

CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS EXTRACELULARES DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Adriana Llorente, Sandra Pérez y Amelia Farrés, Ingeniería y Tecnología FESC y Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, Circuito de la Investigación s/n. Conjunto "E" FQ, Lab. 312, Cd. Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F. Fax: 56 22 53 09, llorente@servidor.unam.mx

Palabras clave: *Pediococcus acidilactici*, actividad proteolítica

Introducción. *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, bacteria acidoláctica utilizada en la bioconservación de alimentos, posee actividad proteolítica extracelular (1). Este hecho es importante porque no hay proteasas extracelulares reportadas para este género, aunque se ha identificado que algunas cepas de bacterias acidolácticas poseen actividades de proteinasa, dipeptidasa, dipeptidil aminopeptidasa y de aminopeptidasa intracelular, y en *P. pentosaceus* una tripeptidasa intracelular (2,3). El objetivo de esta investigación es hacer una caracterización inicial de la actividad proteolítica identificada en la cepa *P. acidilactici* 8042.

Metodología. El microorganismo se cultivó en condiciones microaerofílicas en medio MRS, sin agitación. Los sobrenadantes de cultivo colectados a la mitad de la fase logarítmica (8h) fueron concentrados por liofilización. La actividad proteolítica se evaluó espectrofotométricamente empleando como sustratos azocaseína, Hide powder azure o elastin-Congo Red, y tripsina como referencia. La evaluación en zimogramas se realizó con SDS-PAGE 10% T, copolimerizados con azocaseína gelatina o elastina soluble (4). Las zonas de hidrólisis se visualizaron con Azul de Coomassie. En los sistemas anteriores se evaluó el efecto de inhibidores de proteasas (20 mM PMSF; Complete™ Mini, EDTA-free., 10 mM EDTA y 10 mM O-Phe). Se obtuvo el perfil electroforético de las muestras precipitadas con TCA en geles SDS-PAGE, 10% T visualizados con tinción de plata (5).

Resultados y Discusión. Se detectaron dos zonas de hidrólisis en zimogramas, que no son visibles en todos los sustratos. Una, de alto PM >200 kDa, se detectó en caseína, gelatina y elastina y otra de 107 kDa sólo en gelatina (figura 1a). La actividad proteolítica se mantuvo después de estar en contacto con agentes desnaturizante reductor y caotrópico y no fue inhibido por PMSF, Mini Complete EDTA free™, o agentes quelantes como EDTA y O-Phe en

las condiciones evaluadas (figura 1b). La respuesta a temperatura fue diferente para las dos proteasas: la actividad gelatinolítica de 107 kDa se perdió después del tratamiento térmico a 90 °C durante 10 min, sin embargo, la actividad de la proteasa >200 kDa fue estable después del mismo tratamiento.

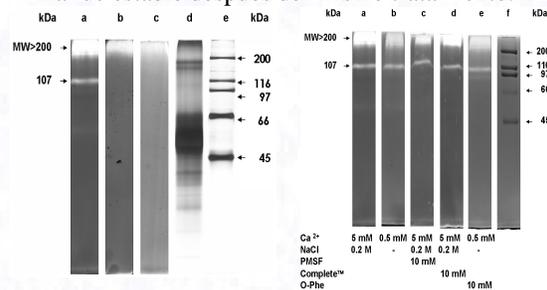


Fig. 1a (izq.) Zimogramas a) gelatina, b) caseína, c) elastina d) tinción de plata, e) MPM HR (Bio-Rad). 1b (der) Zimogramas de gelatina incubados con inhibidores de proteasas: PMSF, Mini Complete™ EDTA free, O.Phe.

Conclusiones. Se demostró que la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 posee dos proteasas extracelulares que degradan caseína, gelatina y elastina. La actividad elastolítica encontrada en la cepa 8042 es de suma importancia por la similitud que guarda con el Lysostaphin™, por sus posibilidades de empleo como antibacteriano.

Agradecimientos: PAPIIT-DGAPA-UNAM IN 210306, CONACYT beca 23428

Bibliografía.

- Llorente, B. A. Pérez, M. S. y Farrés, G.S.A. 2005. XI Congreso SMBB.
- Kunji, E.R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., and Konings, W.N. 1996. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**:187-221.
- Simitsopoulou, M., Vafopoulou, A., Choli-Papadopoulou, T., and Alichandis, E. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(12):4872-4876.
- Lantz, M.S., and Ciborowski, P. 1994. In: V.L., Clark, and P.M., Bavoil (Eds). *Methods in Enzymol.* **235**:563-594, New York. Acad. Press.
- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E., and Haard, N. F. 1993. *Anal. Biochem.* **214**:65-69.