



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**IDENTIFICACIÓN DE HIDROLASAS PEPTIDOGLUCANO
PRODUCIDAS POR *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y
Limosilactobacillus fermentum SP-23.**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

L. Q. C. Amairany López Zamudio

Directores:

Patricia G. Mendoza García

Carolina Peña Montes

H. VERACRUZ, VER.

2021



H. Veracruz, Veracruz, **11/Junio/2021**
OFICIO: ITV/DEPI/No.326/2021
Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

C. López Zamudio Amairany
PRESENTE

Por este conducto se le comunica que su tesis de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERIA BIOQUÍMICA** titulada:

“Identificación de hidrolasas peptidoglucano producidas por *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23”

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica-
Antorcha y Luz de Fuego Permanente-*

EL H. JURADO


OLAYA PIRENE CASTELLANOS ONORIO
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST.


PATRICIA GUILLERMINA MENDOZA GARCÍA
PRESIDENTE




MADÉLEINE HIDALGO MORALES
SECRETARIO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN


CLAUDIA YURITZI FIGUEROA HERNÁNDEZ
VOCAL


CAROLINA PEÑA MONTES
SUPLENTE



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver.

Tel. (229) 934 1500

tecnm.mx | veracruz.tecnm.mx





Instituto Tecnológico de Veracruz
Subdirección Académica
División de Estudios de Posgrado e Investigación

El presente trabajo de tesis titulado “Identificación de hidrolasas peptidoglucano producidas por *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23”. Presentado por el (la) C. López Zamudio Amairany, ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

1.1. MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

DIRECTORA

DRA. PATRICIA GUILLERMINA MENDOZA GARCÍA

CO-DIRECTORA

DRA. CAROLINA PEÑA MONTES

REVISORA

DRA. MADELEINE HIDALGO MORALES

REVISORA

DRA CLAUDIA YURITZI FIGUEROA HERNÁNDEZ



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogares
C.P. 91897, Veracruz, Ver.

Tel. (229) 934 1500

tecnm.mx | veracruz.tecnm.mx

Número de registro: RPIL-072
Fecha de inicio: 2017-04-10
Término de la certificación 2021-04-10



DEDICATORIA

A mi padre Alfredo, por ser mi pilar y mi fuerza, por no dejarme caer nunca, siempre en mi corazón y en mi mente.

A mi madre Cira, por enseñarme a luchar y conseguir las metas que me propongo, por ser luz en mis días de oscuridad.

A mis hermanas y sobrinos porque me enseñaron a salir adelante a pesar de cualquier obstáculo.

A Alberto por demostrarme su amor y comprensión siempre.

A mis amigas Karla, Brenda, Hilda y Laura por estar en las buenas y en las malas a mi lado.

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de posgrado otorgada y por el Apoyo Complementario para Mujeres Indígenas Becarias Conacyt 2019 y 2020.

Al Tecnológico Nacional de México campus Veracruz por el apoyo de proyectos financiados.

A la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz.

A los laboratorios de Microbiología a cargo de la Dra. Patricia Guillermina Mendoza García, Bioquímica a cargo de la Dra. Rosa María Oliart Ros y Genética aplicada a cargo de la Dra. Carolina Peña Montes por permitir integrarme al equipo de trabajo y realizar mis experimentos.

Dra. Amelia Farrés González Saravia por brindarme su apoyo cuando lo solicitamos.

RESUMEN

López Zamudio, Amairany. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz. Mayo 2021. **Identificación de hidrolasas peptidoglucano producidas por *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23**. Directoras: Dra. Patricia G. Mendoza García y Dra. Carolina Peña Montes.

Las hidrolasas de peptidoglucano (PGH), son enzimas involucradas en diversas funciones celulares, hidrolizan de manera controlada los enlaces del peptidoglucano, clasificándose en *N*-acetilmuramidasa, *N*-acetilglucosaminasa, *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa y en peptidasas. Estas enzimas son secretadas mediante la vía general de secreción (sec) o mediante el sistema de translocación doble de arginina (TAT) y tienen pesos moleculares de 27 kDa a 137 kDa. Su importancia radica en su potencial uso como compuestos bactericidas, que inhiben el crecimiento de bacterias de importancia en salud pública. El objetivo de este trabajo fue identificar las PGH producidas por *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 aisladas de quesos frescos artesanales y heces de neonato. Para ello se realizó la identificación fenotípica y genotípica de las bacterias en estudio, mediante cinéticas de crecimiento y enzimáticas se determinó la fase de crecimiento con mayor actividad de PGH, a partir de proteínas extracelulares, de citosol y adheridas a membrana, posteriormente, se determinó el peso molecular de las proteínas por electroforesis (SDS-PAGE) y con zimogramas con *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698. Las bandas con actividad lítica “*in situ*” se identificaron mediante secuenciación de péptidos. Los resultados mostraron una identidad molecular >98 % con *Pediococcus acidilactici* y *Limosilactobacillus fermentum*, la mayor actividad enzimática de PGH fue en las proteínas adheridas a membrana, a las 14 h para *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y a las 16 h en *Limosilactobacillus fermentum* SP-23. Se identificaron bandas con actividad lítica con pesos moleculares de 23 kDa (SP-23) y 25 kDa (ITV-26) la cual coincide con una endopeptidasa ATP dependiente, que no ha sido reportada en la hidrólisis del peptidoglucano. La actividad observada de endopeptidasa le confiere un gran interés en la industria de alimentos y la biotecnología debido a su potencial utilización para el control de microorganismos patógenos.

ABSTRACT

López Zamudio, Amairany. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz. Mayo 2021. **Identificación de hidrolasas peptidoglucano producidas por *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23.** Directoras: Dra. Patricia G. Mendoza García y Dra. Carolina Peña Montes.

Peptidoglycan hydrolases (PGH), are enzymes involved in various cellular functions, hydrolyze peptidoglycan bonds in a controlled manner, classifying them as N-acetylmuramidases, N-acetylglucosaminases, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases and peptidases. These enzymes are secreted by the general secretion pathway (sec) or by the double arginine translocation system (TAT) and have molecular weights of 27 kDa to 137 kDa. Their importance lies in their potential use as bactericidal compounds, which inhibit the growth of bacteria of public health importance. The objective of this work was to identify the HGP produced by *Pediococcus acidilactici* ITV-26 and *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 isolated from fresh artisan cheeses and neonate feces. For this, the phenotypic and genotypic identification of the bacteria under study was carried out, using growth kinetics and enzymes, the growth phase with the highest PGH activity was determined, from extracellular, cytosol and membrane-adhered proteins, later, it was determined the molecular weight of the proteins by electrophoresis (SDS-PAGE) and with zymograms with *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698. Bands with lytic activity "in situ" were identified by peptide sequencing. The results showed a molecular identity >98% with *Pediococcus acidilactici* and *Limosilactobacillus fermentum*, the highest enzymatic activity of PGH was in the proteins adhered to the membrane, at 14 h for *Pediococcus acidilactici* ITV-26 and at 16 h in *Limosilactobacillus fermentum* SP-23. Bands with lytic activity with molecular weights of 23 kDa (SP-23) and 25 kDa (ITV-26) were identified, which coincide with an ATP-dependent endopeptidase, which has not been reported in the hydrolysis of peptidoglycan. The observed endopeptidase activity gives it great interest in the food industry and biotechnology due to its potential use for the control of pathogenic microorganisms.

INDICE

RESUMEN	V
ABSTRACT	VIII
INDICE	IX
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABLAS	14
LISTA DE ABREVIACIONES	15
1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES	17
2.1. Bacterias ácido lácticas	17
2.1.1. Clasificación de bacterias ácido lácticas	17
2.1.2. <i>Pediococcus acidilactici</i>	22
2.1.3. <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	24
2.1.4. Importancia de las bacterias ácido lácticas	26
2.1.5. Metabolitos antimicrobianos de bacterias ácido lácticas	27
2.2. Peptidoglucano de paredes celulares en bacterias	29
2.3. Hidrolasas de peptidoglucano	30
2.3.1. Clasificación de las hidrolasas de peptidoglucano	31
2.3.2. Dominios catalíticos de hidrolasas de peptidoglucano	32
2.3.3. Dominios catalíticos	33
2.3.4. Dominios de unión a la pared celular	34
2.3.5. Hidrolasas de peptidoglucano de bacterias ácido lácticas	36
2.3.6. Hidrolasas de peptidoglucano recombinantes	38
2.3.7. Aplicaciones de hidrolasas de peptidoglucano	39
2.3.8. Hidrolasas de peptidoglucano con actividad antimicrobiana.	39
2.4. Antecedentes del grupo de investigación	41
2.5. Síntesis de antecedentes	41
3. HIPÓTESIS	42

4. OBJETIVOS	42
Objetivo General	42
Objetivos Específicos	42
5. MATERIALES Y MÉTODOS	43
5.1. Material biológico	44
5.2. Crecimiento de cepas	44
5.3. Identificación fenotípica y genotípica de las BAL	45
5.3.1. Identificación fenotípica	45
5.3.2. Identificación genotípica	45
5.4. Curva de crecimiento bacteriano	47
5.4.1. Determinación de la fase de crecimiento con mayor actividad enzimática	47
5.5. Actividad enzimática	48
5.5.1. Actividad de PGH utilizando 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminida	48
5.6. Identificación de proteínas	49
5.6.1. Electroforesis SDS-PAGE y zimogramas	49
5.6.2. Identificación de proteínas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
6.1. Identificación fenotípica y genotípica de bacterias	51
6.1.1. Identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas.	51
6.1.2. Identificación genotípica de bacterias lácticas	52
6.1.3. Análisis bioinformático	54
6.2. Curva de crecimiento	58
6.3. Actividad enzimática	59
6.3.1. Determinación de la fase de crecimiento con mayor producción enzimática	59
6.4. Perfil de proteínas y zimogramas de los extractos protéicos	62
6.5. Identificación de enzimas tipo PGH adheridas a membrana	64
6.6. Identificación de PGH en los genomas de <i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	67
6.6.1. Análisis bioinformático de la secuencia de PGH identificada	70
7. CONCLUSIONES	73
8. RECOMENDACIONES	74

9.	BIBLIOGRAFÍA	75
10.	ANEXOS	88
10.1.	Apéndice A Medios de cultivos	88
10.2.	Apéndice B Frotis bacteriano	89
10.3.	Apéndice C Tinción de Gram	90
10.4.	Apéndice D Pruebas bioquímicas API 50 CHL	91
10.5.	Apéndice E Resultados pruebas bioquímicas BAL	92
10.6.	Apéndice F Extracción de DNA en muestra	93
10.7.	Apéndice G Buffers de trabajo	94
10.8.	Apéndice H Liofilización de los extractos	94
10.9.	Apéndice I Secuencias de microorganismo	95
10.10.	Apéndice J Curva estándar p-nitrofenol	97
10.11.	Apéndice K Cinética enzimática de PGH katalas	98
10.12.	Apéndice L Secuencias de hidrolasa peptidoglucano	99

LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 2. 1 Ruta de la glucólisis en bacterias ácido lácticas.....</i>	<i>19</i>
<i>FIGURA 2. 2 Ruta de las pentosas fosfato en bacterias ácido lácticas.....</i>	<i>20</i>
<i>FIGURA 2.3 Estructura de peptidoglucano de bacterias Gram positivas.</i>	<i>30</i>
<i>FIGURA 2. 4 Clasificación de las Peptidoglucano Hidrolasas de acuerdo con su especificidad.....</i>	<i>32</i>
<i>FIGURA 5.1 Diagrama general de la metodología.....</i>	<i>43</i>
<i>FIGURA 6.1 Identificación morfológica de BAL en estudio.....</i>	<i>51</i>
<i>FIGURA 6.2 DNA de microorganismo en estudio.</i>	<i>53</i>
<i>FIGURA 6.3 Amplificación del gen 16S de los microorganismos en estudio.....</i>	<i>54</i>
<i>FIGURA 6.4 Alineamiento del gen 16S de <i>Pediococcus acidilactici</i> (ensilaje).</i>	<i>56</i>
<i>FIGURA 6.5 Alineamiento del gen 16S de <i>Pediococcus acidilactici</i> (maíz fermentado).</i>	<i>56</i>
<i>FIGURA 6.6 Alineamiento del gen 16S de <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (leche de ganado).</i>	<i>57</i>
<i>FIGURA 6.7 Alineamiento del gen 16S de <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (intestino).</i>	<i>57</i>
<i>FIGURA 6. 8 Curva de crecimiento de <i>Limosilactobacillus fermentum</i> SP-23 y <i>Pediococcus acidilactici</i> ITV-26.....</i>	<i>59</i>
<i>FIGURA 6.9 Cinética de producción de PGH en el extracto de proteínas adheridas a membrana.</i>	<i>61</i>
<i>FIGURA 6.10 Perfil de proteínas de <i>Pediococcus acidilactici</i> ITV-26 en gel de SDS-PAGE.</i>	<i>63</i>
<i>FIGURA 6.11 Perfil de proteínas de <i>Limosilactobacillus fermentum</i> SP-23 en gel de SDS- PAGE de los extractos protéicos.</i>	<i>64</i>
<i>FIGURA 6.12 Perfil de proteínas (A) y zimograma (B) en geles de poliacrilamida con los extractos de las proteínas adheridas a membrana de <i>Pediococcus acidilactici</i> ITV-26.</i>	<i>65</i>

FIGURA 6.13 Perfil de proteínas adheridas a membrana de Limosilactobacillus fermentum SP-23 en geles de poliacrilamida..... 66

FIGURA 6. 14 Alineamiento de la secuencia identificada con la secuencia reportada del NCBI con no. de acceso WP_002829919.1 71

FIGURA 6.15 Alineamiento de ALZITV-26 la secuencia de nucleótidos y aminoácidos. 72

LISTA DE TABLAS

<i>TABLA 2.1 Taxonomía del género <i>Pediococcus</i></i>	23
<i>TABLA 2. 2 Taxonomía del género de <i>Limosilactobacillus</i></i>	25
<i>TABLA 2. 3 Metabolitos con actividad antibacteriana producida por BAL</i>	28
<i>TABLA 2. 4 Dominios catalíticos de las hidrolasas de peptidoglucano</i>	33
<i>TABLA 2. 5 Dominios de unión a la pared celular de BAL</i>	35
<i>TABLA 2. 6 PGH con actividad antimicrobiana</i>	40
<i>TABLA 5.1 Identidad de los microorganismos en estudio</i>	44
<i>TABLA 6.2 PGH hipotéticas de <i>Pediococcus acidilactici</i></i>	67
<i>TABLA 6.3 PGH hipotéticas de <i>Limosilactobacillus fermentum</i></i>	69
<i>TABLA 6.4 Análisis de la secuencia de aminoácidos de PGH de <i>Pediococcus acidilactici</i> ITV-26</i>	70

LISTA DE ABREVIACIONES

BAL	Bacterias ácido lácticas
PGH	Hidrolasas de peptidoglucano
GRAS	Generalmente reconocido como seguros
PI	Fosfato inorgánico
CoA	Coenzima A
DAP	Ácido diaminopimélico
NacGlc	Ácido n-acetilglucosamina
NacMur	Ácido N-acetilmurámico
pH	Potencial de Hidrógeno
pb	Pares de bases
Mpb	Mil pares de bases
API	Índice de perfil analítico
Sec	Vía General de Secreción
TAT	Sistema de translocación de doble arginina
4N-NAG	4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminida
PG	Peptidoglucano
SH3	Dominio de homología 3 de SRC
CHAP	Dominio amidohidrolasa / peptidasa
UNIDA	Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos
IPLA	Instituto de Productos Lácteos de Asturias
MRS	Man, Rogosa y Sharpe.
ADN	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico.
ATCC	American Type Culture Collection
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
TAE	Tris-acetate-edta

2. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos representado por varios géneros, con características metabólicas, morfológicas y fisiológicas en común (Gálvez *et al.*, 2007), tienen gran valor en la industria alimentaria, debido al papel importante en la fermentación de una variedad de alimentos, su utilidad se basa en proporcionar características sensoriales a los productos tales como sabor, olor, textura, consistencia, entre otros, esas cualidades se generan en el proceso de fermentación, permitiendo aumentar el valor nutritivo y la inocuidad de éstos (Carr *et al.*, 2002; Azadnia *et al.*, 2011).

Las BAL poseen la capacidad de producir sustancias antibacterianas históricamente usadas para conservar alimentos por su naturaleza GRAS () (Salminen, 2004), estas sustancias se producen en los productos finales del metabolismo de las BAL: como ácido láctico, acético y propiónico, además de estos ácidos orgánicos también pueden producir peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, reuterina, reuteriicina, ácido 2-pirrolidona, 5-carboxílico, bacteriocinas, hidrolasas de peptidoglucano (PGH), entre otras (Hernández *et al.*, 2005).

Las PGH son enzimas que hidrolizan de manera controlada los enlaces del peptidoglucano, pueden ser utilizadas como compuestos bactericidas, inhibiendo el crecimiento de bacterias de importancia en salud pública (BISP). En los últimos años se ha hecho notorio el impacto de la respuesta de BISP por su resistencia a antisépticos, desinfectantes y antibióticos lo que ha ocasionado brotes de infecciones en la población y hospitales con una alta mortalidad (Turner *et al.*, 2004). Las PGH además de ser utilizadas en tratamientos biomédicos contra infecciones, pueden ser usadas como bioconservadores naturales, para aumentar la vida de anaquel y seguridad de los alimentos. Por lo que, el presente estudio se centra en identificar las PGH producidas por *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23.

3. ANTECEDENTES

3.1. Bacterias ácido lácticas

Las BAL son microorganismos denominados de esta manera por su principal característica; la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos, estas constituyen un grupo heterogéneo de bacterias representado por varios géneros con características morfológicas, metabólicas y fisiológicas en común, en general son cocos o bacilos Gram-positivos, no esporulados, no móviles, oxidasa, catalasa y reductasa negativa, carecen de citocromos, no reducen los nitratos, entre otras propiedades (Gálvez *et al.*, 2007).

Las BAL se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversas fuentes como: el medio ambiente, piel y tracto digestivo (Torres, 2002; Azadnia *et al.*, 2011). Las BAL aisladas de alimentos como productos lácteos, cárnicos y vegetales son utilizadas tradicionalmente como bioconservadores naturales; impidiendo el crecimiento de microorganismos patógenos y/o responsables de la descomposición del alimento, además pueden brindarles otros beneficios sensoriales como color, olor, sabor, textura, etc. (Gálvez *et al.*, 2007).

3.1.1. Clasificación de bacterias ácido lácticas

La clasificación de las BAL fue inicialmente propuesta por Orla Jensen en 1919, esta se basa principalmente en la fermentación de los carbohidratos, crecimiento a diferentes temperaturas, y por su capacidad de tolerancia a altas concentraciones de cloruro de sodio (Axelsson *et al.*, 2000). Su principal característica se debe a la fermentación de los carbohidratos, clasificándolas como: **homofermentativas** y **heterofermentativas**, las primeras producen solo ácido láctico como producto final y las heterofermentativas producen ácido láctico y otros metabolitos (García-Hernández *et al.*, 2016). Por su crecimiento en diferentes rangos de temperatura se clasifican en

mesófilas (10-45 °C) y **termófilas** (25-80 °C) (Mathur *et al.*, 2005; Parra-Huertas, 2010).

La clasificación filogenética del grupo de las BAL se constituye por los géneros: *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Weissella* y *Tetragenococcus* (Ahmed, 2003; Ogier y Serror, 2008; Zheng *et al.*, 2020).

3.1.1.1. Metabolismo

Las BAL **homofermentativas** son el grupo donde se encuentran los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus* y algunos *Lactobacillus*, catabolizan la glucosa en un 85 % de ácido láctico por la ruta de la glucólisis (Figura 2.1) o también denominada vía de Embden-Meyerhoff (Jay, 2000; Wood *et al.*, 1995).

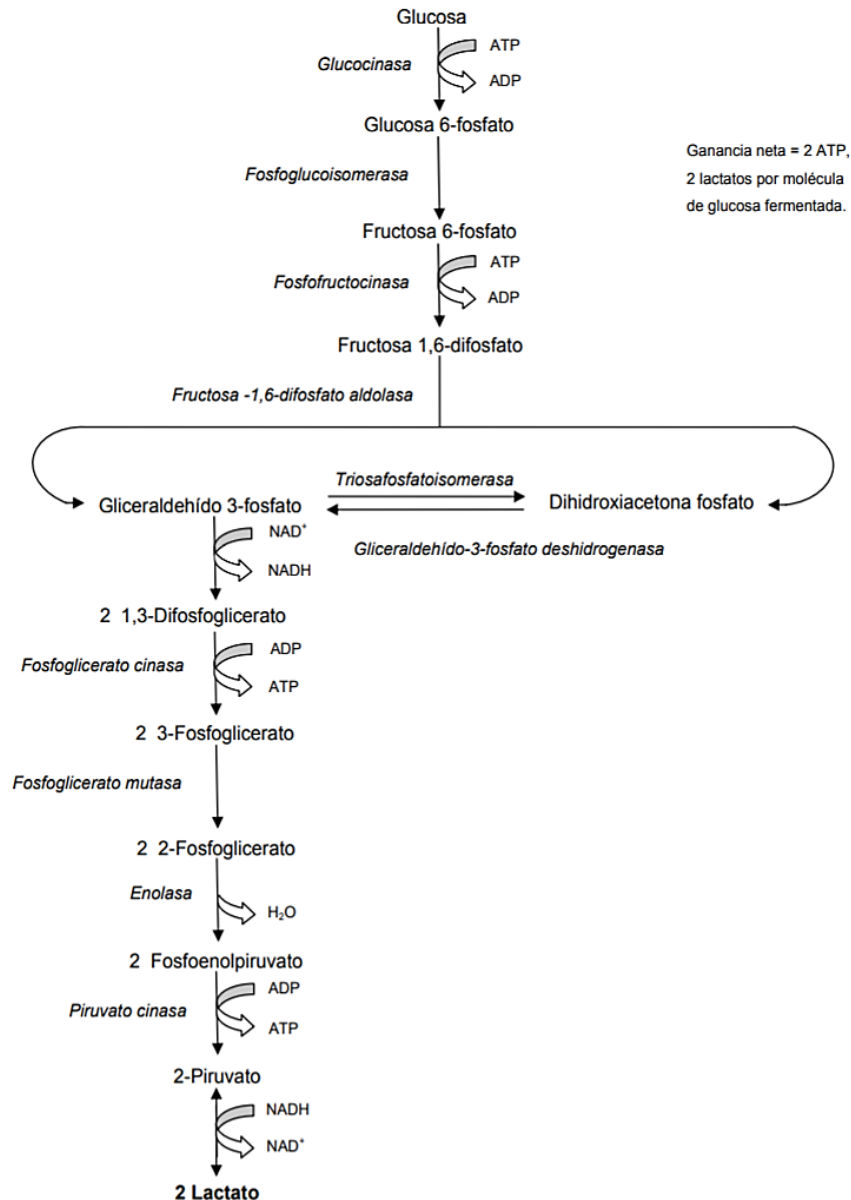


FIGURA 2. 1 Ruta de la glucólisis en bacterias ácido lácticas.

(Jay, 2000)

El grupo de las BAL **heterofermentativas**, está formado por todas las especies de *Leuconostoc*, así como algunos *Lactobacillus*; estos producen solamente 50% de ácido láctico, así como etanol, ácido acético y CO₂, utilizan la vía de las hexosas monofosfato o de las pentosas (Figura 2.2), este grupo de bacterias producen la enzima fosfoacetolasa pero carecen de la aldosa y de la hexosa isomerasa, razón por la que utilizan estas vías metabólicas (Jay, 2000; Wood *et al.*,1995).

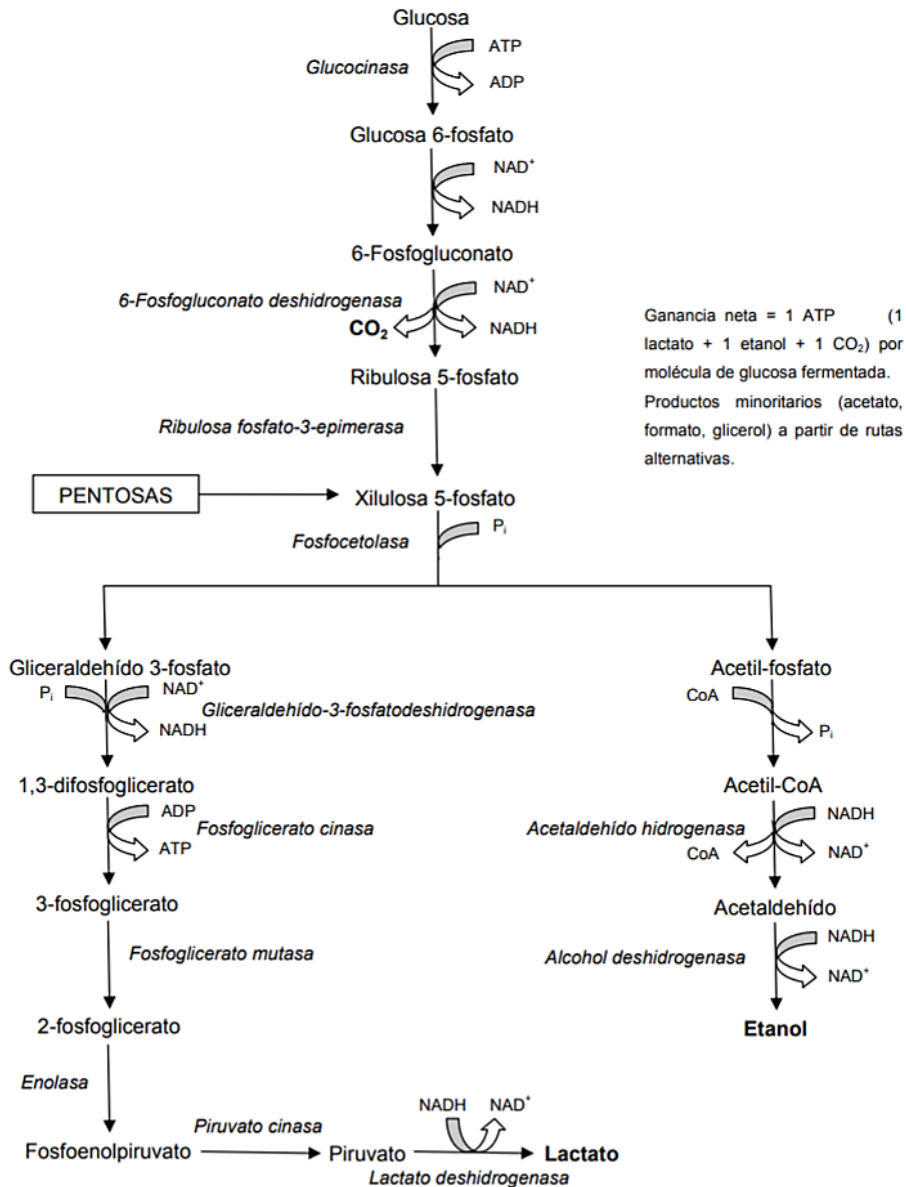


FIGURA 2.2 Ruta de las pentosas fosfato en bacterias ácido lácticas.
(Jay, 2000)

3.1.1.2. Sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas

En la fermentación se producen ácidos orgánicos que ayudan a conservar la vida de anaquel del alimento; además, se liberan algunos aminoácidos que aumentan la calidad nutritiva (Wacher, 2014). Algunos de estos aminoácidos que se incrementan son la lisina y el triptófano, además de vitaminas como la niacina y la riboflavina (Barros y Buenrostro, 2011). Durante la liberación de estos aminoácidos también se liberan fragmentos de proteína (péptidos), debido a las enzimas proteolíticas pertenecientes al sistema proteolítico de las BAL (Villadóniga *et al.*, 2009). Algunos péptidos liberados durante la fermentación pueden presentar actividad biológica; es decir, son capaces de regular funciones fisiológicas en el humano.

La proteólisis es la degradación de las proteínas por acción del sistema proteolítico de las BAL, lo que produce pequeños péptidos y aminoácidos libres (Smit *et al.*, 2005).

El sistema proteolítico de las BAL comprende tres componentes principales: proteinasas, peptidasas y proteínas de transporte. Las proteinasas escinden la proteína en péptidos, luego las peptidasas (intracelulares) degradan los péptidos a aminoácidos y péptidos más pequeños. Los sistemas de transporte son responsables de transferir aminoácidos y péptidos a través de la membrana citoplasmática (Kenny *et al.*, 2003)

Los productos finales de la proteólisis son con mayor frecuencia los aminoácidos utilizados por BAL como fuente de nitrógeno para su crecimiento, la actividad proteolítica de las BAL es muy diversa dependiendo de la especie, subespecie e incluso la cepa. Entre los cocos, las especies más proteolíticas son *Lactococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, mientras que el menos proteolítico es *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. De los lactobacilos utilizados en la industria láctea, las especies con más actividad son *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus acidophilus* (Linares-Morales *et al.*., 2020; Saidi *et al.*., 2020; Toe *et al.*, 2019 y Lim *et al.*, 2019).

3.1.1.3. Enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas se pueden dividir en los siguientes grupos: Serina proteinasas (EC 3.4.21), cisteína proteinasas (EC 3.4.22), proteinasas aspárticas (EC 3.4.23), metaloproteinazas (EC 3.4.24) y treonina proteinasas (EC 3.4.25) (Ramachandran *et al.*, 2016; Mamo *et al.*, 2018; Gurumallesh *et al.*, 2019).

Las proteinasas de las BAL son proteínas de diferente peso molecular, se sintetizan en células bacterianas como zimógeno, hidrolizan los enlaces peptídicos de los extremos del sustrato, sobre la base de su mecanismo químico de catálisis en sustratos peptídicos, a pesar de la alta similitud estructural, las proteínas bacterianas del ácido láctico muestran diferencias en especificidad al sustrato las cuales muestran una preferencia por las partes hidrofóbicas de las proteínas (Kunji *et al.*, 1996).

En la primera etapa de la proteólisis, las enzimas proteolíticas extracelulares degradan proteínas en tamaños más pequeños. Dependiendo de la proteína se van degradando según su tamaño por ejemplo la β -caseína se degrada a más de 100 oligopéptidos diferentes compuestos de 4 a 30 aminoácidos residuos, pero la mayoría de los péptidos contienen de 4 a 10 residuos de aminoácidos (Reid *et al.*, 1995), posteriormente los péptidos formados debido a la degradación por las proteinasas unidas a la pared celular de BAL se transportan a las células a través de mecanismos de transporte específicos (Opp, DptP y Dpp), los cuales se encargan de introducir los péptidos al citoplasma (Venegas-Ortega *et al.* 2019). En el citoplasma, la degradación se lleva a cabo mediante endopeptidasas (oligopeptidasas) y aminopeptidasas. Las endopeptidasas rompen los enlaces intracelulares de los péptidos, mientras que las aminopeptidasas eliminan los aminoácidos de los extremos N y C de los péptidos (Savijoki *et al.*, 2006). Los productos formados por la acción de oligopeptidasas y amidopeptidasas son sustratos para di y tripéptidasas. Los últimos productos de hidrólisis son los aminoácidos libres, que son una rica fuente de nitrógeno para las BAL, la descomposición enzimática de proteínas es particularmente importante para BAL, porque proporciona aminoácidos necesarios para la síntesis de sus propias proteínas, péptidos y su crecimiento, permitiéndole una reducción significativa del gasto energético en la síntesis de aminoácidos *de novo* (Kunji *et al.*, 1996; Savijoki *et al.*, 2006).

3.1.2. *Pediococcus acidilactici*

El interés en el género *Pediococcus* se debe a su capacidad de producir metabolitos que le confieren características importantes en la inhibición de microorganismos competidores e incluso patógenos. Incluyen 12 especies perteneciente al grupo filogenético formado por lactobacilos y leuconostocs (Tabla 2.1) (Garvie, 1986). Los *Pediococcus* tienen características específicas: son cocos de 0.4-1.4 mm de diámetro, forman pares y tétradas. La pared celular de estas BAL tiene un peptidoglucano formado por los aminoácidos L-Lys-L-Ala-D-Asp, otros tienen ácido diaminopimélico (DAP) en la pared celular, son tolerantes a los ácidos, no pueden sintetizar porfirinas y poseen un metabolismo homofermentativo, son anaerobios facultativos, se encuentran en la superficie de plantas y frutas, en productos alimenticios como carnes curadas, embutidos crudos y pescado adobado, y se utilizan en la producción de alimentos fermentados y conservación de alimentos (Mundt, 1969; Calderón-Santoyo *et al.*, 2001).

TABLA 2.1 Taxonomía del género *Pediococcus*.

Rango	Nombre taxonómico
Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Lactobacillales
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
Genero	<i>Pediococcus</i>
Especies	<p><i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus argentanicus</i> <i>Pediococcus cellicola</i> <i>Pediococcus clausenii</i> <i>Pediococcus etanoliduranos</i> <i>Pediococcus inopinatus</i> <i>Pediococcus parvulus</i> <i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus siamensis</i> <i>Pediococcus stilesii</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i></p>

(NCBI, 2021)

Las colonias de *Pediococcus* en medios de cultivos sólidos varían de 1.0 - 2.5 mm de diámetro, son lisas, redondas de color blanco grisáceo, su temperatura óptima de crecimiento es de 25 - 40 °C, el pH óptimo para el crecimiento es 6.0 - 6.5, crecen en presencia de NaCl del 4.0 y al 6.5 %, presentan proteasas, dipeptidasas, dipeptidil aminopeptidasas y aminopeptidasas (Garvie, 1986).

Pediococcus acidilactici es miembro de las BAL, se utiliza como cultivo iniciador en productos cárnicos y vegetales fermentados, con un tamaño de colonia de 0.6 a 1 mm de diámetro, se agrupa en pares, tétradas o racimos. Estas BAL crecen en un intervalo de pH de 4.2 a 8.0, en concentraciones de cloruro de sodio del 9 al 10 %, sus temperaturas óptimas de crecimiento varían entre 35 - 40 °C, sin embargo, es un microorganismo termoresistente (tolera hasta 70 °C por 10 minutos), una de las características específicas de *Pediococcus acidilactici* es la capacidad hidrolizar la arginina lo cual lo distingue del resto de los *Pediococcus* (Yáñez *et al.*, 2002).

3.1.3. *Limosilactobacillus fermentum*

El género *Lactobacillus* pertenece al filo Firmicutes, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Lactobacillaceae* (Tabla 2.2), dentro de las bacterias ácido lácticas, hasta este año 2020 contaba aproximadamente con 250 especies, sin embargo, se observó que el género *Lactobacillus* era demasiado diverso y englobaba especies no relacionadas, por lo que se realizaron estudios de la composición genética, ciertas propiedades fisiológicas, metabólicas y estilos de vida para facilitar la clasificación. Se agruparon 25 géneros, incluidos 23 nuevos que incluyen; *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*; así como los nuevos géneros: *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, ***Limosilactobacillus***, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* y *Secundilactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

TABLA 2. 2 Taxonomía del género de *Limosilactobacillus*.

Rango	Nombre taxonómico
Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Lactobacillales
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
Género	<i>Limosilactobacillus</i>
Especies	<i>Limosilactobacillus agrestis</i> <i>Limosilactobacillus albertensis</i> <i>Limosilactobacillus alvi</i> <i>Limosilactobacillus antri</i> <i>Limosilactobacillus balticus</i> <i>Limosilactobacillus caviae</i> <i>Limosilactobacillus coleohominis</i> <i>Limosilactobacillus equigenerosi</i> <i>Limosilactobacillus fastidiosus</i> <i>Limosilactobacillus fermentum</i> <i>Limosilactobacillus frumenti</i> <i>Limosilactobacillus gastricus</i> <i>Limosilactobacillus gorillae</i> <i>Limosilactobacillus ingluviei</i> <i>Limosilactobacillus mucosae</i> <i>Limosilactobacillus oris</i> <i>Limosilactobacillus panis</i> <i>Limosilactobacillus pontis</i> <i>Limosilactobacillus portuensis</i> <i>Limosilactobacillus reuteri</i> <i>Limosilactobacillus rudii</i> <i>Limosilactobacillus secaliphilus</i> <i>Limosilactobacillus urinaemulieris</i> <i>Limosilactobacillus vaginalis</i> <i>Limosilactobacillus timonensis</i> <i>Limosilactobacillus sin clasificar</i> <i>Limosilactobacillus sp.</i>

(NCBI, 2021)

Los *Lactobacillus* son bacilos cortos o largos de 0.5 - 1.2 x 1.0 - 10.0 µm, Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativa, no formadora de esporas, que crecen mejor bajo condiciones microaerófilas (Aguirre y Collins, 1993), se pueden

encontrar en el aparato gastrointestinal de mamíferos y aves, en alimentos de origen vegetal y animal (Callon *et al.*, 2004).

Las colonias de *Lactobacillus* en medio de cultivo pueden variar desde colonias grisáceas, blancas pequeñas a medianas, mucoides o no mucoides (Ross *et al.*, 2005). La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 30 - 40 °C (Morishita *et al.*, 1981).

Limosilactobacillus fermentum antes denominado *Lactobacillus fermentum* es un microorganismo heterofermentativo, mesófilo con temperatura óptima de crecimiento de 37 °C, anaerobio facultativo, con tamaño de genoma de 2,10 Mpb, con 1,843 proteínas (Morita *et al.*, 2008).

3.1.4. Importancia de las bacterias ácido lácticas

Las BAL son de gran importancia en la industria por sus diversas aplicaciones: en alimentaria debido a su uso en la elaboración de alimentos fermentados, en la industria farmacéutica y son utilizadas también para la producción de metabolitos de interés, por ejemplo: péptidos, proteínas, enzimas, vacunas entre otras.

Se destaca su valor como conservador debido al efecto antimicrobiano primario de las bacterias lácticas por la competencia de los nutrientes del sustrato, y a la formación de ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico), con el consiguiente descenso del pH (Cintas *et al.*, 2000). Asimismo, a la producción de metabolitos como el etanol, CO₂, H₂O₂, diacetilo, acetaldehído, isómeros de los aminoácidos, reuterina y otros compuestos no proteicos de bajo peso molecular y por compuestos proteicos de síntesis ribosomal como bacteriocinas y enzimas como las PGH estudiadas en esta investigación.

Las bacterias en estudio han sido reportadas en la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana como las bacteriocinas y enzimas con dicha actividad.

3.1.5. Metabolitos antimicrobianos de bacterias ácido lácticas

Además de su función tecnológica las BAL tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos alterantes y/o perjudiciales en los alimentos o incluso dentro la comunidad. Las BAL tienen un efecto antimicrobiano primario esto se debe a la competencia por el sustrato y a la producción de ácidos orgánicos, así como: etanol, CO₂, H₂O₂, diacetilo, acetaldehído y otros metabolitos del oxígeno, también por compuestos proteicos de síntesis ribosomal como bacteriocinas y enzimas como las PGH (Cintas *et al.*, 2000).

La reserva los ácidos orgánicos principalmente el ácido láctico y acético reduce el pH del ambiente, esto ocasiona la inhibición de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, tal es el caso de *Limosilactobacillus fermentum* (QDC32) *Lactocaseibacillus casei* (QDC31), que presentan un efecto inhibitorio frente a *Salmonella typhimurium*, este efecto se le atribuye a la penetración del ácido láctico de forma no disociada en la membrana celular, un pH mas alto en el interior celular suscita la disociación, dando lugar a la liberación de H⁺ y el anión correspondiente; de modo que, ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular (Requena, 1995; Urrego *et al.*, 2005). Uno de los productos finales de la fermentación heterofermentativa es el CO₂ y en ocasiones se obtiene por descarboxilación de aminoácidos, este producto promueve un ambiente anaerobio, reduce el pH y ayuda a destruir la integridad de la pared celular (Ouwehand, 1998). Otro producto de la fermentación en este caso del citrato es el diacetilo, se ha mostrado la actividad antimicrobiana a nivel de 200 µg/ml para levaduras y bacterias Gram negativas y a 300 µg/ml para bacterias Gram positivas no lácticas (Axelsson, 2000; Ouwehand, 1998). Asimismo, pueden producir peróxido de hidrógeno cuando el oxígeno está presente, produciendo peroxidación a los lípidos de la membrana por los radicales hidroxilo y una consecuente susceptibilidad de la célula (Ouwehand, 1998).

Dentro de los compuestos proteicos de síntesis ribosomal se encuentran las bacteriocinas las cuales son péptidos, que se excretan al medio extracelular y que, en algunos casos, poseen un amplio espectro de acción y actividad contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

cereus, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* (Yang *et al.*, 2012; Benmechernene *et al.*, 2013). Las principales sustancias producidas por BAL que presentan actividad antimicrobiana, las cuales se enlistan en la tabla 2.3.

Además, de la actividad antimicrobiana destacan péptidos con actividad inmunomodulante (LeBlanc *et al.*, 2002), anticancerígena (De Moreno de LeBlanc *et al.*, 2005), hipocolesterolémicos (Kawase *et al.*, 2000), antimicrobiana (Lorenzen y Meisel, 2005), (Hernández *et al.*, 2005), acarreadora de minerales (Lorenzen y Meisel, 2005), reguladora de actividad intestinal y del sistema nervioso (Rokka *et al.*, 1997) y antioxidante (Hernández-Ledezma *et al.*, 2005).

TABLA 2. 3 Metabolitos con actividad antibacteriana producida por BAL.

Metabolito	Microorganismo productor	Referencia
Diacetilo	La mayoría de las BAL	Montville y Winkowski, 1997
Reuterina	<i>L. reuteri</i> <i>L. coryniformis</i>	Magnusson y Schnürer, 2001
BLIS: sustancias inhibitorias y similares a las bacteriocinas	La mayoría de las BAL	Montville y Winkowski, 1997
Bacteriocinas	La mayoría de las BAL	Nes, <i>et al.</i> , 1996
Dipeptidos cíclicos: Ciclo-PhePro Ciclo-PheOHPro Ciclo-GlyLeu	<i>L. coryniformis</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. pentosaceus</i>	Magnusson y Schnürer, 2001 Stróm <i>et al.</i> , 2002
Hidroxiácidos 3-hidroxi-tetradecanoico 3-hidroxi-decanoico 3-hidroxi-5-cis-dodecanoico 3-hidroxi-decanoico	<i>L. plantarum</i>	Magnusson, J <i>et al.</i> , 2003
Péptidos bioactivos	La mayoría de las BAL	Visser, S. <i>et al.</i> , 1986.
PGH	La mayoría de las BAL	Fedorov <i>et al.</i> , 2003 Cibik y Chapot-Chartier, 2004 Lortal y Chapot-Chartier, 2005 Turner <i>et al.</i> , 2007

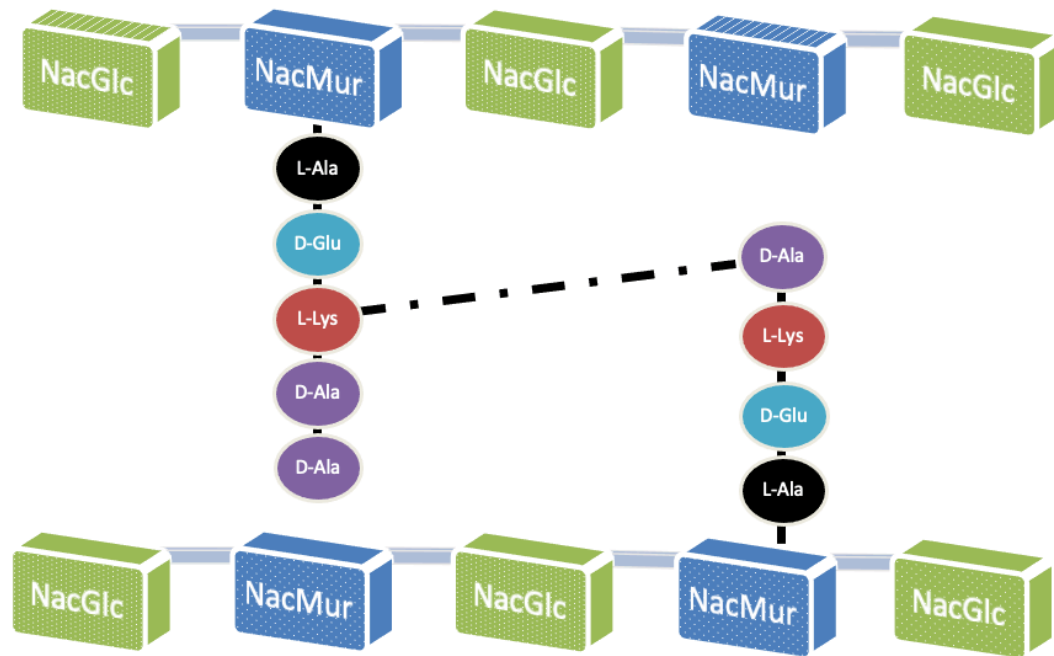
Desde el punto de vista molecular, los antimicrobianos ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplasma, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos (Calvo y Martínez-Martínez, 2006).

3.2. Peptidoglucano de paredes celulares en bacterias

La pared celular bacteriana debe su resistencia a una capa compuesta de peptidoglucano, también llamado mureína o mucopéptidos que es un polímero complejo compuesto por una estructura básica, moléculas alternadas de N-acetil glucosamina y de ácido N-acetilmurámico y un grupo idéntico de enlaces peptídicos cruzados (Figura 2.3). La estructura básica es la misma en todas las especies bacterianas; las cadenas tetrapeptídicas laterales y los enlaces peptídicos varían de una especie a otra (Brooks *et al.*, 2006).

Las cadenas laterales tetrapeptídicas de todas las especies tienen ciertas características importantes en común. La mayor parte tiene L-alanina en la primera posición (unida al ácido N-acetilmurámico), D-glutamato o la sustitución de d-glutamato en la posición 2 y D-alanina en la posición 4. La tercera posición es la más variable: la mayor parte de las bacterias Gram negativas tienen ácido diaminopimélico u otro aminoácido en dicha posición (Brooks *et al.*, 2006).

El ácido diaminopimélico es un elemento singular en las paredes celulares bacterianas; es el precursor inmediato de la glicina en la biosíntesis bacteriana de dicho aminoácido. El hecho de que las cadenas de peptidoglucanos tengan enlaces cruzados significa que cada capa de peptidoglucanos tiene una sola molécula gigante. En una bacteria Gram positiva hay hasta 40 hojas de peptidoglucano, lo que constituye hasta 50 % del material de la pared celular; en las bacterias Gram-negativas parece haber sólo una o dos hojas, lo que constituye 5 a 10 % del material de la pared. La bacteria adquiere su forma, que es característica para cada especie en particular, por la estructura de su pared celular (Brooks *et al.*, 2006).



(NacGlc: N-acetilglucosamina, NacMur: N-acetilmurámico)

FIGURA 2.3 Estructura de peptidoglucano de bacterias Gram positivas.

(Modificado de Layec *et al.*, 2008)

Las enzimas involucradas en la degradación de peptidoglucano son las PGH, las cuales intervienen en la inserción de nuevos monómeros, remodelación y recambio de peptidoglucano (Murray *et al.*, 2006, Tsuyoshi y Thomas, 2011).

3.3. Hidrolasas de peptidoglucano

Las enzimas con actividad lítica como agente antibacteriano se han utilizado en la industria de los alimentos, debido a las ventajas que le brindan al producto y al consumidor; dentro de las ventajas se encuentran la eliminación de las bacterias, el biocontrol de estas y el tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por estos microorganismos. Diversos autores reportan que las BAL son una fuente importante

de la producción de PGH, los géneros más reportados son *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Turner *et al.*, 2007).

Las PGH son enzimas involucradas en diversas funciones celulares que requieren de la pared celular; por ejemplo durante el crecimiento, la división celular, la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células hijas durante la división, formación de flagelos (en algunos casos) y la autólisis, que generalmente se induce en condiciones adversas como la falta de nutrientes (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Vollmer *et al.*, 1997). Esta regulación la realizan las PGH mediante la hidrólisis de enlaces covalentes del PG, están ubicadas en la pared celular y actúan específicamente sobre la base de su sitio de incisión en el PG.

Las PGH caracterizadas tienen una organización estructural modular con dos dominios: un dominio catalítico que contiene el sitio activo de la enzima y un dominio de unión a la pared celular (Turner *et al.*, 2004; Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

3.3.1. Clasificación de las hidrolasas de peptidoglucano

La clasificación de las PGH depende del tipo de enlace que hidrolizan en el PG, como se muestra en la figura 2.4; las *N*-acetilglucosaminasas hidrolizan el enlace β -1,4 de la cadena de glucanos, dejando un extremo *N*-acetilglucosamina reductor. Las *N*-acetilmuramidasa hidrolizan el enlace β -1,4 de la cadena de glucanos, dejando un extremo ácido *N*-acetilmurámico reductor libre, también denominadas lisozimas; si forman un anillo 1,6-anhidro en el *N*-acetilmurámico son llamadas transglicosilasas líticas. Las *N*-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa, rompen el enlace amida entre el *N*-acetilmurámico y la L-alanina del péptido. Las peptidasas son capaces de hidrolizar el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos también denominadas carboxipeptidasas o de romper completamente los puentes formados por los péptidos y se le denominan endopeptidasas (Layec, *et al.*, 2008; Vollmer *et al.*, 2008).

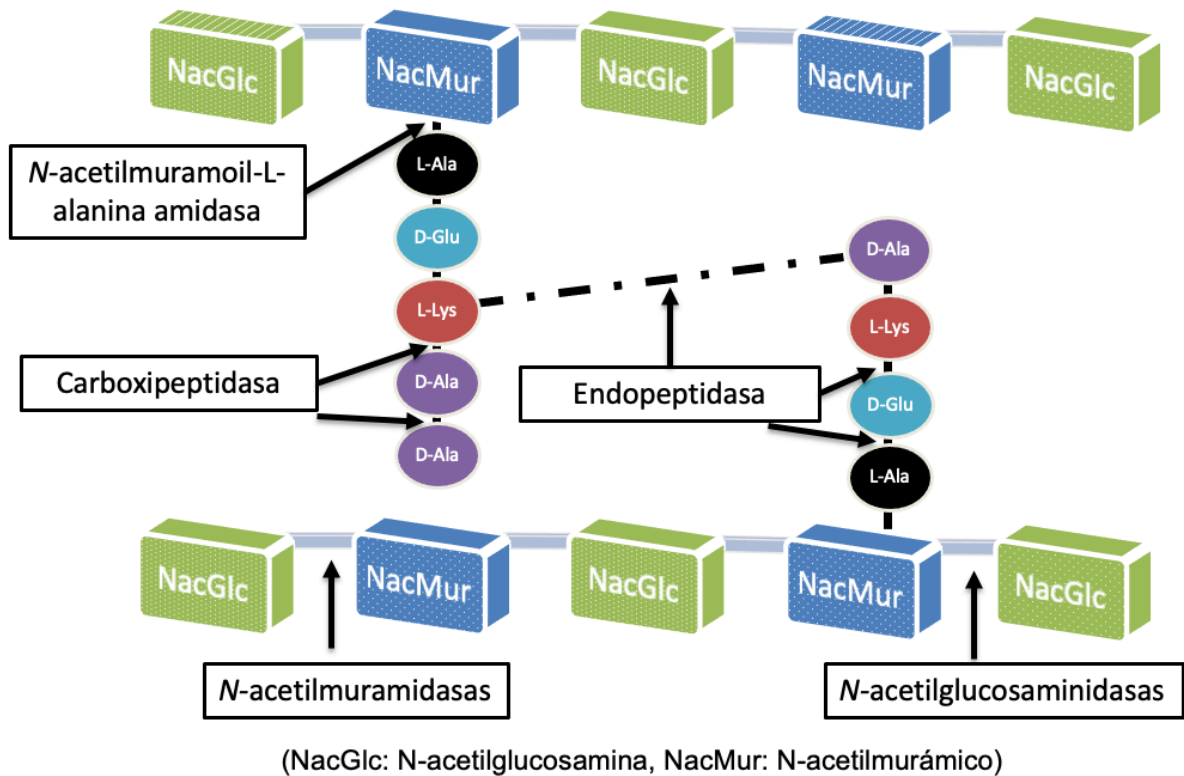


FIGURA 2. 4 Clasificación de las hidrolasas de peptidoglucano de acuerdo con su especificidad

(Modificado de Layec *et al.*, 2008)

3.3.2. Dominios catalíticos de hidrolasas de peptidoglucano

La especificidad de las PGH depende de su dominio catalítico, en la mayoría de los casos se componen de dos dominios: un dominio catalítico que contiene el sitio activo de la enzima y un dominio de unión a la pared celular compuesto por varias repeticiones de aminoácidos (Díaz *et al.*, 1991; Joris *et al.*, 1992; Layec *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente la BAL pertenecen al filo Firmicutes, el cual se caracteriza por la amplia expresión de PGH, se han descrito 14 dominios catalíticos y 27 dominios de asociación de superficie (Finn *et al.*, 2006).

3.3.3. Dominios catalíticos

Los dominios catalíticos están especializados en la escisión de un enlace peptidoglucano específico, se han descrito 14 dominios catalíticos los cuales se enlistan en la tabla 4. Las PGH están compuestas de un solo dominio catalítico, sin embargo, se han estudiado enzimas que muestran múltiples dominios catalíticos distintos o idénticos asociados con uno o más sustratos/dominios de unión, por ejemplo, la principal PGH de *S. aureus* una autolisina bifuncional denominada Atl (Oshida *et al.*, 1995). Atl se produce inicialmente como una proteína de 138 kDa con un dominio amidasa y un dominio glucosaminidasa después de un procesamiento proteolítico genera dos PGH principales: una N-acetilmuramil-L-alanina amidasa de 62 kDa y una N-acetilglucosaminidasa de 51 kDa conferidos por glucosaminidasa y amidasa_2 (Oshida *et al.*, 1995; Komatsuzawa *et al.*, 1997).

TABLA 2. 4 Dominios catalíticos de las hidrolasas de peptidoglucano

N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	Endopeptidasa	Carboxipeptidasa	N-acetilglucosaminidasa	N-acetilmuramidasa
Amidasa 2 (PF01510)	Peptidasa M23 (PF01551)	Peptidasa_S66 (PF02016)	Glucosaminidasa (PF01832)	Glico_hidro_25 (PF01183)
Amidasa 3 (PF01520)	CHAP (PF05257)	VanY (PF02557)		SLT (PF01464)
Amidasa 5 (PF05382)		Peptidasa_S11 (PF02113)		Transglicosilasa (PF06737)
CHAP (PF05257)		Peptidasa_S13 (PF00768)		

(Modificado de Layec *et al.*, 2008)

Lactococcus lactis tiene tres N-acetilglucosaminidasas conocidas (AcmA, AcmB y AcmC) y una hipotética (AcmD), dos de los cuales (AcmA y AcmD) tienen tres

dominios de peptidoglucano vinculante LysM (Huard *et al.*, 2003; Huard *et al.*, 2004) La presencia de tres dominios LysM ha demostrado ser óptimo para la actividad de AcmA porque las proteínas variantes con menos o más dominios LysM presentan menor actividad (Steen *et al.*, 2005).

El nivel de actividad de las enzimas hidrolíticas no solo resulta de la eficiencia de los dominios catalíticos, sino que también está controlado por los dominios de unión a la pared celular (Layec *et al.*, 2008).

3.3.4. Dominios de unión a la pared celular

Los dominios de unión a la pared celular son de gran importancia para la eficiencia catalítica de las PGH. Una de sus principales funciones es la unión de las proteínas a la pared celular y la orientación de la enzima a su sitio de acción (Braun *et al.*, 1997; Janecek *et al.*, 2000). Su número puede ser esencial para la unión eficiente de las PGH a la pared celular. Por ejemplo, el número de copia del dominio de unión a colina (ChBD /CW_binding_1), LysM y SH3, ha demostrado ser importante para la alta eficiencia catalítica de las PGH: su inactividad conduce a una fuerte reducción (Eckert *et al.*, 2006) o incluso deficiente actividad de las PGH (Sass y Bierbaum, 2007), la N-acetilmuramidasa LytC de *S. pneumoniae* contiene un dominio de unión a colina por el cual lleva a cabo su fijación al ácido teicoico de la pared celular, que es esencial para su actividad (Monterroso *et al.*, 2005). Otro caso es el dominio G5, que induce la unión con N-acetilglucosamina, se encuentra en ciertas hidrolasas que son capaces de romper los oligosacáridos en su entorno para proporcionar fuentes de carbono (Clarke *et al.*, 1995) o el dominio SH3 que se asocia con la supervivencia de los patógenos dentro de la célula invadida (Layec *et al.*, 2008).

En la tabla 5 se presentan 27 dominios de superficie que pueden encontrarse en bacterias como *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, entre otras.

TABLA 2. 5 Dominios de unión a la pared celular de BAL

(Modificado de Layec *et al.*,2008)

Dominios de unión	Sitios de unión	Número de acceso XFAM
Big_4	Variedad de proteínas de superficie bacteriana.	PF07532
CBM_5_12	Módulo de unión a carbohidratos (CBM)	PF02839
ChW	Proteínas que contienen repeticiones de ChW (triptófano)	PF07538
Collagen	Proteínas de repetición de triple hélice	PF01391
CpL_7	Las repeticiones CW_7 forman un motivo de unión a la pared celular	PF08230
Cu_amine_oxidN1	Oxidación de aminas primarias a aldehídos	PF07833
Cw_binding_1	Repeticiones en P15057 reconocimiento de las paredes celulares que contienen colina	PF01473
Cw_binding_2	SlpA y Cwp2 dominios para la unión de PSII, un componente de la pared celular	PF04122
DUF1142	Proteínas de la cola del profago que probablemente actúan como endopeptidasas.	PF06605
DUF1958	Proteína 4 de unión a penicilina procariota.	PF09211
Erfk_YbiS_YhnG	Proteína YkuD, ErfK / YbiS / YcfS / YnhG	PF03734
FG_GAP	Repetición de FG-GAP extracelular que se encuentra en las integrinas alfa.	PF01839
GBS_Bsp_like	Repetición similar a GBS Bsp, proteína del estreptococo del grupo B (GBS).	PF08481
G5	Dominio G5, proteínas extracelulares, proteínas del metabolismo del PG	PF07501
LysM	Dominio LysM (motivo de lisina) degradación de la pared celular bacteriana.	PF01476
PBP5_C	Proteína 5 de unión a penicilina, dominio C-terminal, D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa.	PF07943
PG_bindling_1	Dominio de unión de peptidoglicano putativo, está compuesto por tres hélices alfa.	PF01471
fago bolin	SPP1 fago holina, proteínas holinas de los bacteriófagos del grupo dsDNA <i>Siphidoviridae</i>	PF04688
SH3_2	Dominio variante SH3, proteína implicada en la transducción	PF07653
SH3_3	Dominio SH3 bacteriano, proteínas bacterianas hipotéticas de función desconocida	PF08239
SH3_4	Dominio SH3 bacteriano, proteínas bacterianas hipotéticas de función desconocida	PF06347

SH3_5	Dominio SH3 bacteriano, proteínas bacterianas hipotéticas de función desconocida	PF08460
SLpA	Dominio de la proteína A de la capa superficial, proteínas de la superficie celular bacteriana	PF03217
SLH	Polímeros piruvilados de pared celular: ácidos teicoicos, ácidos teicurónicos, ácidos lipoteicoicos o lipoglicanos.	PF00395
SPOR	Dominios bacterianos SPOR se unen al peptidoglucano	PF05036
TMP	Repetición motivo WXXh donde X puede ser cualquier residuo y h es un residuo hidrófobo.	PF05017
YSIRK_signl	Motivo SIRKxxxGxxS dominio transmembrana	PF04650

3.3.5. Hidrolasas de peptidoglucano de bacterias ácido lácticas

Diversos autores han reportado que las BAL son una fuente importante de producción de PGH y se pueden utilizar para controlar patógenos en la industria alimentaria y en los hospitales, por su actividad antimicrobiana.

El género con más reportes de producción es: *Lactobacillus* (Cibik y Chapot-Chartier, 2004; Turner *et al.*, 2004; Yokoi *et al.*, 2005; Donovan y Foster-Frey 2008). Además, se ha descubierto que una especie puede producir dos o hasta tres enzimas con actividad lítica (Baker *et al.*, 2006).

Los estudios de este tipo de enzimas inician con la lisozima la cual es una muramidasa (N-acetil muramidasa, E.C. 3.2.1.17), descubierta en por Alexander Fleming, catalogada como aditivo de uso alimentario, con peso molecular de 14.307 kDa y está compuesta por una secuencia de 129 residuos de aminoácidos, con un punto isoeléctrico (pI) de 10.7; previene el crecimiento de *Oenococcus oeni*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, (Jollés y Jollés, 1984).

En *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* aislado de productos lácteos se expresa una glucosidasa y una N-acetil-muramil-L-alanina amidasa con actividad lítica de 41 y 52 kDa según el análisis de especificidad (Cibik *et al.*, 2001).

Se caracterizó una PGH producida principalmente durante el crecimiento vegetativo de *Clostridium perfringens*, denominada como ACP la cual tiene una estructura modular con tres dominios: un dominio de péptido señal, un dominio N-terminal con secuencias repetidas y un dominio catalítico C-terminal con un peso molecular de 122.388 kDa con un pl de 8.79 (Camiade *et al.*, 2009).

Donovan y colaboradores 2006 estudiaron la endolisina del bacteriófago B30 de *Streptococcus agalactiae*, con actividad lítica contra los tres principales patógenos causantes de mastitis del ganado lechero, es decir, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus* (Baker *et al.*, 2006; Pritchard *et al.*, 2006; Donovan *et al.*, 2006).

Lactobacillus gasseri JCM11 31 (*Lactobacillus acidophilus*) presenta dos proteínas extracelulares de 55 y 35 kDa con actividad autolítica (por análisis de zimograma), el pH óptimo para la lisis fue en un rango de 6.0 a 7.0 (Yokoi *et al.*, 2004).

En 2005 reportan la actividad de PGH producidas por *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc citreum* y *Lacticaseibacillus casei* con pesos moleculares de 18-55 kDa (Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

Se han identificado en *Enterococcus hirae* ATCC9790 dos PGH con actividad muramidasa; una de ellas, denominada SF muramidasa, que ha demostrado ser una exoenzima que degrada progresivamente hebras de glucanos de su extremo GlcNAc y la pesticina que es una endo N-acetilmuramidasa (Vollmer *et al.*, 2008).

En *Staphylococcus Lugdunensis* se identificó una PGH (ALT) con actividades de N-acetilglucosaminidasa y N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa con un peso molecular de 140.69 kDa siendo la principal autolisina de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Bourgeois *et al.*, 2007).

En 2013 García-Cano y colaboradores reportan PGHs aisladas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con actividad lítica contra *Staphylococcus aureus* con pesos moleculares de 110 y 99 kDa en zimogramas con sustrato *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (García-Cano *et al.*, 2013), asimismo, se reportó una PGH de *Enterococcus faecalis* (AtID) con peso molecular de 62 kDa con actividad antibacteriana contra *Listeria*

monocytogenes, *Staphylococcus aureus* y cepas de *Enterococos* de origen clínico (Serrano-Maldonado *et al.*, 2018).

Para la metodología utilizada en este trabajo se basa en su mayoría en Cibik y Chapot-Chartier que evaluaron PGH de *Lactobacillus pentosus* donde identificaron PGH en las proteínas de membrana en la fase estacionaria del crecimiento (16 h); con actividad lítica a los 31, 58 y 112 kDa, en proteínas del citosol presentó actividad a los 31 kDa; en el extracto crudo actividad a los 31, 43, 58, 77, 95 y 112-kDa por lo que se planteo utilizar esta metodología para conocer donde se encuentra la PGH (Cibik y Chapot-Chartier, 2004).

3.3.6. Hidrolasas de peptidoglucano recombinantes

Se han aislado PGH recombinantes para evaluar su expresión, actividad; así como para caracterizar sus propiedades físicoquímicas, bioquímicas, de reacción y de especificidad, a continuación, se mencionan algunos casos de BAL.

La clonación de *Lactobacillus gasseri* JCM11 31 T se realizó en el sistema de *E. coli* XL1-Blue utilizando el vector plásmido pUC118, produjo dos plásmidos recombinantes, holgaY y lysgaY. LysgaY codificó una proteína de 310 aminoácidos, cuyo peso molecular se calculó en 33.7 kDa y un pI 8.75; holgaY codificó una proteína de 143 aminoácidos con masa molecular calculada y pI de 15.7 kDa y 9.25, la secuenciación reveló una homología significativa con muramidasa putativas del fago *Lactobacillus* Badh, Lj965, Lj928, LL-H, mv4 y mv1 (Yokoi *et al.*, 2005).

Se caracterizó por primera vez la proteína AtIL de *Staphylococcus lugdunensis*; se clonó, el gen AtIL que codifica una proteína bifuncional con actividad lítica N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa y N-acetilglucosaminidasa sobre el peptidoglucano se realizó en el sistema de expresión pBAD / His B (Invitrogen) se utilizó para subclonar y expresar los fragmentos del gen en *E. coli* TOP10 (Invitrogen). El gen atIL codificó una proteína de 1279 aminoácidos con una masa molecular calculada de 140.69 kDa (Bourgeois *et al.*, 2008).

Se utilizó el sistema pET (pET System, Novagen) y la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3) para la clonación y expresión de la PGH bifuncional de 99 kDa de

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 en *Escherichia coli* (García-Cano *et al.*, 2015). La lisina CHAP k del bacteriófago K, se expresó de forma heteróloga en *Escherichia coli* BL21 (DE3) utilizando el vector pET28a, el gen codificó una proteína con una masa molecular calculada de 19.701 kDa, con una pureza del 95% (Shan *et al.*, 2020).

3.3.7. Aplicaciones de hidrolasas de peptidoglucano

Se ha descrito concisamente el mecanismo de estas enzimas principalmente en la más estudiada que es la lisozima esta enzima utiliza su mecanismo de acción frente a bacterias Gram positivas destruyendo las paredes celulares por hidrólisis del enlace β 1-4 entre el ácido *N*-acetil-murámico y *N*-acetilglucosamina del peptidoglucano, debilitando así la pared celular y la consecuente lisis celular.

En la industria alimentaria se utiliza la lisozima en alimentos como carnes, embutidos, pescado, verduras, frutas, vino y leche en polvo, también es utilizada en cosméticos y en la industria farmacéutica (Maidment, 2009; Nakimbugwe *et al.*, 2006).

La lisozima de huevo está catalogada como aditivo de uso alimentario con el código E-1105, ha sido utilizada como preservador por contacto de la superficie del alimento como vegetales frescos, pescado, carne, frutas, langostinos y otros alimentos (Mine *et al.*, 2004).

La lisostafina es una enzima producida por *Staphylococcus simulans* la cual tiene un efecto bactericida sobre *S. aureus* y esta le confiere aplicaciones en alimentos, en medicina veterinaria y humana (Fedorov *et al.*, 2003; Szweda *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2007).

3.3.8. Hidrolasas de peptidoglucano con actividad antimicrobiana.

La resistencia de antibióticos representa una amenaza para la salud, la seguridad alimentaria y el desarrollo, el uso de algunas enzimas con actividad lítica como agentes antimicrobianos se ha incrementado en la industria de los alimentos (Donovan *et al.*, 2006; García *et al.*, 2010). En la tabla se enlistan algunas PGH que han mostrado actividad frente a microorganismos resistentes.

TABLA 2. 6 PGH con actividad antimicrobiana

PGH	Microorganism o aislado	Microorganismo inhibido	Referencia
Lisostafina	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	Fedorov <i>et al.</i> , 2003
HolgaY y lysgaY	<i>Lactobacillus gasseri</i> JCM 1130	<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> y <i>Lactococcus lactis</i>	Yokoi <i>et al.</i> , 2004
N-acetil-muramidasa	Bacteriófago B30	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Baker <i>et al.</i> , 2006
AtIL	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> ATCC 43809	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Bourgeois <i>et al.</i> , 2008
Endolisina	Profago LambdaSa2	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus equi</i>	Donovan <i>et al.</i> , 2006
Acp	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698, <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium difficile</i> y <i>Clostridium perfringens</i>	Camiaide <i>et al.</i> , 2010
N-acetilglucosamida	<i>Pediococcus acidilactici</i> 99 kDa	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042, <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	García-Cano <i>et al.</i> , 2013
AtID	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698, <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC, <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Serrano-Maldonado <i>et al.</i> , 2018
PGH1 105,5 KDa y PGH2 30,9 KDa	<i>Pediococcus acidilactici</i> NDCDC 25	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus albus</i> y <i>Escherichia coli</i>	Gandhi <i>et al.</i> , 2020

3.4. Antecedentes del grupo de investigación

Las BAL utilizadas en este trabajo ha sido estudiadas por el grupo de investigación del laboratorio de Microbiología de la UNIDA del Instituto Tecnológico de Veracruz, En particular *Pediococcus acidilactici* ITV-26 se aisló de muestras de heces de neonato lactante sano, identificada bioquímicamente por la galería API 50 CHL con un 98 % de identidad (I.D.) y su caracterización molecular se realizó en el Instituto de Fijación de Nitrógeno de la UNAM, se han realizado estudios de la producción de la bacteriocina en diferentes condiciones se ha observado que se produce de forma extracelular durante el crecimiento en fase logarítmica tardía y se acumula en la fase estacionaria (López del Castillo, 1998, Calderón-Santoyo *et al.*, 2001).

Limosilactobacillus fermentum SP-23 fue aislado de quesos frescos elaborados artesanalmente a partir de leche bronca en el municipio de la Joya, Veracruz, identificado bioquímicamente por la galería API 50 CHL y su caracterización molecular se realizó en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA) (Portilla-Vázquez *et al.*, 2016).

3.5. Síntesis de antecedentes

Se han realizado estudios de PGH de bacterias Gram positivas de los géneros *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, entre otros. Las PGH se identificaron mediante zimogramas utilizando como sustrato *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, mostrando actividad lítica *in situ*, donde se ha reportado que tienen actividad antimicrobiana frente a bacterias de importancia en salud pública. Sin embargo, no se han realizado estudios de PGH de los microorganismos utilizados en el presente estudio, *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 y *Pediococcus acidilactici* ITV-26 productor de bacteriocinas.

4. HIPÓTESIS

Las cepas *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 producen al menos una PGH.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

- Identificar las hidrolasas de peptidoglucano producidas por *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 aisladas respectivamente de heces de neonato y quesos frescos artesanales.

Objetivos Específicos

- Estudiar la producción de PGH extracelulares, adheridas a membrana y en citosol producidas por *Pediococcus* y *Limosilactobacillus*.
- Identificar las PGH de *Pediococcus* y *Limosilactobacillus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 5.1 se muestra un diagrama general de la metodología empleada en el presente trabajo.

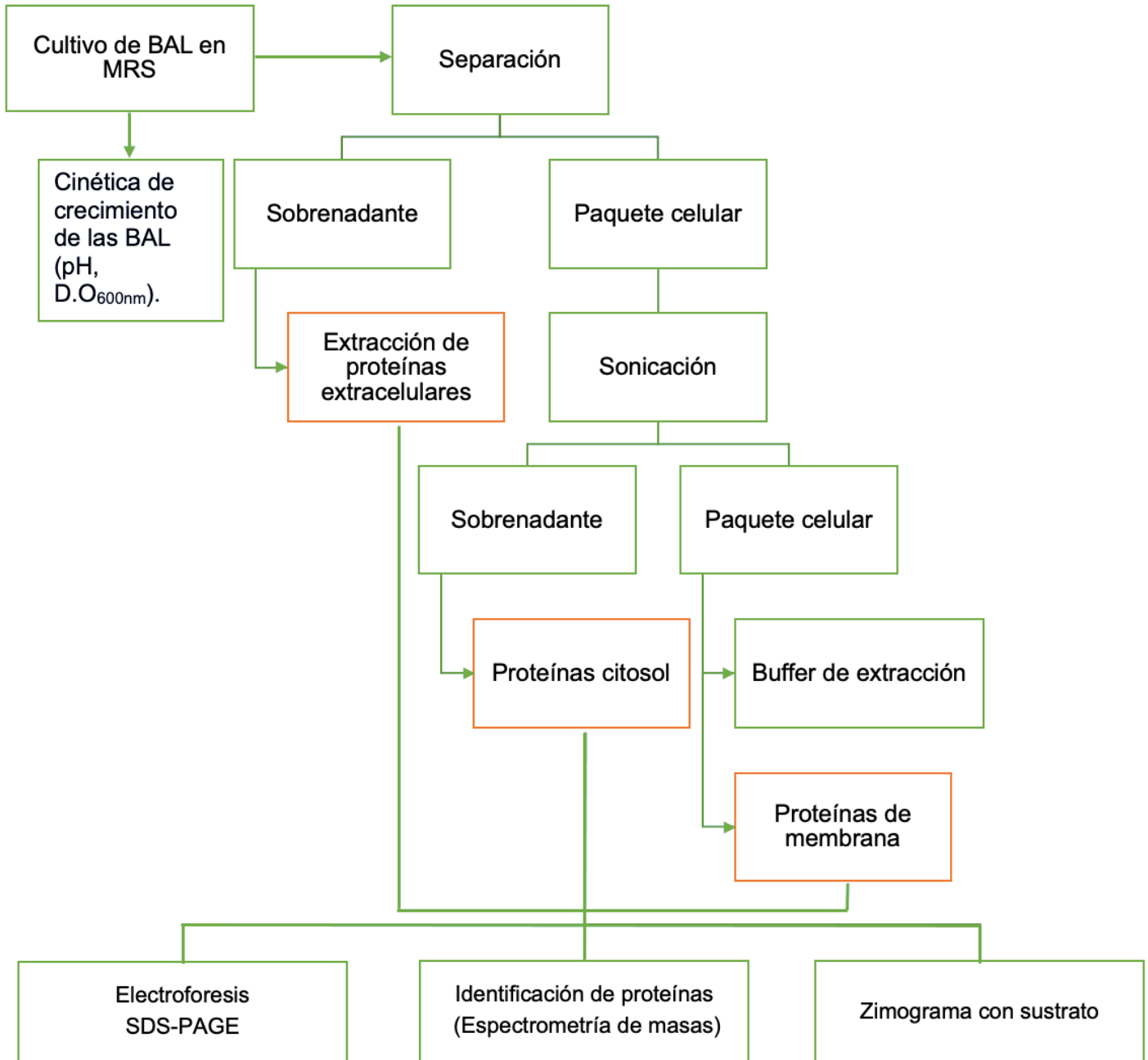


FIGURA 5.1 Diagrama general de la metodología

6.1. Material biológico

Las cepas para este trabajo se muestran en la tabla 5.1, las cuales fueron aisladas de heces de neonato lactante sano (López del Castillo, 1998) y de quesos frescos artesanales de la Joya, Ver (Portilla-Vázquez *et al.* 2016) e identificadas en el laboratorio de Microbiología, perteneciente a la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (UNIDA) del Instituto Tecnológico de Veracruz (ITVer) y por el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), la cepa utilizada como sustrato para los zimogramas es una cepa de colección proporcionada por la Facultad de Química UNAM.

TABLA 5.1 Identidad de los microorganismos en estudio.

BAL	CEPARIO/PROCEDENCIA	CLAVE
<i>Pediococcus acidilactici</i>	UNIDA Microbiología ITVer	ITV-26
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	UNIDA Microbiología ITVer	SP-23
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	Facultad de Química UNAM	MI-4698

6.2. Crecimiento de cepas

Las cepas *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23, fueron preservadas en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (Apéndice A) con 40 % (v/v) de glicerol (1 ml) y conservadas a -70 °C en un ultracongelador (REVCO modelo ULT1386-5-A30), se reactivaron en 10 mL de caldo MRS (Man, Rogosa, Sharpe) con inóculo de 1 %, en una incubadora (Precision Scientific modelo 815) a 37 °C por 18 horas y se resembraron a las 12 h, para posteriormente aislarlas en agar MRS (González Gómez, 2002).

6.3. Identificación fenotípica y genotípica de las BAL

6.3.1. Identificación fenotípica

La identificación fenotípica se compone de examen macroscópico, microscópico y bioquímico, el primero evalúa la morfología de las colonias para una identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos.

En un crecimiento en agar MRS con un inóculo al 1 % e incubado 24 h a 37 °C, se examinó la morfología de las colonias como el tamaño, la forma, la consistencia y el color; consecutivamente se realizó el frotis bacteriano (Apéndice B) de una colonia y se realizó el examen microscópico. Se tiñó con colorante Gram (Apéndice C) y se observó en el microscopio de campo claro con objetivo 100x e inmersión en aceite observando la forma (cocos o bacilos), tamaño (cortos largos) y disposición.

A partir de las colonias estudiadas se realizaron las pruebas bioquímicas mediante el sistema API 50 CHL (Apéndice D) lo cual permitió estudiar rápida y fácilmente 49 caracteres destinados a la identificación del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos. La batería consta de cúpulas que contienen los medios necesarios para que la BAL metabolice alguno de los componentes y podamos ver a simple vista una reacción química.

El llenado de los microtubos con el medio 50CHL (Apéndice D), la adición del inóculo, la incubación, la lectura e interpretación de las pruebas se realizó de acuerdo con la metodología descrita en la ficha técnica del sistema API 50CHL de Biomerieux. La interpretación de estas reacciones se realiza con la ayuda de la tabla de identificación, y el reconocimiento se consigue mediante un software de identificación apiweb™ API 50CHL V5.1.

6.3.2. Identificación genotípica

6.3.2.1. Extracción de ADN

Para la identificación genotípica se realizó una extracción de DNA con fenol-acetato de sodio (López-Zamudio, 2020) (Apéndice F), la concentración (ng/μL) de ADN extraído se estimó espectrofotométricamente en un equipo NANODROP 2000 de

la marca Thermo Scientific mediante su absorbancia a 205 nm y por electroforesis con gel de agarosa en el cual se observó la integridad del ADN extraído.

6.3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN extraído se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen de reacción de 25 µl, utilizando los cebadores AAGGAGGTGATCCAGCC y AGAGTTTGATCCTGGCTCAG para la amplificación del gen 16S descritos por Weisburg *et al.*, 1991. Se utilizó un termociclador (Lan Cycler Genius) con el siguiente perfil: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 34 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 30 seg, hibridación a 50 °C por 30 seg y extensión 72 °C por 1 min, con una extensión final después del último ciclo a 72 °C por 5 min. Para la detección del producto se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, la visualización de la amplificación se realizó mediante luz ultravioleta.

6.3.2.3. Purificación y secuenciación de amplicón

Las muestras obtenidas fueron purificadas de acuerdo con las instrucciones del proveedor con los kits comerciales *Zymoclean gel DNA recovery kit (zymoresearch)* y *purelink quick gel extraction and PCR purification combo kit (Invitrogen)*, posteriormente fueron enviadas para su secuenciación al Instituto de Biotecnología de la UNAM el cual utiliza el método de Sanger.

Una vez obtenidos los cromatogramas, se obtuvo la secuencia y se analizó con el programa Chromas 2.6.4. Las secuencias fueron posteriormente alineadas contra la base de datos del NCBI y contra las secuencias obtenidas de las bases de datos de los genomas. (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)).

6.4. Curva de crecimiento bacteriano

Para determinar la curva de crecimiento de las cepas, se inocularon 5 ml de caldo MRS con un inóculo con concentración 1×10^7 UFC/mL, en tubos de ensayo 16x150 con rosca. Los tubos se incubaron 18 horas en estufa de cultivo (Precision Scientific modelo 815) a 37 °C. Se sembraron 800 mL de caldo MRS en matraces Erlenmeyer de 1000 ml con 8 mL de inóculo con concentración 1×10^7 UFC/mL. Se incubó el cultivo en estufa a 37 °C 24 h. Se tomaron 40 mL de medio cada 2 horas y se midió el pH (potenciómetro jenco 6173R), la D.O._{.600 nm} (Microplate reader Benchmark BioRad) y se extrajeron proteínas extracelulares, de membrana y citosol.

6.4.1. Determinación de la fase de crecimiento con mayor actividad enzimática

A) Proteínas extracelulares

A partir de las cinéticas se obtuvieron las fracciones las cuales se centrifugaron a 3,000 x g (Centrifuga 5810 R Eppendorf Rotor F-34-6-38) durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante obtenido se concentró en tubos Amicon® Ultra-15 Millipore con una membrana de tamaño de corte de 10 kDa, el sobrenadante contenía las proteínas extracelulares, el paquete celular se lavó dos veces con un buffer 50 mM Tris-HCl, pH 8 (Mora *et al.*, 2003).

B) Proteínas de citosol

El paquete celular se ajustó con buffer 50 mM Tris-HCl, pH 8 a una D.O._{.600 nm} de 1.5-2.0, se sonicó (sonicador VCX 130 PB) a una amplitud de 30 Hz con 10 ciclos de 20 s a 4° C, se centrifugó 10,000 x g (Centrifuga HERMLE Z 216 MK) durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante que contiene la fracción soluble con las proteínas de citosol, se colectó (Cibik y Chapot Chartier, 2004).

C) Proteínas adheridas a membrana

El botón residual de las muestras se resuspendió en 10 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl y 2 % SDS, se ajustó a una D. O._{600 nm} de 1.5-2.0, se agitó y se colocó en baño maría 80 °C por 5 min (Eppendorf Thermomixer Comfort 5355) posteriormente, se enfrió a temperatura ambiente, se centrifugó 10,000 x g (Centrifuga HERMLE Z 216 MK) durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante contenía las proteínas adheridas a membrana.

Todas las muestras fueron liofilizadas (Liofilizador FreeZone 4.5 LABCONCO) (Apéndice H) y preservadas a -70 °C en un ultracongelador (REVCO modelo ULT1386-5-A30) hasta su posterior utilización (Cibik y Chapot Chartier, 2004).

6.5. Actividad enzimática

6.5.1. Actividad de PGH utilizando 4-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosaminida

La actividad de PGH fue determinada utilizando el sustrato el 4-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosaminida (4NAG) (sigma-Aldrich), en microplaca de 96 pozos (Microtest Plate 96 Well SARSTEDT). Se colocaron 10 µl de 4NAG de 1 mg/ml, 10 µl del extracto proteico y 80 µl de citrato de sodio pH 4.8 (J.T. BAKER), se utilizó como testigo positivo a la β-N-glucosaminidasa (*Canavalia ensiformis*, Sigma-Aldrich) en una concentración de 10 µg/ml y como negativo la lisozima (Bio-tech) en una concentración de 10 µg/ml. Se incubaron a 37 °C durante 10 min, posteriormente se agregaron 100 µl carbonato de sodio 140 mM (J.T. BAKER) para detener la reacción e incrementar el color. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Microplate reader Benchmark BioRad). Se realizó una curva estándar de 4-nitrofenol (4-NP). Una unidad se define como: 1 µmol de 4-nitrofenol liberado en 1 min a 37 °C (García-Cano *et al.*, 2013).

6.6. Identificación de proteínas

6.6.1. Electroforesis SDS-PAGE y zimogramas

El peso molecular de las proteínas se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10 %, se tomaron 20 µl de muestra y se adicionaron 10 µl de amortiguador de carga, se corrió a 80 voltios por 90 min en una cámara vertical Mini Protean III (Bio-Rad) con una fuente de poder (Power Pac 200 BioRad) con el amortiguador catodo y anodo. Posteriormente se lavó el gel con agua destilada durante 30 min, se realizó la tinción con azul de Coomassie (Bio-Safe™ Coomassie Stain #1610786) durante 2 horas y se sometió a desteñir con una disolución de 10 % de metanol, 10 % de ácido acético glacial y 80 % de agua destilada (Laemmli, 1920).

Para realizar los zimogramas se prepararon geles SDS al 10 % de poliacrilamida copolimerizado con 0.2% de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 como sustrato, las células se resuspendieron con los reactivos necesarios para la elaboración del gel separador, se corrió a 80 voltios por 90 min en una cámara vertical Mini Protean III (Bio-Rad) con una fuente de poder (Power Pac 200 BioRad), el gel se lavó dos veces con agua destilada y se incubó a 37 °C con amortiguador de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 con Tritón X-100 1 % v/v) durante 16 horas en agitación (Enviviron-Shaker Lab-Line Orbit). La actividad se observó por la presencia de una banda clara o translúcida sobre un fondo opaco, para aumentar el contraste del gel se agregó 0.1 % KOH y 1 % de azul de metileno durante 30 minutos, se destiñó con agua destilada hasta observar la aparición de las bandas (Leclerc y Asselin, 1989). La observación de los geles y la obtención de las imágenes se hicieron en un fotodocumentador (Bio-Rad Gel Doc™ XR+) utilizando el software Image Lab™.

6.6.2. Identificación de proteínas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Las bandas con actividad lítica de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 se cortaron y se enviaron para su identificación al instituto de Ecología, A.C. (INECOL®) campus Xalapa, se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Thermo Scientific™ Orbitrap Fusion™ Tribrid™) esta técnica analítica combina la cromatografía de líquidos como técnica de separación y la espectrometría de masas como técnica de detección, identificación y cuantificación para compuestos proteicos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación fenotípica y genotípica de bacterias

7.1.1. Identificación fenotípica de bacterias ácido lácticas.

Las cepas *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 se confirmaron mediante pruebas bioquímicas API 50 CHL las cuales coinciden con lo reportado por Portilla-Vázquez *et al.*, 2016 y López del Castillo, 1998 los cuales trabajaron con estas cepas, en la figura 6.1 se muestran la identificación morfológica mediante examen macroscópico y microscópico.

Limosilactobacillus fermentum SP-23 es una cepa que no se le han realizado estudios de actividad antimicrobiana, por lo que no se sabe si produce bacteriocinas, sin embargo, géneros de *Lactobacillus* han mostrado tener actividad lítica antimicrobiana producida por las PGH (Cibik y Chapot-Chartier, 2004; Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

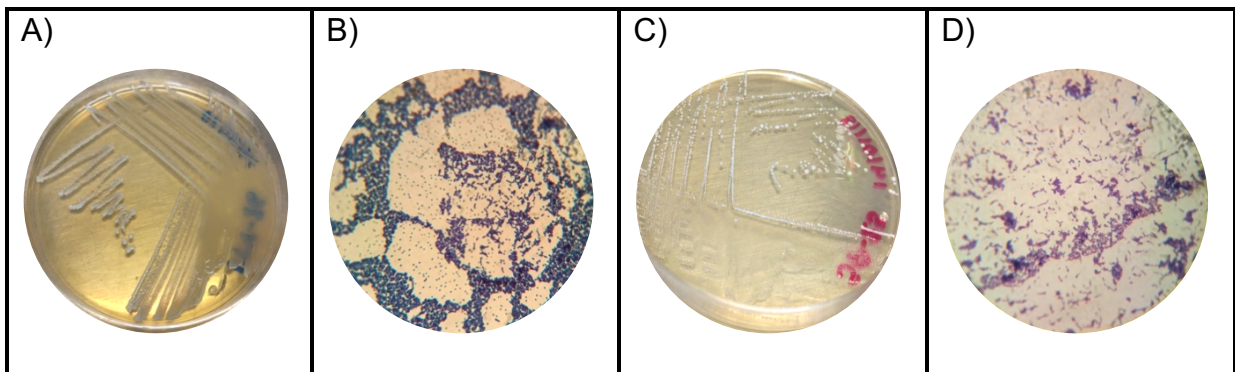


FIGURA 6.1 Identificación morfológica de BAL en estudio.

En los paneles A y C se muestran los microorganismos en estudio en agar MRS en placa; en los paneles B y D se muestran las imágenes al microscopio de los microorganismos en estudio.

La figura 6.1 muestra la morfología de los microorganismos en estudio, en el caso de *Pediococcus acidilactici* ITV-26, en el panel A) se observa la placa con agar MRS, se muestran colonias blancas, redondas, lisas, con bordes regulares. En el panel B) se observa la imagen al microscopio de campo claro de células de la colonia de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 teñida con Gram, objetivo 100x e inmersión en aceite, se muestran cocos Gram-positivo, los cuales se agrupan en pares o tétrada (Doi *et al.*, 2009), ambos resultados coinciden con López del Castillo, 1998, que observó colonias pequeñas blancas con tinción positiva al Gram, reacción de catalasa negativa, y morfología celular cocoide y con lo reportado en el Manual de Bacteriología Sistemática edición 2009 de Bergey's. En cuanto a *Limosilactobacillus fermentum* SP-23, en el panel C) se observa en la placa de agar MRS colonias blancas, puntiformes, En el panel D) se observa la imagen al microscopio de campo claro de *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 teñida con Gram, objetivo 100x e inmersión en aceite, se muestran bacilos cortos Gram positivos, lo cual coincide con lo reportado por Portilla-Vázquez *et al.*, 2016 que observó colonias pequeñas de color blanquecino con bordes bien definidos. Las bacterias aisladas en función de su morfología correspondían a microorganismos de forma bacilar.

El resultado bioquímico de los microorganismos estudiados fue de 94.1 % y 96.3 % (Tabla 7.1), esto coincide con lo reportado por Portilla-Vázquez *et al.*, 2016 y López del Castillo, 1998, los cuales identificaron los microorganismos para el estudio de bacteriocinas.

7.1.2. Identificación genotípica de bacterias lácticas

En la figura 6.2 se muestran las bandas resultantes de la extracción de DNA de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23, en un gel de agarosa al 1 %. Como puede observarse se distinguen dos bandas de tamaño mayor a 10,000 pb, indicativo de la presencia del DNA genómico. Ambas bandas se observan integras y puras, lo cual se confirmó según las relaciones de absorbancia 260/280, donde se encuentran en el rango 1.7 - 2.0.

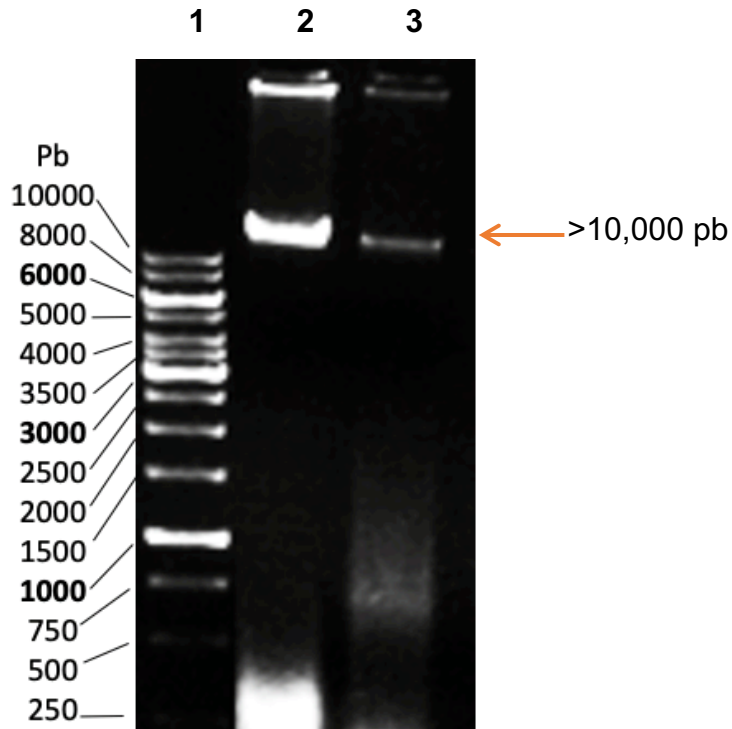


FIGURA 6.1 DNA de microorganismo en estudio.

Pediococcus acidilactici ITV-26 (carril 2) y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 (carril 3) y marcador 1 kb (carril 1) en gel de agarosa al 1 %.

Considerando que el DNA extraído es de buena calidad y con rendimiento adecuado, se realizó la amplificación del gen 16S por PCR. En la figura 6.3 se muestran las bandas intensas de los amplicones del gen 16S obtenidos con el tamaño teóricamente esperado de 1500 pb de acuerdo con el tamaño del gen 16S (Weisburg *et al.*, 1991 (Apéndice I). Posteriormente se realizó la purificación del amplicón con el kit comercial. La secuenciación fue realizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

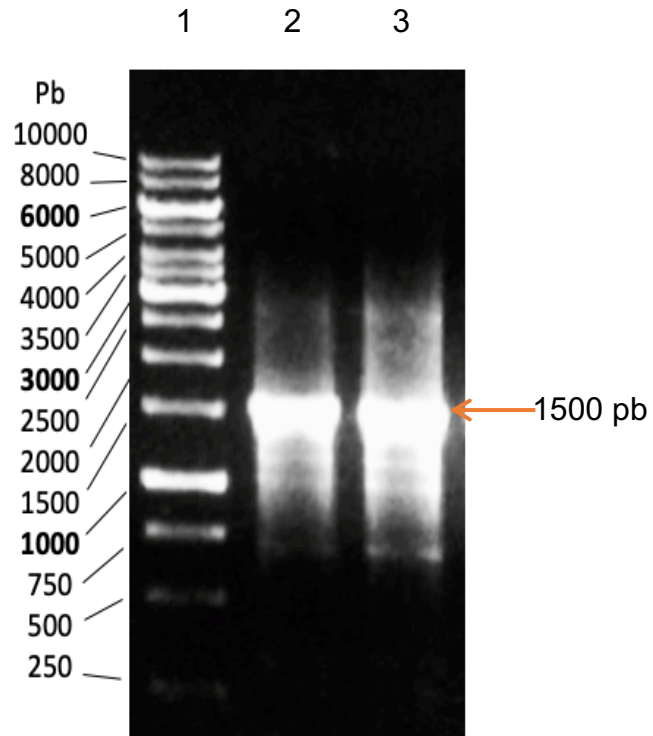


FIGURA 6.2 Amplificación del gen 16S de los microorganismos en estudio. Amplicón del gen 16S de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 (carril 2), Amplicón del gen 16S de *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 (carril 3) y marcador 1 kb (carril 1) en gel de agarosa al 1%.

7.1.3. Análisis bioinformático

El análisis de las secuencias se realizó por BLAST en el servidor del NCBI, indicando los porcentajes de identidad (ID) en la Tabla 6.2, la cual muestra más del 98 % de similitud mostrando un valor E de 0; siendo más significativa la coincidencia con cepas de interés. Esto coincide con lo reportado por Portilla *et al.*, 2016 y López del Castillo, 1998, por lo que se confirmó la identidad de las cepas en estudio tanto bioquímica como genotípicamente.

TABLA 6.2 Identidad de los microorganismos en estudio.

Identificación bioquímica			Identificación molecular		
Microorganismo	T	% ID	Microorganismo	Valor E	% ID
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SP-23	0.72	94.1	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SP-23	0.0	99.79
<i>Pediococcus acidilactici</i> ITV-26	0.75	96.3	<i>Pediococcus acidilactici</i> ITV-26	0.0	98.23

Los alineamientos se realizaron mediante la plataforma virtual MultAlin con las secuencias del gen 16S de *Limosilactobacillus fermentum* aislados de quesos y *Pediococcus acidilactici* de heces reportadas en la literatura. La cepa ITV-26 aislada de heces de neonatos se alineó con cepas obtenidas de ensilaje y maíz fermentado (Figura 6.4 y 6.5), así como SP-23 aislada de quesos frescos se alineó con cepas aisladas de leche de ganado e intestino (Figura 6.6 y 6.7). Estos alineamientos se señalan con un recuadro las bases nitrogenadas que no coinciden de las secuencias reportadas en el NCBI ya que provienen de otras fuentes, sin embargo, el porcentaje aproximado es < 2 %.

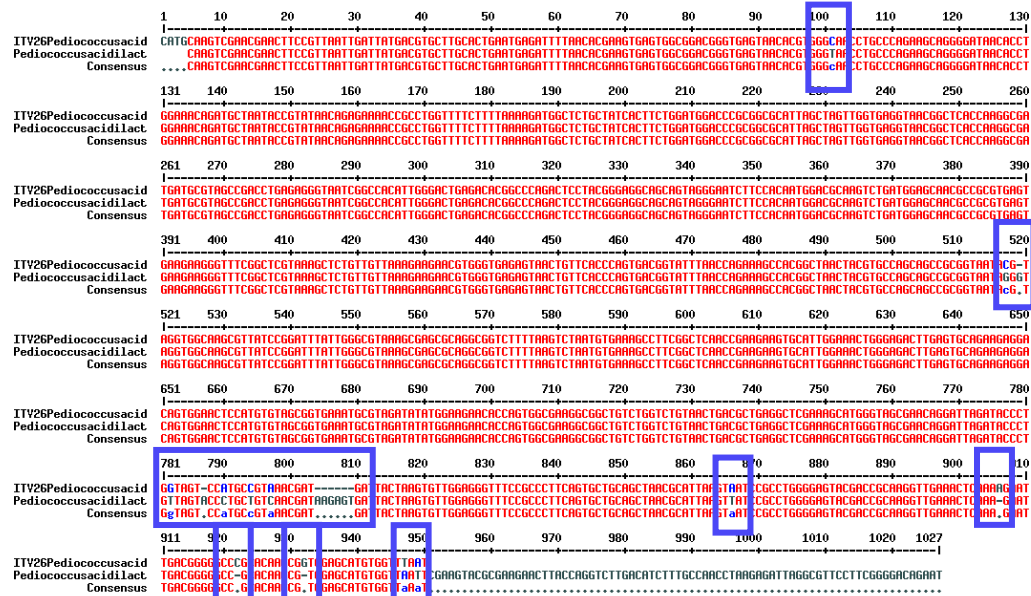


FIGURA 6.3 Alineamiento del gen 16S de *Pediococcus acidilactici* (ensilaje).

Se alineó *Pediococcus acidilactici* ITV-26 aislada de heces de neonato lactante frente a *Pediococcus acidilactici* cepa NGRI 0510Q aislada de ensilaje (No. de acceso NR_041640.1).

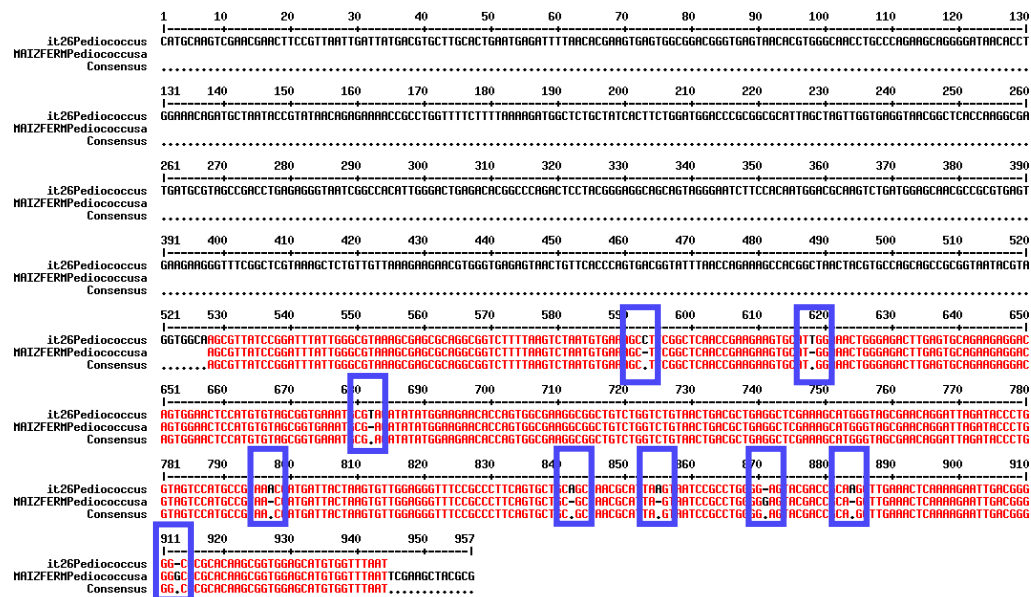


FIGURA 6.4 Alineamiento del gen 16S de *Pediococcus acidilactici* (maíz fermentado).

Se alineó *Pediococcus acidilactici* ITV-26 aislada de heces de neonato lactante frente a *Pediococcus acidilactici* cepa KKP 2065 aislada de maíz fermentado (No. de acceso MT090568.1).

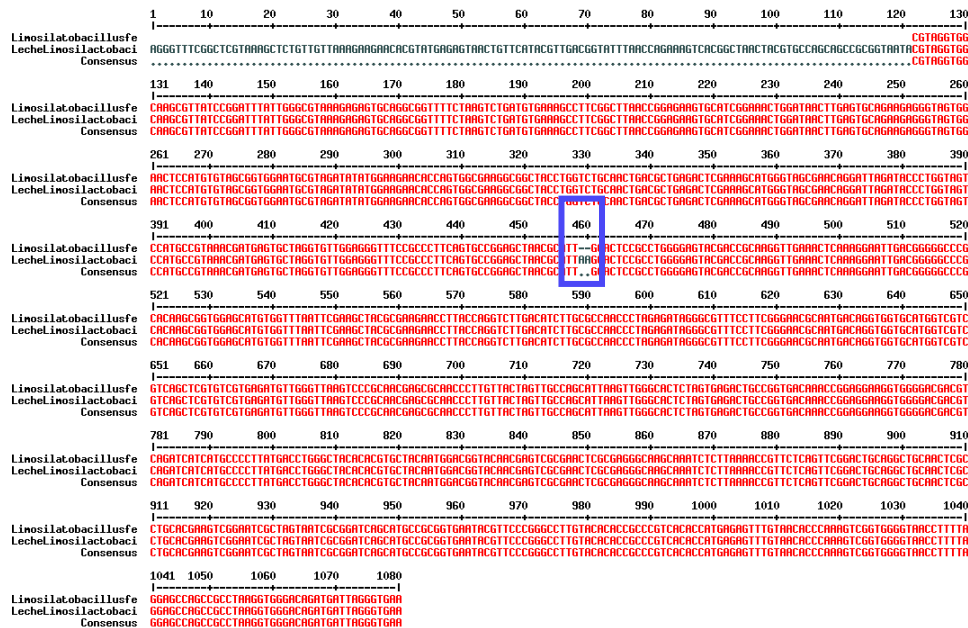


FIGURA 6.5 Alineamiento del gen 16S de *Limosilactobacillus fermentum* (leche de ganado).

Se alineó *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 aislada de quesos frescos frente a *Limosilactobacillus fermentum* cepa SLDL-112 aislada de Leche de ganado (No. de acceso MH773188.1).

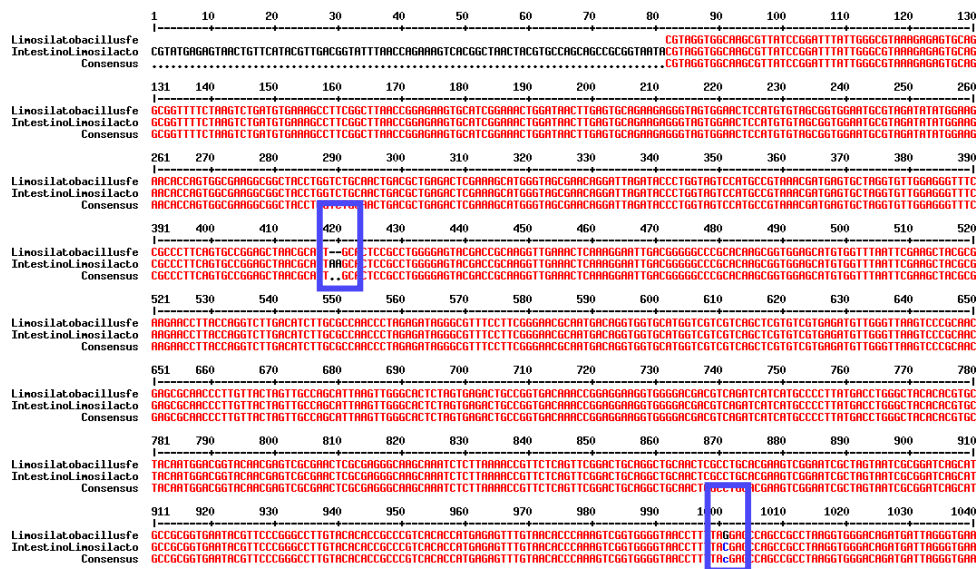


FIGURA 6.6 Alineamiento del gen 16S de *Limosilactobacillus fermentum* (intestino).

Se alineó *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 aislada de quesos frescos frente a *Limosilactobacillus fermentum* cepa UN01 16S gen aislada de intestino (No. de acceso HQ449670.1).

7.2. Curva de crecimiento

Se obtuvo la curva de crecimiento en medio de cultivo MRS con la densidad óptica y pH de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23, en la figura 6.8 se puede observar que el crecimiento de *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 en color verde con tres fases; la primera fase que va desde las 0 horas hasta las 4 horas de crecimiento correspondiente a la fase de adaptación, de las 4 a las 14 horas la fase exponencial en donde las células se reproducen sin limitación de sustancias nutritivas a velocidad máxima, seguida de una fase estacionaria hasta las 12 horas en donde no se diferencia un aumento significativo de las células; mismo caso para *Pediococcus acidilactici* ITV-26 en color azul con un comportamiento similar a *Limosilactobacillus fermentum* SP-23, donde se destaca su fase estacionaria a las 12 h lo cual coincide con García-Toledo *et al.*, 2018 y López del Castillo, 1998 que reportaron el inicio de la fase estacionaria a las 12 h, ya que trabajaron con el mismo microorganismo.

En ambos casos se observa una disminución de pH hasta 4, esta disminución es consecuencia de la fermentación; lo cual además de reducir los riesgos de presencia de patógenos, tiene ciertos beneficios sensoriales en alimentos (Walstra *et al.*, 2001), *Pediococcus acidilactici* ITV-26 es un microorganismo homofermentativo con producción predominantemente de ácido láctico como resultado de la fermentación de carbohidratos simples como la glucosa y la lactosa (Holzapfel *et al.* 2001). En comparación con *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 que es una especie heterofermentativa y por lo tanto no produce solo ácido láctico sino otros metabolitos como ácido acético, propiónico y butírico (Dellaglio *et al.*, 2004).

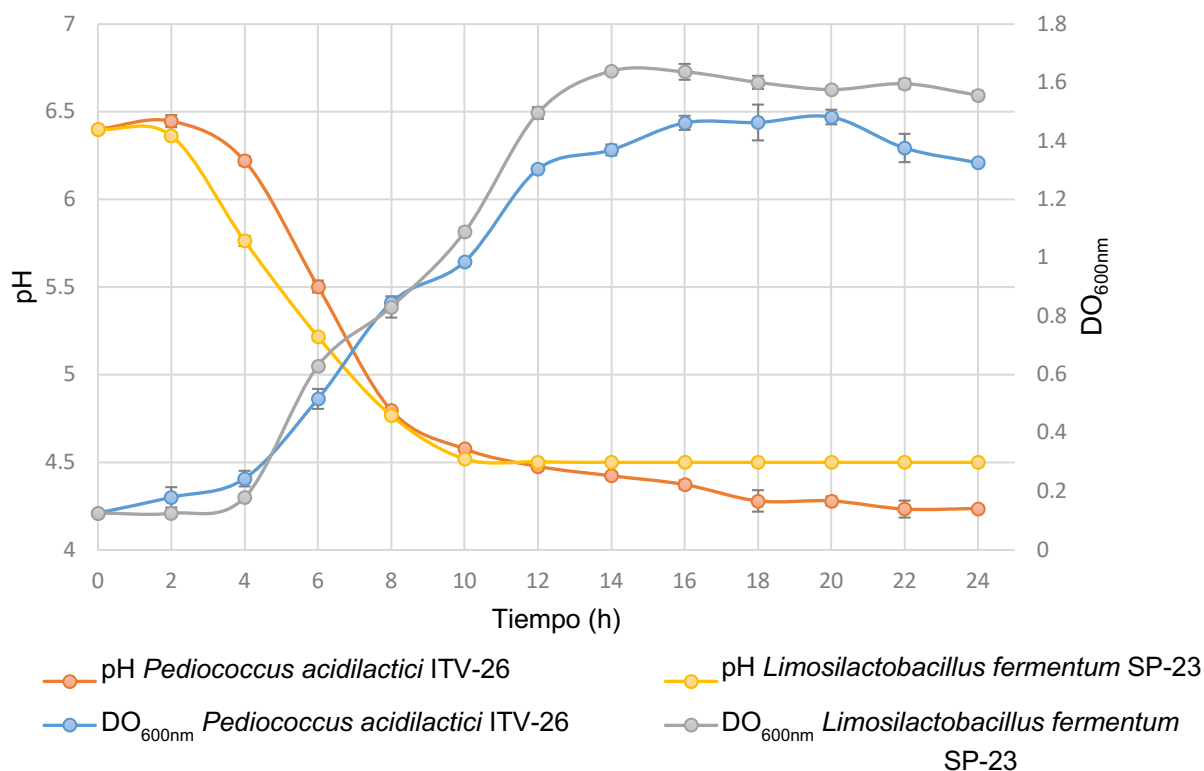


FIGURA 6. 7 Curva de crecimiento de *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 y *Pediococcus acidilactici* ITV-26.

Las cepas se crecieron en MRS por 24 h, determinando pH y DO_{600nm} en función del tiempo.

7.3. Actividad enzimática

7.3.1. Determinación de la fase de crecimiento con mayor producción enzimática

La cinética de crecimiento también permitió determinar el tiempo y la fase de crecimiento donde se encuentra la mayor actividad de PGH de las fracciones obtenidas (extracelular, citosol y membrana).

Para la obtención de cada una de las fracciones celulares se llevaron a cabo dos procedimientos en específico; el empleo de un amortiguador de extracción para obtener las proteínas adheridas a membrana y la ultrasonificación para las proteínas citosólicas mediante el proceso de ruptura (Mora *et al.*, 2003; Cibik y Chapot-Chartier, 2004).

Las proteínas extracelulares no mostraron actividad PGH, la fracción citosólica presentó poca actividad esto puede deberse a la ultrasonificación, ya que es un método mecánico que genera calor y forma burbujas ocasionando desnaturalización de las proteínas con una consecuente disminución de la actividad (Zayas, 1997). Las proteínas adheridas a membrana presentaron actividad durante toda la cinética de crecimiento en ambos microorganismos, en la figura 6.9 podemos observar color naranja la actividad de *Pediococcus acidilactici* ITV-26, la cual mostró mayor actividad a las 14 h y en color azul la actividad *Limosilactobacillus fermentum* SP-23, con mayor actividad a las 16 h ambas en la fase estacionaria de su crecimiento. También se observan dos picos más de actividad a las 6 h en ambos microorganismos en la fase logarítmica y entrando a la fase de muerte a las 22 h para *L. fermentum* y 24 h para *P. acidilactici*. Lo anterior puede deberse a la producción de más enzimas del tipo PGH que se expresaron en las cepas en estudio bajo las condiciones de crecimiento y caracterización realizadas. Diversos autores han descrito que una especie puede llegar a producir dos o más PGH con actividad lítica (Baker *et al.*, 2006), por ejemplo, *Lactobacillus pentosus*, que presenta la actividad a los 31, 58 y 112 kDa (Cibik y Chapot-Chartier, 2004), lo que sugiere que la actividad puede presentarse por dos o mas enzimas diferentes; García-Cano, 2013 reporta dos PGH de 99 y 110 kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Estas actividades enzimáticas probablemente se deban al recambio de la pared celular o a la lisis celular (Lortal y Chapot-Chartier, 2005), estos resultados coinciden con Velasco-Pérez, 2016 que reportó la actividad de PGH de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en la fracción de proteínas adheridas a membrana, con dos máximos de actividad a las 8 h y 16 h del cultivo, fase logarítmica y estacionaria; García-Cano *et*

al., 2013 estudio una hidrolasa bifuncional de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, con mayor actividad a las 8 h proponiendo la metodología de hidrolisis de 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminida.

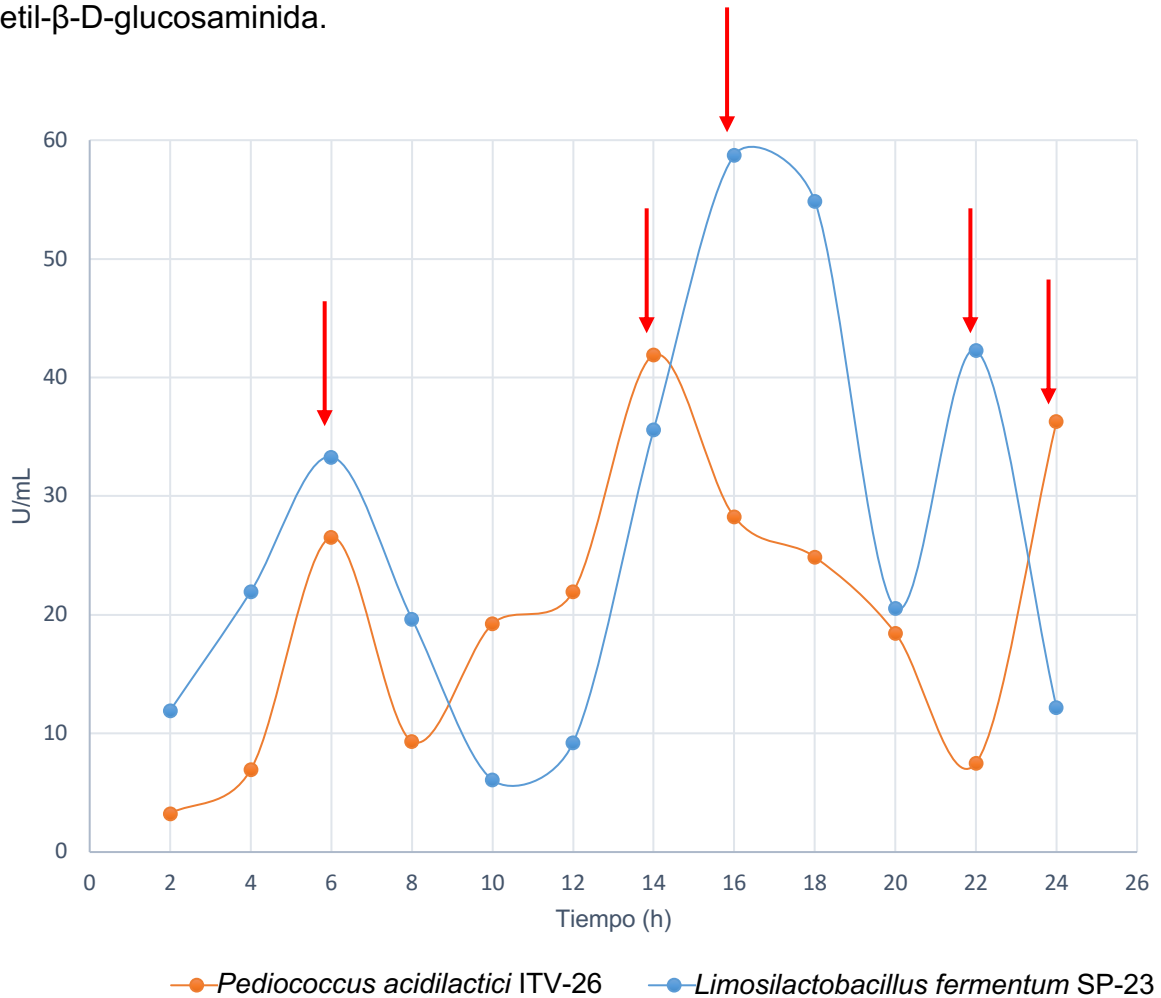


FIGURA 6.8 Cinética de producción de PGH en el extracto de proteínas adheridas a membrana.

La actividad se determinó utilizando como sustrato 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminida y las unidades (U) se reportan en $\mu\text{mol}/\text{min}$ liberados de 4-NP. En naranja, extracto de proteínas adheridas a membrana a las 14 h de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y en azul, extracto de proteínas adheridas a membrana de *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 a las 16 h.

7.4. Perfil de proteínas y zimogramas de los extractos protéicos

Con el fin de conocer los perfiles de proteínas de los extractos proteicos de cada microorganismo, se realizaron geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) con las muestras de proteínas del extracto crudo, de citosol y de membrana para *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23. Se observan bandas desde los 10 hasta los 250 kDa en ambos microorganismos

Como se puede observar en la figura 6.10 el patrón de bandeo de las proteínas del extracto crudo extracelulares de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 se identifican proteínas que van desde los 10 kDa hasta los 250 kDa, no diferenciándose claramente las proteínas debido a la alta concentración de proteínas, las proteínas de membrana se observan bien definidas debido a esto y a la evidencia de la actividad enzimática se utilizó esta fracción para realizar los zimogramas e identificar las bandas con actividad lítica, a diferencia de las proteínas de citosol muy tenues, confirmando la desnaturización de las proteínas por el método y la evidente disminución de la actividad enzimática. En las proteínas de la membrana de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 se logran identificar las bandas a los 99 y 110 kDa reportada por Garcia-Cano, 2013 y Velasco-Pérez, 2016.

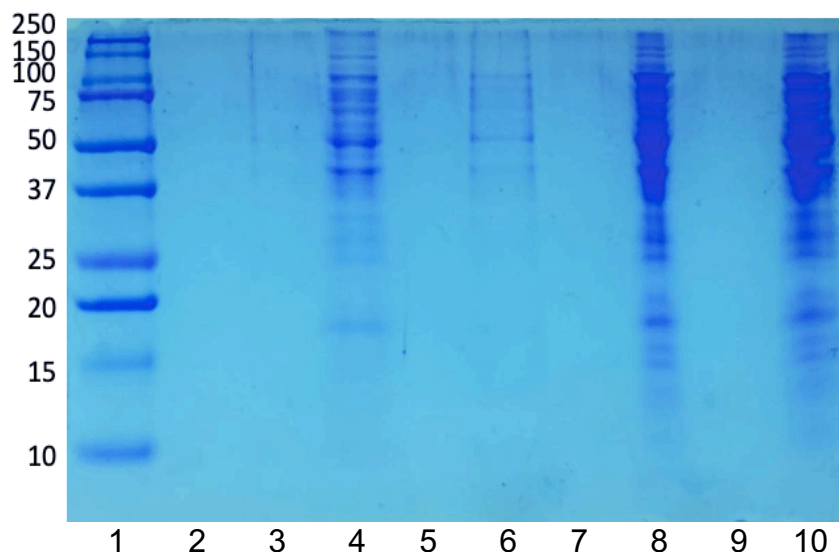


FIGURA 6.9 Perfil de proteínas de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 en gel de SDS- PAGE.

Carril 1 marcador de peso molecular 10-250 kDa (Precision Plus Protein™ Bio-rad), carril 4 proteínas de la membrana, carril 6 proteínas del citosol y carril 8 y 10 proteínas del extracto crudo extracelular.

En el perfil de proteínas de *Limosilactobacillus fermentum*, se identifican proteínas desde los 10 kDa, se muestra en la figura 6.11. Tanto en los extractos crudos como las proteínas de membrana se observan bandas bien definidas, los extractos de citosol y extracelulares no mostraron actividad (datos no mostrados) por lo que no se realizaron perfiles de proteínas, no existen estudios de actividad PGH de la especie *fermentum*, sin embargo, se realizan análisis con PGH del género *Lactobacillus*: el perfil de PGH en *Lactobacillus* se conserva dentro de la especie, por lo que se propuso como herramienta de clasificación el perfil de PGH el zimograma con paredes celulares como sustrato, en *Lactobacillus pentosus* las dos bandas principales de PGH a 112 y 58 kDa son características de la especie (Cibik y Chapot-Chartier, 2004), en *Lactobacillus helveticus* presenta una banda de 42 kDa y 6 bandas entre 29 y 33 kDa (Valence y Lortal, 1995).

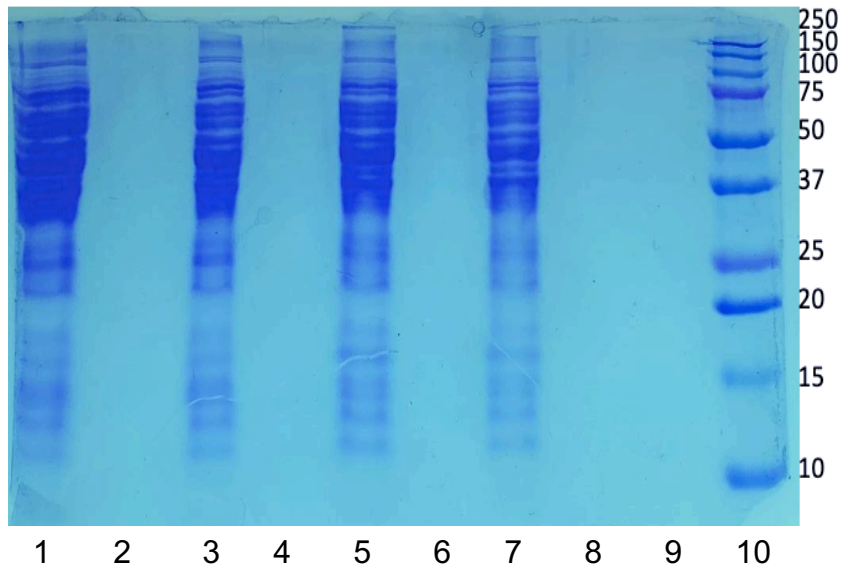


FIGURA 6.10 Perfil de proteínas de *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 en gel de SDS- PAGE de los extractos protéicos.

Carril 1 y 5 proteínas del extracto crudo extracelular, carril 3 y 7 proteínas adheridas a membrana y carril 10 marcador de peso molecular 10-250 kDa (Precision Plus Protein™ Bio-rad).

Se realizaron zimogramas con *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 en el tiempo con mayor actividad enzimática para identificar las bandas con la actividad lítica *in situ*, en ambos microorganismos se observaron bandas con actividad en el extracto de las proteínas adheridas a membrana. Por tanto, los siguientes experimentos se realizaron con estos extractos.

7.5. Identificación de enzimas tipo PGH adheridas a membrana

En la figura 6.12 se muestra específicamente el perfil de proteínas del extracto de proteínas adheridas a membrana de *Pediococcus acidilactici* ITV-26, el cual mostró la mayor actividad a las 14 h. En este gel, se muestra una banda con actividad lítica en 25 kDa aproximadamente, adicionalmente se observaron otras bandas entre los 100 kDa y 80 kDa, lo cual coincide con García-Cano *et al.*, 2013, el cual reporta actividad lítica intensa de una N-acetil muramidasa, con peso molecular de 99 kDa, sin

embargo, la mayor actividad se observó en 25 kDa y es de interés debido a que no se ha reportado con actividad PGH en este peso molecular.

El hecho de encontrar una nueva enzima del tipo PGH, puede deberse a las condiciones de crecimiento y producción empleadas para la cepa de este estudio; así como ser intrínseco a la misma; la cual presenta seguramente diferencias genotípicas con las cepas reportadas, como pudimos observar en el análisis de alineamiento del gen 16S mencionado en el punto 1.9.3 donde se encuentran diferencias en las secuencias. Es importante también mencionar que la cepa ITV-26 fue aislada de heces de neonato a diferencia de la utilizada por García-Cano que proviene de un salami fermentado; otra diferencia importante es que la cepa ITV-26 produce bacteriocinas y la ATCC 8042 es una de las pocas cepas que no produce bacteriocinas (Mora *et al.*, 2003). Es importante recordar que en la hidrólisis de peptidoglucano están involucradas diversas enzimas, lo cual explica la presencia de varios picos de actividad a lo largo de la cinética de producción de PGH como se observa en la figura 6.9. La enzima de 25 kDa observada en este estudio seguramente es una de varias PGH involucradas en la hidrólisis de peptidoglucano

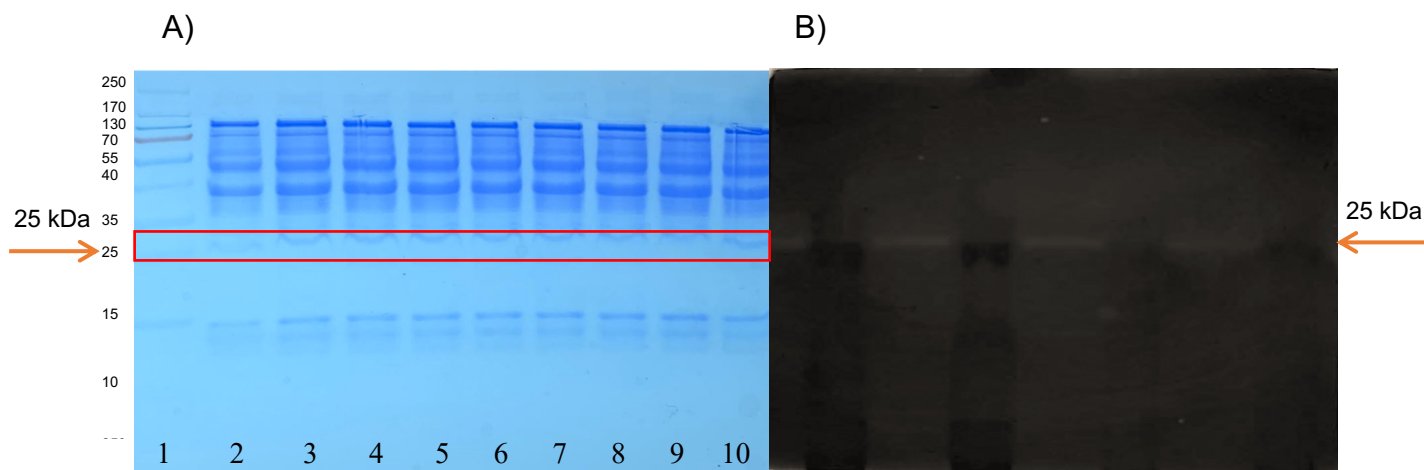


FIGURA 6.11 Perfil de proteínas (A) y zimograma (B) en geles de poliacrilamida con los extractos de las proteínas adheridas a membrana de *Pediococcus acidilactici* ITV-26.

A) Proteínas adheridas a membrana de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 en todos los carriles y, en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular 10-250 kDa (Precision Plus Protein™ Bio-rad). B) Zimograma de proteínas adheridas a membrana de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 con 0.2 % de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, se observa en blanco una banda con actividad lítica de PGH en 25 kDa.

La figura 6.13 muestra el perfil de proteínas adheridas a membrana (A) de *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 a las 16 h donde se observó la mayor actividad (figura 7.7). En el zimograma (B) se muestra una banda con actividad lítica con un peso molecular experimental de 23 kDa. Aunque no se han estudiado las PGH de *Limosilactobacillus fermentum*, se han estudiado en otros *Lactobacillus* como *Lactobacillus pentosus* con bandas líticas de 58 y 112 kDa (Cibik y Chapot-Chartier, 2004). Lortal y colaboradores (2005), reportan un estudio de enzimas tipo PGH en *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* mostrando enzimas con actividad con pesos moleculares en un rango de 18 a 55 kDa en los extractos de lisis de pared celular; sin embargo es importante mencionar que no se reportan PGH con peso molecular de 23 kDa (Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

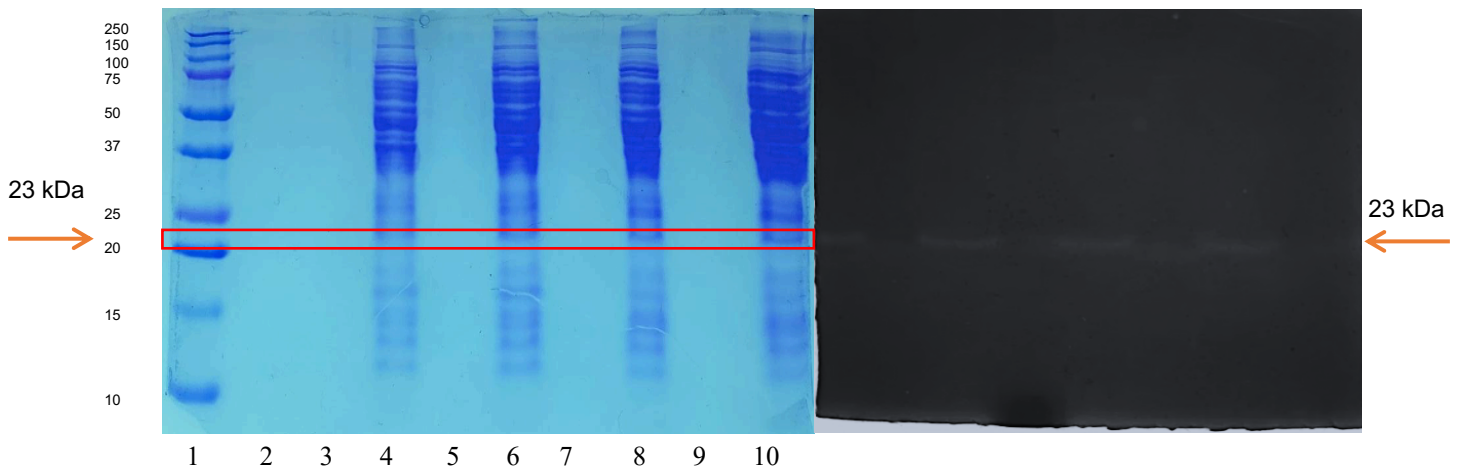


FIGURA 6.12 Perfil de proteínas adheridas a membrana de *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 en geles de poliacrilamida.

A) Proteínas adheridas a membrana de *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 en los carriles 1, 3, 5, 7 y carril 10 marcador de peso molecular 10-250 kDa (Precision Plus Protein™ Bio-rad). B) Zimograma de proteínas adheridas a membrana de *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 con 0.2 % de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, se observa una banda blanca con actividad lítica en 23 kDa.

7.6. Identificación de PGH en los genomas de *Pediococcus acidilactici* y *Limosilactobacillus fermentum*

Se realizó un análisis bioinformático para determinar las proteínas presentes en el genoma de los microorganismos, este análisis muestra la presencia de PGH en las tablas 6.2 y 6.3 Se obtuvieron los pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos. Se destacan las proteínas que probablemente podrían ser las enzimas líticas que se expresaron en las cepas en estudio bajo las condiciones de crecimiento y caracterización realizadas.

En el caso de *P. acidilactici*, se encontraron 30 PGH con pesos moleculares que van desde 24 hasta 100 kDa (tabla 6.2), remarcado con color azul las PGH que coinciden con el peso molecular experimental encontrado en el zimograma con actividad litica (25 kDa), en rojo las endopeptidasas y en verde la PGH con el peso molecular reportado por García-Cano *et al.*, 2018 donde encontró una N-acetilmuramidasa de 99 kDa para *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

TABLA 6.1 PGH hipotéticas de *Pediococcus acidilactici*.

Nombre/No. De acceso	PM Da	pI
N-acetilmuramidasa/ A4V11_04070	24563.96	9.69
N-acetilmuramidasa/ A4V11_09050	100408.46	9.11
1,4-beta-N-acetilmuramidasa/ A 4V11_09 815	29770.13	9.89
Hidrolasa de peptidoglucano bifuncional/ A0A0F6T2T1	99388.29	9.15

Peptidasa, familia S41/ E0NDW9	51199.71	9.66
N-acetilmuramidasa/ K9IF91_PEDAC	99677.85	9.20
N-acetilmuramidasa/ A0A1L6H8Y4	100303.45	9.17
DD-transpeptidasa/ E0NDK5	85024.49	8.45
Amidasa de N-acetilmuramoil-L-alanina/ A0A1Y0WF37	68433.70	5.01
N-acetilmuramidasa/ A0A6A4XAH1	100471.70	9.23
Peptidasa, familia S41/ D2EKZ9	51216.74	9.66
Proteína del dominio de señal KXYKXGKXW/ E0NI38	100476.75	9.20
C-terminal de procesamiento de peptidasa/ R0G5A4	51433.97	9.64
N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa/E0NE25	33101.72	9.62
Familia de glicosil hidrolasa 25 /E0NHL2	29769.14	9.89
Familia de glicosil hidrolasa 25/ D2EJ08	29771.11	9.84
N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa/ D2EL50	32370.89	9.62
Familia de glicosil hidrolasa 25/ D2EL74	42467.09	9.85
Familia de glicosil hidrolasa 25/ E0NDD7	50211.52	9.42
Lisozima M1 (1,4-beta-N-acetilmuramidasa)/ R0GFE6	29799.21	9.92
Lisozima M1/ K9IBD1	29818.17	9.89
1,4-beta-N-acetilmuramidasa/ A0A1L6HAE4	29728.00	9.81
1,4-beta-N-acetilmuramidasa/ A0A1L6HAP6	48208.23	9.49
Familia de glicosil hidrolasa 25/ D2ELY6	46906.44	9.29
Proteasa de procesamiento de carboxilo terminal/ K9IED2	48190.96	9.55
Proteína que contiene el dominio PDZ/ A0A5R9BMF5	51211.72	9.63
Proteína no caracterizada/ R0G5K6	28051.97	4.30
1,4-beta-N-acetilmuramidasa/ A0A1L6HCU6	32735.53	6.89
Peptidasa S41/ A0A1D8RLA8	51241.75	9.63
Proteína dominio de unión a peptidoglucano lys/ A0A5R9BEG3	41202.43	9.85

En la tabla 6.3 se muestra el análisis realizado en el genoma de *Limosilactobacillus fermentum*, se identificaron proteínas con pesos moleculares que van desde 23 hasta los 45 kDa, remarcado en naranja las PGH que coinciden con el peso molecular experimental (23 kDa) (Figura 6.13). En esta especie no se han realizado estudios para identificar las enzimas con actividad PGH, el peso molecular experimental encontrado con actividad lítica de PGH es de aproximadamente 23 kDa; lo cual puede sugerir ser una N-acetil muramidasa, por el peso molecular teórico de 23.16 kDa (remarcado con color amarillo).

TABLA 6.2 PGH hipotéticas de *Limosilactobacillus fermentum*

Nombre/No. De acceso	PM Da	pl
N-acetilmuramidasa / <u>LAF 1479</u>	23164.56	9.57
Peptidoglucano endopeptidasa/ <u>A0A1L7GTR7</u>	33989.73	5.32
Endolisina/ <u>A0A158SMK8</u>	44326.42	9.03
Peptidoglucano endopeptidasa/ <u>A0A2S7GBQ7</u>	33905.67	5.09
Putativa endolisina/ <u>A0A2N8Z5G7</u>	44666.94	8.74
Peptidoglicano endopeptidasa/ <u>A0A3G3E6Z2</u>	33873.59	5.32
N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa/ <u>D0DRH9</u>	36135.19	9.52
Glucósido hidrolasa, familia 25/ A0A158SJT0	34130.77	5.94
Familia de glucósidos hidrolasas 25/ <u>A0A0R2EDG5</u>	39672.84	4.75
Peptidoglucano hidrolasa/ <u>A0A1L7GYE6</u>	41798.75	6.39
Familia de glucósidos hidrolasas 25/ <u>A0A4Z0CE27</u>	34494.58	6.16
N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa/ <u>A0A158SMW4</u>	31516.80	9.65
Familia de glicosil hidrolasa 25/ <u>D0DUM4</u>	41364.44	7.79
Enzima lítica de la pared celular/ <u>Q64J93</u>	34235.45	5.33
Familia de glicosil hidrolasa 25/ <u>D0DVV0</u>	33209.94	6.91
Proteína con dominio de unión a peptidoglucano LysM/ <u>A0A3G3E8K2</u>	41389.23	6.75
Proteína no caracterizada/ <u>B2GAZ0</u>	41385.24	6.75

Familia de glucósidos hidrolasas 25/ <u>D0DUM0</u>	39072.30	5.08
N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa/ <u>C0WX64</u>	32085.38	9.46
N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa/ <u>A0A1D7ZZ42</u>	30715.54	9.46
Familia de glucósidos hidrolasas 25/ <u>A0A2K2TGL6</u>	35197.58	7.81
Putativa N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa/ <u>A0A2N8Z454</u>	31560.77	9.56
1,4-beta-N-acetilmuramidasa/ <u>A0A1L7GW75</u>	32663.57	6.99
Proteína no caracterizada/ <u>A0A1L7GTJ4</u>	38232.35	5.25
1,4-beta-N-acetilmuramidasa/ <u>A0A2K2TGB2</u>	32919.60	6.52
Proteína del dominio C-terminal de lisozima Cpl-7/ <u>A0A1Q2T6Q8</u>	32677.60	6.99
Proteína no caracterizada/ <u>A0A3G3E8L2</u>	45966.83	5.25

7.6.1. Análisis bioinformático de la secuencia de PGH identificada

Los resultados de identificación de la proteína de 25 kDa de *Pediococcus acidilactici* ITv-26 por medio de la secuenciación de péptidos mostraron que la banda de actividad corresponde a una subunidad proteolítica de endopeptidasa (ClpP) ATP-dependiente (denominada ALZITV-26). En la Tabla 6.4 se indican el porcentaje de identidad (ID), peso molecular teórico (PM), punto isoeléctrico teórico (pI) y la cantidad de aa. de la proteína con no. de acceso WP_002829919.1.

TABLA 6.3 Análisis de la secuencia de aminoácidos de PGH de *Pediococcus acidilactici* ITV-26

Nombre	Valor E	% ID	PM (kDa)	pI	Longitud aa
Subunidad proteolítica de endopeptidasa ALZITV-26	3e-140	100%	21.5	4.86	197

ID: Identidad, PM: Peso molecular, pI: punto isoeléctrico, aa: aminoácidos

El resultado obtenido de la PGH identificada se trata de una endopeptidasa, con un peso molecular de 21 kDa, lo cual no se ha observado para otras PGH, el peso molecular más aproximado se trata de una N-acetilmuramidasa con un peso molecular de 24 kDa.

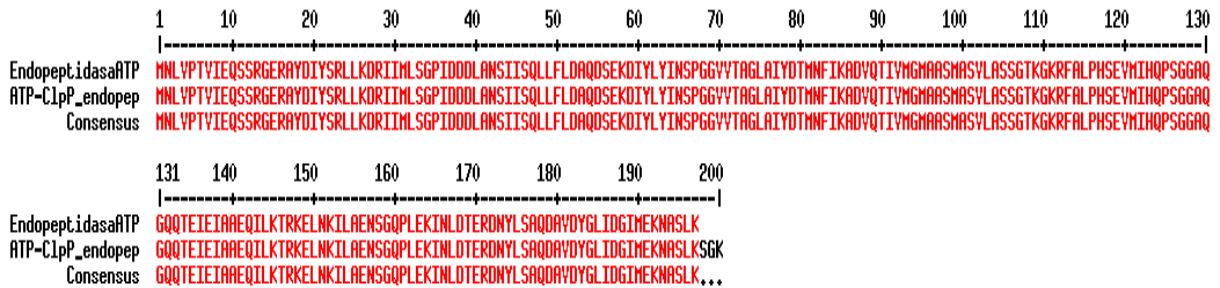


FIGURA 6. 13 Alineamiento de la secuencia identificada con la secuencia reportada del NCBI con no. de acceso WP_002829919.1

En la figura 6.14 se muestra el alineamiento mediante la plataforma virtual MultAlin de ALZITV-26 y la subunidad proteolítica de endopeptidasa ClpP ATP-dependiente reportada en el genoma, donde se observa la homología, no obstante, se puede observar que la secuencia reportada tiene 3 aa al final de más, esta enzima endopeptidasa no se ha reportado con actividad litica en el peptidoglucano esto puede deberse a los tres aa de más.

```

ATGAACTTGGTTCCAACCGTTATTGAACAATCATCACGTGGCGAACGTGCTTATGATATTTACTCACGACTA
1  M N L V P T V I E Q S S R G E R A Y D I Y S R L 24
TTAAAAGATCGGATTATTATGTTATCAGGTCCAATTGACGATGATTTGGCTAACTCAATCATTCTCAATTA
25  L K D R I I M L S G P I D D D L A N S I I S Q L 48
CTATTCCTTGATGCACAAGACTCTGAAAAAGACATTTACCTTTACATCAACTCTCCAGGTGGCGTAGTTACT
49  L F L D A Q D S E K D I Y L Y I N S P G G V V T 72
GCTGGATTGGCAATCTACGACACGATGAACTTCATTAAGCTGACGTACAAACCATCGTAATGGGAATGGCT
73  A G L A I Y D T M N F I K A D V Q T I V M G M A 96
GCTTCGATGGCCAGTGTTTTAGCTTCTTCTGGTACAAAGGGCAAACGTTTTGCATTGCCTCATTGAGAAGTT
97  A S M A S V L A S S G T K G K R F A L P H S E V 120
ATGATTCATCAACCTTCTGGTGGTGTCAAGGTCAACAAACTGAAATTGAAATTGCCGCTGAACAAATTTTG
121 M I H Q P S G G A Q G Q Q T E I E I A A E Q I L 144
AAGACTCGGAAAGAGTTAAATAAAAATTTTGGCAGAAAATTCTGGTCAACCGCTAGAAAAGAACAATTTTGAA
145 K T R K E L N K I L A E N S G Q P L E K I N L D 167
GACTCGGAAAGAGTTAAATAAAAATTTTGGCAGAAAATTCTGGTCAACCGCTAGAAAACGGTATCATGGAAAAGA 192
168 T E R D N Y L S A Q D A V D Y G L I D G I M E K
AACGCAAGCCTTAAGTAA
193 N A S L K

```

FIGURA 6.14 Alineamiento de ALZITV-26 la secuencia de nucleótidos y aminoácidos.

En la figura 6.15 se observa la secuencia de nucleótidos de la endopeptidasa ClpP, los aminoácidos de cada codón se encuentran debajo. Las endopeptidasas hidrolizan los enlaces internos de las cadenas laterales del peptidoglucano (Ver metodología 2.3.1), debido a esto se propone que esta enzima hidroliza los enlaces peptídicos de la unión de los aminoácidos L-Lys-L-Ala-D-Asp que conforman el peptidoglucano de *Pediococcus* (Calderón-Santoyo *et al.*, 2001). Sin embargo, tienen que realizarse la purificación y caracterización de la PGH para elucidar el mecanismo de hidrólisis del peptidoglucano.

8. CONCLUSIONES

- Se confirmó bioquímica y molecularmente la identidad de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23.
- La mayor actividad de PGH se observó en el extracto de proteínas adheridas a membrana, menor actividad en proteínas de citosol y nula actividad en proteínas extracelulares en ambos microorganismos.
- En la fase estacionaria del crecimiento de ambos microorganismos se observó la mayor actividad de PGH en *Pediococcus acidilactici* ITV-26 a las 14 h y en *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 a las 16 h.
- Se demostró actividad de una PGH *in situ* con un peso molecular experimental aproximado de 25 kDa (ITV-26) y 23 kDa (SP-23).
- La enzima PGH con un peso molecular experimental de 25 kDa, fue identificada como una endopeptidasa Clp de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 con un peso molecular teórico de 21.5 kDa, la cual no ha sido reportada en la hidrólisis del peptidoglucano.

9. RECOMENDACIONES

Purificar y caracterizar la endopeptidasa Clp de *Pediococcus acidilactici* ITV-26.

Estudiar el mecanismo de hidrólisis de la endopeptidasa Clp de *Pediococcus acidilactici* ITV-26.

Estudiar la expresión de las enzimas PGH utilizando diferentes inductores.

Estudiar el efecto lítico a través de las cinéticas enzimáticas en los otros picos donde se identificó actividad PGH para los dos microorganismos, con el fin de determinar si el efecto de hidrólisis es producto de más de una PGH.

Estudiar la actividad antimicrobiana sobre cepas de interés en salud pública.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, M., Collins M.D. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl Bacteriol.* 75(2):95-107.
2. Ahmed, F.E., 2003. Genetically modified probiotics in foods. *Trends Biotechnol.* 21(11):491-497.
3. Axelsson, L., y Ahné, S. 2000. Lactic acid bacteria. Applied Microbial Systematics. Springer, Dordrecht, pp 367-388.
4. Azadnia, P., Zamani, M.H., Ghasemi, S.A., Babaki, A.K., Jashni, M.Y. y Taarof, N. 2011. Isolation and identification of thermophilic Lactobacilli from traditional yogurts of tribes of kazerun. *J. Anim Vet Adv.* 10(6):774-776.
5. Baker J.R., Liu C., Dong S. y Pritchard D.G. 2006. Endopeptidase and glycosidase activities of the bacteriophage B30 lysin. *Appl Environ Microbiol.* 72(10):6825-6828.
6. Barros, C., Buenrostro, M. 2011. Pozol, popo, champurrado. *Rev Dig Uni.* 12(4):1-9.
7. Benmechernene, Z., Fernandez-No, I., Kihal, M., Böhme, K., Calo-Mata, P. y Barros-Velazquez, J. 2013. Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 7(1):66-73.
8. Bourgeois, I., Camiade, E., Biswas, R., Courtin, P., Gibert, L., Götz, F., Chapot-Chartier, M.P., Pons, J.L. y Pestel-Caron, M. 2009. Characterization of AtlL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activities. *FEMS Microbiol Lett.* 290(1):105-13.
9. Bourgeois, I., Pestel-Caron, M., Lemeland, J.F., Pons, J.L., y Caron, F. 2007. Tolerance to the glycopeptides vancomycin and teicoplanin in coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(2):740-743.

10. Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G. y Cossart, P. 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol microbiol.* 25(2):285–294.
11. Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. y Mietzner, T.A. 2006. *Quimioterapia microbiana*. Microbiología médica.
12. Calderón-Santoyo. M., Mendoza-García. P., García-Alvarado. M.A. y Escudero-Abarca. B.I. 2001. Effect of physical factors on the production of bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* ITV26. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 26:191-195.
13. Callon, C., Millet, L. y Montel, M.C. 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J Dairy Res.* 71(2):231–244.
14. Calvo, M. y Martínez-Martínez L. 2006. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Formación Medica Continuada. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España.
15. Wacher, R.C. 2014. La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Rev Dig Uni.* 15(8):1-14.
16. Carr, F.J., Chill, D. y Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol.* 28(4):281–370.
17. Cibik, R. y Chapot-Chartier, M. P. 2004. Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Lett Appl Microbiol..* 38(6):459–463.
18. Cibik, R., Tailliez, P., Langella, P. y Chapot-Chartier, M. P. 2001. Identification of Mur, an atypical peptidoglycan hydrolase derived from *Leuconostoc citreum*. *Appl Environ Microbiol.* 67(2),858–864.
19. Cintas, L. M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E. y Nes, I.F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J bacteriol.* 182(23):6806–6814.

20. Clarke, V.A., Platt, N., & Butters, T.D. 1995. Cloning and expression of the beta-N-acetylglucosaminidase gene from *Streptococcus pneumoniae*. Generation of truncated enzymes with modified aglycon specificity. *J. Biol. Chem.* 270(15):8805–8814.
21. De Moreno de LeBlanc, A., Matar, C., LeBlanc, N. y Perdigón, G. 2005. Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. *Breast cancer res.* 7(4): R477–R486.
22. Dellaglio, F., Torriani, S. y Felis, G.E. 2004. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(3): 809–812.
23. Díaz, E., López, R. y García, J.L. 1991. Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J Biol Chem.* 266(9): 5464–5471.
24. Doi, K., Nishizaki, Y., Fujino, Y., Ohshima, T., Ohmomo, S. y Ogata, S. (2009). *Pediococcus lolii* sp. nov., isolated from ryegrass silage. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59(5):1007–1010.
25. Donovan, D. M., Foster-Frey, J., Dong, S., Rousseau, G.M., Moineau, S., y Pritchard, D.G. 2006. The cell lysis activity of the *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30 endolysin relies on the cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase domain. *Appl Environ Microbiol,* 72(7): 5108–5112.
26. Eckert, C., Lecerf, M., Dubost, L., Arthur, M. y Mesnage, S. 2006. Functional analysis of AtIA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *J bacteriol.* 188(24): 8513–8519.
27. Fedorov, T.V., Surovtsev, V.I., Pletnev, V.Z., Borozdina, M.A. y Gusev, V.V. 2003. Purification and some properties of lysostaphin, a glycyglycine endopeptidase from the culture liquid of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Biochemistry (Mosc),* 68(1): 50–53.
28. Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Böckler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L. y

- Bateman, A. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue): D247–D251.
29. Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. y Ben Omar, N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*. 120(1-2): 51–70.
30. García-Cano, I., Campos-Gómez, M., Contreras-Cruz, M., Serrano-Maldonado, C.E., González-Canto, A., Peña-Montes, C., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S. y Farrés, A. 2015. Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99(20): 8563–8573.
31. García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C.E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G. y Quirasco, M. 2014. Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *Food Sci Tech*. 59(1):26–34.
32. García-Cano, I., Velasco-Pérez, L., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Mendoza-Hernández, G., Llorente-Bousquets, A. y Farrés, A. 2011. Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *J Appl Microbiol*. 111(3):607–615.
33. García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J.L., Nicoli, J.R., Moreira-Silva, J., Rodríguez, Z., Fuertes, H., Nuñez, O., Albelo, N., Halaihel, N. 2016. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Res Vet Sci*. 108:125–13
34. García-Toledo, J.A. 2018. Nanoencapsulación de la bacteriocina del *Pediococcus acidilactici* ITV26 por Microfluidización. Tesis doctoral. Instituto Tecnológico de Veracruz.
35. Garvie, E.L. 1986. Genus *Pediococcus*. In: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed. Vol 2. The Williams & Wilkins Co. Baltimore. USA. pp: 1075-1079.
36. Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B. y Muthusamy, S. 2019. A systematic reconsideration on proteases. *Int. J. Biol. Macromol.*, 128, 254–267.

37. Mamo, J. y Assefa, F. 2018. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. *J. Food Qual.* 7:957-269.
38. Hernández-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. 2005. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *J. Sci. Food Agric.* 85(6): 1041–1048.
39. Hernández, D., Cardell, E. y Zárata, V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J Appl Microbiol.* 99(1): 77–84.
40. Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. y Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* 73(2): 365S–373S.
41. Huard, C., Miranda, G., Redko, Y., Wessner, F., Foster, S.J. y Chapot-Chartier, M.P. 2004. Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactococcus lactis*: identification of a third N-acetylglucosaminidase, AcmC. *Appl Environ Microbiol.* 70(6): 3493–3499.
42. Huard, C., Miranda, G., Wessner, F., Bolotin, A., Hansen, J., Foster, S.J. y Chapot-Chartier, M.P. 2003. Characterization of AcmB, an N-acetylglucosaminidase autolysin from *Lactococcus lactis*. *Microbiology (Reading).* 149(3): 695–705.
43. Janecek, S., Svensson, B. y Russell, R.R. 2000. Location of repeat elements in glucansucrases of *Leuconostoc* and *Streptococcus* species. *FEMS microbiol lett.* 192(1): 53–57.
44. Jay, J.M. 2000. Microbiología Moderna de los Alimentos 4ª. Ed. Acribia, Zaragoza España, pp 441-475
45. Jollés, P. y Jollés, J. 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem.* 63(2):165–189.

46. Joris, B., Englebert, S., Chu, C.P., Kariyama, R., Daneo-Moore, L., Shockman, G.D. y Ghuysen, J.M. 1992. Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin. *FEMS Microbiol Lett.* 70(3):257–264.
47. Kajimura, J., Fujiwara, T., Yamada, S., Suzawa, Y., Nishida, T., Oyamada, Y., Hayashi, I., Yamagishi, J., Komatsuzawa, H. y Sugai, M. 2005. Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol microbiol.* 58(4):1087–1101.
48. Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H. y Hosono, A. 2000. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J Dairy Sci.* 83(2):255–263.
49. Kenny, O., FitzGerald, R.J., O’Cuinn, G., Beresford, T. y Jordan, K. 2003. Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.* 13(7):509–516.
50. Komatsuzawa, H., Sugai, M., Nakashima, S., Yamada, S., Matsumoto, A., Oshida, T. y Suginaka, H. 1997. Subcellular localization of the major autolysin, ATL and its processed proteins in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol immunol*, 41(6):469–479.
51. Kumar J.K. 2008. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80(4):555–561.
52. Kunji, E.R.S. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 70(2-4):187–221.
53. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
54. Layec, S., Decaris, B. y Leblond-Bourget, N. 2008. Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Res microbiol.* 159(7-8):507–515.
55. Leblanc, J.G., Matar, C., Valdez, J.C., Leblanc, J. y Perdigon, G. 2002. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J Dairy Sci.* 85(11), 2733-2742.

56. Lim, Y.H., Foo, H.L., Loh, T.C., Mohamad, R. y Abdullah, N. 2019. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 10, 1–13.
57. Linares-Morales, J.R., Cuellar-Nevárez, G.E., Rivera-Chavira, B.E., Gutiérrez-Méndez, N., Pérez-Vega, S. B. y Nevárez-Moorillón, G.V. 2020. Selection of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables based on their antimicrobial and enzymatic activities. *Foods.* 9(10):1399.
58. López del Castillo, L.M. 1998. Aislamiento de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y Caracterización Parcial de la Bacteriocina Producida. Tesis de maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
59. Lorenzen, P.C. y Meisel, H. 2005. Influence of trypsin action in yoghurt milk on the release of caseinophosphopeptide-rich fractions and physical properties of the fermented products. *Int Dairy J tech*, 58(2):119-124.
60. Lortal, S. y Chapot-Chartier, M.P. 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int Dairy J.* 15(6–9):857–871.
61. Magnusson, J. y Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl environ microbiol*, 67(1):1-5.
62. Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. y Schnürer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 219(1):129–135.
63. Maidment, C. 2009. A study into measuring the antibacterial activity of lysozyme-containing foods. *Nutr. Food Sci.* 39(1):29-35.
64. Mathur, S. y Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review. *Int J Microbiol.* 105(3):281-295.

65. Monterroso, B., López-Zumel, C., García, J.L., Sáiz, J. L., García, P., Campillo, N.E. y Menéndez, M. 2005. Unravelling the structure of the pneumococcal autolytic lysozyme. *Biochem J.* 391(1):41-49.
66. Montville, J.T. y Winkowski, K. 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria.. Fundamentals and Frontiers Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville. Whashington D.C. *Food Microbiol.* 557-577.
67. Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M.G., Senini, L. y Manachini, P.L. 2003. Autolytic activity and pediocin induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *J Appl Microbiol*, 94(4):561-570.
68. Morishita, Y. y Shiromizu, K. 1986. Characterization of lactobacilli isolated from meats and meat products, *Int. J. Food Microbiol.* 3(1):19-29.
69. Mundt, J.O. 1986. Lactic Acid Streptococci, in *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. Eds., Vol.2., Williams & Wilkins, Baltimore. 1065-1066.
70. Murray, R.P., Rosenthal, S.K. y Pfäuer, A.M. 2006. Microbiologia medica. 7th. Ed. Elsevier, España. pp. 11-47.
71. Nakimbugwe, D., Masschalck, B., Deckers, D., Callewaert, L., Aertsen, A. y Michiels, C.W. 2006. Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts. *FEMS microbiol lett.* 259(1):41–46.
72. Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. y Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70(2-4):113–128.
73. Ogier, J.C. y Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genres. *Int j Food Microbiol.* 126(3):291–301.
74. Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y.M., Suginaka, H. y Tomasz, A.1995. A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 92(1):28-289.

75. Ouwehand, A.C. 1998. Microbiology and Functional Aspects 3rd Ed. "Antimicrobial components from lactic acid bacteria, in Lactic Acid Bacteria" S. Salminen and A. V. Wright. New York, NY, USA, pp. 139–159
76. González G.N. 2002. Producción, Purificación y Caracterización Parcial de la Bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV-26. Tesis de licenciatura en Químico farmacéutico biólogo. Facultad de Ciencias químicas. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
77. Parra Huertas, R. A. 2010. Review, bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *BSAA*. 8(1):93-105.
78. Portilla-Vázquez, S., Rodríguez, A., Ramírez-Lepe, M., Mendoza-García, P. G. y Martínez, B. 2016. Biodiversity of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Mexican Regional Cheeses and their Contribution to Milk Fermentation, *Food Biotech.* 30(3):155-172
79. Pritchard, D.G., Dong, S., Baker, J.R., y Engler, J.A. 2004. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiol Rea.* 150(7): 2079–2087.
80. Ramachandran, R., Altier, C., Oikonomopoulou, K. y Hollenberg, M.D. 2016. Proteinases, their extracellular targets, and inflammatory signaling. *Pharmacol Rev.* 68(4):1110–1142.
81. Reid, J.R., Coolbear, T., Moore, C.H., Harding, D.R. y Pritchard, G.G. 1995. Involvement of enzyme-substrate charge interactions in the caseinolytic specificity of lactococcal cell envelope-associated proteinases. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11)3934–3939.
82. Requena, T. y Pelaez C. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. producción de bacteriocinas. 1995. *Rev esp Cienc Technol Al.* 35(1):19-44.
83. Rokka, T., Syväoja, E.L., Tuominen, J. y Korhonen, H.J. 1997. Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT-milk, *Milk Sci Int.* 52(12):675-678.

84. Roos, S., Engstrand, L. y Jonsson H. 2005. *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55(1):77-82.
85. Saidi, Y., del Rio, B., Senouci, D.E., Redruello, B., Martinez, B., Ladero, V., Kihal, M. y Alvarez, M.A. 2020. Polyphasic characterisation of non-starter lactic acid bacteria from Algerian raw Camel's milk and their technological aptitudes. *Food Technol Biotechnol.* 58(3):1–30.
86. Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. y Lee, Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Sci. Technol.* 10:1-4.
87. Sass, P. y Bierbaum, G. 2007. Lytic activity of recombinant bacteriophage phi11 and phi12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 73(1)347-352.
88. Savijoki, K., Ingmer, H. y Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 394–406.
89. Serrano-Maldonado, C.E., García-Cano, I., González-Canto, A., Ruiz-May, E., Elizalde-Contreras, J.M. y Quirasco, M. 2018. Cloning and Characterization of a Novel N-acetylglucosaminidase (AtID) from *Enterococcus faecalis*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 28(1):14–27.
90. Shan, Y., Yang, N., Teng, D., Wang, X., Mao, R., Hao, Y., Ma, X., Fan, H. y Wang, J. 2020. Recombinant of the Staphylococcal Bacteriophage Lysin CHAPk and Its Elimination against *Streptococcus agalactiae* Biofilms. *Microorganisms.* 8(2):216.
91. Smit, G., Smit, B.A. y Engels, W.J. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev.* 29(3):591-560.
92. Steen, A., Buist, G., Horsburgh, G. ., Venema, G., Kuipers, O.P., Foster, S.J. y Kok, J. 2005. AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *FEBS J.* 272(11):2854-2868.

93. Szweda, P., Schielmann, M., Kotlowski, R., Gorczyca, G., Zalewska, M. y Milewski, S. 2012. Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *App Microbiol Biotech.* 96(5):1157–1174.
94. Tenovuo, J. 2002. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral dis.* 8(1):232-9.
95. Toe, C.J., Foo, H.L., Loh, T.C., Mohamad, R., Abdul Rahim, R. y Idrus, Z. 2019. Extracellular proteolytic activity and amino acid production by lactic acid bacteria isolated from Malaysian foods. *Int. J. Mol. Sci.* 20(7), 1777.
96. Torres, M.R. 2002. Flora intestinal, probióticos y salud. 2nd. Ed. Formas finas. Guadalajara, Jal, México.
97. Turner, M.S., Hafner, L.M., Walsh, T. y Giffard, P.M. 2004. Identification, characterisation and specificity of a cell wall lytic enzyme from *Lactobacillus fermentum* BR11. *FEMS Microbiol Lett.* 238(1):9–15.
98. Turner, M.S., Waldherr, F., Loessner, M.J. y Giffard, P.M. 2007. Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 30(1):58–67.
99. Uehara, T. y Bernhardt, T.G. 2011. More than just lysins: peptidoglycan hydrolases tailor the cell wall. *Curr Opin Microbiol.* 14(6):698–703.
100. Urrego-Velásquez, L. y Cadavid-Rojas, A. 2005. Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y reológica, de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte de carne de res (Huevo de Solomo). Facultad de Ciencias Agropecuarias., Medellín Colombia, MED-COL, pp. 72.
101. Velasco-Pérez, L.M, 2010. Caracterización y espectro antibacteriano de la peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura en química de alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
102. Venegas-Ortega, M.G., Flores-Gallegos, A.C., Martínez-Hernández, J.L., Aguilar, C.N. y Nevárez-Moorillón, G.V. Production of bioactive peptides from lactic

- acid bacteria: A sustainable approach for healthier foods. *Compr. Rev Food Sci Food Saf.* 18(4):1039–1051.
103. Villadóniga, C., Vairo C. S.E., Morcelle del Valle, S.R., Errasti, M.A., Bruno, M.A., Barros, M. y Cantera, A.M.B. 2009. Productos bioactivos obtenidos por proteólisis (nutracéuticos y alimentos funcionales). Enzimas proteolíticas de vegetales superiores: Aplicaciones industriales. CYTED, Buenos Aires, pp. 273-297.
104. Vollmer, W., Blanot, D. y De Pedro, M.A. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* 32(2):149–167.
105. Vollmer, W., Pils, H., Hantke, K., Höltje, J.V. y Braun, V. 1997. Pesticin displays muramidase activity. *J bacterial.* 179(5):1580–1583.
106. Walstra, P., Geurts, T.J., Normen, A., Jellema A. y Van-Boekel, M.A. 2001. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Editorial Acribia S.A. España. p730.
107. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. y Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J bacterial.* 173(2):697–703.
108. Wood, J.B. y Holzapfel, W.H. 1995. The genera of lactic acid bacteria. 1a. Ed. Blackie Academic & Profesional Vol. 2. pp:1-12
109. Yáñez, J.F., Salazar, J.M., Chaires, L.M., Jiménez, J.H., Márquez, M.R., y Ramos, E.G.R. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance Y Perspectiva*, 21:313–319.
110. Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C. y Fillmore, S. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 2(1):48.
111. Yokoi, K.J., Shinohara, M., Kawahigashi, N., Nakagawa, K., Kawasaki, K., Nakamura, S., Taketo, A. y Kodaira, K. 2005. Molecular properties of the two-component cell lysis system encoded by prophage phigaY of *Lactobacillus gasseri* JCM 1131T: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol.* 99(3):297-308.

112. Yokoi, K.J., Kawasaki, K., Taketo, A. y Kodaira, K. 2004. Characterization of lytic enzyme activities of *Lactobacillus gasseri* with special reference to autolysis. *Int J food microbiol.* 96(3):273-279.
113. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G. y Lebeer, S. 2020. A taxonomic note on the genus description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70(4):2782-2858.

11. ANEXOS

11.1. Apéndice A Medios de cultivos

a) Medio Caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe)

Componente	g/L
Glucosa	20
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
Fosfato de potasio	2
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
Sulfato de Mg	0.2
Sulfato de Mn	0.05
Tween 80	1 mL
pH: 6.4 ± 0.2	

Disolver los componentes en 1 litro de agua desionizada. Calentar agitando hasta ebullición, para su completa disolución. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

b) Medio Agar MRS Man Rogosa Sharpe

Componente	g/L
Glucosa	20
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
Fosfato de potasio	2
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
Sulfato de Mg	0.2
Sulfato de Mn	0.05
Agar bacteriológico	15
Tween 80	1 ml
pH: 6.4 ± 0.2	

Disolver los componentes en 1 litro de agua desionizada. Calentar agitando hasta ebullición, para su completa disolución. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Colocar 20 ml en cajas Petri estériles.

c) Medio 50 CHL

Componente	g/L
Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	4
Fosfato de potasio	2
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
Sulfato de Mg	0.2
Sulfato de Mn	0.05
Purpura de bromocresol	15
Tween 80	1 ml
pH: 6.7 ± 0.3	

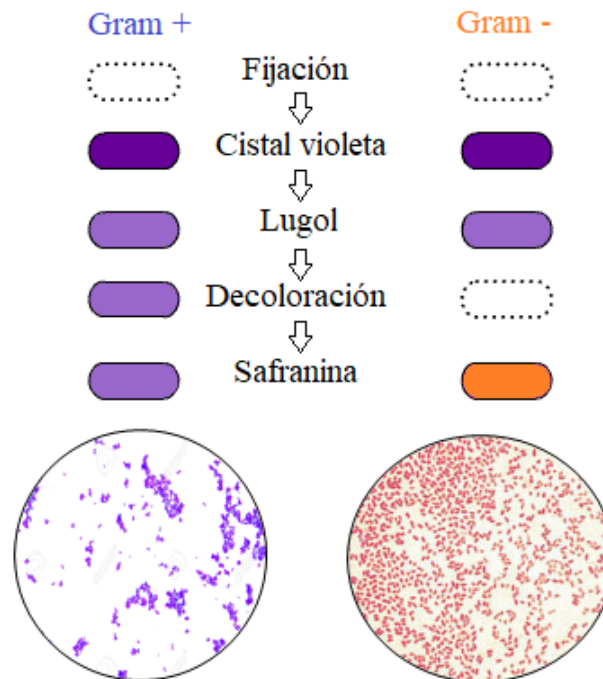
Disolver los componentes en 1 litro de agua desionizada. Calentar agitando hasta ebullición, para su completa disolución. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Colocar 10 ml en tubos estériles.

11.2. Apéndice B Frotis bacteriano

1. Colocar una pequeña gota de agua en el centro de un portaobjetos limpio.
2. Flamear el asa de siembra, tomar, en condiciones asépticas, una colonia del cultivo bacteriano en medio sólido y transferirlo a la gota de agua. Remover la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida para facilitar su secado.
3. Si la muestra se toma de un cultivo en medio líquido, no es necesario realizar los dos primeros pasos ya que basta con colocar y extender una gota de la suspensión bacteriana, que se toma con el asa de siembra, directamente sobre el portaobjetos.
4. Esperar hasta que el líquido se evapore o acelerar su evaporación acercando el portaobjetos a la llama del mechero. En este caso hay que tener mucha precaución de no calentar demasiado el portaobjetos pues las células pueden deformarse o romperse.
5. Pasar cinco veces el portaobjetos por la llama durante unos segundos. Dejar enfriar el portaobjetos entre los pases.
6. Una vez realizado el frotis y fijadas las bacterias, las pasan al proceso de tinción.

11.3. Apéndice C Tinción de Gram

1. Una vez realizado el frotis se agrega el colorante azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar un minuto.
2. Enjuagar con agua no directamente sobre la muestra
3. Agregar lugol y esperar un minuto aproximadamente.
4. Agregar alcohol acetona y esperar entre 30 segundos.
5. Enjuagar con agua.
6. Agregar safranina o fucsina básica y esperar un minuto.
7. Lavar levemente con agua.
8. Dejar secar y observar al microscopio con objetivo 100x e inmersión en aceite.



Tinción de Gram.

11.4. Apéndice D Pruebas bioquímicas API 50 CHL

Preparación de las galerías API 50 CH

1. La cámara de incubación (tapa o fondo) se preparó agregando 10 mL de agua destilada en los recipientes del fondo para crear una atmosfera húmeda.
2. Se sacó cada una de las filas de su embalaje, separaron en dos filas del 0- 19, 20- 29, 30-39, 40-49 y se colocan en el fondo de la cámara de incubación.

Preparación del inculo

1. En un tubo de ensayo con 2 mL de agua destilada estéril se colocó varias colonias del medio de cultivo MRS en agar ayuda del asa de siembra y se realizó una suspensión densa del tubo de agua destilada
2. En un tubo de ensayo con 5mL de agua destilada estéril se realizó una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de Mcfarland, transfiriendo 4 de gotas de la suspensión (n).
3. En medio de cultivo API 50CHL y se inoculó 2 veces el número de gotas citadas (2n).
4. Homogenizamos, la suspensión y se utiliza de inmediato.

Inoculación de las galerías

1. Agregar el inculo con el medio de cultivo API 50 CHL inoculado con una pipeta estéril en los 50 tubos de las galerías, tomando en cuenta los siguientes criterios:
2. Inclina ligeramente hacia delante la cámara de incubación.
3. Evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la pipeta en el borde de la cúpula.
4. Cuando se inocula en el tubo, no rebasar el límite superior del mismo con el fin de conservar una buena anaerobiosis.
5. Incubar las galerías a 37 °C por 48 horas, revisando las galerías a las 24 h y a las 48 h.

11.5. Apéndice E Resultados pruebas bioquímicas BAL

No.	ITV-26	SP-23	S
0	-	-	0
1	+	-	GLY
2	-	-	ERY
3	-	-	DARA
4	+	-	LARA
5	+	-	RIB
6	-	-	DXYL
7	-	-	LXYL
8	-	-	ADO
9	-	-	MDX
10	+	+	GAL
11	+	+	GLU
12	+	+	FRU
13	+	-	MNE
14	-	-	SBE
15	-	-	RHA
16	-	-	DUL
17	-	-	INO
18	+	-	MAN
19	-	-	SOR
20	+	-	MDM
21	-	+	MDG
22	+	-	NAG
23	-	-	AMY
24	-	-	ARB

25	+	-	ESC
26	+	-	SAL
27	+	-	CEL
28	+	+	MAL
29	+	+	LAC
30	+	+	MEL
31	+	+	SAC
32	+	-	TRE
33	-	-	INU
34	-	-	MLZ
35	+	+	RAF
36	-	-	AMD
37	-	-	GLYG
38	-	-	XLT
39	+	-	GEN
40	-	-	TUR
41	-	-	LYX
42	-	-	TAG
43	-	-	DFUC
44	-	-	LFUC
45	-	-	DARL
46	-	-	LARL
47	-	-	GNT
48	-	-	2KG
49	-	-	5KG
	96.3%	94.1 %	% ID

11.6. Apéndice F Extracción de DNA en muestra

1. A partir del medio de cultivo inoculado al 1% en MRS por 12 h.
2. En microtubo eppendorf se colocó 1 ml de medio obtenido, se centrifugó a 10,000 rpm en una centrifuga Z 216 MK marca HERMLE por 5 minutos y se retiró el sobrenadante.
3. Al paquete celular obtenido se le adicionó 500 µL de buffer TE y 50 µL de lisozima (Biotech 10 mg/ml) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 45 minutos.
4. Se adicionó 300 µl de solución amortiguadora de lisis y se incubó a 50 °C en baño maría por 1 hora.
5. Cada muestra se colocó en tubos Eppendorf con volumen de 400 µl y se les adicionó 500 µl de fenol.
6. Se centrifugó a 13,000 RPM en una centrifuga Z 216 MK marca HERMLE durante 15 min a 4 °C y se repitió hasta que desapareció el botón.
7. Posteriormente se adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol al 95 %, se dejó en refrigeración por 4 horas.
8. Se centrifugó a 13,000 rpm en una centrifuga Z 216 MK marca HERMLE por 15 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante por decantación dejándolo secar al aire.
9. Por último, se hidrató el precipitado con 35 µL de solución amortiguadora TE y se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1% por 45 minutos a 85 volts.

11.7. Apéndice G Buffers de trabajo

- Buffers TE (Tris 1M pH 8, 0.5 M EDTA pH 8, agua estéril)
- Buffer Gel Separador (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)
- Buffer Gel Concentrador (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)
- Buffer de carga (0.125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% Glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol, pH 6.8)
- Buffer de corrida (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.3)
- Buffer cátodo, reservorio superior (100mM Tris-HCl, 100mM Tricina, 0.1% SDS)
- Buffer ánodo, reservorio inferior (200mM Tris-HCl, pH 8.9)

11.8. Apéndice H Liofilización de los extractos

1. Colocar 1 mL cada una de los extractos obtenidas en tubos eppendorf de 2 mL, protegidas con papel parafilm.
2. Congelar cada una de las muestras a una temperatura de -70°C por 12 h.
3. Encender el equipo para liofilizar siguiendo las indicaciones del mismo.
4. Alcanzado el vacío y temperatura adecuados, colocar las muestras dentro de los vasos para liofilizadora y conectar al equipo.
5. Liofilizar las muestras hasta obtener un polvo completamente seco.

11.9. Apéndice I Secuencias de microorganismo

>*Limosilatobacillusfermentum*_SP23

TTCACCCTAATCATCTGTCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCCACCGAC
TTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTAT
TCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGCAGGCGAGTTGCA
GCCTGCAGTCCGAACTGAGAACGGTTTTAAGAGATTTGCTTGCCCTCGCGAGTTCGCGAC
TCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTG
ACGTCGTCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAA
TGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
ACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCATTGCGTTCCCGAAGGAAACGCCCTATCT
CTAGGGTTGGCGCAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAAAC
CACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTC
GTACTCCCCAGGCGGAGTGCYYAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCTCC
AACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTAC
CCATGCTTTTCGAGTCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGGTAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTT
CTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTACCCTCTTCTGCACT
CAAGTTATCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTT
AGAAAACCGCCTGCACTCTCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACG

>*Limosilatobacillusfermentum*_SP23 inversa

CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATG
TGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTG
GAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGG
TCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCC
GTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTGCACTCCG
CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAG
GGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTCTTAAAACCGTTC
TCAGTTCCGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAA
GTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAA

>Pediococcusacidilactici_ITV26

CATGCAAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGTGCTTGCACTGAATGAGATTT
TAACACGAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCAGAAAGCAGGG
GATAACACCTGAAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTTTCTTT
TAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC
GCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGT
TGTTAAAGAAGAACGTGGGTGAGAGTAACTGTTCAACCAGTGACGGTATTTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCT
CAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAATC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTC
TGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTG
CAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT

>Pediococcusacidilactici_ITV26 inversa

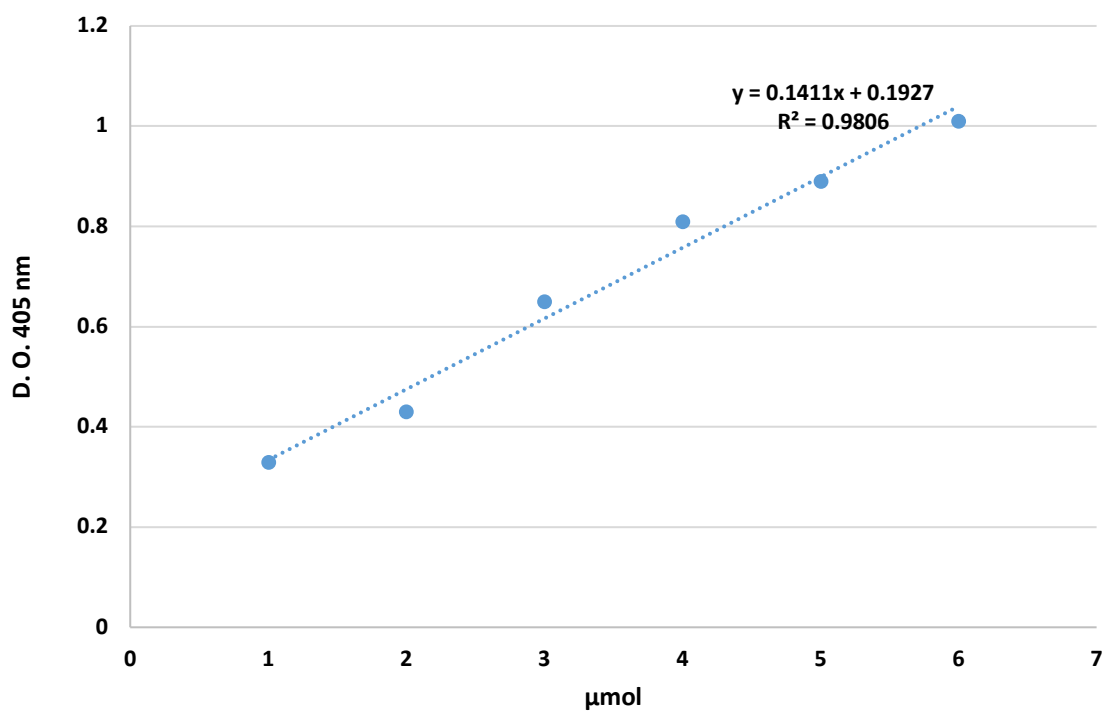
ATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCT
ACTCCCCAGGCGGATTACTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACTTAGTA
ATCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTACCCATGCTTTGAGCCTCAGC
GTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTA
CACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGCACTTCTTCGGTTGAGC
CGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAAAGACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGC
TTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAC
TGGGTGAACAGTTACTCTCACCCACGTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCTTCTTC
ACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG
AGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGGCTACGCATCATCGCCTTG
GTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCCAGAAGTGATAGCAGAGCCATCTT
TTAAAAGAAAACCAGGCGGTTTTCTCTGTTATACGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCTGC
TTCTGGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTTCGTGTTAAAATCTCATTAGTG
CAAGCACGTCATAATCAATTAACGGAAGTTCGTTGACTTGCATG

11.10. Apéndice J Curva estándar p-nitrofenol

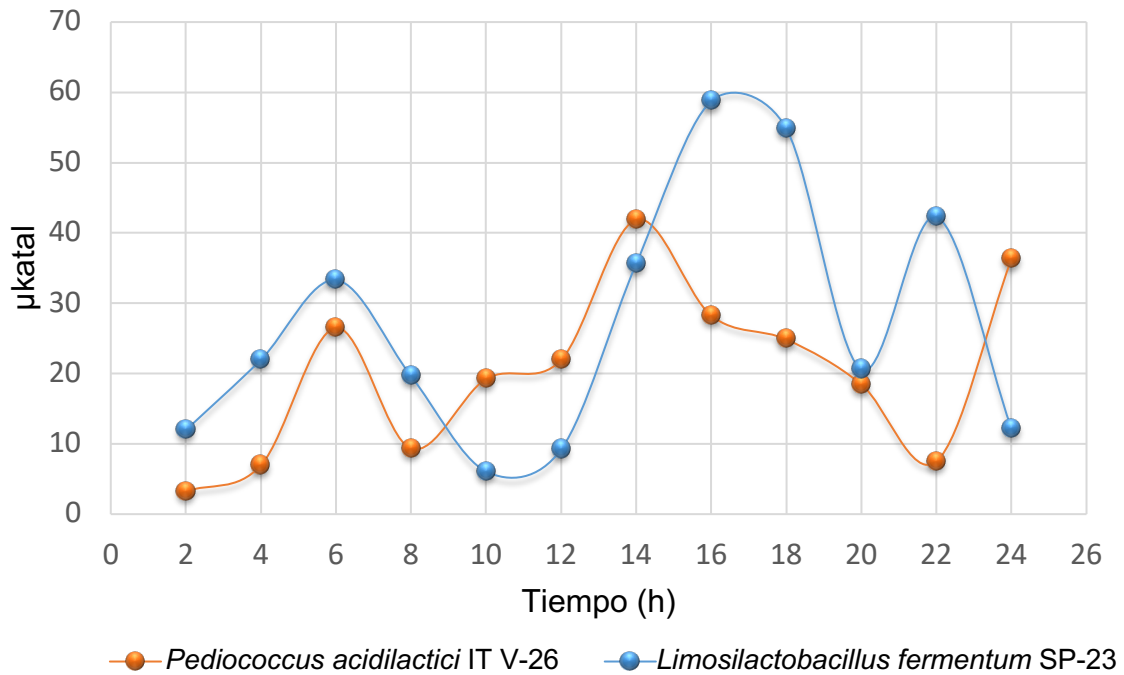
Masa molar	139.11 g·mol ⁻¹ g/mol
Punto de fusión	110 - 115 °C (383-158 K)
Punto de ebullición	279 °C (552 K)

[μmol]	D. O.
292	0.33
584	0.43
876	0.65
1168	0.81
1460	0.89
1752	1.01

Curva patron p-nitrofenol



11.11. Apéndice K Cinética enzimática de PGH katalas



Cinética enzimática de PGH con sustrato 4-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosaminida. Proteínas adheridas a membrana a las 14 h de *Pediococcus acidilactici* ITV-26 y *Limosilactobacillus fermentum* SP-23 a las 16 h.

11.12. Apéndice L Secuencias de hidrolasa peptidoglucano

> NZ_CP053421.1: c465501-464908 Cromosoma de la cepa PMC65 de *Pediococcus acidilactici*, 16S

```
ATGAACTTGGTTCCAACCGTTATTGAACAATCATCACGTGGCGAACGTGCTTATGATATTTACTCACGAC
TATTAAGATCGGATTATTATGTTATCAGGTCCAATTGACGATGATTTGGCTAACTCAATCATTCTCA
ATTACTATTCCTTGATGCACAAGACTCTGAAAAAGACATTTACCTTTACATCAACTCTCCAGGTGGCGTA
GTTACTGCTGGATTGGCAATCTACGACACGATGAACTTCATTAAGCTGACGTACAAACCATCGTAATGG
GAATGGCTGCTTCGATGGCCAGTGTCTTAGCTTCTTCTGGTACAAAGGGCAAACGTTTTGCATTGCCCTCA
TTCAGAAGTTATGATTCATCAACCTTCTGGTGGTGTCTCAAGGTCAACAACTGAAATTGAAATTGCCGCT
GAACAAATTTGAAGACTCGGAAAGAGTTAAATAAAATTTTGGCAGAAAATTTCTGGTCAACCGCTAGAAA
AAATCAACCTTGATACGGAACGGGATAACTACCTCTCTGCGCAAGACGAGTTGATTATGGTTTGATCGA
CGGTATCATGAAAAGAACGCAAGCCTTAAGTAA
```

>CLPPendopetidase*Pediococcus acidilactici* [WP_002829919.1](#)

```
1 mnlvptvieq srrgeraydi ysrlldrii mlsgpidddl ansiisqlf ldaqdsekdi
61 ylyinspggv vtaglaiydt mnfikadvqt ivmgmaasma svlassgtkg krfalphsev
121 mihqpsggaq gqpteieiaa eqilkrkel nkilaensgq plekinlde rdnylsaqda
181 vdyglidgim eknaslk
```

```
ATGAACTTGGTTCCAACCGTTATTGAACAATCATCACGTGGCGAACGTGCTTATGATATTTACTCACGACTA
1 M N L V P T V I E Q S S R G E R A Y D I Y S R L 24
TTAAAGATCGGATTATTATGTTATCAGGTCCAATTGACGATGATTTGGCTAACTCAATCATTCTCAATTA
25 L K D R I I M L S G P I D D D L A N S I I S Q L 48
CTATTCCTTGATGCACAAGACTCTGAAAAAGACATTTACCTTTACATCAACTCTCCAGGTGGCGTAGTTACT
49 L F L D A Q D S E K D I Y L Y I N S P G G V V T 72
GCTGGATTGGCAATCTACGACACGATGAACTTCATTAAGCTGACGTACAAACCATCGTAATGGGAATGGCT
73 A G L A I Y D T M N F I K A D V Q T I V M G M A 96
GCTTCGATGGCCAGTGTCTTAGCTTCTTCTGGTACAAAGGGCAAACGTTTTGCATTGCCTCATTGAGAAGTT
97 A S M A S V L A S S G T K G K R F A L P H S E V 120
ATGATTCATCAACCTTCTGGTGGTGTCTCAAGGTCAACAACTGAAATTGAAATTGCCGCTGAACAAATTTG
121 M I H Q P S G G A Q G Q Q T E I E I A A E Q I L 144
AAGACTCGGAAAGAGTTAAATAAAATTTTGGCAGAAAATTTCTGGTCAACCGCTAGAAAGAACAATTTTGAA
145 K T R K E L N K I L A E N S G Q P L E K I N L D 167
GACTCGGAAAGAGTTAAATAAAATTTTGGCAGAAAATTTCTGGTCAACCGCTAGAAACGGTATCATGAAAAGA
168 T E R D N Y L S A Q D A V D Y G L I D G I M E K
193 AACGCAAGCCTTAAGTAA
N A S L K
```