



CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA PEPTIDOGLUCANO HIDROLASA BIFUNCIONAL DE 99-kDa DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Manuel Campos Gómez, Israel García Cano, Amelia Farrés. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química. UNAM. México. CP 04510. manolcgg@hotmail.com

Palabras clave: Pediococcus acidilactici, peptidoglucano hidrolasas, bifuncional

Introducción. Las peptidoglucano hidrolasas (PGH's) son enzimas que degradan el peptidoglucano (componente principal de la pared celular de las bacterias), estas proteínas están involucradas en muchas funciones, ej. la división celular y la autólisis. En reportes recientes algunas PGH's se han usado como conservadores en varios productos alimenticios (1). *P. acidilactici* ATCC 8042, produce una PGH de 99-kDa, cuyo gen se encuentra reportado para varias cepas de la misma especie. La secuencia en aminoácidos contiene dos posibles dominios catalíticos conservados (*N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa y *N*-acetilglucosaminidasa) (2), a este tipo de proteínas se les denomina bifuncionales. Este trabajo consiste en clonar y expresar, de manera independiente, ambos dominios de la proteína con la finalidad de probar la actividad lítica independiente de ambos.

Metodología. Se diseñaron cebadores específicos para amplificar el dominio de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa. Se utilizó el vector pET-22b(+) y se expresó en *E. coli* utilizando IPTG como inductor. La actividad lítica fue determinada por medio de zimogramas de *Micrococcus lysodeikticus* (0.2%p/v). La proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad utilizando el tallo de histidinas (6X His C-term) que contenía el vector utilizado.

Resultados. Se realizaron varias subclonas (Fig. 1) para el dominio de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa (*Dcat*, *amiR1*, *amiR1R2* y *amiR1R2R3*) la diferencia entre cada una de ellas es el tamaño de la región intermedia que une a los dos dominios en la secuencia reportada en la base de datos (NCBI).

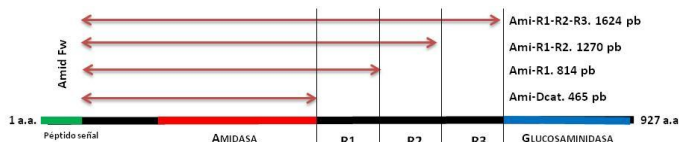


Fig 1. Diferentes subclonas generadas para el dominio de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa

En la Fig. 2 se observan los diferentes productos de PCR a partir de DNA genómico de *P. acidilactici* ATCC 8042 obtenidos con los diferentes cebadores utilizados, así como el análisis de las subclonas obtenidas.

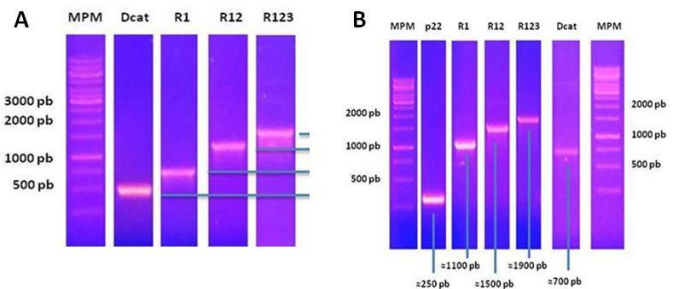


Fig 2. A. Amplicones obtenidos a partir de DNA genómico. B. Analisis de las subclonas obtenidas utilizando cebadores T7.

Se expresó el dominio de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa utilizando la construcción *AmiR1R2R3*, encontrando la mayor actividad lítica en la fracción citosólica. Las condiciones de inducción fueron las siguientes: 37°C / 200 rpm / 3 hrs / [IPTG]= 1 mM. En la Fig. 3 se observan las bandas de actividad lítica contra *Micrococcus lysodeikticus* del la fracción citosólica y de la proteína semipurificada.

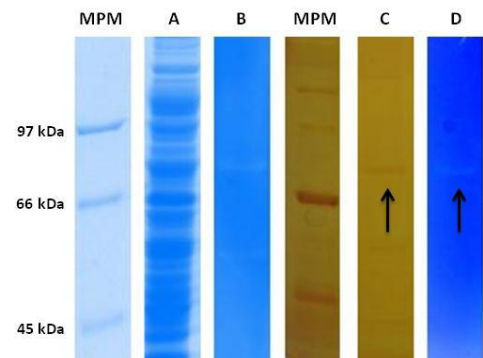


Fig. 3. MPM. Marcador de peso molecular (Low-Range, Biorad) A y B(zimograma). Fracción citosólica. C y D(zimograma). Proteína semi-purificada

Conclusiones. El dominio de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa presenta actividad lítica de manera independiente en zimogramas contra *Micrococcus lysodeikticus*.

Agradecimiento. Al CONACYT por la beca otorgada durante la realización de este proyecto.

Bibliografía.

- Callawaert L., Walmagh M., Michels C., Lavigne R. (2011). Curr Opin Biotechnol. vol (22-2): 164-171.
- García-Cano I., Velasco-Perez L., Rodrigues-Sanoja R., Sánchez S., Mendoza-Hernandez G., Farrés A. (2011). J Appl Microbiol. vol. (111-3): 607-615.