



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PEPTIDOGLUCANO HIDROLASA DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

#

Aline Valenzuela, Israel García-Cano y Amelia Farrés, Depto. Alimentos y Biotecnología, Lab. 312 Facultad de Química, UNAM, México D.F.C.P. 04510. farres@unam.mx

Palabras clave: *Pediococcus acidilactici*, peptidoglucano hidrolasas, *N*-acetil muramidasa.

Introducción. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son utilizadas en el sector de los alimentos debido a que producen una amplia gama de sustancias con actividad antibacteriana. Se ha reportado que la BAL *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 presenta enzimas con actividad de peptidoglucano hidrolasa (PGH) las cuales tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes bacterias patógenas (1). Por medio de zimografía, se detectaron dos bandas con actividad lítica, a los 110 y 99 kDa (2). Tras obtener su secuencia de aminoácidos se estableció que la proteína de 110 kDa es una proteína putativa con función desconocida hasta el momento y que posee una región hidrofóbica (carboxilo terminal). La proteína de 99 kDa presenta una región con función de amidasa, glucoamidasa y de unión a Zn²⁺.

El propósito de este trabajo es caracterizar bioquímicamente a las dos enzimas con actividad de peptidoglucano hidrolasa de *P. acidilactici* debido a que este tipo de enzimas pueden ser utilizadas como bioconservadores en la industria de alimentos.

Metodología. Se siguió la metodología para la purificación parcial de la PGH descrita por García-Cano (2011). Se evaluó la estabilidad de la actividad lítica a la temperatura (37°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C y 90°C) así como el efecto del pH (5-10). Se ensayó el efecto de concentraciones de 1 y 10 mM de inhibidores (EDTA, EGTA y PMSF) y activadores (Mg²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Na⁺ y K⁺). Los ensayos se llevaron a cabo en zimograma SDS-PAGE al 10%, utilizando *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato para determinar diferencias de comportamiento entre las dos enzimas. Para determinar la actividad de endopeptidasa, muramidasa, y glucoamidasa se siguió la metodología descrita por 3, 4 y 5, respectivamente.

Resultados:

Estabilidad de temperatura, pH e inhibidores

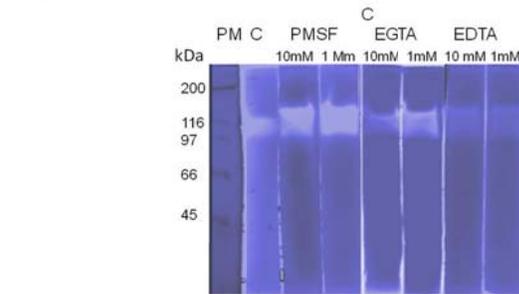
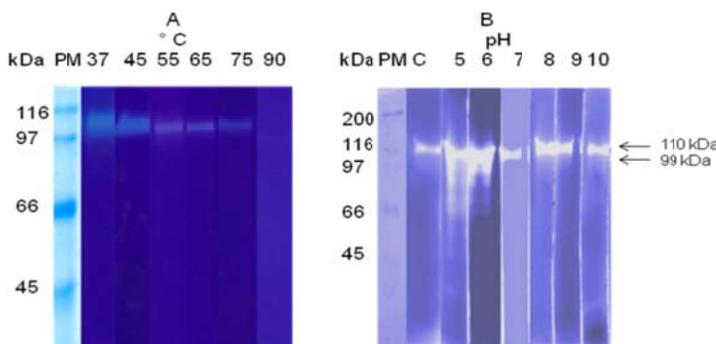


Fig.1. Zimogramas SDS-PAGE 10%. A) Efecto de la temperatura. B) efecto del pH. C, PGH, p H=8 C) inhibidores. C, PGH sin inhibidor. PM marcador de peso molecular.

Tabla 1. Efecto de activadores y especificidad por sustratos

Activador	Efecto	Actividad	Sustrato	Resultado
Mg ²⁺	+	Endopeptidasa	Tripeptido [Leu-Gly-Gly]	+
Zn ²⁺	-		Tetrapeptido [Leu-Gly ₄]	+
Ca ²⁺	-		Pentaglicina [Gly] ₅	+
Na ⁺	+	Muramidasa	<i>M. lysodeikticus</i>	+
K ⁺	+	Glucoamidasa	4-nitrofenil-N-acetil-D-glucosaminida	-

Conclusiones.

No fue posible establecer diferencias entre las dos proteínas con respecto a los parámetros evaluados. La fracción con actividad de peptidoglucano hidrolasa obtenida de *P. acidilactici* es estable en un intervalo de temperatura de 37° a 75°C con la máxima actividad lítica a 37°C. A pH de 5 y 6, se observó la mayor actividad lítica, y a valores de pH mayores no se observó disminución en la actividad lítica con respecto al control. El EDTA inactivó la actividad lítica en 1 y 10 mM, seguido de EGTA, aunque en menor proporción con respecto al anterior. La fracción semipura presentó actividad de muramidasa y endopeptidasa, fue estimulada por Mg y Na, y no se encontró actividad de glucoamidasa.

Bibliografía.

1. Velasco-Pérez, L., (2010) .Tesis de licenciatura Facultad de Química, UNAM.
2. García-Cano, et. al., (2010). *J. Appl. Microbiol.* En prensa.
3. Simitopoulou, M., et. al., (1997). *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4872-4876.
4. Sigma- Aldrich (2001). Technical bulletin.
5. Ohbuchi, K., et. al., (2001). *J. Biosci. Bioeng.* 91:487-492.