



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Ximena Casales-Cabrera, Israel García-Cano y Amelia Farrés, Depto. Alimentos y Biotecnología, Lab. 312. Facultad de Química, UNAM, México D.F. C.P. 04510. rexay@hotmail.com

**Palabras clave:** *Pediococcus acidilactici*, proteasa, zimograma gelatina.

**Introducción.** Las bacterias ácido lácticas (BAL) son usadas en productos fermentados como quesos, yogurts y salchichas. Sus metabolitos desempeñan funciones que impactan en procesos como la conservación, desarrollo del sabor y maduración (1). Una de las BAL más utilizadas como cultivo iniciador de productos cárnicos es la especie *Pediococcus acidilactici*. Se ha reportado que esta especie presenta una banda de actividad proteolítica extracelular a los 200 kDa (2), la cual fue purificada y caracterizada como una metaloproteasa dependiente de Zinc (3). En ciertas ocasiones, tanto en cultivos estáticos (2) como en agitación, pero adherida a membrana (3) se reportó actividad proteolítica a los ~90 kDa. El propósito de este estudio fue la localización y caracterización de la proteasa de ~90 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 y su comparación con la proteasa extracelular de alto peso molecular. El mejor conocimiento de las propiedades de estas enzimas permitirá manipular adecuadamente sus condiciones de producción y mejorar sus capacidades tecnológicas, relacionadas con sabor y textura en productos cárnicos fermentados.

**Metodología.** Se creció a *P. acidilactici* en medio MRS, se incubó a 29°C con agitación y sin agitación, las células se cosecharon a las 8 h de crecimiento. Para la localización de la proteasa se trabajó con tres fracciones celulares: extractos crudos (2), proteínas adheridas a membrana (3) y la fracción citosólica obtenida por sonicación. El monitoreo de la actividad proteolítica se llevó a cabo por métodos espectrofotométricos empleando tres diferentes sustratos: colágeno, elastina, caseína. La proteasa encontrada en la fracción citosólica se purificó parcialmente mediante una precipitación diferencial (40%, 60% y 80%) con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Cada fracción se dializó con una membrana de 50 kDa. A su vez se realizaron SDS-PAGE al 10% y zimogramas contra gelatina. Se evaluó el efecto de diferentes inhibidores (EGTA, EDTA y PMSF, 1 mM y 10 mM de cada uno) por medio de zimogramas.

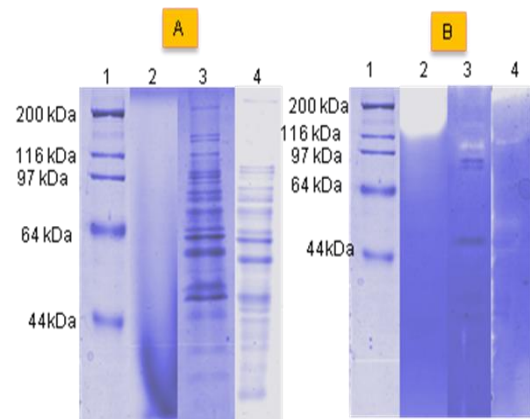
**Resultados.** Se encontró que las mejores condiciones de crecimiento de *P. acidilactici* para la detección de la actividad proteolítica fue con agitación a 120 rpm. La fracción citosólica permitió la detección de una banda de actividad con un peso molecular cercano a los 90 kDa, que tuvo la capacidad de hidrolizar colágeno y caseína (tabla 1 y figura 1). La precipitación diferencial con

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 60% ayudó a que la actividad incrementara en 2 órdenes de magnitud. La proteasa de 97 kDa fue inhibida con 10 mM de PMSF.

**Tabla 1.** Actividad espectrofotométrica contra diferentes sustratos.

	U/min* mg proteína total		
	Colágeno	Caseína	Elastina
	595nm	280nm	450nm
Extracto Crudo	3.39	X	x
Adheridas a membrana	X	0.954	2.58
Citosol	2.75	4.48	x

Unidad= el cambio en la absorbancia en 0.001/min



**Figura 1.** A), SDS-PAGE 10%. B). Zimograma de gelatina. Carril 1 A y 1 B, marcador de peso molecular alto; carril 2 A y 2 B extracto crudo; carril 3 A y 3 B citosol; carril 4 A y 4 B proteínas adheridas a membrana.

**Conclusiones.** *P. acidilactici* ATCC 8042 presenta diferentes actividades proteolíticas en preparaciones obtenidas a partir de células, membranas o extractos celulares. La proteasa intracelular tiene un peso molecular de 97 kDa, y su mayor actividad se encontró con gelatina y colágeno. Su inhibición con PMSF en una concentración de 10 mM sugiere que se trata de una serin-proteasa, cuyas propiedades difieren de la encontrada extracelularmente.

### Bibliografía.

1. Caplice E. and Fitzgerald G. (1999) *Inter. J. Food Microbiol.* 50:131-149.
2. Llorente et. al. (2008) *Can. J. Microbiol.* 54:694-699.
3. Granados E. (2009) Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM