina y el N-acetilmurámico.
- N-acetil-muramoil-L-alanina amidasa (amidasa), hidroliza el enlace amida formado entre el carboxilo del lactoilo del N-acetilmurámico y el amino de la L-alanina.
- Peptidasas (endopeptidasas y carboxipeptidasas), hidrolizan los diferentes enlaces peptídicos del PG.
- Transglicosidasas líticas que hidrolizan el mismo enlace que las muramidases, pero producen muropéptidos anhidros.

La autodegradación de la pared celular bacteriana libera el contenido intracelular incluyendo enzimas y DNA, es decir, la actividad autolítica de las PGHs conduce a la lisis bacteriana. A continuación, se presenta la Fig. 1.2. que señala el sitio de hidrólisis de las PGHs en la pared celular de las bacterias.



**Figura 1.2. Localización de los enlaces que hidrolizan las peptidoglucano hidrolasas en la pared de la célula bacteriana.** Adaptado de Alcorlo y col., 2017. Abreviaturas. AcHN: N-acetil; Ala: alanina; anhNAM: N-acilmurámico anhidro; Glu: ácido glutámico; LT: transglucosilasas líticas; m-DAP: ácido meso- diaminopimélico; NAG: N-acetilglucosamina; NAM: N-acilmurámico.

### 1.4.2. Proteasas

Las proteasas son enzimas cuya función es hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas. Se clasifican en dos grupos: exopeptidasas y endopeptidasas. El primer grupo actúa en los extremos de la cadena polipeptídica y se subdivide en aminopeptidasas y carboxipeptidasas. El grupo de las endopeptidasas hidrolizan los enlaces de las regiones internas de la cadena polipeptídica y se divide en cuatro subgrupos: serín, cisteín, aspártico y metalo proteasas (Raghunath y Badgujar, 2010; Kieliszek y col., 2021).

- Aminopeptidasa, hidroliza el enlace peptídico del extremo amino.
- Carboxipeptidasa, hidroliza el enlace peptídico del extremo carboxilo.
- Serín proteasas, se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en su sitio activo. Son activas a pH neutro y alcalino. La quimotripsina y tripsina

pertenece a esta familia.

- Cisteín proteasas, o tiol proteasas, su pH óptimo es neutro. Son susceptibles a los agentes sulfhidrilo. La papaína es el ejemplo más conocido de esta familia.
- Aspártico proteasas, dependen de dos residuos de ácido aspártico para su función catalítica. Un ejemplo de esta familia es la pepsina.
- Metallo proteasas, se caracterizan por un ion metálico divalente en su sitio activo por lo que son inhibidas por agentes quelantes. La mayoría de las enzimas que se han reportado contienen zinc. La lisostafina pertenece a este grupo.

La actividad proteolítica de las BAL se ha centrado en el estudio de la degradación de la caseína por cepas de *Lactococcus lactis*. Su sistema proteolítico, constituido por proteinasas y el sistema de transporte de péptidos, es el más estudiado. Los péptidos generados por la lactocepina I (PI) y lactocepina III (PIII), proteasas extracelulares localizadas en la superficie celular, se transportan al interior de la célula a través de los sistemas de transporte de péptidos Opp, Dpp y DtpT para ser hidrolizados por endopeptidasas y aminopeptidasas en el citoplasma (Von Schillde y col., 2012; Kowalczyk y col., 2015).

Existen pocos estudios sobre las enzimas producidas por *Pediococcus*. Simitsopoulou y col., (1997), reportaron una tripeptidasa intracelular proveniente de *P. pentosaceus* aislada de una muestra de queso Feta. Recientemente se caracterizó una serín proteasa extracelular de *P. acidilactici* NCDC252 (Gandhi y col., 2021).

En el grupo de trabajo se ha estudiado a *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con el objetivo de caracterizar su actividad lítica y proteolítica. Llorente-Bousquets (2008) descartó que la cepa posea el gen *pedB*, y reportó una banda termoestable de 110 kDa con actividad sobre *M. lysodeikticus*, *L. innocua* y *S. aureus* presente en el sobrenadante de cultivo. Por su parte, García-Cano y col., (2011), reportaron dos PGHs, de 99 kDa y 110 kDa, en la fracción celular con actividad sobre *M. lysodeikticus*, *S. typhi*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Mediante

espectroscopia de masas se identificó a la proteína de 99 kDa como una *N*-acetilmuramidasa. Barbosa (2018) clonó en un sistema de expresión heterólogo la proteína de 110 kDa, y determinó que es una PGH con actividad muramidasa.

Llorente y col., (2008) detectaron, por medio de análisis zimográficos, dos bandas proteolíticas: una mayor a 200 kDa y otra de 107 kDa, la banda que se perdió después de aplicar tratamiento térmico a la muestra.

El uso industrial de enzimas es muy extenso y cuenta con numerosas aplicaciones, su demanda crece por lo que la búsqueda de fuentes sostenibles aumenta. Un recurso muy utilizado son los microorganismos como fuente de enzimas. En 2008 el 75 % de las ventas mundiales de enzimas correspondió a enzimas hidrolíticas de origen microbiano y las proteasas representaron el 59 % del total de las ventas (Gaur y Wadhwa, 2008).

## 2. Metodología

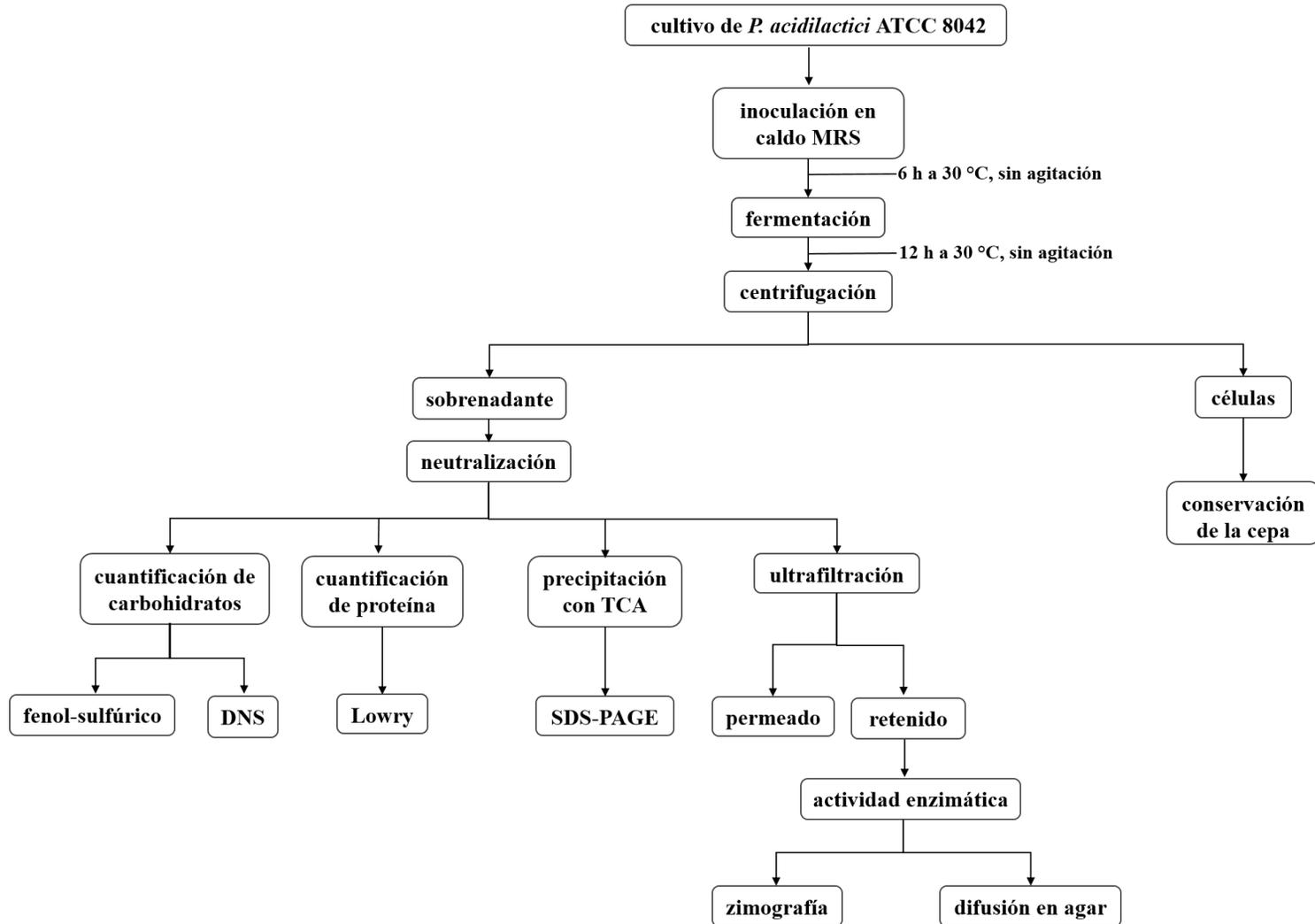


Figura 2.1. Diagrama general de la estrategia experimental.

## **2.1. Materiales y métodos**

### **2.1.1. Reactivos y estándares**

Acetato de sodio, acetona, ácido acético, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético (TCA), carbonato de sodio, citrato de amonio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, tartrato de sodio, fosfato de potasio, glicerol anhidro, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, sulfato de cobre, sulfato de magnesio heptahidratado, sulfato de manganeso tetrahidratado y tartrato doble de sodio y potasio de *J. T. Baker*; ácido 3,5-dinitrosalicílico de *Eastman Chemical*; azul de metileno, albúminasérico bovino (BSA), sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano (CHAPS), gelatina de bovino tipo B, glucosa monohidratada, reactivo Folin y Ciocalteu, lisozima de clara de huevo, *Tween 80* y *Triton X-100* de *Sigma Aldrich*; acrilamida, azul de bromofenol, azul de *Coomassie R-250*, bisacrilamida, dodecil sulfato de sodio, glicina, tris (hidroximetil) aminometano (Tris), urea y estándares de peso molecular *SDS- PAGE Molecular Weight Standards, Low Range y Precision Plus Protein Standards, Dual Color* de *BIO-RAD*; *PageBlue Protein Staining Solution* de *Thermo Scientific*; caseinato de calcio de *Lactoprot*, tripsina y caseína calidad *Hammarsten* de *Research Organics*.

Para la elaboración de las disoluciones, se empleó agua Tipo I (18.2 MΩ/cm a 25 °C) filtrada a través de una membrana de *Nylon* con tamaño de poro de 0.45 μm (*Simplicity UV, Millipore*) y material desechable.

### **2.1.2. Medios de cultivo**

Agar, bacto peptona, extracto de carne, extracto de levadura, hidrolizado pancreático de caseína, leche descremada en polvo, proteosa peptona, MRS de *Difco*<sup>TM</sup>.

### **2.1.3. Material biológico**

*Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se obtuvo de chaquiras con medio MRS:glicerol (80:20) (v/v) mantenidas en criotubos a -20 °C. Para los ensayos de actividad lítica

se utilizaron células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma-Aldrich) y de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565.

#### **2.1.4. Caracterización de la cepa**

La caracterización morfológica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se realizó por observación de las colonias en agar MRS y la observación de los frotis teñidos con tinción de Gram (Microscopio biológico binocular digital DMS-653).

### **2.2. Preparación del medio de cultivo, inóculo y fermentación de *P. acidilactici* ATCC 8042**

#### **2.2.1. Preparación del medio de cultivo**

Se preparó, por duplicado, el medio de cultivo MRS modificado. Se disolvieron las sales en agua destilada y se distribuyeron 140 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, se añadió la fuente de nitrógeno y se esterilizó a 121 °C durante 15 min (Autoclave *Yamato Sterilizer SM300*).

Se preparó una disolución concentrada de glucosa y se esterilizó. Se adicionaron 5 mL de esta disolución a cada matraz bajo condiciones estériles (Campana de flujo laminar, *ADLER*). Se tomaron 20 mL del medio de cultivo como muestra control de la actividad enzimática, para determinar el pH, la concentración inicial de carbohidratos y de proteína soluble, y para medir el color del medio.

#### **2.2.2. Activación de la cepa**

El caldo MRS se utilizó para el crecimiento y mantenimiento de ATCC 8042. Para la elaboración del medio sólido se añadió agar para una concentración final de 10 g/L. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Se colocó una chaquiras con las células de la cepa *P. acidilactici* en tubos con tapón de rosca con 10 mL de caldo MRS y se incubó a 30 °C hasta su desarrollo. Se tomó una asada y se sembró por estría en agar MRS y se incubó durante 24 h a 30 °C (Horno de convección, DX-300, *Yamato*).

### **2.2.3. Preparación del inóculo**

Para la preparación del pre-inóculo se inoculó un matraz Erlenmeyer de 50 mL de capacidad, con 20 mL de caldo MRS con una colonia de aproximadamente 1 mm y se incubó a 30 °C durante 20 h en condiciones estáticas. Se realizó un pase al 1 % (v/v) del pre-inóculo a un segundo matraz Erlenmeyer de 50 mL de capacidad con 20 mL de medio MRS y se incubó durante 6 h. Este cultivo fue utilizado para la fermentación.

### **2.2.4. Fermentación**

Cada matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 125 mL de medio de cultivo se inoculó al 1 % (v/v). La fermentación a 30 °C en condiciones estáticas se detuvo a las 12 h reduciendo la temperatura empleando un baño de hielo. Se tomó una alícuota de 10 mL y midió el pH (*pH Meter*, Mo. 390, *Beckman-Coulter*) y la densidad óptica (D.O.) a 600 nm (*BioSpectrometer Kinetic*, *Eppendorf*).

### **2.2.5. Obtención del sobrenadante de cultivo**

El cultivo se centrifugó a 10000 r.p.m., durante 60 min a 4 °C (Centrífuga, Mo. J2-MC, *Beckman-Coulter*). Se recuperó el sobrenadante y se neutralizó con una disolución estéril de NaOH 1 N.

#### **2.2.5.1. Cuantificación de los azúcares reductores**

La concentración de azúcares reductores se determinó, por triplicado, en los medios de cultivo sin inocular y en los sobrenadantes de cultivo. Se utilizó una disolución de 2 mg/mL de glucosa como estándar de la curva de calibración (Sumner, 1924) (apéndice A).

#### **2.2.5.2. Cuantificación de los azúcares totales**

La concentración de azúcares totales se determinó, por triplicado, en los medios de cultivo sin inocular y en los sobrenadantes de cultivo formulados con sacarosa. Se empleó una disolución de 100 µg/mL de sacarosa como estándar de la curva de calibración (Dubois y col., 1956).

### **2.2.5.3. Cuantificación de proteína soluble**

Se determinó, por triplicado, la concentración de proteína en los sobrenadantes de cultivo empleando una disolución de 2 mg/ mL de BSA como estándar de la curva de calibración (Lowry y col., 1951; Peterson, 1977) (apéndice B).

### **2.2.5.4. Concentración de las proteínas por ultrafiltración**

Los sobrenadantes de cultivo neutralizados se concentraron por ultrafiltración (UF) mediante unidades *Amicon™ Ultra-15* para filtración con centrifuga de 10 000 MWCO (*Ultracel™ membrane, Millipore*) a 5000 r.p.m., a 4 °C (centrifuga 5430 R, *Eppendorf*). Se colectó la fracción retenida y se realizaron dos lavados con una disolución amortiguadora estéril de Tris-HCl 25 mM (pH 7.0).

## **2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y zimografía**

### **2.3.1. Preparación de la muestra**

Se concentró la fracción proteínica de los sobrenadantes neutralizados mediante precipitación con TCA al 50 % (m/v). El precipitado se lavó dos veces con acetona fría y se re-disolvió utilizando una disolución de urea 8 M y CHAPS al 4 % (m/v) y el volumen mínimo necesario de NaOH 1 N para neutralizar la muestra (Nandakumar y col., 2003). Tanto a las muestras concentradas por precipitación con TCA como la fracción retenida por UF se les adicionó un volumen equivalente de la disolución amortiguadora de muestra [Tris-HCl 0.0625 M (pH 6.8), SDS 2 % (m/v), glicerol 10 % (v/v) y azul de bromofenol 0.001 % (m/v)] (Laemmli, 1970).

### **2.3.2. Preparación de geles de poliacrilamida**

Se prepararon geles de poliacrilamida (12.5 % T, 2.6 % C) de 1 mm de espesor para la obtención de los perfiles proteínicos y para el ensayo de la actividad enzimática (Cuadro 2.1.). Se adicionaron células de *Micrococcus lysodeikticus* a una concentración final de 0.2 % (m/v), como sustrato para la actividad lítica (Leclerc, 1989), y gelatina al 0.1 % (m/v) para detectar la actividad proteolítica (García Carreño y col., 1993).

### 2.3.3. SDS-PAGE

La electroforesis se realizó aplicando una diferencia de potencial de 100 V (*Mini PROTEAN, Tetra Cell, BIO-RAD*) en la disolución amortiguadora de Tris–glicina (pH 8.3) adicionada de SDS al 1 % (m/v). Al término de la electroforesis, los geles para SDS-PAGE se tiñeron con azul de *Coomassie* R-250 y G-250. Para eliminar el exceso de colorante del gel se empleó una disolución de ácido acético:metanol:agua (1:5:4) (v/v/v) para el primer caso, y agua para el colorante en su estado coloidal.

**Cuadro 2.1.**

Formulación del gel concentrador y del gel separador para SDS-PAGE y zimografía

composición (mL)	concentrador	separador		
		SDS-PAGE	zimograma	
			PGH	Proteasa
Agua	6.08	3.18	2.68	2.18
amortiguador Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)	2.50	-	-	-
amortiguador Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)	-	2.60	2.60	2.60
células 4 %	-	-	0.50	-
gelatina 1 %	-	-	-	1.00
acrilamida 30 %	1.36	5.50	4.16	4.16
APS 10 %	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01
volumen final	10.00	10.00	10.00	10.00

Abreviaturas. APS: persulfato de amonio, TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletildiamina.

### 2.3.4. Detección de la actividad lítica y proteolítica por zimografía

Los geles se lavaron con agua desionizada o con una disolución de *Triton X-100* al 2.5 % (m/v), con agitación orbital (*Labnet International*) a 40 r.p.m. durante 60 min, para la renaturalización de la PGH y la proteasa, respectivamente. Para la PGH, el gel se mantuvo en una disolución amortiguadora de Tris-HCl (25 mM, pH 7.0) con *Triton X-100* al 1 % (m/v) a 30 °C durante 20 horas. Posteriormente el gel se tiñó con azul de metileno al 0.1 % (m/v) en KOH al 0.01 % (m/v). Se removió el exceso de colorante con agua destilada. En el caso de la actividad proteolítica, el gel se

incubó en una disolución amortiguadora de Tris-HCl (50 mM, pH 8), adicionada de CaCl<sub>2</sub> (5 mM) y NaCl (200 mM) a 30 °C durante 20 h. Para detectar la actividad caseinolítica el gel se sumergió en una disolución de caseína calidad *Hammarsten* al 2 % (m/v) en el mismo amortiguador durante 60 min con agitación orbital a 40 r.p.m., a 4 °C, y se incubó bajo las mismas condiciones descritas. Al término de la incubación los geles se tiñeron y destiñeron como en SDS-PAGE utilizando azul de *Coomassie* R-250.

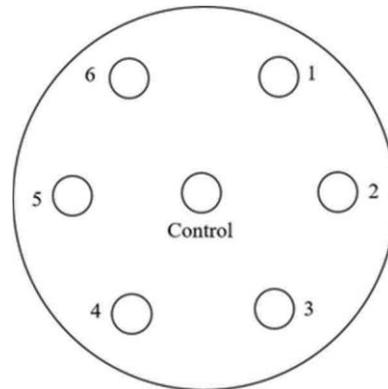
Se utilizó el fotodocumentador (*Gel Doc XR+ Imaging System, BIO-RAD*) controlado por el *software Image Lab* (versión 3.0) para la adquisición de las imágenes de los geles, así como para la estimación de los pesos moleculares de las bandas utilizando estándares de peso molecular conocido. Cuando se emplearon estándares preteñidos el peso molecular de las bandas se calculó a partir de la recta de la migración relativa en función del peso molecular de los estándares.

### **2.3.5. Detección de actividad proteolítica y lítica mediante difusión en agar**

Se determinó, por triplicado, la actividad enzimática de los sobrenadantes de cultivo neutralizados y concentrados por UF. La actividad proteolítica se detectó en placas de agar con caseinato de calcio (Vijayaraghavan y col., 2013).

Se prepararon disoluciones de caseinato de calcio al 2 % (m/v) y agar al 1.6 % (m/v) y se esterilizaron a 121 °C por 15 min en autoclave, se mezclaron volúmenes iguales de las disoluciones y adicionaron a cajas de Petri de 90 mm x 15 mm estériles desechables (20 mL/caja) bajo condiciones asépticas. En cada caja con el medio solidificado se realizaron 6 pozos de 7 mm de diámetro con cilindros de acero inoxidable estériles cuya distribución se muestra en la Figura 2.2. En cada pozo se adicionó 50 µL de la porción de ensayo. La medición del diámetro de los halos de hidrólisis se realizó a 30 °C a las 20 h y 40 h de incubación.

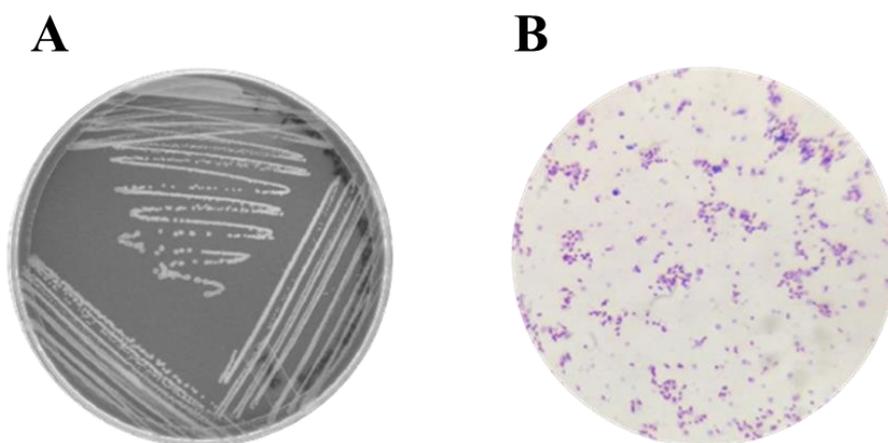
Se realizaron las curvas de actividad enzimática mediante la técnica de difusión en agar, empleando tripsina (apéndice C) y lisozima (apéndice D) como controles positivos de la actividad proteolítica y lítica, respectivamente.



**Figura 2.2. Distribución de los pozos en la caja de Petri para el ensayo de la actividad enzimática.**

### 3. Resultados y análisis de resultados

Se activó la cepa ATCC 8042 en caldo MRS bajo condiciones estáticas a 30 °C. En agar MRS la morfología macroscópica correspondió a un cultivo puro de colonias circulares, de aproximadamente 1 mm de diámetro y de coloración blanca (Figura 3.1.A). Se observaron cocos Gram positivo, con agrupaciones de tétradas y algunos diplococos (Figura 3.1.B). A lo largo del estudio se encontró que la cepa fue viable en refrigeración al menos 7 días en agar MRS (Difco™).



**Figura 3.1. Pureza del cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042.** **A.** Colonias en agar MRS (Difco™). **B.** Tinción de Gram. Imagen capturada con el Microscopio Biológico Binocular Digital de campo claro DMS-653.

Considerando las investigaciones previas, se evaluaron dos medios de cultivo: la formulación MRS<sub>Sac</sub>, con sacarosa (10 g/L) y bacto peptona (BP) (10 g/L) y la MRS<sub>Glu</sub>, formulado con glucosa (20 g/L) y proteosa peptona (PP) (10 g/L). En ambos, las sales y los extractos de carne y levadura se mantuvieron a la misma concentración que el medio MRS de Difco™. Se evaluaron 6 tiempos de fermentación para MRS<sub>Sac</sub> y 4 tiempos para el medio con glucosa, a 30 °C, sin agitación. Los resultados de densidad óptica (D.O.) y pH de la fermentación de la especie *acidilactici* ATCC 8042 con sacarosa y glucosa se presentan en los Cuadros 3.1. y 3.2., respectivamente.

**Cuadro 3.1.**Fermentación de *P. acidilactici* ATCC 8042 en MRS<sub>Sac</sub><sup>1</sup>

<b>tiempo (h)</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>22</b>
<b>D.O.</b>	1.5	1.3	1.3	1.4	1.3	1.3
<b>pH</b>	5.8	5.9	5.8	5.8	5.9	5.8

<sup>1</sup>: valores promedio (n= 3) de cada tiempo de fermentación en caldo MRS formulado con sacarosa (10 g/L) y bacto peptona (BP) (10 g/L) en condiciones estáticas a 30 °C.

**Cuadro 3.2.**Fermentación de *P. acidilactici* ATCC 8042 en MRS<sub>Glu</sub><sup>1</sup>

<b>tiempo (h)</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>
<b>D.O.</b>	1.8	4.6	6.3	7.4
<b>pH</b>	5.7	4.8	4.4	4.2

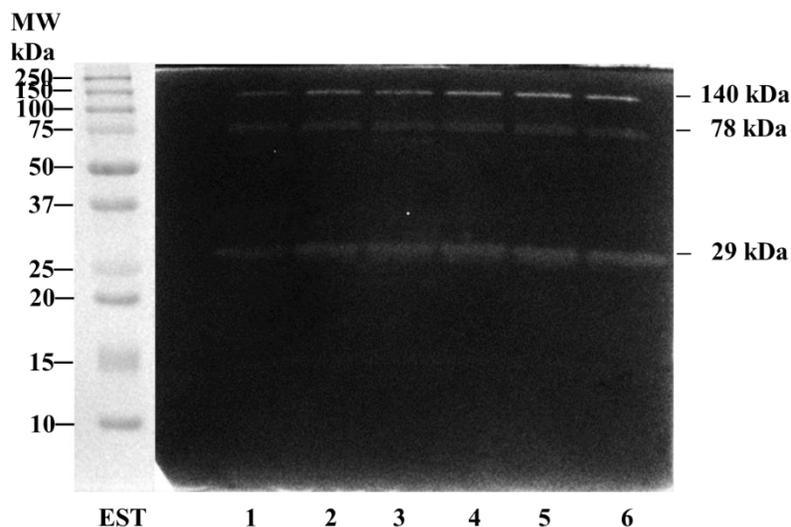
<sup>1</sup>: valores promedio (n= 3) de cada tiempo de fermentación en caldo MRS formulado con glucosa (20 g/L) y proteosa peptona (10 g/L) en condiciones estáticas a 30 °C.

A las 12 h de cultivo de la cepa alcanzo un crecimiento de 1.3 unidades de D.O., y la acidez generada disminuyó el pH 5.8 en el medio formulado con sacarosa, mientras que para MRS<sub>Glu</sub> la D.O., fue de 7.4 y el valor de pH descendió hasta 4.2, es decir, la cepa alcanzó un mayor crecimiento, en menos tiempo, cuando la fuente de carbono fue glucosa. De acuerdo con Bosma y col., (2017) la capacidad de utilización de la sacarosa depende de la cepa de *P. acidilactici*. Algunas como la NRRL B-639, utilizan la sacarosa hasta las 48 h o 72 h de fermentación.

Los disacáridos deben ser hidrolizados por enzimas sintetizadas por el microorganismo para su ingreso al citosol, mientras que los monosacáridos entran a la célula por sistemas facilitadores del transporte que utilizan un gradiente de concentración, por consiguiente, emplear glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo implica un menor gasto energético para las células (Castrejón y col., 2007).

El análisis zimográfico permite separar a las proteínas de acuerdo a su peso molecular seguido de la detección de la actividad enzimática, para lo cual, después de la electroforesis, el gel se transfiere a una disolución con *Triton X-100* con el fin de remover el SDS y renaturalizar a la enzima de interés. En particular, ambas hidrolasas se observan como una banda clara sobre fondo oscuro en los geles de poliacrilamida.

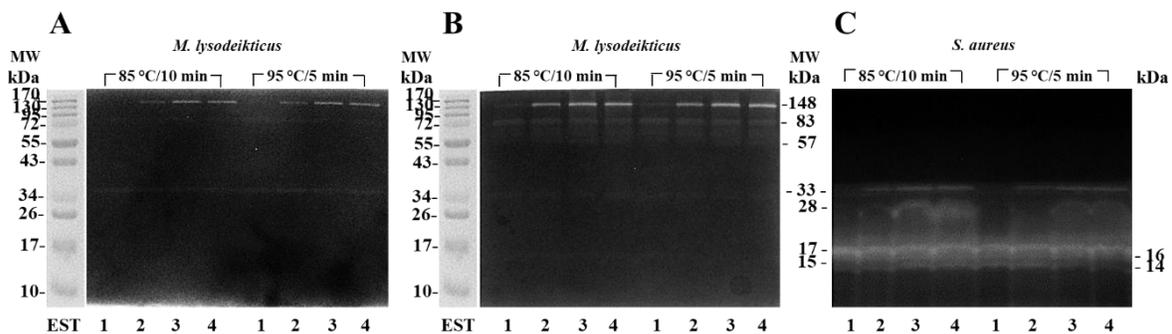
Bajo las condiciones descritas, se detectó actividad PGH extracelular por zimografía empleando como sustrato estándar a las células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698. Se observaron tres bandas de actividad lítica con pesos moleculares aproximados de 29 kDa, 78 kDa y 140 kDa en los sobrenadantes de cultivo neutralizados (Fig. 3.2.). Se puede apreciar el incremento en la intensidad de las bandas a mayor tiempo de fermentación.



**Figura 3.2. Zimografía sobre células de *M. lysodeikticus* ATCC 4698.** (SDS-PAGE, 12.5 % T). Muestras de los sobrenadantes de cultivo neutralizados de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en MRS<sub>Sac</sub>. Tiempo de fermentación: 8 h (carril 1), 10 h (carril 2), 12 h (carril 3), 14 h (carril 4), 17 h (carril 5) y 22 h (carril 6). EST: estándares de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color, BIO-RAD*). Incubación en amortiguador Tris-HCl (25 Mm, pH 7) adicionado de 1 % de *Triton X-100*, durante 20 h a 30 °C. Tinción con azul de metileno al 0.1 % en KOH al 0.01%. Digitalización y análisis de la imagen mediante fotodocumentador (*Gel Doc XR+ Imaging System, Image Lab 3.0, BIO-RAD*).

Las bandas con actividad lítica extracelular producidas en el medio MRS<sub>Sac</sub> fueron de pesos moleculares similares a las PGHs de 110 kDa, 70 kDa y 28 kDa detectadas por Corona (2018). En ningún tiempo de la fermentación se detectó actividad proteolítica (resultado que no se muestra).

Se evaluó la actividad PGH en los sobrenadantes del medio MRS formulado en el laboratorio con glucosa (MRS<sub>Glu</sub>) (Fig. 3.3.). Se detectaron tres bandas de actividad de lítica sobre el sustrato estándar entre las 8 y 12 horas de fermentación, de aproximadamente 148 kDa, 83 kDa y 33 kDa, pero no a las 6 horas (Fig. 3.3.A). La banda lítica de aproximadamente 33 kDa se detectó en todos los tiempos de fermentación. La intensidad de las bandas se incrementó conforme avanzó la fermentación y todas se caracterizaron por conservar actividad después de que las muestras se sometieron a 80 °C por 10 min y a 95 °C por 5 min en un baño seco con agitación (*Thermomixer Comfort, Eppendorf*).



**Figura 3.3. Actividad lítica de los sobrenadantes de cultivo.** (SDS-PAGE, 12.5 % T). **A.** Zimografía con *M. lysodeikticus* como sustrato, renaturalización en amortiguador Tris-HCl (25 Mm, pH 7) adicionado de 1 % de *Triton X-100* durante 20 h a 30 °C. **B.** Extensión del tiempo de renaturalización a 60 h **C.** Zimografía con *S. aureus* como sustrato, mismas condiciones que en A (mismas muestras, corrida simultánea). Tiempo de fermentación de *P. acidilactici* ATCC 8042 en MRS<sub>Glu</sub>: 6 h (carril 1), 8 h (carril 2), 10 h (carril 3), 12 h (carril 4). EST: estándares de peso molecular (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas*). Tinción con azul de metileno. Digitalización y análisis de las imágenes mediante fotodocumentador (*Gel Doc XR+ Imaging System, Image Lab 3.0, BIO-RAD*).

Prolongar el tiempo de incubación del gel a 60 h permitió la detección de varias bandas entre 57 kDa a 83 kDa, y se aprecian mejor las bandas de actividad lítica con respecto al gel que se incubó por 20 h.

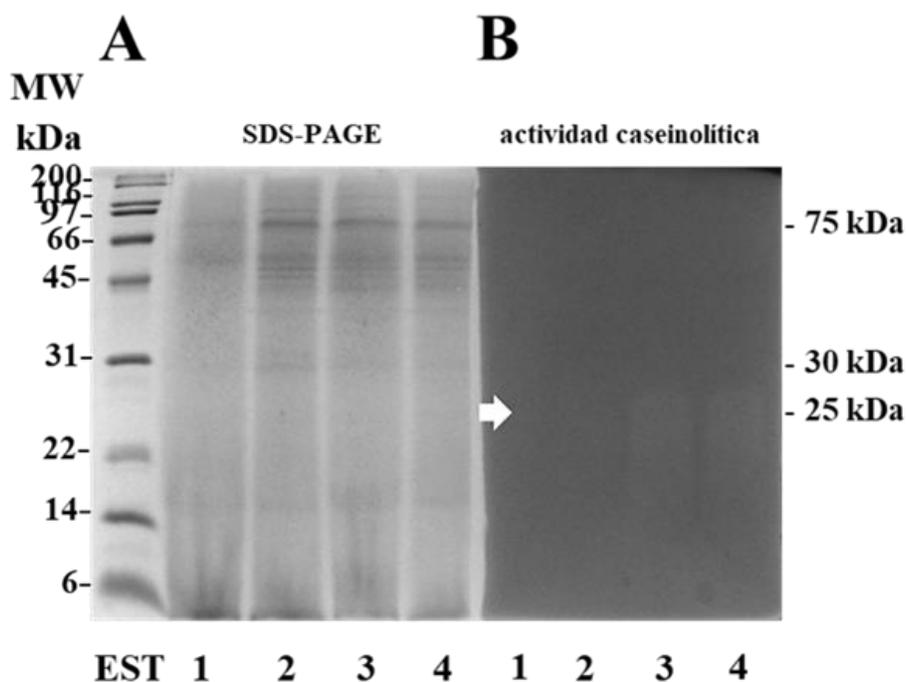
Mora y col., (2003) detectaron, en extractos celulares de varias cepas de *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, hasta 8 bandas líticas de entre 45 kDa y 110 kDa en geles con células de *M. lysodeikticus* después de 12 h de renaturalización, al que denominaron perfil secundario de lisis (PS). La formación de bandas secundarias podría atribuirse a la proteólisis parcial de PGHs de alto peso molecular generando fragmentos que conservan actividad enzimática (Selvarani y col., 2000).

De forma simultánea se evaluó la actividad lítica sobre células de *S. aureus*, es decir, al mismo tiempo, empleando las mismas muestras y bajo las mismas condiciones de ensayo (Fig. 3.3.C). Se detectó la banda de 33 kDa, pero no las bandas líticas de alto peso molecular observadas en *M. lysodeikticus*. Adicionalmente se observaron bandas de 28 kDa, 17 kDa, 16, 15 y 14 kDa. Aunque la estructura del PG es conservada, modificaciones en su arquitectura, como lo es la O-acetilación del C6 de los residuos del NAM hace que *S. aureus* sea resistente a la acción de las lisozimas (Vollmer, 2008).

En un intento de purificar la actividad proteolítica de los sobrenadantes de cultivo de MRS<sub>Glu</sub>, las muestras neutralizadas se precipitaron con sulfato de amonio (solución saturada al 80 %). Se dializó toda la noche a baja temperatura (*Multiple dialyzer, Pope Scientific, Inc., USA*) utilizando una membrana para retener proteínas de peso molecular superior a 12 kDa (*Sigma Chemical, Co., USA*). La obtención del perfil proteínico y la actividad caseinolítica se realizó en el mismo gel, ya que la caseína puede difundir en el gel de poliacrilamida después de la electroforesis (Fig. 3.4.).

Se detectaron varias bandas de proteína por SDS-PAGE. La banda más intensa de 75 kDa se detectó a partir de las 8 h de cultivo (Fig. 3.4.A, carriles 2-4), y podría corresponder a la primera banda con actividad lítica sobre la pared celular de *M.*

*lysodeikticus* que se observa a simple vista sin necesidad de teñir el gel con azul de metileno. Se visualizaron cuatro bandas con un peso molecular aproximado de entre 45 kDa a 60 kDa y dos bandas más tenues de aproximadamente 30 kDa y 17 kDa. La banda con actividad sobre caseína de 25 kDa se detectó a las 10 y 12 horas de fermentación (Fig. 3.4.B, carriles 3 y 4, respectivamente).



**Figura 3.4. Perfil proteínico y actividad proteolítica de los sobrenadantes de cultivo semipurificados de *P. acidilactici* ATCC 8042.** (SDS-PAGE, 12.5 % T). Ensayo en el mismo gel. **A.** Perfil electroforético de la fracción proteínica en condiciones reductoras. **B.** Actividad proteolítica sobre caseína. Tiempo de fermentación en MRS<sub>Glu</sub>: 6 h (carril 1), 8 h (carril 2), 10 h (carril 3), 12 h (carril 4). EST: estándares de peso molecular (*Molecular Weight Standards, Broad Range, BIO-RAD*). Incubación en amortiguador Tris-HCl (50 mM, pH 8), adicionado de CaCl<sub>2</sub> (5 mM) y NaCl (200 mM), durante 20 h a 30 °C. Tinción con azul de Coomassie R-250. Digitalización y análisis de la imagen mediante fotodocumentador (*Gel Doc XR+ Imaging System, Image Lab 3.0, BIO-RAD*).

Los resultados anteriores demostraron que la composición del medio de cultivo es clave en la propagación de *P. acidilactici* ATCC 8042 y determinante en su expresión enzimática.

La formulación más utilizada para el crecimiento de las BAL es el caldo MRS, formulado en 1960 para diversas cepas del género *Lactobacillus* por De Man, Rogosa y Sharpe. Sin embargo, determinar los nutrientes apropiados en las cantidades suficientes para la mayor producción de biomasa, producción de algún metabolito de interés o actividad enzimática permite eliminar los componentes no necesarios del medio de cultivo.

Tradicionalmente los estudios bioquímicos se llevan a cabo analizando un factor nutricional a la vez (Hayek y col., 2019). En ese sentido, se evaluó el efecto de cada una de las fuentes de nitrógeno del caldo MRS en la actividad proteolítica de ATCC 8042, y se incluyó en el estudio: hidrolizado pancreático de caseína (5 g/L), leche descremada en polvo (1 g/L) y caseína (1 g/L), en medio base de glucosa al 1 % y sales sin *Tween* 80 (medios reformulados, MRFs) (Cuadro 3.3., Figura 3.5.). A todas las formulaciones se adicionó extracto de levadura (2.5 g/L) para promover el crecimiento. Los resultados se contrastaron contra el MRS formulado en el laboratorio como control (MRF<sub>9</sub>).

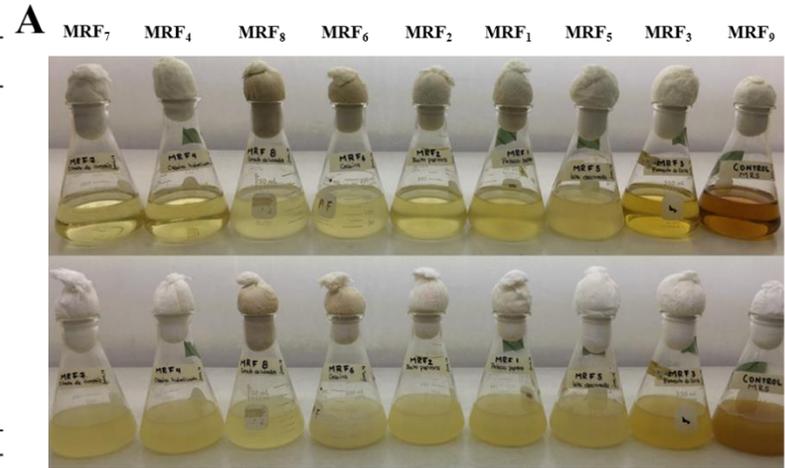
Manteniendo constante el contenido de glucosa y extracto de levadura, el desarrollo de ATCC 8042 en cada fuente de nitrógeno ensayada fue menor con respecto al control, formulado con la misma composición química que el medio comercial, pero con una reducción del 50 % en el contenido de glucosa. El menor valor de D.O., (1.0) correspondió a la muestra MRF<sub>8</sub> y el mayor valor (7.6) correspondió al control, por lo que además del extracto de levadura, la cepa requiere de un mayor contenido de nitrógeno proteínico. Entre los hidrolizados de proteína empleados a un mismo nivel de concentración (5 g/L): PP (MRF<sub>1</sub>), BP (MRF<sub>2</sub>), caseína hidrolizada (MRF<sub>4</sub>) y el extracto de carne (MRF<sub>3</sub>), se alcanzó una D.O., de entre 2.4 a 2.9 y un valor de pH 4.5. El crecimiento fue menor en los demás ensayos: leche en polvo (MRF<sub>5</sub>),

caseína (MRF<sub>6</sub>) y citrato de amonio (MRF<sub>7</sub>). En el control, a las 12 h de cultivo el pH descendió hasta 4.2. Si bien la acidificación es la principal estrategia competitiva de la especie, la disminución de pH a valores cercanos al pKa del ácido láctico (pH 3.8) inhibe el crecimiento al difundir la especie protonada al interior de la célula.

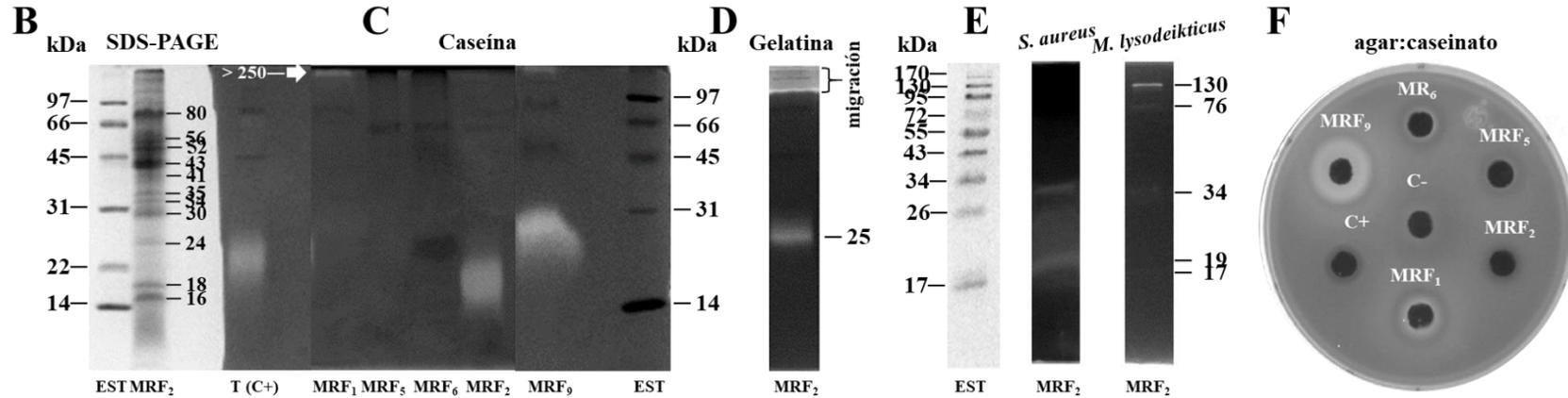
**Cuadro 3.3.**

Composición de los medios reformulados (MRFs) y resultados de las fermentaciones

Ingrediente (g/L)	medio reformulado (MRF)									Control
	MRF <sub>1</sub>	MRF <sub>2</sub>	MRF <sub>3</sub>	MRF <sub>4</sub>	MRF <sub>5</sub>	MRF <sub>6</sub>	MRF <sub>7</sub>	MRF <sub>8</sub>	MRF <sub>9</sub>	
Proteosa peptona	5	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Bacto peptona	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto de carne	-	-	5	-	-	-	-	-	-	10
Caseína hidrolizada	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
Leche en polvo	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Caseína	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Citrato de amonio	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2
Extracto de levadura	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0
Glucosa	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Acetato de sodio	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Fosfato dipotásico	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sulfato de magnesio	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sulfato de manganeso	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
pH	7.6	7.7	7.5	7.6	7.8	7.6	6.6	7.9	6.7	6.7
<b>Resultados</b>										
D.O. (600 nm)	2.9	2.6	2.7	2.4	1.1	1.2	1.5	1.0	7.6	7.6
pH	4.5	4.5	4.5	4.5	5.1	5.1	5.0	5.2	4.2	4.2



Medios de cultivo reformulados antes y después de la fermentación de *P. acidilactici* ATCC 8042



**Figura 3.5. Efecto de la fuente de nitrógeno en la fermentación de *P. acidilactici* ATCC 8042 y en la actividad enzimática extracelular. Cuadro 3.3. Composición de los medios de cultivo reformulados (MRFs) y resultados de las fermentaciones.** Densidad óptica (D.O.) y pH a las 12 h de cultivo a 30 °C en condiciones estáticas. **A.** Medios de cultivo reformulados (MRFs) antes y después de la fermentación. **B.** Perfil de proteínas (SDS-PAGE, 12.5 %T, condiciones reductoras) del sobrenadante de cultivo precipitado con ácido tricloroacético. EST: estándar de peso molecular (SDS-PAGE *Molecular Weight Standards, Low Range, BIO-RAD*). **C.** Actividad proteolítica sobre caseína. Tripsina como control positivo (T C+). **D.** Actividad proteolítica sobre gelatina. **E.** Actividad lítica sobre células de *S. aureus* y *M. lysodeikticus* –mismas muestras, corrida simultánea– (SDS-PAGE, 12.5 % T). Muestras de los sobrenadantes de cultivo neutralizados y concentrados por ultrafiltración. EST: estándar de peso molecular (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas*). **F.** Proteólisis mediante la técnica de difusión en agar en pozo (diámetro del pozo de 7 mm; 50 µL muestra). Tripsina como control positivo (C+) y amortiguador estéril como control negativo (C-) ver apéndice C. Incubación a 30 °C durante 20 h. Digitalización y análisis de las imágenes mediante fotodocumentador (*Gel Doc XR+ Imaging System, Image Lab 3.0, BIO-RAD*).

Con la intención de minimizar la producción de pigmentos en los medios de cultivo, además de disminuir la concentración de extracto de carne, extracto de levadura y glucosa, la adición de glucosa concentrada, a cada matraz, se realizó aparte y bajo condiciones estériles. No obstante, fue evidente la reacción de Maillard en los medios de cultivo reformulados, siendo el extracto de carne el componente que más contribuyó al obscurecimiento no enzimático: MRF<sub>9</sub> > MRF<sub>3</sub> > MRF<sub>5</sub> > MRF<sub>1</sub> > MRF<sub>2</sub> > MRF<sub>4</sub> > MRF<sub>7</sub> > MRF<sub>6</sub> > MRF<sub>8</sub> (Fig. 3.5.A).

En la preparación de las muestras para SDS-PAGE, sólo precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) los sobrenadantes de cultivo de MRF<sub>1</sub>, MRF<sub>5</sub>, MRF<sub>6</sub> y MRF<sub>9</sub>. El TCA es el agente caotrópico más efectivo para precipitar las proteínas a partir de disoluciones diluidas. No se conoce bien el mecanismo de precipitación, pudiendo ser la agregación hidrofóbica la vía dominante (Yvon y col., 1989). Aunque la precipitación con TCA es un método rápido de limpieza y concentración, presenta varios inconvenientes: desnaturaliza a las proteasas (Novák y Havlicěk, 2016); requiere de una concentración mínima de proteína para generar turbidez y precipitar, de al menos 10 µg/ mL de BSA (Choi y col., 1993); no es útil para

precipitar todas las proteínas (por ejemplo, gelatina); el precipitado es difícil de redissolver y es extremadamente ácido, lo que hace necesario eliminar y neutralizar el TCA residual debido a que afecta la separación electroforética (Novák y Havlicěk, 2016).

Además del control, solo en la muestra MRF<sub>2</sub> se detectó actividad lítica y proteolítica extracelular. Se logró recuperar, redissolver, separar y visualizar al menos 14 proteínas (80, 56, 52, 43, 41, 35, 34, 30, 24, 18 y 16) kDa y 3 bandas de peso molecular > 97 kDa (Fig. 3.5.B).

Se detectaron dos bandas con actividad caseinolítica en las muestras MRF<sub>9</sub> y MRF<sub>2</sub> concentradas por UF de 28 kDa y 18 kDa, respectivamente. Adicionalmente se detectó una proteasa extracelular de alto peso molecular (>250 kDa) que hidrolizó a la caseína cuando el medio se formuló con PP (MRF<sub>1</sub> y MRF<sub>9</sub>) y no BP (MRF<sub>2</sub>) (Fig. 3.5.C). Se detectaron dos gelatinasas de 100 kDa y de 25 kDa en MRF<sub>2</sub> (Fig. 3.5.D). La gelatina copolimerizada migró durante la electroforesis por lo que se puede confundir con la actividad proteolítica. Para evitar este artefacto se continuó el estudio con caseína como sustrato.

La actividad PGH se determinó empleando células liofilizadas *M. lysodeikticus* y *S. aureus* de manera simultánea. En todas las muestras se detectó la PGH de 76 kDa en el gel con *M. lysodeikticus*, sin la necesidad de concentrar ni de neutralizar los sobrenadantes de cultivo, pero sólo se detectó la banda de alto peso molecular (130 kDa) en MRF<sub>2</sub> y en el control (resultado que no se muestra). Ambas PGHs no fueron activas sobre las células de *S. aureus*. Sin embargo, se detectaron dos bandas de mayor intensidad, de aproximadamente 34 kDa y 19 kDa, que lisaron la pared celular del patógeno y en menor medida sobre *M. lysodeikticus* (Fig. 3.5.E).

El ensayo de la actividad proteolítica se realizó por difusión en agar en pozo ya que fue más sensible que la técnica de difusión en disco (apéndice C). El diámetro promedio (n= 3) de los halos de hidrólisis en las muestras correspondió a 20 mm en

MRF<sub>9</sub>, 15 mm en MRF<sub>1</sub>, 12 mm en MRF<sub>5</sub> y 13 mm en MRF<sub>6</sub>. Debido a que en este ensayo las muestras no se neutralizaron, el ácido láctico difundió y precipitó al caseinato de calcio por lo que se visualizó una zona blanca dentro del halo de proteólisis (Fig. 3.5.F). El diámetro promedio del halo de la muestra MRF<sub>2</sub> de 11 mm fue equivalente al producido por una disolución de tripsina de 0.21 ng/μL, (T<sub>1</sub>) (apéndice C).

Se evaluó la actividad lítica de los sobrenadantes de cultivo de los medios MRF<sub>2</sub>, MRF<sub>9</sub> y MRF<sub>1</sub> en cajas de Petri con agar y células liofilizadas de *M. lysodeikticus* ATCC 4698. Las cajas se incubaron a 30 °C durante 20 h, como en el ensayo con lisozima (apéndice D). Sin embargo, no se observaron los halos de inhibición ni tampoco cuando se empleó un cultivo fresco del microorganismo estándar. Por lo anterior, se continuó el estudio analizando los zimogramas.

Para corroborar la detección de la actividad caseinolítica se estudió el efecto de los componentes del medio a dos diferentes concentraciones de los hidrolizados de proteína (5 y 10) g/L, del extracto de levadura (2.5 y 4.0) g/L, glucosa (5 y 10) g/L, con y sin extracto de carne (5 g/L). Para efectos comparativos se emplearon los medios MRS comerciales disponibles (Difco™ y Oxoid™), el medio con sacarosa y el control (MRF<sub>9</sub>). Para descartar el efecto del ácido láctico, los sobrenadantes, libres de células, se neutralizaron con una solución estéril de NaOH 1 M, expresando la producción de acidez como el volumen requerido del álcali necesario para neutralizar 100 mL de sobrenadante. Adicionalmente se cuantificó, por triplicado, la concentración de carbohidratos reductores y carbohidratos totales, para las muestras del medio elaborado con sacarosa, y se determinó la concentración de proteína tanto en los medios de cultivo como en los sobrenadantes de cultivo neutralizados. Los resultados a las 12 h de cultivo a 30 °C se muestran en el Cuadro 3.4.

**Cuadro 3.4.**

Efecto de la composición del medio de cultivo en la fermentación de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

identificación original	A	B	D	BP	PP	A	C	B	D	BPG	BPS	PPG	PPS	MRF <sub>9</sub>	Difco	Oxoid
identificación por # matraz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>Ingredientes (g/L)</b>																
proteosa peptona	-	-	-	-	5	5	5	10	10	-	-	5	5	10	10	-
bacto peptona	5	10	10	5	-	-	-	-	-	5	5	-	-	-	-	10
extracto de carne	-	-	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	8
extracto de levadura	4	4	4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5	5	4
glucosa	5	5	10	10	10	5	10	5	10	10	-	10	-	10	20	20
sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	10	-	-	-
<b>Resultados</b>																
pH	4.4	4.4	4.3	4.4	4.3	4.6	4.6	4.6	4.3	4.1	5.3	4.1	5.2	4.1	4.2	4.3
D.O. (600 nm)	3.1	3.6	3.9	5.7	6.1	5.1	5.7	6.6	6.6	5.7	2.6	5.5	2.5	7.8	7.1	4.7
proteína inicial (mg /mL)	-	-	-	7.7	9.3	8.1	7.4	14.1	13.9	8.0	8.0	8.5	8.5	16.8	20.7	18.6
proteína final (mg /mL)	-	-	-	6.7	7.4	8.1	7.9	12.4	12.7	5.8	7.3	8.1	7.6	13.3	-	-
CHOS inicial (g/L)	7.8	7.8	15.5	12.7	13.0	6.6	12.9	6.9	12.9	11.6	9.3 <sup>2</sup>	12.1	10.3 <sup>2</sup>	12.7	24.4	21.6
CHOS final (g/L)	0.6	0.2	5.7	4.0	4.4	0.3	4.7	0.3	3.6	1.1	7.1 <sup>2</sup>	1.1	8.8 <sup>2</sup>	0.4	12.9	14.3
CHOS residual (%)	8.1	3.1	36.8	31.2	33.8	4.5	36.4	4.3	27.9	9.3	76.0	9.0	85.0	3.1	52.9	66.2
NaOH (mL)	5.3	5.9	5.7	8.2	7.8	6.2	7.3	6.3	8.4	10.0	3.0	10.0	3.0	11.0	11.4	7.7
Proteasa (kDa)	22	22	22	24	ND	ND	ND	ND	ND	24	ND	25	ND	28	30	ND

Abreviatura. ND: no detectado. <sup>1</sup>: Resultados obtenidos a las 12 h de cultivo incubados a 30 °C en condiciones estáticas. <sup>2</sup>: Concentración de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico (análisis de regresión lineal: n= 10, m= 0.0118, b= -0.0691, r= 0.9901 R<sup>2</sup>= 0.9804).

El menor desarrollo de la cepa correspondió a las formulaciones con 10 g/L de sacarosa (matraces: #11 y #13) y el mayor se obtuvo en el MRF<sub>9</sub> formulado con 10 g/L de glucosa (matraz #14). Los resultados de las muestras de los matraces #1 y #2 son similares, a pesar de que en la formulación del matraz #2 se adicionó el doble de la concentración de BP (10 g/L), y también fueron cercanos los resultados de las muestras #2 y #3, a pesar de que en el matraz #3 se adicionó el doble de la concentración de glucosa (10 g/L) encontrando 36.8 % de carbohidratos sin fermentar. El efecto positivo del extracto de carne en el desarrollo de la cepa se observó con las formulaciones de los matraces #1, #2 y #3, que no lo contienen, y en donde se obtuvo el menor crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042.

En todas las muestras el contenido de carbohidratos reductores fue mayor a lo esperado, aportado por los extractos de carne y de levadura. Debido a que en los medios formulados con BP no se observaron cambios importantes en el crecimiento, a pesar de las diferentes concentraciones empleadas de bactopectona (5 g/L y 10 g/L) y del extracto de levadura (2.5 g/L y 4 g/L), algunos componentes del extracto de carne, como carbohidratos fermentables, hierro, ribosa y nucleótidos, influyeron positivamente en el desarrollo de la cepa.

El valor de D.O., de los medios con sacarosa fue de 2.5 sin importar la fuente de nitrógeno y los medios con glucosa obtuvieron una D.O., promedio de 5.6. A partir de estos resultados se corroboró que la cepa ATCC 8042 no hidrolizó a la sacarosa y que el desarrollo del cultivo fue resultado del poder reductor que aportaron los extractos de carne y levadura.

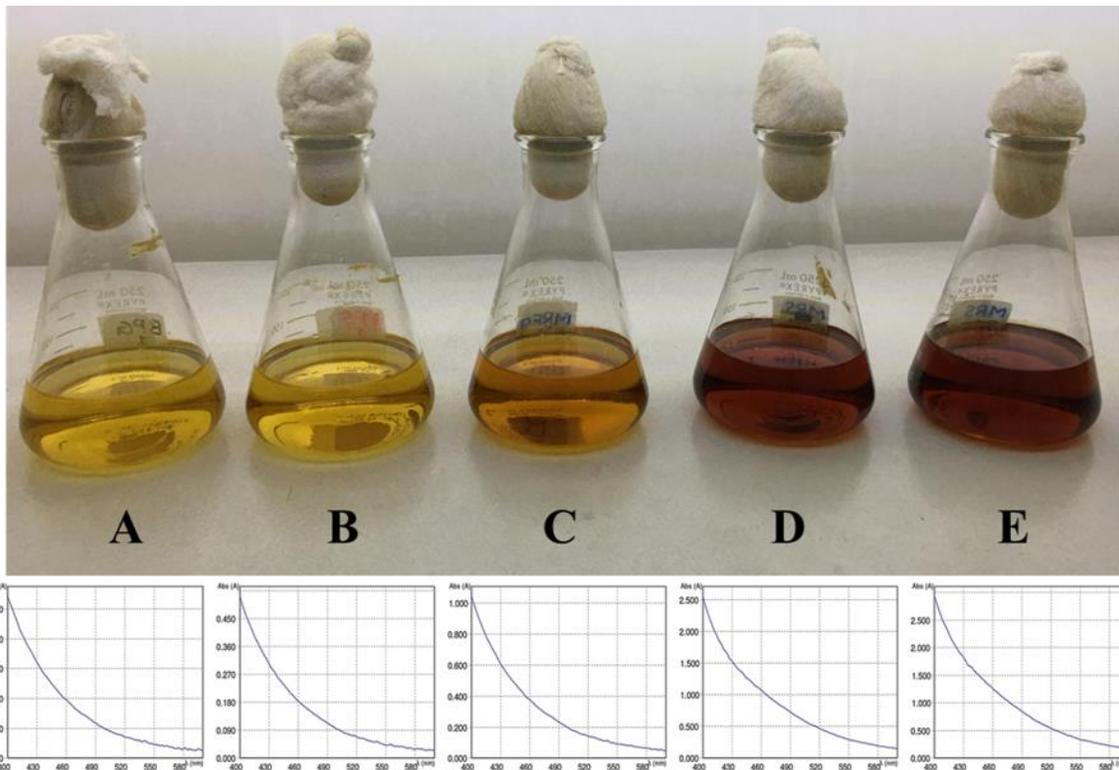
Los hidrolizados de proteína se evaluaron a dos niveles de concentración 5 y 10 (g/L), las formulaciones con BP, que es un hidrolizado enzimático de origen animal, corresponden a las muestras de los matraces # (1, 2, 3, 4, 10 y 11). Los mayores valores de D.O., se obtuvieron con las formulaciones de los matraces #4 y #10, ambos con una concentración de 5 g/L de BP, 5 g/L de extracto de carne, 2.5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de glucosa.

La fuente de nitrógeno en las muestras de los matraces de #5 a #9 y de #12 a #16 fue PP. La formulación con el mayor crecimiento D.O., 7.8 correspondió al matraz #14, seguido de los matraces #8 y #9 con una D.O., de 6.6, todas con una concentración de 10 g/L del hidrolizado. El crecimiento de la cepa en los matraces #7 y #12 fue prácticamente el mismo. Finalmente, las formulaciones con 5 g/L de PP (matraces # 5, 6, 7 y 12) alcanzaron un valor promedio de D.O., de 5.0.

Considerando lo anterior, se determinó el barrido espectral en la región visible de tres medios modificados ( $MRS_{Mod}$ ) en donde se detectó la proteasa, formulados con glucosa (10 g/L) y bacto peptona (5 g/L) (A), glucosa (10 g/L) y proteosa peptona (5 g/L) (B), glucosa (10 g/L) y proteosa peptona (10 g/L) (C) y los caldos MRS Oxoid™ (D) y Difco™ (E) (Fig. 3.6.) para relacionar el valor de absorbancia generada en cada muestra con la cantidad de pigmentos producidos durante la esterilización de los medios de cultivo, dada su reconocida actividad antimicrobiana.

A la longitud de onda de 420 nm los medios de cultivo comerciales alcanzaron valores de absorbancia mayores a 1.5, la muestra C ( $MRF_9$ ) un valor de 0.8 y las muestras A y B obtuvieron valores de 0.4. Por lo que la reducción del 50 % en el contenido de glucosa, hidrolizado de proteína, extracto de carne y extracto de levadura redujo 4 veces la absorbancia de los medios de cultivo MRS modificados.

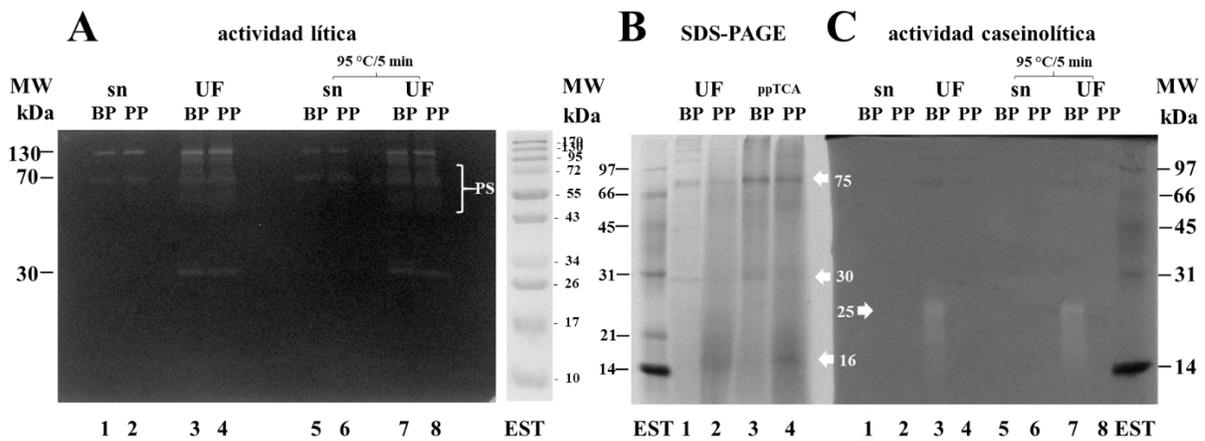
La formación de pigmentos y la formación de 5-hidroximetil-2-furfural que ocurren durante la etapa inicial de la reacción de Maillard se han detectado a una longitud de onda de 420 nm, mientras que la detección de compuestos de pirazina a 280 nm (Echevarría y col., 2016).



**Figura 3.6. Comparación de color de los medios de cultivo formulados en el laboratorio y comerciales, y sus barridos espectrales correspondientes.**  
**A:** MRS<sub>Mod</sub> formulado con glucosa (10 g/L) y bacto peptona (5 g/L) (matraz #10),  
**B:** MRS<sub>Mod</sub> formulado con glucosa (10 g/L) y proteosa peptona (5 g/L) (matraz #12),  
**C:** MRF<sub>9</sub>, formulado con glucosa (10 g/L) y proteosa peptona (10 g/L) (matraz #14),  
**D:** MRS Oxoid™ (20 g/L de glucosa y 10 g/L de peptona) (matraz #16) y **E:** MRS Difco™ (20 g/L de glucosa y 10 g/L de proteosa peptona No. 3) (matraz #15). El número de matraz corresponde a la identificación de muestras del cuadro 3.4.

Aunque no fue un objetivo reducir el color de los medios de cultivo, fue importante considerarlo debido a la amplia gama de compuestos derivados de la reacción de Maillard, que han sido asociados con su capacidad antioxidante (Chen y Kitts, 2008), actividad antiinflamatoria (Chen y Kitts, 2012), actividad antimicrobiana (Einarsson y col., 1983; Schirru y col., 2013), escisión del DNA bacteriano, así como alteraciones en la permeabilidad y funcionalidad de la membrana celular (Rurián y Morales, 2008). Las modificaciones químicas de las proteínas generan una menor disponibilidad de nutrientes y el desarrollo de color puede interferir en su cuantificación, en los ensayos enzimáticos, y en su identificación por secuencia.

En todas las muestras analizadas la concentración de proteína fue mayor cuando se utilizó PP que BP, empleados al mismo nivel en la formulación. Aunque el contenido de nitrógeno total y el de aminoácidos en la BP (15.4 % y 3.5 %, respectivamente) y en la PP (14.3 % y 2.8 %, respectivamente) son similares, la PP contiene en mayor porcentaje de péptidos de peso molecular superior a los 10 kDa (*Bionutrients BD*, 2006). En ese sentido, la PP debe ser un mejor inductor de proteasas que la BP. Por lo anterior se estudió el efecto de la fuente de peptona sobre la actividad proteolítica y lítica (Fig. 3.7.).



**Figura 3.7. Efecto del tipo de peptona sobre la actividad extracelular de los sobrenadantes de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 en MRS<sub>Mod.</sub>** (SDS-PAGE, 12.5 % T) **A.** Actividad lítica sobre células de *M. lysodeikticus*. **B.** Perfil proteínico y **C.** Actividad caseinolítica – mismo gel – (12.5 % T). Muestras: sobrenadantes de cultivo neutralizados de medio formulado con bacto peptona (carril 1 y 5), sobrenadantes de cultivo neutralizados de medio formulado con proteosa peptona (carril 2 y 6), sobrenadantes de cultivo neutralizados y concentrados por ultrafiltración del medio formulado con bacto peptona (carril 3 y 7), sobrenadantes de cultivo neutralizados y concentrados por ultrafiltración del medio formulado con proteosa peptona (carril 4 y 8). EST: estándar de peso molecular (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas; SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, BIO-RAD*) (*Gel Doc XR+ Imaging System, Image Lab 3.0, BIO-RAD*). Abreviaturas. Sn: sobrenadante neutralizado; UF: muestra de sobrenadante neutralizado concentrado por ultrafiltración; BP: bacto peptona; PP: proteosa peptona; ppTCA: precipitación con ácido tricloroacético; PS: perfil secundario de lisis.

Dos bandas líticas de aproximadamente 30 kDa se detectaron en el medio formulado con BP (Fig. 3.7.A, carril 3) y sólo una cuando se empleó PP (carril 4). Un resultado similar se obtuvo cuando células liofilizadas de *L. monocytogenes* ATCC 15313 se utilizaron como sustrato (Corona, 2018). Se observó el mismo perfil de bandas líticas secundarias en las muestras concentradas sobre las células de *M. lysodeikticus*, independientemente del origen del hidrolizado de proteína (carriles 3 y 4). Las bandas líticas fueron termorresistentes (carriles 7 y 8). La proteasa de 25 kDa con actividad caseinolítica se detectó en BP (Fig. 3.7.C, carriles 3 y 7), pero no se detectó actividad proteolítica en PP (carriles 4 y 8). El perfil proteínico fue similar en ambas muestras (Fig. 3.7.B). Las principales bandas de proteína que se detectaron fueron de 75 kDa, 30 kDa y 16 kDa.

Se analizaron las muestras de los matraces 6 a 14 para poder comparar y definir las condiciones en las que se produce la proteasa en los medios de cultivo elaborados con PP. Se incluyeron las muestras de los sobrenadantes de cultivo formulados con BP y PP, sin inocular y concentrados por UF, como controles negativos del ensayo de actividad caseinolítica (Fig. 3.8.).

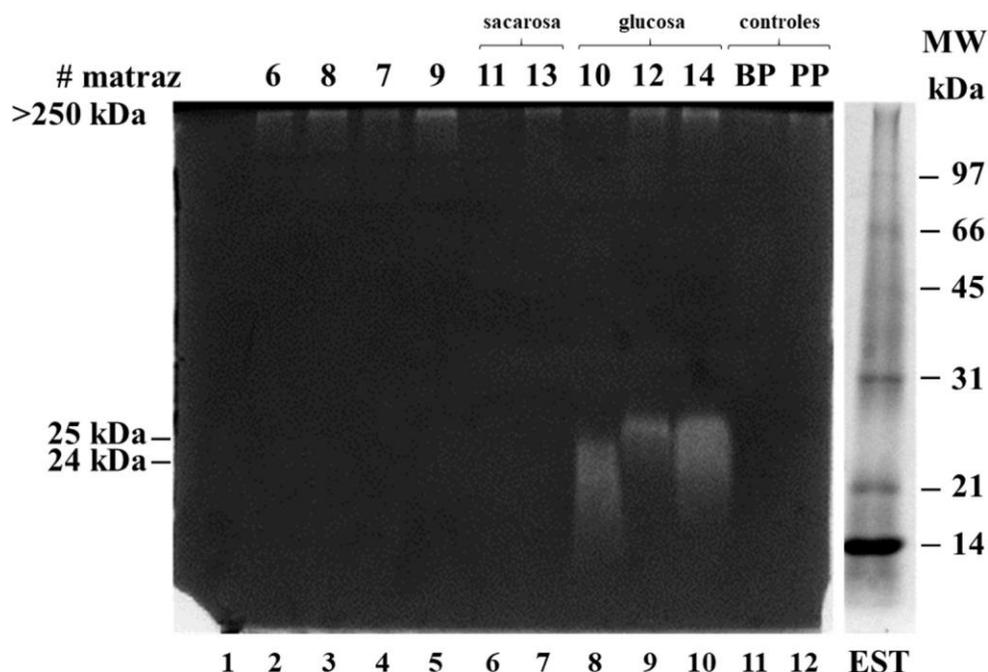
En todas las muestras formuladas con PP, incluido el control (carril 12), se detectó la banda de alto peso molecular (> 250 kDa), por lo que puede corresponder a la actividad enzimática residual de la proteasa empleada en la producción de la proteosa peptona.

Aunque la composición del medio de cultivo fue la misma para los matraces # (5, 7 y 12), los resultados fueron diferentes. Se alcanzó una mayor D.O. y el pH fue mayor a 4.1 para los matraces #5 y #7, la concentración de carbohidratos sin fermentar (33.8 % y 36.4 %, respectivamente) también fue mayor que en la muestra del matraz #12 (9.0 %). El microorganismo produjo la proteasa cuando alcanzó al menos una densidad óptica de 5.5 y fermentó el 90 % de los carbohidratos con la producción suficiente de ácido láctico para reducir 2.5 unidades de pH en el sobrenadante de cultivo formulado con 5 g/L de PP y 10 g/L de glucosa (matraz #12) (Fig. 3.8., carril

9). Se encontró que, a mayor concentración de proteína inicial en el medio, 16.8 mg/mL (matraz #14) vs. 8.5 mg/mL (matraz #12), mayor tamaño e intensidad de la banda proteolítica (carril #10).

La concentración de glucosa en el medio influyó en la expresión de la proteína con actividad caseinolítica como se ha reportado para cepas de *Lactococcus* (Guédon y col., 2021).

### actividad caseinolítica



**Figura 3.8. Comparación de la actividad proteolítica sobre caseína de los sobrenadantes de cultivo.** (SDS-PAGE, 12.5 % T). Muestras de los sobrenadantes de cultivo neutralizados y concentrados por UF. Identificación de matraces. **#6:** MRS<sub>Mod</sub> formulado con glucosa (5 g/L) y bacto peptona (5 g/L). **#8:** MRS<sub>Mod</sub> formulado con glucosa (5 g/L) y proteosa peptona (10 g/L). **#5:** MRS<sub>Mod</sub> formulado con glucosa (10 g/L) y proteosa peptona (5 g/L). **#9:** MRS<sub>Mod</sub> formulado con glucosa (10 g/L) y proteosa peptona (10 g/L). **#11:** MRS<sub>Mod</sub> formulado con sacarosa (10 g/L) y bacto peptona (5 g/L). **#13:** MRS<sub>Mod</sub> formulado con sacarosa (10 g/L) y proteosa peptona (5 g/L). **#10:** MRS<sub>Mod</sub> formulado con glucosa (10 g/L) y bacto peptona (5 g/L). **#12:** MRS<sub>Mod</sub> formulado con glucosa (10 g/L) y proteosa peptona (5 g/L). **#14:** MRF<sub>9</sub>, formulado con glucosa (10 g/L) y proteosa peptona (10 g/L). Muestras control. BP: bacto peptona; PP: proteosa peptona. El número (#) de matraz corresponde a su identificación en el cuadro 3.4. EST: estándar de peso molecular (*Molecular Weight Standards, Low Range, BIO-RAD*). Incubación en amortiguador Tris-HCl (50 mM, pH 8), adicionado de CaCl<sub>2</sub> (5 mM) y NaCl (200 mM), durante 20 h a 30 °C. Tinción con azul de Coomassie R-250. Digitalización y análisis de la imagen mediante fotodocumentador (*Gel Doc XR+ Imaging System, BIO-RAD*).

*P. acidilactici* ATCC no produce proteasas a las 12 h de fermentación a 30 °C en el medio con sacarosa y BP o PP (carriles 11 y 12, respectivamente). El microorganismo se desarrolló lo suficiente para producir proteasas extracelulares a partir de una concentración de 10 g/L de glucosa, 5 g/L de proteosa peptona, 5 g/L

de extracto de carne, 2.5 g/L de extracto de carne suplementado con sales y minerales (matraz #12). Al disminuir en un 50 % los macrocomponentes del medio MRS original, disminuyó el efecto represor de la glucosa y aminoácidos, con lo que también se logró reducir significativamente el color de los sobrenadantes.

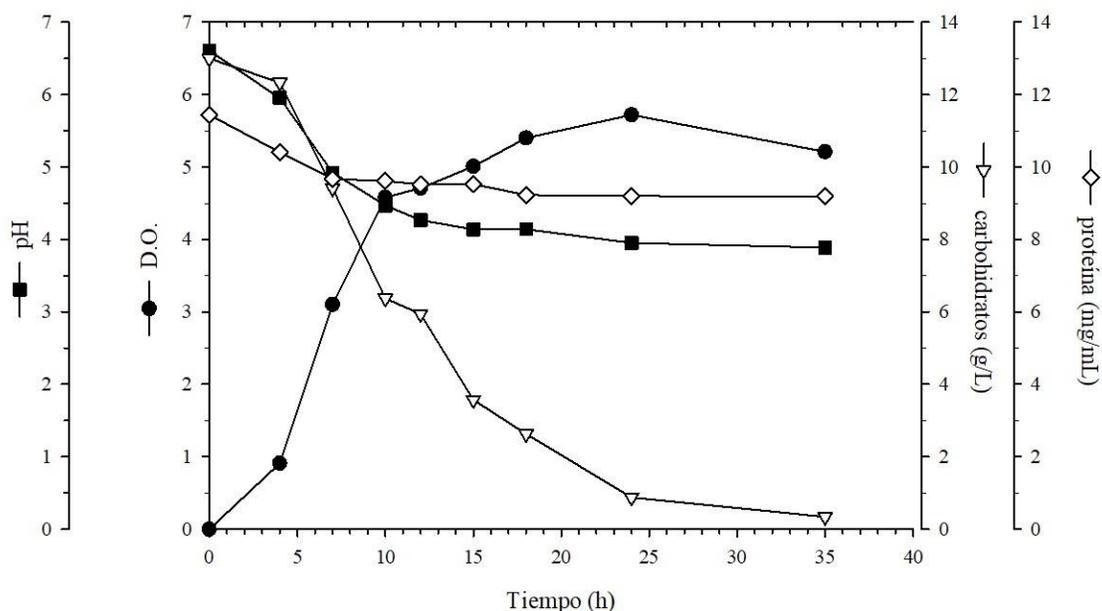
Con estos resultados, se diseñó el experimento para obtener la curva de crecimiento de la cepa ATCC 8042 con la formulación del MRS<sub>Mod</sub> identificada con el matraz #12 que contiene una reducción del 50 % de ingredientes respecto al medio comercial Difco™ . La fermentación se monitoreó durante 35 h, se evaluaron los mismos parámetros y se realizó la caracterización de los perfiles electroforéticos y los zimogramas de los sobrenadantes de cultivo neutralizados y concentrados para cada tiempo de fermentación. Los resultados se muestran en el Cuadro 3.5.

**Cuadro 3.5.**  
Fermentación de *P. acidilactici* ATCC 8042 en MRS<sub>Mod</sub><sup>1</sup>

tiempo (h)	0 <sup>2</sup>	4	7	10	12	15	18	24	35
D.O. (600 nm)	0.0	0.9	3.1	4.6	4.7	5.0	5.4	5.7	5.2
pH	6.6	5.9	4.9	4.5	4.3	4.1	4.1	4.0	3.9
carbohidratos (g/L)	13.0	12.3	9.4	6.4	5.9	3.6	2.6	0.9	0.3
proteína (mg/mL)	11.4	10.4	9.7	9.6	9.5	9.5	9.2	9.2	9.2

<sup>1</sup>: valores promedio (n= 3; CV < 3 %).

<sup>2</sup>: medio de cultivo sin inocular como blanco del ensayo.



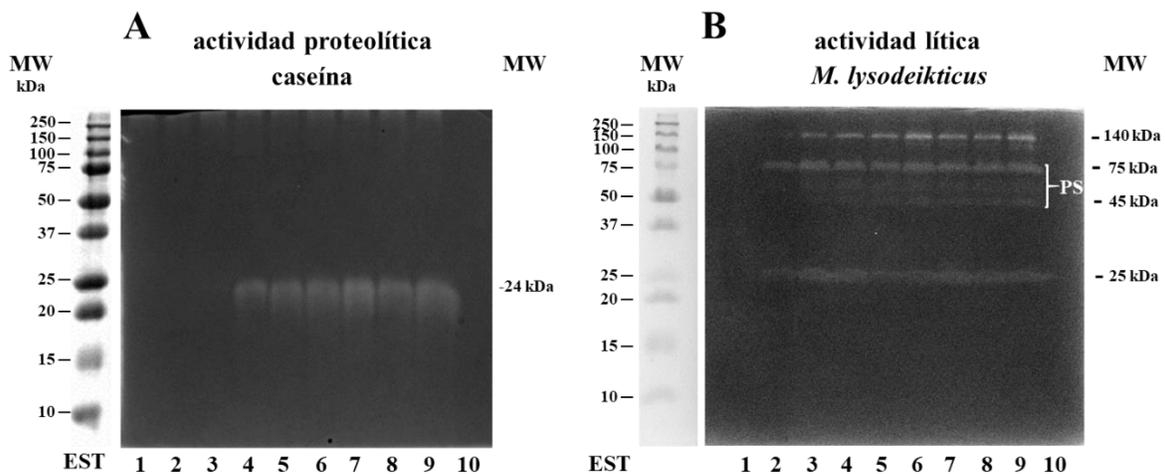
**Figura 3.9. Curva de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 en medio MRS<sub>Mod</sub> bajo condiciones estáticas a 30 °C.**

Se obtuvo la curva característica del crecimiento bacteriano (Figura 3.9.). La fase lag ocurrió en el intervalo de 0 a 4 h, durante esta etapa no hubo cambios importantes en la D.O., el microorganismo consumió el 5.3 % de los carbohidratos. La fase logarítmica ocurrió aproximadamente entre las 4 h y hasta las 10 h de fermentación. En este intervalo de tiempo se consumieron 5.9 g/L de glucosa (45.4 %) y se incrementó la D.O., en 3.7 unidades. En la fase estacionaria se consumió el resto de la glucosa.

El valor de pH disminuyó rápidamente en la fase exponencial de crecimiento y prácticamente se alcanzó el de pKa del ácido láctico. A pesar de la tolerancia que poseen las LAB al ácido láctico, la acumulación de esta molécula influye en su fisiología, daña el potencial de membrana y modifica el pH del citosol, afectando su metabolismo y provocando la desnaturalización de proteínas lo que conduce a la muerte celular (Papadimitriou y col., 2015).

El valor de proteína inicial en el medio correspondió a 11.4 mg/mL y el consumo de proteína durante las primeras 10 h fue de 1.8 mg/mL. Se consumió la proteína al inicio de la fermentación y no en condiciones de escasez de carbohidratos. Lo esperado es que el microorganismo utilice primero los aminoácidos y bases nitrogenadas provenientes de los extractos de carne y levadura, posteriormente, los aminoácidos aportados por la proteosa peptona.

Se evaluó la actividad proteolítica y lítica de los sobrenadantes concentrados de la fermentación (Figura 3.10.). Con la reducción de hasta un 50 % de los principales componentes del medio ( $MRS_{Mod}$ ), con respecto a la formulación del medio comercial, se alcanzó una menor densidad celular, pero fue adecuada para detectar tanto la actividad lítica como la proteolítica con una significativa disminución del color de los sobrenadantes de cultivo.

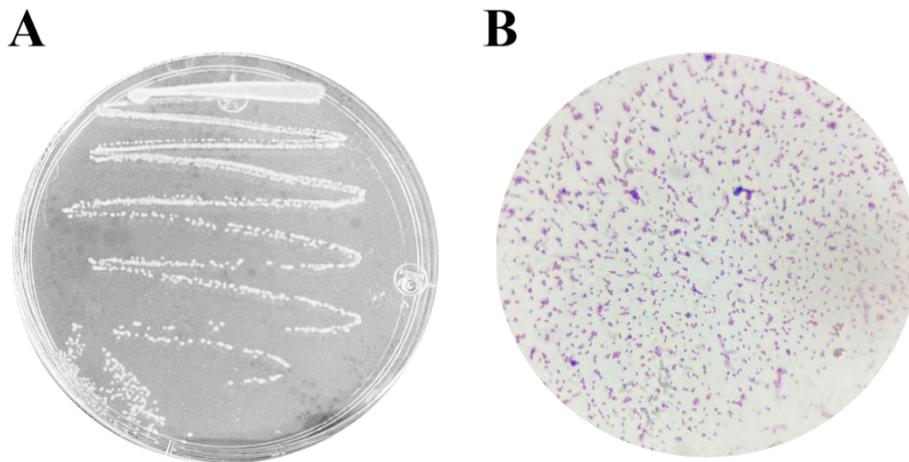


**Figura 3.10. Actividad enzimática extracelular de la curva de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 en  $MRS_{Mod}$  por zimografía. (SDS-PAGE, 12.5 % T). A. Actividad proteolítica y B. Actividad lítica. Muestras de los sobrenadantes de cultivo neutralizados y concentrados por ultrafiltración. Tiempo de fermentación: medio de cultivo sin inocular (carril 1); 4 h (carril 2); 7 h (carril 3); 10 h (carril 4); 12 h (carril 5); 15 h (carril 6); 18 h (carril 7); 24 h (carril 8); 35 h (carril 9). EST: estándares de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color, BIO-RAD*). PS: perfil secundario de lisis. Digitalización y análisis de la imagen mediante fotodocumentador (*Gel Doc XR+ Imaging System, BIO-RAD*).**

La proteasa de 25 kDa (Fig. 3.10.A) fue detectada en la fase exponencial tardía del crecimiento que correspondió a las 10 h de fermentación con el consumo del 50 % de glucosa y un valor de pH 4.5.

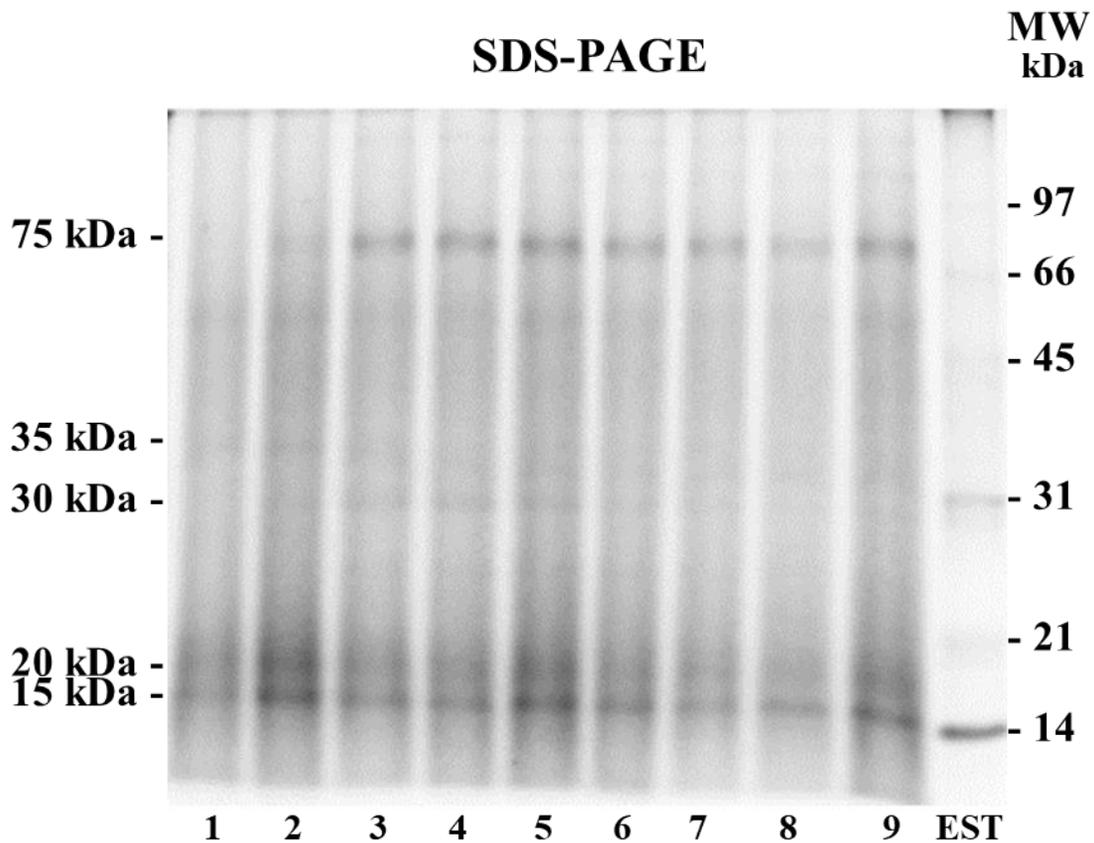
Se detectaron las tres PGHs sobre células de *M. lysodeikticus* en la fase exponencial de la curva de crecimiento: las bandas de 75 kDa y de 25 kDa, a las 4 h de cultivo (carril 2), y la banda de 140 kDa hasta las 7 horas de cultivo (carril 3). El PS se detectó a partir de las 7 h y abarcó el intervalo de 45 a 75 kDa (Fig. 3.10.B).

Se tomó una asada del último matraz de la fermentación de la cepa, se sembró en agar MRS y se realizó la tinción de Gram. A las 24 h se observó el crecimiento característico: pequeñas colonias circulares (< 1 mm) de color blanco (Fig. 3.11.A) y no se observaron cambios en su morfología (Figura 3.11.B), por lo tanto, las células fueron viables al final de la curva de crecimiento, y no se observó lisis celular.



**Figura 3.11 Evaluación de pureza del cultivo *P. acidilactici* ATCC 8042 a las 35 h de fermentación. A.** Colonias en agar MRS (Difco™). **B.** Tinción de Gram. Imagen capturada con el Microscopio Biológico Binocular Digital de campo claro DMS-653.

Se obtuvo el perfil proteínico por SDS-PAGE de las muestras de los sobrenadantes precipitados con TCA de cada tiempo de fermentación (Figura 3.12.). El perfil fue similar entre las muestras detectando 7 bandas de proteína con (15, 20, 30, 35, 75) kDa y dos bandas tenues con pesos moleculares mayores a 97 kDa.



**Figura 3.12. Perfil proteínico de la curva de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 en MRS<sub>Mod.</sub>** (SDS-PAGE, 12.5 %T). Muestras de los sobrenadantes de cultivo precipitados con TCA. Tiempo de fermentación: medio de cultivo sin inocular (carril 1); 4 h (carril 2); 7 h (carril 3); 10 h (carril 4); 12 h (carril 5); 15 h (carril 6); 18 h (carril 7); 24 h (carril 8); 35 h (carril 9). EST: estándares de peso molecular (*SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, BIO-RAD*). Tinción con azul de Coomassie G-250 (*PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific*). Adquisición de imagen mediante fotodocumentador (*Gel Doc XR+ Imaging System, Image Lab 3.0, BIO-RAD*).

El perfil secundario de lisis podría potencializar la actividad bacteriolítica de la cepa ante la falta de nutrientes u otras condiciones desfavorables. La degradación de las PGHs por proteasas puede contribuir con las bandas de bajo peso molecular (de entre 15 kDa a 20 kDa) observadas en los zimogramas con *S. aureus* que retienen actividad lítica.

#### 4. Conclusiones

Se detectó y caracterizó la actividad lítica y/o proteolítica por zimografía en los sobrenadantes de cultivo de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

El medio de cultivo para la detección de ambas actividades extracelulares se formuló con glucosa (10 g/L), proteosa peptona (5 g/L), extracto de carne (5 g/L) y extracto de levadura (2.5 g/L), (MRS<sub>Mod</sub>), con lo que se logró reducir significativamente el obscurecimiento no enzimático.

Se detectaron 3 bandas líticas termoestables sobre células de *M. lysodeikticus* con un peso molecular promedio de 30 kDa, 77 kDa y 140 kDa. La hidrólisis de la pared celular del sustrato estándar fue independiente de la fuente de carbono (glucosa o sacarosa), del hidrolizado de proteína (bactopeptona o proteosa peptona) y de la adición o no de detergente (*Tween* 80). Sólo la PGH de 30 kDa mostró actividad sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 13565.

El perfil de bandas líticas sobre *S. aureus*, fue diferente al del microorganismo de referencia debido en gran medida a la diferente composición de la pared celular.

La principal banda lítica de 77 kDa se produjo a las 4 h de fermentación en el medio MRS<sub>Mod</sub>. Varias bandas líticas adicionales de entre 45 kDa a 75 kDa se detectaron a partir de las 7 y hasta las 35 h de fermentación.

*Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 produce una proteasa extracelular con actividad sobre caseína y gelatina, verificada por pruebas de difusión en agar, de aproximadamente de 25 kDa en la fase exponencial tardía de crecimiento, independientemente del hidrolizado de proteína empleado.

La proteosa peptona es mejor inductor de proteasas por su mayor contenido de péptidos de alto peso molecular.

Las diferencias encontradas en los pesos moleculares de las enzimas disminuyeron conforme se redujo el obscurecimiento no enzimático del medio de cultivo.

La cepa no es autolítica ni fue capaz de utilizar a la sacarosa como fuente de carbono bajo las condiciones de ensayo descritas.

Se obtuvo el perfil proteínico de los sobrenadantes de cultivo de la cepa en el MRS<sub>Mod</sub>. Fue consistente detectar a la banda de 75 kDa, que corresponde a la primera banda lítica detectada por zimografía.

La degradación de las PGHs por proteasas puede contribuir con las bandas de bajo peso molecular, que retienen actividad lítica, observadas en los zimogramas con *S. aureus*.

## 5. Perspectivas

Identificar a las proteínas con actividad enzimática extracelular por espectrometría de masas.

Purificar a la enzima de peso molecular cercano a los 30 kDa para su caracterización bioquímica.

Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana sobre microorganismos de interés sanitario.

## 6. Bibliografía

1. Alcorlo, M., Martínez-Caballero, S., Molina, R. y Hermoso, J. (2017). Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 44(19): 87-100.
2. Attri, P., Jodha, D. y Singh, J. (2018). Purification, kinetic and functional characterization of membrane bound dipeptidyl peptidase-III from NCDC 252: a probiotic lactic acid bacteria. *Molecular Biology Reports*, 45(5): 973-986.
3. Barbosa, P. (2018). Caracterización de la actividad antimicrobiana de la proteína recombinante de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 de 110-kDa. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.
4. BD Biosciences (2015) BD Bionutrients Technical Manual. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/lcn01558-bionutrients-manual.pdf>.
5. BD Biosciences. (2006). BD Bionutrients Technical Manual. Fourth Edition. Disponible en: <https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/misc/lcn01558-bionutrients-manual.pdf>
6. Bhowmik, T. y Marth, E. (1990). Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* Species in Cheese Ripening: A Review. *Journal of Dairy Science*, 73(4): 859-866.
7. Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4): 665-684.
8. Bosma, E., Forster, J. y Nielsen, A. (2017). Lactobacilli and pediococci as versatile cell factories –Evaluation of strain properties and genetic tools. *Biotechnology Advances*, 35(4): 419-442.
9. Briggs, M. (1953). An improved medium for lactobacilli. *Journal of Dairy Research*, 20(1): 36-40.
10. Carr, F., J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281-370.
11. Chapot-Chartier, M. (2010). Bacterial autolysins. In: Prokaryotic Cell Wall Compounds, Eds H. König, H. Claus y A. Varna (Berlin, Heidelberg: Springer Verlag), 383–406.
12. Chapot-Chartier, M. y Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(1): 1-23.
13. Chen X. M. y Kitts D. D. (2012). Characterization of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioactive fractions recovered from a glucose-lysine Maillard reaction model system. *Molecular Cellular Biochemistry*, 364(1-2): 147-157.
14. Chen X. M. y Kitts D. D. (2008). Antioxidant activity and chemical properties of crude and fractionated Maillard reaction products derived from four sugar-amino acid Maillard reaction model systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126(1): 220-224.
15. Cho, S., Yang, J., Park, S., Kim, B., y Seo, S. (2019). Complete Genome Sequence of Lactic Acid Bacterium *Pediococcus acidilactici* Strain ATCC 8042, an Autolytic Anti-bacterial Peptidoglycan Hydrolase Producer. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(3): 483-487.
16. Contreras-Cruz, M. (2020). Producción de proteasas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.

17. Corcoran, B., Stanton, C., Fitzgerald, G. y Ross, R. (2007). Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. *Microbiology Society*, 153(1): 291-299.
18. Corona, A. (2018). Estudio de la actividad peptidoglicano hidrolasa extracelular nativa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
19. De Man, J., Rogosa, M., y Sharpe, M. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1): 130-135.
20. Deguchi, Y. y Morishita, T., (1992). Nutritional Requirements in Multiple Auxotrophic Lactic Acid Bacteria: Genetic Lesions Affecting Amino Acid Biosynthetic Pathways in *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Pediococcus acidilactici*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(6): 913-918.
21. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350–356.
22. Echavarría A., P., Ibarz, A. y Pagán, J. (2016). Kinetics of color development in glucose/ amino acid model systems at different temperatures. *Scientia Agropecuaria*, 7(1): 15-21.
23. Einarsson, H., Snygg, B.G., Eriksson, C. (1983). Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 31(5): 1043-1047.
24. Endo, A. y Dicks, L. (2014). Physiology of the LAB. In: *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. 1st ed. Edited by Wilhelm H. Holzapfel and Brian J. B. Wood, John Wiley & Sons, 13-30.
25. García-Cano, I., Velasco-Pérez, L., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Mendoza-Hernández, G., Llorente-Bousquets, A., y Farrés, A. (2011). Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3): 607-615.
26. García-Carreño, F.L., Dimes, L.E. y Haard, N.F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214(1): 65-69.
27. Gaur, S., y Wadhwa, N. (2008). Alkaline protease from senesced leaves of invasive weed Lantana camara. *African Journal of Biotechnology*, 7(24): 4602-4608.
28. Hayek, S. A., R. Gyawali, S. O. Aljaloud, A. Krastanov y S. A. Ibrahim. (2019). Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of Dairy Reserch*, 86(4): 490–502.
29. Hebert, E., Raya, R. y De Giori, G., (2000). Nutritional Requirements and Nitrogen-Dependent Regulation of Proteinase Activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12): 5316-5321.
30. Holtje, J., V. (1995). From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 164(4): 243-254.
31. Kandler, O. (1983). Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3): 209-224.
32. Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1(3): 1-13.

33. Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K. y Kot, A.M. (2021). Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules*, 26(7):1858.
34. Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M. y col. (2021). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 14: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2021. *European Food Safety Authority Journal*, 19(7): 6689-6692.
35. Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P., Bardowski, J. Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., y Fernández, M. (2015). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria, In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 1-33.
36. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
37. Leclerc, D. y Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*, 35(8): 749-753.
38. Ledesma, O., De Ruiz Holgado, A., Oliver, G., De Giori, G., Raibaud, P. y Galpin, J., (1977). A Synthetic Medium for Comparative Nutritional Studies of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 42(1): 123-133.
39. Lee, T. y Huang, K. (2013). The role of hydrolases in bacterial cell-wall growth. *Current Opinion in Microbiology*, 16 (6): 760-766.
40. Leroy, F. y De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2): 67-78.
41. Llorente-Bousquets, A. (2008). Caracterización de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.
42. Llorente-Bousquets, A., Pérez-Munguía, S. y Farrés, A. (2008). Novel extracelular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(8): 694-699.
43. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
44. Matamoros, S. (2013). Identificación de la actividad lítica de la proteína similar a transportador ABC en *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.
45. Marco, M., Marco, M.L., Sanders, M.E., Gänzle, M., y col. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(1): 196–208.
46. Nandakumar, M.P., Shen, J., Raman, B. y Marten, M.R. (2003). Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research*, 2(1): 89-93.
47. Neuhaus, F. y Baddiley, J. (2003). A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of d-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 67(4): 686-723.

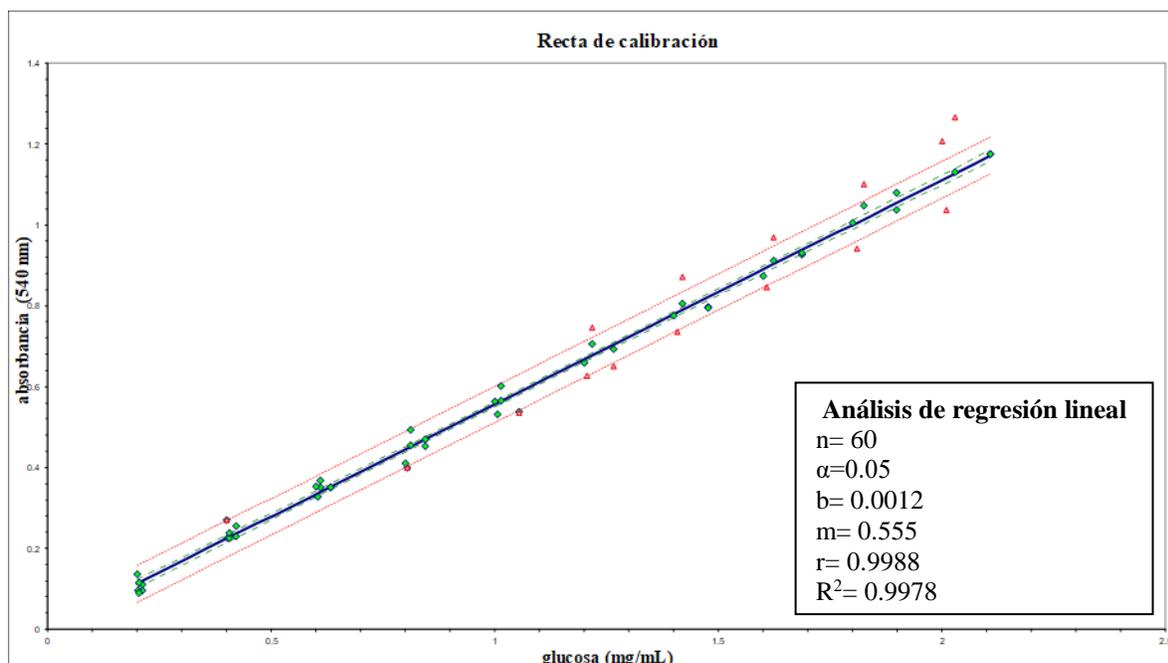
48. Novák, P. y Havlíček, V. (2016). *Protein Extraction and Precipitation. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, Ed. Elsevier B.V., pp. 51–62.
49. Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B.D. y Tsakalidou, E. (2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6(58):1-28.
50. Peterson, G. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2): 346-356.
51. Raccach, M. (2014). *Pediococcus*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1-5.
52. Raghunath, T., M. y Badgujar, S., B. (2010). Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 3(9): 2048-2068.
53. Rogosa, M., Mitchell, J. y Wiseman, R. (1951). A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal Lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, 62(1): 132-133.
54. Rurián-Henares, J.A. y Morales, F.J. (2008). Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7): 2357-2362.
55. Russell, A., Hood, R., Bui, N., LeRoux, M., Vollmer, W. y Mougous, J. (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 475(1): 343-349.
56. Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C., y Marx, H. (2017). The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. *Trends In Biotechnology*, 35(8): 756-769.
57. Schirru, S., Favaro, L., Mangia, N. P., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R. y Todorov, S. D. (2013). Comparison of bacteriocins production from *Enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimised commercial MRS medium. *Annals of Microbiology*, 64(1): 321-331.
58. Schumann, P. (2011). Peptidoglycan Structure. *Taxonomy of Prokaryotes. Methods in Microbiology*, Edited by Fred Rainey, Aharon Oren, 38(1):101-129.
59. Selvarani, G.L., Gopal, P.K., Sullivan, P.A. y Pillidge, C.J. (2000). Varying influence of the autolysin, N-acetyl muramidase, and the cell envelope proteinase on the rate of autolysis of six commercial *Lactococcus lactis* cheese starter bacteria grown in milk. *Journal of Dairy Research*, 67(4): 585–596.
60. Sharma, A., Tewari, R., Rana, S., Soni, R. y Soni, S. (2016). Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(8): 1346-1380.
61. Simitsopoulou, M., Vafopoulou, A., Choli-Papadopoulou, T. y Alichanidis, E. (1997). Purification and partial characterization of a tripeptidase from *Pediococcus pentosaceus* K9.2. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12): 4872-4876.
62. Stiles, M. E. (1996). *Biopreservation by lactic acid bacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4): 331–345
63. Stiles, M. y Holzappel, W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1): 1-29.
64. Stoyanova, L., Ustyugova, E. y Netrusov, A., (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3): 229-243.
65. Sumner, J. (1924). The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 62(2): 287-290.

66. Szweda, P., Schielmann, M., Kotlowski, R., Gorczyca, G., Zalewska, M. y Milewski, S. (2012). Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5): 1157-1174.
67. Vignolo, G., Fadda, S. y Castellano, P., (2008). Bioprotective Cultures. *Meat Biotechnology*, Ed. F. Toldrá, pp.399-424.
68. Vijayaraghavan, P. y Prakash Vincent, S. (2013). A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresol green dye. *Journal of Biochemical Technology*, 4(3): 628-630.
69. Vollmer, W., Blanot, D. y De Pedro, M., (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2): 149-167.
70. Von Schillde, M.A.; Hörmannspurger, G.; Weiher, M.; Alpert, C.A.; Hahne, H.; Bäuerl, C.; Van Huynegem, K.; Steidler, L.; Hrcir, T.; Pérez-Martínez, G.; y col. (2012), Lactocepin secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines. *Cell Host and Microbe*, 11(4): 387–396.
71. Yvon, M., Chabanet, C. y Pélissier, J., (1989). Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions Hypothesis on the precipitation mechanism. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 34(3): 166-176.

**Apéndice A. Determinación de carbohidratos reductores por DNS.** Cinturones de confianza y predicción para la regresión lineal.

Disolución de glucosa. Se preparó una disolución de glucosa (2 mg/mL) en agua desionizada. A partir de esta disolución se prepararon una serie de estándares de 0.2 mg/mL a 2 mg/mL. Disolución de DNS. Se disolvió el tartrato doble de sodio y potasio (30 % m/v) en hidróxido de sodio (1 N) y se adicionó el ácido dinitrosalicílico al 1% (m/v). La disolución se aforó, filtró y almacenó en un frasco ámbar.

A lo largo del estudio se prepararon 6 curvas de calibración. En la Figura A1., se muestra los cinturones de confianza y de predicción para la regresión lineal.



**Figura A1. Recta de calibración de glucosa.** Abreviaturas. n: número de datos;  $\alpha$ : riesgo;  $\blacktriangle$  puntos de calibración dudosos; b= ordenada al origen; m= pendiente; r= coeficiente de correlación; R<sup>2</sup>= coeficiente de determinación; regresión lineal (—); cinturón de confianza (- -) y cinturón de predicción (- - -). Plantilla de calibración lineal elaborada por el M en C Francisco Rojo Callejas.

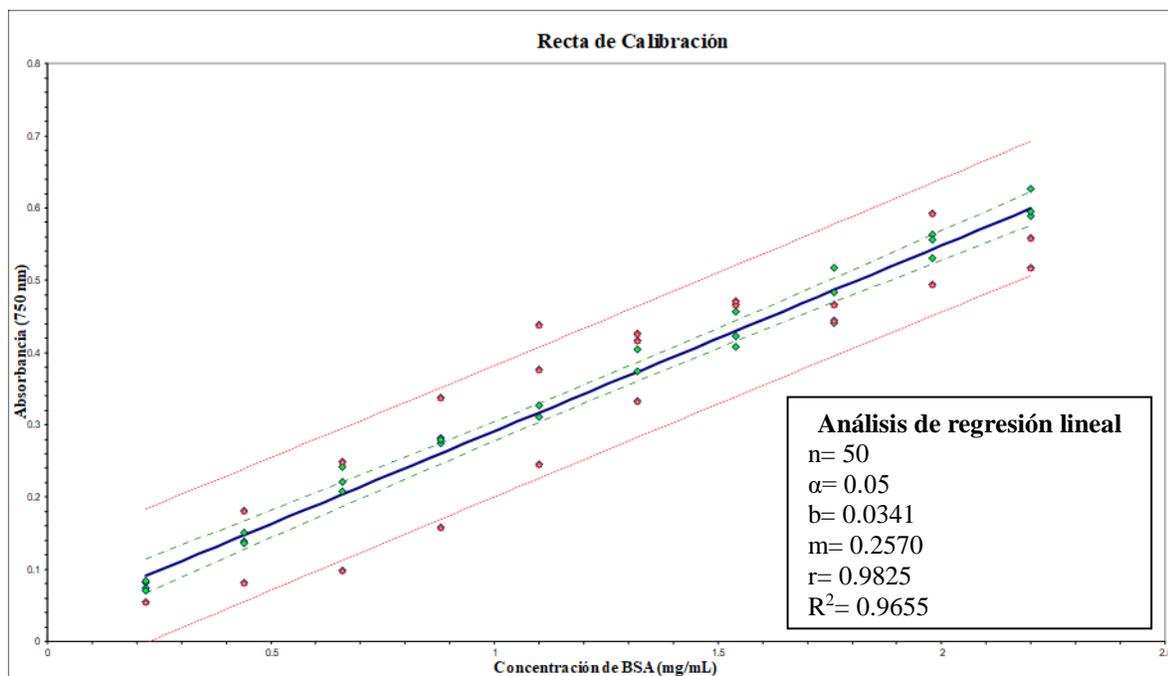
Se calculó el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). El intervalo de confianza sobre los valores de calibración nos permitió rechazar los puntos de calibración ( $x_{std}$ ,  $y_{std}$ ) fuera de la recta (valores aberrantes con un riesgo del 5 %). El intervalo de predicción, mayor al cinturón de confianza de los valores de calibración, permite estimar la incertidumbre de las mediciones de las muestras problema.

**Apéndice B. Determinación de proteína soluble por Lowry.** Cinturones de confianza y predicción para la regresión lineal.

Se preparó una disolución concentrada (*stock*) de albúmina sérico bovina (BSA) (10 mg/mL) en agua. El stock se diluyó para preparar la disolución de trabajo a partir de la cual se prepararon una serie de estándares de 0.2 mg/mL a 2.0 mg/mL.

Disolución alcalina de tartrato de cobre (CTC). Sulfato de cobre al 0.1 %, tartrato de sodio al 0.2 % y carbonato de sodio al 10 %. Al momento del ensayo se mezclan partes iguales del reactivo CTC, NaOH 0.8 N y agua destilada (disolución A) y se diluyó el reactivo de Folin y Ciocalteu con agua destilada (disolución B).

A lo largo del estudio se prepararon 5 curvas de calibración (Fig. B1.).



**Figura B1. Recta de calibración de albúmina sérico bovina (BSA).** Abreviaturas. n: número de datos;  $\alpha$ : riesgo; ▲ puntos de calibración dudosos; b= ordenada al origen; m= pendiente; r= coeficiente de correlación;  $R^2$ = coeficiente de determinación; regresión lineal (—); cinturón de confianza (- -) y cinturón de predicción (- - -). Plantilla de calibración lineal elaborada por el M en C Francisco Rojo Callejas.

**Apéndice C. Determinación de la actividad de la tripsina mediante la técnica de difusión en agar.**

Disolución de tripsina. Se preparó una disolución 0.053 mg/mL de tripsina en HCl 0.001 M. A partir de esta disolución se realizaron 6 diluciones para el ensayo en amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) estéril: 0.21 ng/μL, 0.53 ng/μL, 1.06 ng/μL, 2.12 ng/μL, 5.30 ng/μL y 10.60 ng/μL. De cada disolución se depositaron 50 μL en los pozos formados en el agar solidificado o 30 μL para impregnar discos de papel filtro estériles. Los resultados de la actividad enzimática, determinados mediante la medición de los halos formados se muestran en los Cuadros C1. y C2., respectivamente.

**Cuadro C1.**

Actividad de la tripsina sobre caseinato de calcio por difusión en agar en pozo

30 °C	tripsina (ng)											
	10.6		26.5		53.0		106		265		530	
tiempo (h)	20	40	20	40	20	40	20	40	20	40	20	40
réplicas	halo de actividad proteolítica <sup>1</sup> (mm)											
1	11	12	12	15	13	16	13	17	15	19	16	21
2	11	12	12	14	13	16	13	16	15	19	16	20
3	11	12	11	14	12	16	14	17	15	19	16	20
4	10	12	12	15	14	16	15	17	16	19	17	21
5	10	13	12	15	13	16	14	17	16	19	17	21
promedio	11	12	12	15	13	16	14	17	15	19	16	21

<sup>1</sup>: incluyendo el diámetro del pozo (7 mm; 50 μL muestra).

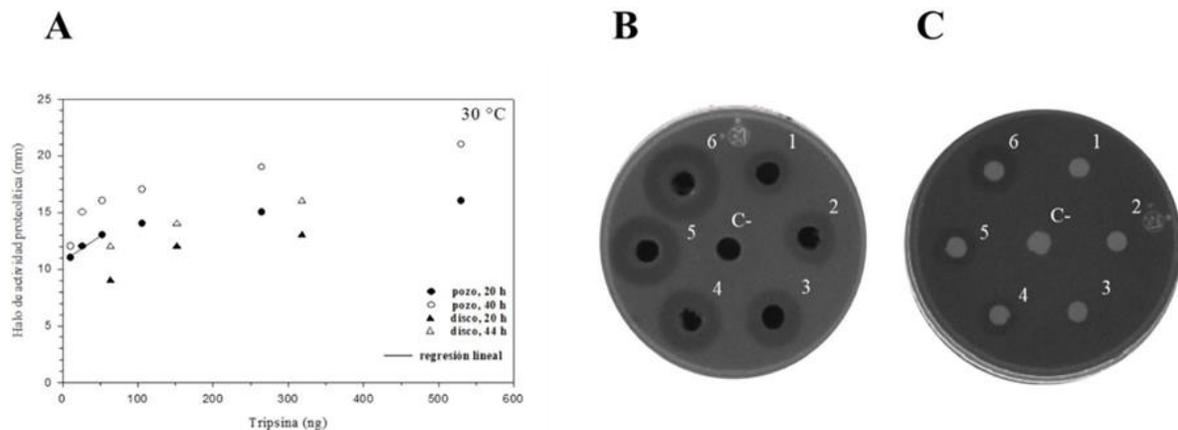
**Cuadro C2.**

Actividad de la tripsina sobre caseinato de calcio por difusión en agar en disco

30 °C	tripsina (ng)											
	6.4		15.9		31.8		63.6		152		318	
tiempo (h)	20	44	20	44	20	44	20	44	20	44	20	44
réplicas	halo de actividad proteolítica <sup>1</sup> (mm)											
1	0	0	0	0	0	0	10	12	11	14	13	16
2	0	0	0	0	0	0	9	11	11	15	13	16
3	0	0	0	0	0	0	9	12	12	14	13	16
4	0	0	0	0	0	0	9	12	12	14	13	16
promedio	0	0	0	0	0	0	9	12	12	14	13	16

<sup>1</sup>: incluyendo el diámetro del disco (6 mm; 30 μL muestra).

Debido a que el coeficiente de correlación no correspondió a un calibrado lineal ( $r < 0.99$ ), la linealización se obtuvo a partir del graficar la actividad en función del log de la cantidad de tripsina vertida en cada pozo (Fig. C1A.). Claramente el método en pozo (Fig. C1B.) fue más sensible que el de disco (Fig. C1C.). De las rectas de calibrado del método de difusión en pozo se calculó el coeficiente de correlación,  $r = 0.999$  y  $r = 0.991$  para las 20 h y 40 h de incubación, respectivamente. Por lo anterior, la medición de la actividad se realizó empleando pozos a 30 °C por 20 h.



**Figura C1. Actividad de la tripsina sobre caseinato por difusión en agar. A.** Curvas de la actividad proteolítica por la técnica de difusión en agar en pozo (diámetro del pozo de 7 mm; 50  $\mu$ L muestra) y en disco (6 mm; 30  $\mu$ L muestra) durante 20 h y 44 h de incubación a 30 °C. **B.** Halos de proteólisis mediante difusión en pozo. **C.** Halos de proteólisis mediante difusión en disco. Concentración de la tripsina en amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 8): 0.21 ng/ $\mu$ L (1), 0.53 ng/ $\mu$ L (2), 1.06 ng/ $\mu$ L (3), 2.12 ng/ $\mu$ L (4), 5.30 ng/ $\mu$ L (5) y 10.60 ng/ $\mu$ L (6). Amortiguador estéril como control negativo (C-). Regresión lineal para el ensayo de difusión en pozo por 20 h (—).

#### Apéndice D. Actividad de la lisozima sobre *M. lysodeikticus* mediante la técnica de difusión en agar

Preparación del medio. Se preparó 200 mL de medio conformado por agar (*Bactoagar*) al 1.2 % w/v, *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 al 0.03 %, en amortiguador de fosfatos (pH 7.0) adicionado de cloruro de sodio al 0.1 %. El medio se esterilizó y se adicionaron 20 mL a cajas de Petri.

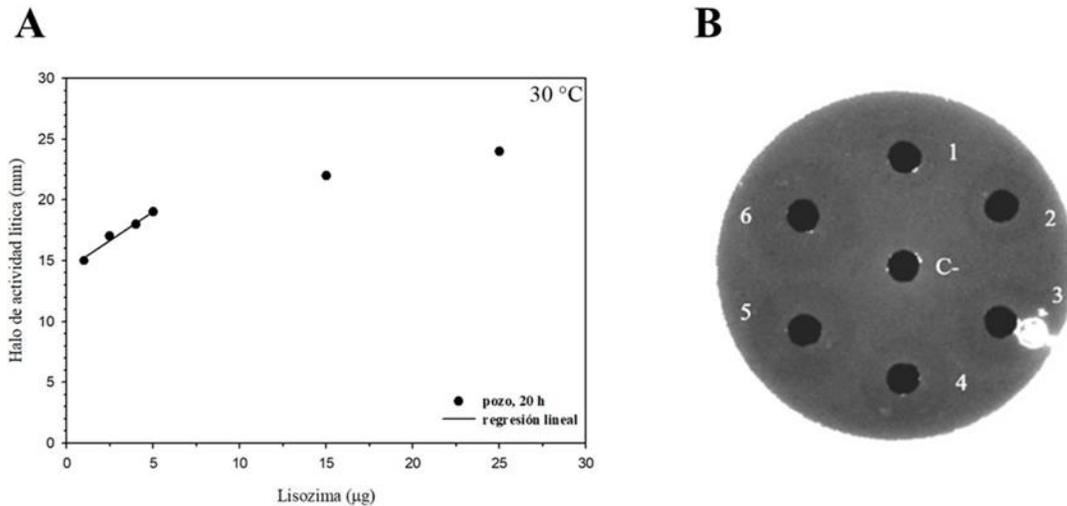
Disolución de lisozima. Se preparó una disolución de lisozima (1 mg/mL) en agua estéril. Apartir de esta disolución se realizaron 6 diluciones para el ensayo: (0.5, 0.3, 0.1, 0.08, 0.05 y 0.02) mg/mL y las cajas se incubaron a 30 °C durante 20 h. Los resultados del halo formado por acción de la lisozima sobre las células del microorganismo de referencia se presentan en el Cuadro D1. y en la Fig. D1. De la recta de calibrado se calculó  $r = 0.994$ .

**Cuadro D1.**

Actividad de la lisozima sobre células de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 por difusión en agar

30 °C réplicas	lisozima (µg)					
	1.0	2.5	4.0	5.0	15.0	25.0
1	14	16	17	19	22	24
2	15	17	18	19	22	24
3	14	17	18	19	21	23
4	15	17	18	19	22	24
5	15	17	18	18	21	24
<b>promedio<sup>1</sup></b>	15	17	18	19	22	24

<sup>1</sup>: valor promedio de cinco réplicas incluyendo el diámetro del pozo (7 mm; 50 µL).



**Figura D1. Actividad de la lisozima sobre células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 por difusión en agar. A.** Curva de la actividad lítica por la técnica de difusión en agar en pozo (diámetro del pozo de 7 mm; 50 µL muestra) durante 20 h a 30 °C. **B.** Halos de inhibición del desarrollo celular. Concentración de la lisozima: 0.02 mg/mL (1), 0.05 mg/mL (2), 0.08 mg/mL (3), 0.1 mg/mL (4), 0.3 mg/mL (5) y 0.5 mg/mL (6). Agua estéril como control negativo (C-). Regresión lineal (—).