

PEPTIDOGLUCANO HIDROLASA DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Israel García-Cano⁽¹⁾, Guillermo Mendoza⁽²⁾ y Amelia Farrés⁽¹⁾

Depto. Alimentos y Biotecnología, Lab. 312. Facultad de Química, UNAM⁽¹⁾. Facultad de Medicina, UNAM⁽²⁾. C.P. 04510. Tel. 56225305. e-mail: farres@servidor.unam.mx

Palabras clave: *Pediococcus acidilactici*, peptidoglucano hidrolasa, zimograma.

Introducción. Las bacterias ácido lácticas (BAL) sintetizan compuestos con la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. En el queso, el desarrollo del olor y sabor característico, se debe a la producción de autolisinas producidas intracelularmente por *Lactobacillus pentosus* [1]. Dicha actividad es el resultado de la acción de enzimas que hidrolizan enlaces covalentes del peptidoglucano, principal componente de la pared celular de bacterias. Este tipo de enzimas son llamadas peptidoglucano hidrolasas (PGH) y se clasifican dependiendo del tipo de enlace que hidrolicen en: muramidasa, glucoamidasa, amidasa y endopeptidasas. En la BAL *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se ha reportado actividad lítica intracelular y extracelular a los 110 kDa, contra *Staphylococcus aureus*, pero hasta el momento no se ha explorado del todo dicha actividad [2, 3]. La finalidad de este trabajo es determinar si la actividad lítica reportada en *P. acidilactici* es una PGH con actividad de muramidasa, glucoamidasa, amidasa o endopeptidasa, con la capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos patógenos de interés en alimentos.

Metodología. Las células de *P. acidilactici* cosechadas de 1 L de medio de cultivo MRS fueron tratadas con 100 mL de buffer de extracción (SDS 2%, EDTA, NaCl, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0), hervidas y centrifugadas [2]. El sobrenadante fue liofilizado, dializado y ultrafiltrado (tamaño de poro, 50 y 100 kDa respectivamente). Se determinó la actividad por difusión en agar y zimogramas, con células de *M. lysodeikticus* y *S. aureus* como sustratos. Para el método de difusión en agar se midió el halo de inhibición por mg de proteína. En zimogramas, la actividad lítica fue comparada con marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

Resultados y discusión. Se tomaron alícuotas en diferentes tiempos de la cinética de crecimiento de *P. acidilactici*, con la finalidad de conocer el tiempo en el cual se obtiene una mayor actividad lítica. En la figura 1 se observa que la mayor actividad es a las 8 h de fermentación. Posteriormente se cosecharon células en este tiempo de fermentación y siguiendo la metodología propuesta, se observó por medio de SDS-PAGE al 10% dos bandas, a los 115 y 100 kDa, las cuales fueron secuenciadas, comparadas y analizadas en la base de datos del NCBI.

La banda de 115 kDa presenta actividad lítica por zimografía (Fig. 2).

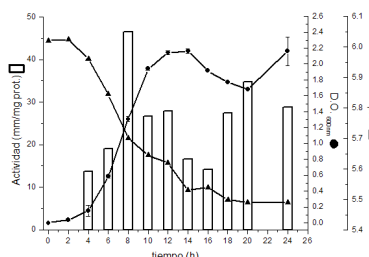


Fig. 1. Actividad lítica vs *S. aureus*, D.O._{600nm} y pH

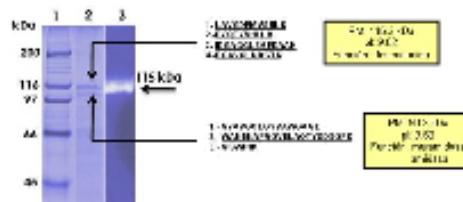


Fig. 2. SDS-PAGE 10%. Semi-purificación y secuenciación de la PGH. Carril 1, marcador de peso molecular alto; carril 2, tinción de coomassie; carril 3, zimograma con *M. lysodeikticus*.

Conclusiones. En la curva de crecimiento se observa que la mayor actividad lítica es a las 8 h de fermentación, posteriormente se presentan una disminución y un incremento en la actividad lítica, sugiriendo la producción de PGH para la división y recambio de la pared celular (8 h) [1] y de autolisina en la fase estacionaria de crecimiento [2]. Con la metodología propuesta para la purificación, se observaron dos bandas en SDS-PAGE, en 115 y 100 kDa presentando actividad lítica la banda de 115 kDa. La fracción semi-purificada presentó actividad contra *S. aureus* y contra péptidos sintéticos (datos no mostrados). Las secuencias de las dos bandas encontradas, indican que son dos enzimas con actividad, peso molecular y pl diferentes.

Agradecimientos. UNAM, Macroproyecto de bovinos

Bibliografía. [1] Cibik R. and Chapot-Chartier M. (2004). *Letters in Applied Microbiology*. 38, 459-463.
[2] Mora D., Musachio F., Fortina M.G. Senini L. and Machini P.L. (2003). *J. Appl. Microbiol.* 94, 561-570.
[3] Llorente A., Pérez M., Farrés A. (2008). *Can. J. Microbiol.* 54:694-699.