

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Análisis *in vitro* e *in silico* de proteínas intracelulares con efecto antimicrobiano producidas por *Pediococcus pentosaceus* 1101

TESIS

Para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

PRESENTA

I.A. Arquimides Ramos Palma

2183801730

DIRECTORA

Dra. Edith Ponce Alquicira

ASESORES

Dra. María De Lourdes Pérez Chabela

Dra. Mariel Calderón Oliver

Iztapalapa CDMX a 21 de febrero del 2024

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONAHCyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-O”

Ciudad de México. a 21 de febrero del 2024.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis:

**Análisis *in vitro* e *in silico* de proteínas intracelulares con efecto
antimicrobiano producidas por *Pediococcus pentosaceus* 1101**

que presentó

I.A. Arquimides Ramos Palma

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesora: Dra. María De Lourdes Pérez Chabela

Asesora: Dra. Mariel Calderón Oliver

Jurado:

Presidente:	Dra. María De Lourdes Pérez Chabela Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
Secretario:	Dr. Julio Cesar Almanza Pérez. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
Vocal:	Dra. Mariel Calderón Oliver. Tecnológico de Monterrey, Campus Toluca.
Vocal:	Dra. Carmen Josefina Juárez Castelán. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Edith Ponce Alquicira, por la oportunidad que me brindo de alcanzar una de mis metas académicas, la confianza y el apoyo brindado desde el momento inicial en el que estaba en búsqueda de un proyecto hasta la culminación del mismo, infinitas gracias.

A mis asesoras, Dra. María de Lourdes Pérez Chabela y Dra. Mariel Calderón Oliver, por el tiempo dedicado y observaciones que hicieron mejorar el trabajo, agradezco su apoyo en todo momento.

A mi mentora, compañera y amiga de laboratorio, Jessica Josefina Hurtado Ríos, la paciencia, la razón y el entendimiento al trabajo desarrollado, aprecio mucho las palabras, las preguntas y observaciones que enriquecieron en todo momento las actividades a realizar, la escucha, los consejos y las risas que hicieron más agradable todos los momentos dentro y fuera del laboratorio, le aprecio y agradezco mucho Doctora.

A la Dra. Carmen Josefina Juárez Castelán, quien fue una de las primeras personas que me oriento y también, permitió trabajar con la cepa aislada de su trabajo de tesis doctoral, que al final estuvo presente como parte del jurado, muchas gracias.

A la doctora Yesica Ruiz Ramírez, por el compañerismo, tiempo y sus observaciones en el desarrollo del trabajo dentro del laboratorio, aprecio mucho la paciencia, dedicación y palabras en el cierre de esta etapa.

A mis compañeros de laboratorio Dra. Adriana, Dr. José Luis, Dra. Monserrat y Mtra. Concepción que bien me recibieron desde el primer momento e hicieron más amena la estancia.



A mi madre y padre, Catita y Flaquito, personas que iluminan mi camino con sabiduría, trabajo, perseverancia, constancia y amor, de los que he aprendido a iniciar y concluir cada etapa haciendo el mejor esfuerzo disfrutando cada momento, el tener siempre una sonrisa que acompañe los buenos y malos momentos, gracias por estar siempre al pendiente, los amo.

A Alin, por caminar junto a mí en esta experiencia de vida; animando, empujando y levantando; mi apoyo, gran agradecimiento con amor por ser y estar.

A mi hermana y hermanos, personas importantes en mi vida y que impulsan a seguir adelante, estando presente en todo momento con risas y el amor característico que nos demostramos.

A todas y todos mis sobrinas y sobrinos, los abrazo.



Dedicatoria.

A mi niña, Camila, con tu sonrisa, alegría y amor hemos construido momentos que se quedan grabados en mente, alma y corazón, que esto sea una nota en tu acervo de experiencias para recordar que toda meta que te propongas se logre con dedicación, esfuerzo y constancia, te amo.

Una meta más con experiencias y vivencias que se recuerdan con gran cariño, a ese niño, adolescente y joven Arquimides que en algún momento se imagino llegar a este punto, con alegría, entusiasmo y agradecimiento a la vida culminamos gratamente esta etapa, me abrazo.

RESUMEN

Las Bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentran presentes en alimentos fermentados de origen cárnico, los géneros más representativos son *Lactobacillus* y *Pediococcus*, que proporcionan estabilidad y prolongan su vida útil debido a que son capaces de producir compuestos con actividad antimicrobiana como las bacteriocinas y el grupo llamado sustancias inhibidoras similares a bacteriocinas (BLIS), recientemente se ha demostrado que proteínas como las peptidoglucano hidrolasas (PHG) y ribosomales presentan dicha actividad.

En trabajos previos, Juárez Castelán (2019) realizó su trabajo de tesis doctoral dentro del grupo de trabajo del Laboratorio W-207 dirigido por la Dra. Edith Ponce Alquicira en la UAM-Iztapalapa, en el cual se aislaron diversas BAL de chorizo tipo español capaces de inhibir a microorganismos asociados al deterioro de alimentos, destacando la cepa *Pediococcus pentosaceus* 1101 que demostró una alta actividad antilisteria. Debido a que existen diversos reportes de péptidos con actividad antimicrobiana producidas por bacterias del género *Pediococcus*, este trabajo tuvo como objetivo identificar *in silico* los posibles metabolitos de origen proteico con efecto antimicrobiano secretados por la cepa de estudio.

En primera instancia se corroboró la identidad de la cepa 1101 mediante la amplificación del gen de referencia 16S ARNr, con un porcentaje de similitud para *Pediococcus pentosaceus* superior al 97%. Asimismo, se realizó la identificación mediante el análisis del perfil proteico por espectrometría de masas (MALDI-TOF-Biotyper) con un resultado de alta confianza.

Posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana de la cepa en estudio contra *Listeria innocua* haciendo uso del sobrenadante libre de células del cultivo, así como la fracción intracelular obtenida a través de un proceso de lisis por disrupción mecánica. Los restos de las células lisadas mostraron mayor actividad antimicrobiana, por lo que se continuó con el análisis de la fracción intracelular.

Se realizaron modificaciones a la condición óptima de crecimiento de la cepa 1101 para saber si existe una variación de la actividad antimicrobiana de la fracción intracelular, se probaron temperaturas de 30°C y 44°C, pH 5 y 6, y adición de 1% de extracto de levadura sobre la base del medio de cultivo. Se realizó la lisis recuperando y concentrando las proteínas por precipitación con ácido tricloroacético y ditiotritol, seguido de lavados con acetona. El perfil electroforético y zimograma de la fracción intracelular realizada en geles de poliacrilamida Tris-tricina mostraron 5 bandas con actividad inhibitoria contra *Micrococcus lisodeikticus* con pesos aparentes de 14.08, 42.83, 52.84, 70.89 y 103.42 kDa en la condición de crecimiento de 44°C.

En el análisis bioinformático los pesos aparentes obtenidos se usaron para identificar las posibles proteínas asociadas a la actividad inhibitoria, se buscaron proteínas reportadas en la base de datos de NCBI mediante palabras clave asociadas con actividad antimicrobiana de PGH y similares al peso, para después filtrar por localización intracelular y transmembranal haciendo uso de la herramienta Psortb. Se obtuvieron las secuencias de las proteínas elegidas, se les realizó un alineamiento para el diseño de primers y posterior simulación de productos, para este ejercicio se buscaron las proteínas en 33 genomas secuenciados y reportados en NCBI de *Pediococcus pentosaceus*. Los resultados obtenidos de la simulación siguen que las proteínas con actividad antimicrobiana pertenecen a la familia de peptidasas M13 asociadas con diversas funciones de señalización y permeabilización de membrana celular

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) are present in fermented meat products, the most representative genera are *Lactobacillus* and *Pediococcus*, which provide stability and prolong their useful life because they can produce compounds with antimicrobial activity, such as bacteriocins and bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS), recent studies have also shown that proteins like peptidoglycan hydrolases (PHG) and ribosomal proteins exhibit antimicrobial activity.

In previous work, Juárez (2019) conducted doctoral research within the W-207 Laboratory group under the supervision of Dr. Edith Ponce Alquicira at UAM-Iztapalapa, in which various LAB of Spanish-type chorizo were isolated. one of them was strain 1101, which demonstrated the inhibition of microorganisms associated with food spoilage and exhibited high anti-*Listeria* activity. The objective of this work was to identify in silico the possible metabolites of protein origin that cause the antimicrobial effect of strain 1101.

The strain under study was identified as *Pediococcus pentosaceus* by amplification of the 16S rRNA reference gene, with a similarity percentage of 97%. Additionally, identification was confirmed through the analysis of the protein profile using mass spectrometry (MALDI-TOF-Biotyper), providing a result of high confidence. the strain under study is named *Pediococcus pentosaceus* 1101.

Subsequently, the antimicrobial activity against *Listeria innocua* was evaluated using the cell-free supernatant of the culture, as well as the intracellular fraction obtained through a mechanical disruption lysis process. The remnants of the lysed cells exhibited higher antimicrobial activity, so the analysis of the intracellular fraction was continued.

Modifications were made to the optimal growth conditions of strain 1101 to assess potential variations in the antimicrobial activity of the intracellular fraction, temperatures of 30°C and 44°C, pH 5 and 6, and addition of 1% yeast extract to the base culture médium were tested. Lysis was performed, recovering and concentrating the proteins through precipitation with trichloroacetic acid and

dithiothreitol, followed by washes with acetone. The electrophoretic profile and zymogram of the intracellular fraction, conducted on Tris-tricine polyacrylamide gels, revealed 5 bands with inhibitory activity against *Micrococcus lisodeikticus*, with apparent weights of 14.08, 42.83, 52.84, 70.89, and 103.42 kDa under the growth condition of 44°C.

In the bioinformatic analysis, the apparent weights obtained were used to identify potential proteins associated with inhibitory activity. Proteins were searched in the NCBI database using keywords related to antimicrobial activity of peptidoglycan hydrolases (PGH) and similar weights. Subsequently, the results were filtered based on intracellular and transmembrane localization using the Psortb tool. The sequences of the chosen proteins were obtained, aligned for primer design, and then subjected to product simulation. In this exercise, proteins were searched in 33 sequenced genomes reported in NCBI for *Pediococcus pentosaceus*. The simulation results suggest that the proteins with antimicrobial activity belong to the M13 peptidase family, associated with various functions such as signaling and cell membrane permeabilization.

Índice general

1	Índice de figuras	12
2	Índice de tablas	13
3	Índice de gráficas	15
4	Introducción	16
4.1	Bacterias ácido lácticas	16
4.1.1	Metabolismo de los carbohidratos en BAL	16
4.1.2	Aplicaciones tecnológicas de las BAL	17
4.1.3	Péptidos antimicrobianos	18
4.1.3.1	Peptidoglucano hidrolasas	18
4.1.3.2	Clasificación del peptidoglucano hidrolasas	20
4.1.3.3	Modo de acción y regulación de PGH	22
4.1.3.4	Bacteriocinas	23
4.1.3.5	Proteínas Ribosomales	27
4.1.4	<i>Pediococcus spp.</i>	28
4.2	Bioinformática en el análisis de proteínas	30
4.2.1	Herramientas Bioinformáticas	31
5	Justificación	33
6	Hipótesis	34
7	Objetivo General	34
7.1	Objetivos específicos	34
8	Metodología general de trabajo	35
8.1	Identificación de la cepa	35
8.1.1	Activación de la cepa	35
8.1.2	Extracción del ADN.	36
8.1.3	Amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr	36
8.1.4	Identificación por espectrometría de masas	37
8.2	Identificación y extracción de compuestos antimicrobianos	38
8.2.1	Fracciones de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101	38
8.2.2	Obtención de la fracción extracelular de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101... ..	38
8.2.3	Ruptura Celular y extracción de proteínas intracelulares	39
8.3	Actividad antimicrobiana	40
8.3.1	Difusión en agar por pozos	40

8.3.2	Difusión en agar con discos	41
8.4	Cinética de crecimiento	42
8.5	Análisis estadístico.	42
8.6	Determinación del efecto antimicrobiano de las proteínas intracelulares de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101 sobre el crecimiento de <i>Listeria</i>	42
8.7	Electroforesis de las proteínas extracelulares y detección de la actividad antimicrobiana por zimograma.	43
8.8	Análisis bioinformático de bandas con actividad antimicrobiana.....	44
8.9	Diseño de primers.....	45
9	Resultados.....	46
9.1	Identificación de cepa	46
9.1.1	16s ARNr	46
9.1.2	Espectrometría de masas	49
9.2	Actividad antimicrobiana en fracciones del medio de cultivo.....	51
9.3	Cinética de crecimiento	54
9.4	Concentración mínima inhibitoria	56
10	Evaluación de la actividad antimicrobiana en las fracciones de la célula de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101.	57
10.1	Compuestos adheridos a la pared celular.....	57
10.2	Ruptura Celular.....	58
11	Perfil de proteínas por SDS-Tris-tricina y Zimograma.....	61
11.1	Condición óptima de crecimiento	61
11.2	Variación en la condición de crecimiento.....	62
11.2.1	Zimograma.....	64
11.2.2	Efecto de la actividad antimicrobiana	67
12	Análisis Bioinformático	69
12.1	Determinación del peso molecular aparente.....	69
12.2	Búsqueda de proteínas.....	70
12.3	Diseño de primers.....	74
13	Conclusiones	81
14	Perspectivas	82
15	Referencias.....	83
16	Anexos.....	92

1 Índice de figuras

Figura 1. Organización de peptidoglucano de <i>Escherichia coli</i>	19
Figura 2. Localización y corte específico de las peptidoglucano hidrolasas.....	20
Figura 3. Árbol filogenético de los géneros relacionados al complejo de <i>Lactobacillus</i>	29
Figura 4. Diagrama general de trabajo.	35
Figura 5. Metodología de análisis bioinformático.	44
Figura 6. ADN total de la cepa en gel de agarosa al 0.8%.	46
Figura 7. Productos de PCR en gel de agarosa al 0.8%.....	48
Figura 8. Búsqueda taxonómica de código obtenido por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	51
Figura 9. Siembra en placa de la lisis celular de la cepa <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101.	59
Figura 10. Perfil proteico y zimograma, a temperatura de incubación de 37°C.....	61
Figura 11. Perfil proteico de la fracción precipitación de proteínas obtenidas de diferentes condiciones de crecimiento.....	63
Figura 12. Zimograma de la fracción precipitación de proteínas obtenidas a diferentes condiciones de crecimiento.....	65
Figura 13. Alineamiento de productos de PCR usando los primers diseñados para la banda B en los genomas completos de <i>Pediococcus pentosaceus</i>	77
Figura 14. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia M13 de <i>Pediococcus Pentosaceus</i> (a) con la secuencia del gen pepO de <i>Lactobacillus helveticus</i> (b) y <i>Lactobacillus gasei</i> (c).....	79

2 Índice de tablas.

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas.....	24
Tabla 2. Herramientas bioinformáticas.	31
Tabla 3. Cebadores universales de amplificación del 16s ARNr.	37
Tabla 4. Condiciones de crecimiento para la cepa de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101...40	
Tabla 5. Resultados de BLAST en la plataforma de NCBI para cepa 1101	49
Tabla 6. Resultados para espectrometría de masas usando MALDI-TOF.....	50
Tabla 7. Actividad antimicrobiana de diferentes fracciones del medio de cultivo de <i>Pediococcus pentosaceus</i>	52
Tabla 8. CMI en el concentrado celular resuspendido en BFS a la hora máxima de actividad antimicrobiana.....	57
Tabla 9. Resultados de la técnica de absorción y desorción de los compuestos en la pared celular.	58
Tabla 10. Actividad antimicrobiana en fracción de restos celulares.	59
Tabla 11. Diluciones para observar el efecto de las proteínas intracelulares.	68
Tabla 12. Interpolación de bandas problema mostrando los centímetros recorridos y sus pesos aparentes.	70
Tabla 13. Cepas con genomas cerrados buscados en la base de datos de NCBI.	71
Tabla 14. Relación de pesos aparentes de las bandas problemas y peso proteico de las proteínas seleccionadas de la búsqueda en base de datos de NCBI.....	72
Tabla 15. Criterios para el diseño de primers.....	74
Tabla 16. Primers diseñados para cada uno de las proteínas con actividad de peptidoglucano hidrolasa.	75
Tabla 17. Componentes de PCR	92
Tabla 18. Densidad óptica (600 nm) de cinética de crecimiento de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101.	93
Tabla 19. mm de halos de inhibición de células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101.....	94
Tabla 20. Análisis de varianza para la densidad óptica de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101.	95
Tabla 21. Diferencias entre grupos para la densidad óptica de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101.....	95
Tabla 22. Análisis de varianza para la actividad inhibitoria de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101.....	96
Tabla 23. Diferencias entre grupos por Kruskal-Wallis para la actividad inhibitoria de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101.	96

Tabla 24. Valores de concentración de proteína y mm de halos de inhibición en diluciones del concentrado de células de 10 horas resuspendidas en BFS.	97
Tabla 25. Cepas de genoma completo para el análisis de proteínas.	98
Tabla 26. Resultado de aplicación de primers diseñadas para la banda B en el gen pepO de diferentes especies reportadas	99

3 Índice de gráficas

Gráfica 1. Cinética de crecimiento por triplicado <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1101.	55
Gráfica 2. Actividad inhibitoria por triplicado de las células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> contra <i>Listeria Innocua</i>	55
Gráfica 3. Efecto bacteriostático de proteínas intracelulares.	68
Gráfica 4. Ajuste lineal para interpolación de las bandas problema.	70

4 Introducción

4.1 Bacterias ácido lácticas

El grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) comprende a un amplio número de bacterias Gram positivas, no móviles, anaerobias facultativas, no esporuladas, cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0.5-0.8mm, capaces de producir ácido láctico, del phylum *Bacillota*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familias *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterocaccaceae*, *Leuconostaceae*, *Streptocaccaceae* y *Lactobacillaceae*, esta última con los géneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y *Pediococcus* (Bintsis, 2018; Zheng y col., 2020). La BAL son de especial importancia en la industria alimentaria ya que participan en la elaboración de productos como lácteos, cárnicos, vegetales y bebidas, por ejemplo, yogurt, quesos, chorizos, salami, chucrut, pulque y pozol, entre otros.

4.1.1 Metabolismo de los carbohidratos en BAL

Las BAL son capaces de degradar varios carbohidratos mediante las rutas metabólicas homofermentativa y heterofermentativa. Las BAL homofermentativas, fermentan las hexosas al ácido láctico mediante la vía de Embden Meyerhof (EM), este grupo incluye algunos *Lactobacillus* y la mayoría de las especies de los géneros *Enterococos*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Kandler, 1983). En condiciones de exceso de glucosa y oxígeno limitado, las BAL homolácticas catabolizan un mol de glucosa en la vía EM para producir dos moles de piruvato; donde la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) se oxida simultáneamente con la reducción de piruvato para producir 2 mol de ácido láctico y 2 mol de ATP por mol de glucosa consumida. Por otra parte, las BAL heterofermentativas utilizan la vía de la fosfocetolasa (vía de la pentosa fosfato) para descomponer los azúcares. En esta ruta, un mol de glucosa se descompone en cantidades equimolares de etanol y ATP. En este grupo destacan el género *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus*. (Taylor, 2015).

Además de producir ácido láctico, estas bacterias también contribuyen al sabor, aroma, textura y mejoran el valor nutricional de los alimentos fermentados a través

de la producción de exopolisacáridos y la modificación de proteínas, lo anterior derivado de su actividad metabólica sobre las proteínas, azúcares y lípidos. Las BAL producen otros metabolitos como ácido propiónico, polioles y compuestos antimicrobianos (Parra, 2010; Bintsis, 2018).

4.1.2 Aplicaciones tecnológicas de las BAL

De acuerdo con Bintsis (2018) las BAL son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores y bioprotectores en productos lácteos, cárnicos, pescados y vegetales, debido a que contribuyen a la inhibición de microorganismos patógenos y alterantes. Además, las BAL producen peptidasas, lipasas y otras enzimas intracelulares, que desempeñan un papel clave durante las fermentaciones que aunado a la producción de exopolisacáridos que modifican con ello las características de aroma, sabor y textura, siendo la base de sus múltiples aplicaciones tecnológicas (Lortal y Chapot-Chartier., 2005).

Un amplio número de BAL son capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana como ácidos, peróxidos, enzimas y péptidos antimicrobianos (PAM) que pueden inhibir a bacterias causantes del deterioro en alimentos, así como a algunos patógenos por lo que ejercen una acción bioprotectora (Sierra et al., 2017). La mayoría de los PAM muestran actividad contra microorganismos Gram-positivos y, con menor frecuencia también se ha reportado actividad específica contra algunas bacterias Gram-negativas, lo que ha atraído el interés en la industria alimentaria (Volzing et al., 2013).

Las BAL desempeñan un papel importante en la producción de alimentos fermentados, en chorizos los más predominantes son algunos del género *Lactobacillus* y del género *Pediococcus*, este último han reportado actividad antimicrobiana contra Gram positivos y Gram negativos.

4.1.3 Péptidos antimicrobianos

Acorde con Gallo et al., (2003) la definición de un PAM se ha aplicado libremente a cualquier péptido con la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, incluidas bacterias Gram-positivas y negativas, así como hongos. Los PAM producidos por BAL incluyen las bacteriocinas y proteínas bioactivas participantes en la división de la pared celular bacteriana como las peptidoglucano hidrolasas que han demostrado actividad antimicrobiana (Venegas et al 2019).

Muchos organismos producen proteínas antimicrobianas, que por su tamaño relativamente pequeño se denominan de forma genérica péptidos, como las bacteriocinas (Chikindas et al., 2018). Las bacteriocinas son activas contra algunos patógenos microbianos humanos y animales, como puede ser *Staphylococcus aureus*, una de las ventajas del uso de bacteriocinas incluye su estabilidad física y su baja toxicidad (Ahmad et al., 2017). Por otro lado, se tienen proteínas de mayor tamaño como las peptidoglucano hidrolasas (PGH) que pueden escindir la pared celular de peptidoglucano de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, por lo que se han propuesto como una alternativa potencial para los antibióticos debido a su actividad bacteriolítica con espectro múltiple (Sharma et al, 2016).

4.1.3.1 Peptidoglucano hidrolasas

El peptidoglucano (PG) es una red bidimensional que rodea a la célula bacteriana, su composición química es similar en procariontes, diferenciándose únicamente en la composición de aminoácidos dentro de la cadena tetrapeptídica (Figura 1) (Gumbart et al., 2014). El PG de las bacterias Gram-positivas como de las Gram-negativas se compone de unidades repetitivas (cadena de glicanos) de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido β -(1-4)-N-acetilmurámico (NAM) entrecruzado por la cadena peptídica unidas a los residuos NAM, el tercer residuo de la cadena peptídica varía entre una bacteria a otra, para las Gram-positivas suele ser lisina y para las Gram-negativas meso-diaminopimelato (mDAP), que también se encuentra en algunas especies de *Listeria* y *Bacillus* (Sharma et al, 2016).

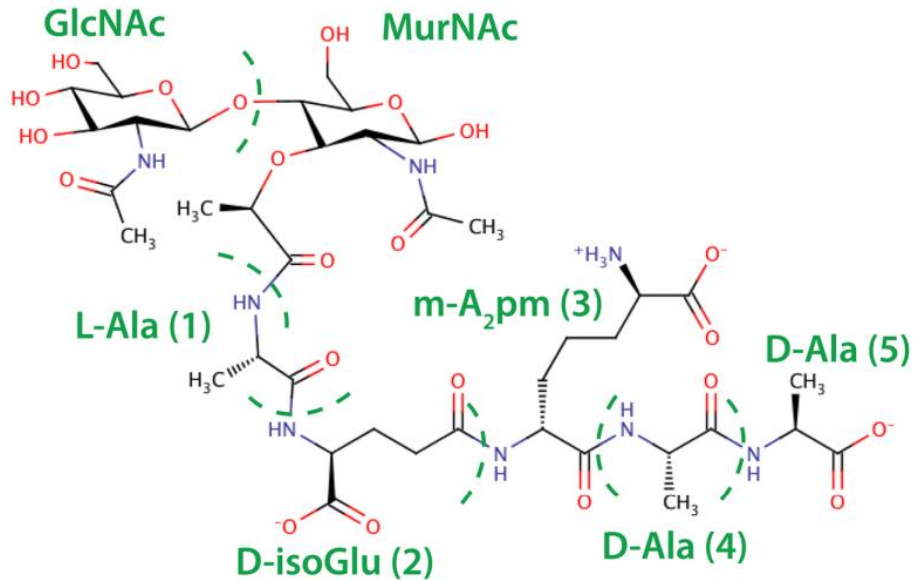


Figura 1. Organización de peptidoglucano de *Escherichia coli*

N-acetilmuramidasa(GlcNAc), N-acetilglucosamida (MurNAC), L-alanina (L-Ala), D-isoglutamato (D-isoGlu), Ácido meso-diaminopimélico (m-A₂pm), D-alalina (D-Ala) (Tomado de Gumbart et al 2014).

En bacterias Gram-negativas el PG se encuentra en menos del 10%, mientras que en bacterias Gram-positivas su contenido se encuentra entre 30 al 70% mostrando variaciones estructurales que pueden considerarse un criterio para la diferenciación bacteriana (López *et al.*,2019).

Las enzimas peptidoglucano hidrolasas (PGH) son capaces de hidrolizar enlaces específicos del peptidoglucano (PG) de la pared celular bacteriana y por tanto son responsables de mantener el recambio global de peptidoglucano (Maliničová et al 2010). Estas enzimas intervienen en la regulación de la rigidez y forma de las células bacterianas, en los mecanismos de resistencia a antibióticos, la susceptibilidad a los fagos, el comportamiento serológico y protegen de la lisis osmótica, entre otros (López *et al.*, 2019).

Las PGH bacterianas también tienen un papel importante en la escisión o ruptura de las cadenas de PG para la inserción de subunidades de PG durante el crecimiento de células bacterianas y para separar las células hijas después de la división celular; aunque la hidrólisis del PG también puede conducir a la autólisis y

muerte celular, particularmente bajo condiciones de estrés (Chapot-Chartier & Kulakauskas., 2014). Las bacterias producen varios tipos de PGH para hidrolizar el PG (Figura 2), por lo que acorde con el sitio de acción se clasifican en glicosidasas, muramidasa, amidasa y peptidasas (Steen et al., 2005.).

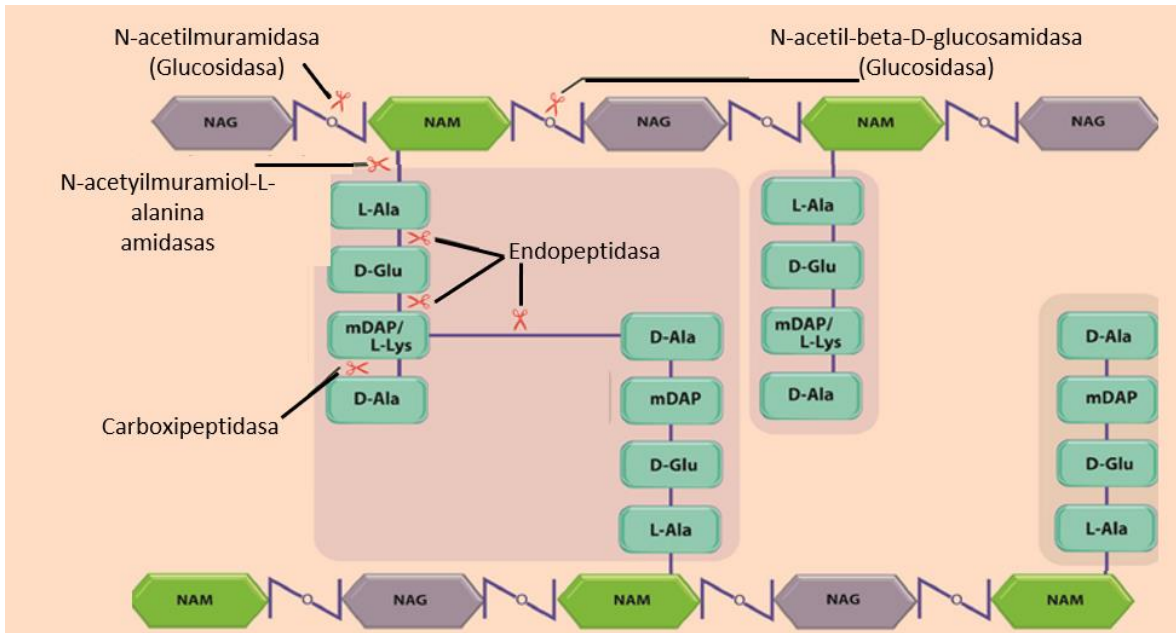


Figura 2. Localización y corte específico de las peptidoglicano hidrolasas (Modificado de Sharma et al, 2016)

4.1.3.2 Clasificación del peptidoglicano hidrolasas

Las PGH se clasifican en función de su sitio de escisión, reconociéndose tres clases principales: (1) las glicosidasas que hidrolizan la columna vertebral del glucano, (2) las amidasa que cortan el péptido de cadena lateral y (3) las peptidasas (endopeptidasas y carboxipeptidasas) que actúan dentro de la cadena lateral del péptido (Sharma et al, 2016).

●Glicosidasas

Las glicosidasas denominadas N-acetil-β-D-muramidasa, N-acilmuramidasa o N-acetilglucosaminidasa son enzimas ubicuas que actúan sobre el enlace β1,4-glicosídico entre los residuos de MurNAc y GlcNAc del peptidoglicano. Este enlace se puede hidrolizar de dos maneras diferentes: las lisozimas hidrolizan el enlace glicosídico, dando como resultado un producto con un residuo de MurNAc reductor

terminal. En contraste, las transglicosilasas líticas rompen el enlace glicosídico con una reacción de transglicosilación intramolecular, lo que resulta en la formación del anillo 1,6-anhidro en el residuo MurNAc del producto (Vollmer et al., 2008).

●Amidasas

Las amidasas N-acetilmuramil-L-Ala (MurNAc-LAA) actúan en el enlace amida entre MurNAc y el residuo de L-alanina N-terminal del péptido de tallo. Estas enzimas, también se les denomina peptidoglicano amidasas o amidasas también llamadas autolisinas para aquellas de origen bacteriano y endolisinas presentes en bacteriófagos. En la mayoría de los casos, los MurNAc-LAA bacterianos son miembros del sistema autolítico bacteriano y contienen un péptido señal en sus extremos N-terminal que permiten su transporte a través de la membrana citoplásmica (Vollmer et al., 2008). Aunque potencialmente letales, estas autolisinas están presentes universalmente entre las bacterias que tienen peptidoglucano (Sharma et al, 2016).

●Peptidasas

De acuerdo con la descripción de Vollmer et al. (2008), estas enzimas hidrolizan los enlaces de amida entre los aminoácidos en el peptidoglicano o sus fragmentos solubles.

Los términos endopeptidasas y carboxipeptidasas, se usan para las enzimas que hidrolizan el enlace amida entre dos aminoácidos en el peptidoglucano y el término amidasa se refiere a las enzimas que rompen entre MurNAc y L-Ala. Asimismo, las peptidasas del peptidoglucano se clasifican como carboxipeptidasas (eliminación de un aminoácido C-terminal) o endopeptidasas (escisión dentro del péptido). Las DD-peptidasas rompen entre dos D-aminoácidos, mientras que las LD-peptidasas o DL-peptidasas dividen entre un L- y un D-aminoácido.

4.1.3.3 Modo de acción y regulación de PGH

La especificidad de sustrato de estas enzimas varía ampliamente definida por el sitio de corte, fragmentando parcialmente al PG en las cadenas de los glicanos o en la cadena peptídica, esta variación de actividad se debe a que las PGH poseen secuencias señal o líder. La eliminación de una secuencia líder puede dar como resultado un cambio en las propiedades físicas y, en algunos casos, la localización subcelular de la proteína (Shockman et al., 1996).

La mayoría de las PGH se componen de al menos dos dominios distintos, el primero es el de unión a la pared celular (CWBD, por sus siglas en inglés *cell wall binding domain*), son responsables de la interacción de las enzimas con la capa de mureína que influye en la localización, la especificidad de las bacterias objetivo y la eficiencia catalítica, el segundo es el dominio catalítico el cual determina la especificidad hidrolítica de la pared celular (Chapot-Chartier & Kulakauskas., 2014).

Se ha reportado que la autólisis de las células de las BAL se debe a la acción de sus PGH, y se les ha relacionado con la liberación de proteínas intracelulares que contribuyen al desarrollo del sabor en los productos fermentados (Visweswaran et al., 2013).

De acuerdo con Vermassen et al., (2019) el tipo y número de dominios de anclaje del peptidoglucano necesarios para la unión máxima difieren de una PGH a otra. Como regla general, estos dominios permiten la unión de las enzimas a la membrana a una concentración adecuada y posicionan adecuadamente el sitio activo con el sustrato del PG para la formación de un complejo enzima-sustrato eficiente.

Las PGH son enzimas potencialmente letales, capaces en muchos casos, de degradar la pared celular de los organismos productores por lo que son altamente reguladas (Rice & Bayles, 2003). La regulación de PGH puede tener lugar a nivel transcripcional, pero también puede estar mediada por mecanismos que implican modificaciones postranscripcionales (Chapot-Chartier & Kulakauskas., 2014).

4.1.3.4 Bacteriocinas

Las bacteriocinas de acuerdo con Arakawa (2019) son péptidos antimicrobianos que se sintetizan ribosomalmente por algunas bacterias, incluidas las bacterias del ácido láctico. Hasta la fecha se han caracterizado la estructura genética, el espectro antibacteriano y modo de acción de muchas de ellas.

Las bacteriocinas muestran un alto grado de especificidad contra cepas de bacterias estrechamente relacionados en su mismo hábitat, y/o con una actividad antimicrobiana de amplio rango, pero en general, varias bacterias Gram-positivas son capaces de producir estos compuestos. Sin embargo, las bacteriocinas de las BAL son las más estudiadas debido al hecho de que la mayoría provienen de alimentos fermentados y son consideradas en general seguras como aditivo alimentario en carnes para su consumo (Woraprayote *et al.*, 2016).

Es por ello el interés de este tipo de metabolitos, ya que se ha reportado que no solo inhiben especies estrechamente relacionadas, sino que tiene efectos de inhibición contra microorganismos patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) y algunos microorganismos que ocasionan el deterioro en alimentos (*Bacillus cereus*), destacando su estabilidad al calor y tolerancia a cambios de pH (Arakawa, 2019).

Otra característica importante es que la bacteria productora tiene un mecanismo específico de inmunidad (Cotter *et al.*, 2005). Sin embargo, las condiciones de cultivo pueden afectar la producción de bacteriocinas, como el pH, temperatura y los requerimientos nutricionales, estos factores son la clave para obtener bacteriocinas con aplicación industrial (Gutiérrez *et al.*, 2018).

4.1.3.4.1 Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo con Klaenhammer (1993): clase I antibióticos; clase II pequeños péptidos estables al calor; y clase III péptidos de mayor tamaño que no son estables al calor. Sin embargo, otros autores

como Cotter et al., (2005) proponen solo dos grupos (Tabla1): grupo I que contiene bacteriocinas que contienen lantionina (lantibióticos) y clase II, bacteriocinas que no contienen lantionina, que en esta última clasificación se tienen 4 subclasificaciones acorde a su modo de acción, estructura y tamaño. A partir de estos trabajos otros autores como Arakawa (2019) y Taylor (2015) han propuesto clasificaciones alternas.

Tabla 1. Clasificación de bacteriocinas
Modificado de Cotter et al., 2005; Arakawa, 2019; Taylor 2015

Clasificación	Categorías/subcategorías		Microorganismo productor/bacteriocina producida	Bacteria inhibida	
Clase I	Contiene Lantionina y otros aminoácidos modificados (<4kDa)	Tipo A. Moléculas anfipáticas	<i>Lactobacillus lactis subsp lactis</i> /Nisina	Gram-positiva	
		Tipo B. Moléculas Globulares	<i>Bacillus Subtilis</i> /Mercacidina		
Clase II	Bacteriocinas no latibióticas (<10kDa)	Subclase IIa (caja N-terminal)	Bacteriocinas listericidas, similares a pediocinas.	<i>Lactobacillus sakei</i> /Sakacina	<i>Listeria spp.</i>
		Subclase IIb (2péptidos /complejos de poración)	Bacteriocinas de componentes de acción sinérgica.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> /Lactacina F	<i>Lactococcus, Enterococcus</i>
		Subclase IIc (grupo tiol)	Bacteriocinas circulares de cabeza y cola	<i>Lactobacillus lactis subsp cremoris</i> /Lactococina	<i>Lactobacilli</i>
		Subclase IId (>30kDa)	Otras bacteriocinas de clase II	<i>Lactobacillus helveticus</i> / Helveticina J	<i>Listeria</i> y otras Gram-positivas

4.1.3.4.2 Clase I.- Lantibióticos.

Los lantibióticos son péptidos (19–38 aminoácidos de longitud) que se caracterizan por que contienen residuos de lantionina o β -metillantionina. Estos residuos inusuales forman puentes covalentes entre ellos, lo que resulta en la formación de anillos internos, responsables de su estructura. Los residuos de lantionina resultan

de la modificación post-traducciona, incluyendo la sustitución de D-alanina para L-serina (Cotter et al., 2005). Los lantibióticos se pueden dividir en:

- Tipo A: Moléculas anfipáticas en forma de toroide (2.1 a 3.5 kDa). Contienen de 2 a 7 cargas positivas. En general, los lantibióticos catiónicos anfílicos alargados (por ejemplo, nisina) son activos a través de la formación de poros, que conduce a la disipación del potencial de membrana y el flujo de salida de pequeños metabolitos de las células sensibles.
- Tipo B. Moléculas globulares (de alrededor de 2 kDa). Tienen carga negativa o neutra. Los lantibióticos globulares (por ejemplo, mersacidina) se definieron originalmente como aquellos lantibióticos que actúan a través de la inhibición de la enzima encargada de transportar subunidades de peptidoglucano.
- Clase II.- Las bacteriocinas más comunes que no contienen lantionina también son pequeños (<10 kDa) péptidos termoestables, pero a diferencia de los lantibióticos, no son sujetos a extensas modificaciones post-traduccionales. La mayoría de las bacteriocinas de clase II son activas, induciendo la permeabilización de la membrana y la subsiguiente filtración de moléculas de la bacteria objetivo (Cotter et al., 2005).

Esta clase de péptidos se dividen en 4 subclases:

- Subclase IIa. Las bacteriocinas de tipo pediocina tienen un espectro estrecho de actividad, pero muestran una alta actividad específica contra el patógeno alimentario *Listeria monocytogenes*. Tienen un rango de 37 a 48 residuos y poseen uno o dos puentes disulfuro. La conservación entre péptidos es más evidente en la región hidrofílica, catiónica N-terminal (caja pediocinica), que contiene la secuencia de aminoácidos Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Cys-X-X-X-X-Val-X-Val, (en la que X es cualquier aminoácido) y se piensa que facilita la unión no específica a la superficie objetivo.

- Subclase IIb.- Bacteriocinas de dos péptidos. Requieren la combinación de actividad de ambos péptidos con un mecanismo de acción que implica la disipación del potencial de membrana, la fuga de iones y / o una disminución de la concentración de ATP intracelular. Estos péptidos muestran una actividad de bacteriocina muy baja si se analizan individualmente. A pesar de que los miembros de este subgrupo son relativamente heterogéneos, se ha propuesto que pudieran subdividirse en péptidos tipo E (mejorados) y tipo S (sinérgicos).
- Clase IIc. Péptidos con grupos tiol (-SH) activos que requieren de cisteína reducida para activarse. Las bacteriocinas de clase IIc (antes clase V) son agrupados sobre la base de que sus extremos N y C son ligados covalentemente, dando como resultado una estructura cíclica.
- Grupo II d. Proteínas grandes (>30kDa), termoestables. Se incluyen enzimas extracelulares bacteriolíticas. Las bacteriocinas restantes se combinan generalmente en un 'misceláneo' o grupo de 'un péptido no linear de pediocina'.

Se reporta otro tipo de compuestos con actividad antimicrobiana con bajo peso molecular similar a las bacteriocinas denominadas Bacteriocin Like inhibitory Sustances (BLIS por su término en inglés), que comparten características en su modo de acción en la actividad antimicrobiana diferenciándose en que las BLIS es una secuencia de nucleótidos aún no caracterizada (Md Sidek et al, 2018; Hurtado, 2019).

Las BLIS son compuestos sintetizados ribosomalmente que son liberados al medio extracelular al igual que las bacteriocinas, su efecto antimicrobiano es debido a la permeabilización de la membrana de las células bacterianas lo que ocasiona una despolarización del potencial de la membrana hasta llegar a la muerte celular (Boyanova et al. 2017). Otra característica de estos tipos de compuestos es que, en concentraciones bajas, son capaces de inhibir algunas bacterias relacionadas estrechamente en el mismo nicho de crecimiento en el que la bacteria productora exhibe inmunidad específica.

Estos compuestos antimicrobianos pueden representar una alternativa al tratamiento con antibióticos y también pueden inhibir los patógenos transmitidos por los alimentos (Pidutti et al., 2017).

4.1.3.5 Proteínas Ribosomales

Se ha reportado un tipo de PAM con bajos pesos moleculares similares a las bacteriocinas de la clase I, estos nuevos péptidos son proteínas ribosómicas que desempeñan un papel esencial en el ensamblaje de los ribosomas y traducción de proteínas (Zhou et al., 2015), sin embargo, se han detectado nuevas funciones independientes a las mencionadas, una de ellas es actividad antimicrobiana (Hurtado et al, 2022).

En el 2009, De Carvalho et al. reportaron tres compuestos antimicrobianos con pesos de 4.4, 6.8 y 9.5 kDa secretada por *Lactobacillus sakei*, la segunda de ellas fue purificada por intercambio catiónico y métodos cromatográficos e identificada como una proteína ribosomal S21 de la subunidad 30S, en este reporte se menciona que esta proteína puede ser activa contra *L. monocytogenes* y *E. faecalis*, probablemente interfiriendo con el ensamblaje y función de los ribosomas, dificultando así la síntesis de proteínas y conduciendo a la muerte celular. Otras proteínas ribosomales han sido identificadas con esta actividad son como lo reporta Pidutti et al.,(2017), proteínas ribosomales L27 Y L30 de la subunidad 50S producida por *Lactobacillus salivarius* SGL03, demostrando que estas proteínas ribosomales inhiben el crecimiento de *Enterococcus faecium*, bacteria Gram-positivo que puede ser comensal en el intestino humano, pero también puede ser patógeno además de contar con una actividad bactericida que son estables a las proteasas, la acidez, el calor y el almacenamiento refrigerado. Por último, Hurtado (2019) identifica una proteína ribosomal L14 de la subunidad 50S con un peso de 13.1 kDa mediante secuenciación por espectrometría de masas secretada por *Lactobacillus paraplantarum* aislada de un producto cárnico.

Existe poca información sobre el mecanismo de acción inhibitoria, en particular Qu et al., (2020) señalan que la proteína ribosomal RPS15 actúa directamente en los lipopolisacáridos y ácidos lipoteicoicos de la pared celular que conduce a la

despolarización de la membrana y la producción de agentes reactivos de oxígeno intracelulares (ROS). Por lo que estas proteínas ribosomales pueden presentar una función extra-ribosomal específica además de las funciones de equilibrio en la síntesis de proteínas (Warner & McIntoch, 2009) y se proponen como nuevas proteínas antimicrobianas de un gran potencial para aplicarse como nuevos fármacos antimicrobianos o como probióticos (Pidutti et al.,2017).

4.1.4 *Pediococcus* spp.

El género *Pediococcus* constituye junto con el género *Lactobacillus* la familia *Lactobacillaceae* (Hammes & Hertel, 2006), ambos compartiendo un ancestro en común junto con más de 200 especies que se encuentran en hábitats ricos en nutrientes mediante adaptación, moviéndose de un hábitat a otro, o vivir libremente en cualquiera (Duar et al.,2017). Wittouck et al. (2019) construyeron una taxonomía basada en los genomas secuenciados del género *Lactobacillus*, mostrando una relación entre los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* y *Fructobacillus*, formando un taxón monofilético denominado “complejo del género *Lactobacillus*”. La posición filogenética de los géneros estrechamente relacionados se ilustra en la Figura 3.

Pediococcus es una de las BAL importantes que se caracterizan por ser Gram-positivos, catalasa negativos, no móviles, quimioorganotróficos y homofermentativos. *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* son las dos especies más comunes en alimentos y lácteos (Singla et al., 2018). Los cultivos generalmente muestran cocos perfectamente redondos (0.4–1.4 mm de diámetro) en pares y tétradas, se caracteriza por una baja relación G+C (<50%). Las especies de *Pediococcus* tienen una relación G+C en el rango de 37–42% (Tm). Todas las especies crecen a 30° C, pero el intervalo de temperatura óptimo es 25–40 °C. *Pediococcus pentosaceus* tiene una temperatura óptima de crecimiento más baja (28–32 °C) que *P. acidilactici* (40 °C). El pH óptimo para el crecimiento es 6.0–6.5.



Figura 3. Árbol filogenético de los géneros relacionados al complejo de *Lactobacillus* (tomado de Wittouck et al., 2019)

Pediococcus pentosaceus tiene un amplio uso en la industria alimentaria debido a su capacidad para producir agentes antimicrobianos. Varias cepas de *P. pentosaceus* producen bacteriocinas responsables de la capacidad inhibir bacterias patógenas y de descomposición durante el almacenamiento de alimentos y bebidas como *Listeria monocytogenes* y *Oenococcus oeni* (Jiang et al., 2020). Aunque también se han reportado actividad antimicrobiana por peptidoglucano hidrolasas (peptidasas, N-acetil-muramidasa) contra *Lactobacillus helveticus* y *Listeria monocytogenes* (Mora et al., 2003).

P. pentosaceus también puede exhibir actividad inhibitoria hacia otras cepas de *Pediococcus* como hacia *P. acidilactici* y *Lactobacillus plantarum*, que pueden compartir nichos con *P. pentosaceus*. Además de su capacidad antibacteriana, otras funciones de *P. pentosaceus* también han atraído mucha atención, como su acción para la regulación de la inmunidad y mejorar el crecimiento animal cuando es suministrado dentro la alimentación del ganado (Jiang et al., 2020).

Juárez (2019), realizó una evaluación de la población microbiana en un chorizo tipo español durante el proceso de fermentación, en el que encontró microorganismos del género *Pediococcus* entre otros, una de las cepas identificadas como 1101 fue trabajada por Escobar (2019), en el que corrobora a la cepa como *Pediococcus pentosaceus* 1101 mencionando actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos.

4.2 Bioinformática en el análisis de proteínas

El uso de tecnologías de alto rendimiento para estudiar los sistemas de biología molecular ha revolucionado la investigación biológica y biomédica, permitiendo el estudio sistemático de los genomas de los organismos o genómica. En conjunto con el estudio de ARN (Transcriptómica), y la expresión de proteínas, incluidas sus estructuras y funciones (proteómica) (Chen et al. 2017).

De acuerdo con Choudhuri (2014) la bioinformática es la disciplina del análisis asistido por computadora de la información relacionada con genes, genomas y sus productos. En otras palabras, para todos los propósitos prácticos, la bioinformática se puede considerar como la biología molecular computacional, que utiliza técnicas computacionales para estudiar la estructura, función, regulación y red interactiva de genes y proteínas. El objetivo final es analizar y predecir la estructura, organización, función, regulación y dinámica de todo el genoma de un organismo.

Las principales herramientas para un análisis bioinformático se basan en el análisis de secuencias de ADN y proteínas utilizando varios programas y bases de datos disponibles en la web (Bayat, 2002). Chen et al. (2017) mencionan que las proteínas

ocupan un término medio molecular entre el gen y la transcripción y muchos niveles más altos de estructura y organización molecular y celular, manifestándose la mayoría de los procesos fisiológicos a nivel de proteínas

La investigación de proteínas mediante herramientas bioinformáticas se basa en proteínas anotadas y bases de datos, después de la separación, identificación y caracterización de una proteína y predicción de su estructura, además del análisis de los datos de la secuencia del genoma. La bioinformática también se emplea en el análisis de la variación, expresión y función de genes, así como en la predicción de la estructura de proteínas, entre otros (Bayat, 2002).

Las secuencias de aminoácidos y las estructuras tridimensionales por sí solas proporcionan información limitada sobre una proteína. Sin embargo, las bases de datos y herramientas computacionales permiten validar y comparar esta información con cientos de proteínas de estructura y función conocidas, para obtener más información sobre la calidad de los datos, clasificación, función y evolución de sus proteínas no caracterizadas (Paxman & Heras., 2016).

4.2.1 Herramientas Bioinformáticas

Como lo menciona Anzaldi et al. (2012), en un tiempo relativamente corto, la edición y el procesamiento de secuencias de ADN y proteínas han dejado el campo de la biología molecular para convertirse en una práctica de rutina en innumerables campos de investigación, la cantidad de herramientas y servidores para realizar análisis de secuencias biológicas y datos relacionados ha explotado, creando una necesidad de integración de recursos (Neerincx & Leunissen, 2005), algunos de los recursos son los que se mencionan en la tabla 2.

Tabla 2. Herramientas bioinformáticas.
(Bayat, 2002; Yu et al., 2011; Rey et al., 2004; Corpet. 1988; Mitchell. 1993).

Herramienta	Uso
Protein Molecular Weight (SMS)	Acepta una secuencia de proteínas y calcula el peso molecular. El peso molecular de la proteína se utiliza cuando desee predecir la ubicación de una proteína de interés en un gel de electroforesis en relación con un conjunto de estándares de proteínas en un marcador para proteínas.

	https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html
Reverse Complement (SMS)	<p>Convierte una secuencia de ADN en su contraparte complementaria. Es posible que desee trabajar con el complemento inverso de una secuencia si contiene un marco abierto de lectura.</p> <p>https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html</p>
PCR Products y Primer map (SMS)	<p>Acepta una secuencia de ADN junto con un par de primers (forward y reverse) y devuelve un mapa textual que muestra la posición de alineamiento de los cebadores. Este programa se utiliza para producir una figura de referencia útil, particularmente cuando han diseñado una gran cantidad de cebadores para un determinado modelo.</p> <p>https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html</p>
PSORTb	<p>Herramienta que permite la predicción de localización subcelular de proteínas, ya que proporciona un servidor web y una versión de código fuente, ambas permitiendo el procesamiento de secuencias de proteína individuales y por lotes. Su base de datos adjunta, PSORTdb proporciona un conjunto de datos de localizaciones de proteínas verificadas experimentalmente, así como resultados de predicción calculados previamente para más de 1000 genomas bacterianos secuenciados disponibles de NCBI.</p> <p>https://www.psort.org/psortb/</p>
MultiAlin	<p>Herramienta de alineación de secuencias múltiples para secuencias de proteínas y ácidos nucleicos. Se ingresan las secuencias en el cuadro de entrada de datos utilizando los formatos FASTA, EMBL-SwissProt o Genbank. (Los usuarios tienen la opción de ajustar los parámetros relacionados con la alineación y la presentación de datos). La salida predeterminada, que se genera rápidamente, es una alineación fácil de leer de las secuencias.</p> <p>http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/</p>
BLAST (herramienta básica de búsqueda de alineación local).	<p>Este software de algoritmo es capaz de buscar en bases de datos genes con estructura de nucleótidos similar y permite la comparación de una secuencia de aminoácidos o ADN desconocida con cientos o miles de secuencias de organismos humanos u otros hasta que se encuentre una coincidencia</p> <p>https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</p>

5 Justificación

La presencia de algunos géneros de bacterias como *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Staphylococcus* se consideran los principales agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), alimentos como la carne y sus derivados actúan como vehículos para la transmisión de estos patógenos. La contaminación de los alimentos por *Listeria monocytogenes* y su frecuente participación como agente responsable de ETA son, por lo general, el resultado de eventos simultáneos que se presentan en distintos puntos de la cadena alimentaria.

La listeriosis, causada por la bacteria *L. monocytogenes* es relativamente poco común, pero grave, con altas tasas de mortalidad (20.30%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Esta enfermedad afecta principalmente a segmentos específicos de la población cuya vulnerabilidad es mayor como mujeres embarazadas, niños recién nacidos, personas mayores y personas con enfermedades que afecten el sistema inmune a nivel mundial de acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud.

Debido a la proliferación de bacterias patógenas y alterantes que se desarrollan postproducción, es necesario desarrollar nuevas alternativas para su control. En el presente trabajo se realizó una aproximación bioinformática para la identificación de proteínas intracelulares con actividad antimicrobiana producidas por la cepa *Pediococcus pentosaceus* 1101 que ha presentado actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*. Es de interés identificar los compuestos antimicrobianos producidos por *Pediococcus pentosaceus* responsables de la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos en alimentos, para su posterior caracterización fisicoquímica y su subsecuente uso como una nueva herramienta de bioconservación.

6 Hipótesis

El género *Pediococcus* ha demostrado la producción de metabolitos de origen proteico con actividad antimicrobiana. Las proteínas responsables de dicha actividad son en su mayoría intracelulares y el uso de herramientas bioinformáticas proporcionará información para la identificación de estas proteínas.

7 Objetivo General

Analizar *in vitro* e *in silico* la cepa *Pediococcus pentosaceus* 1101 para la identificación de proteínas con actividad antimicrobiana

7.1 Objetivos específicos

- Confirmar la identidad de la cepa de estudio por métodos moleculares y espectrometría de masas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de la cepa 1101 en diferentes condiciones de crecimiento y sus fracciones celulares.
- Realizar un análisis electroforético de la fracción intracelular de la cepa 1101.
- Emplear herramientas bioinformáticas para la identificación de las proteínas intracelulares responsables de la actividad antimicrobiana de la cepa 1101.

8 Metodología general de trabajo

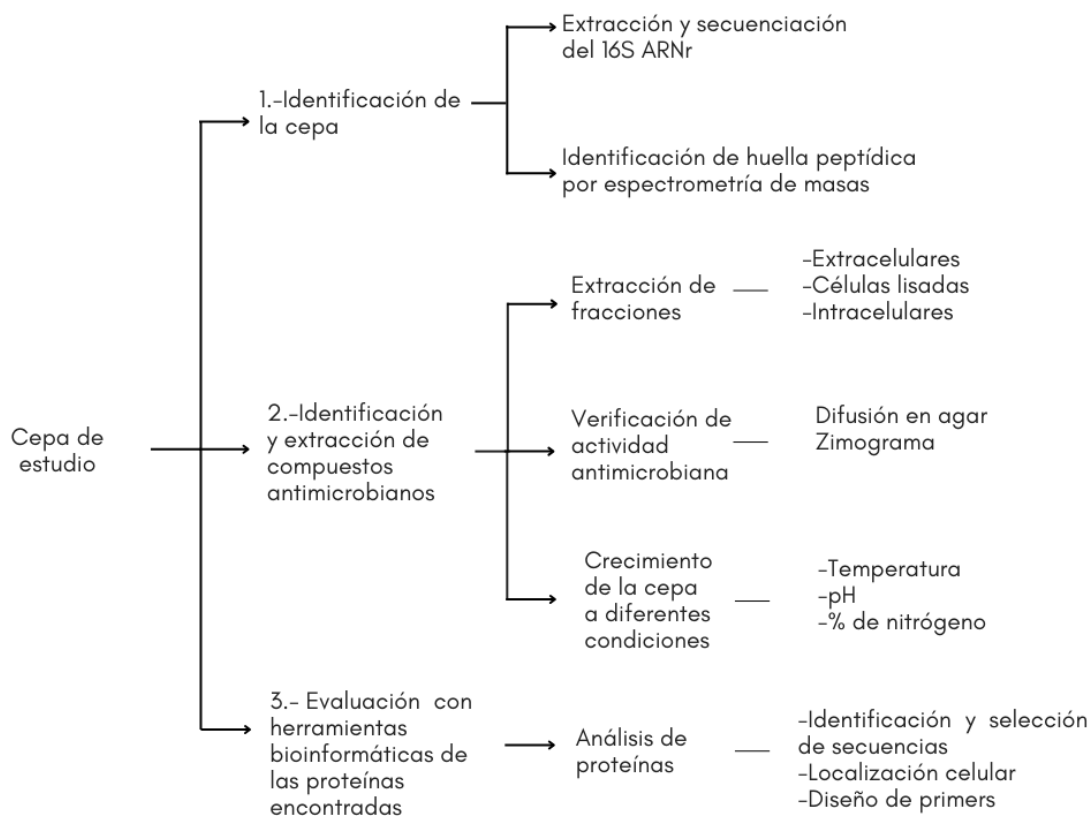


Figura 4. Diagrama general de trabajo.

8.1 Identificación de la cepa

8.1.1 Activación de la cepa

En esta tesis se trabajó con la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101 que fue aislada a partir de chorizo tipo español por la Dra. Carmen Juárez Castelán (2019). La cepa se reactivó en medio líquido Man Rogosa and Sharpe, MRS (De Man et al., 1960) y se incubó a 37 °C por 24 horas. A partir del cultivo, se preparó un stock de la cepa colocando una relación 1:1 del caldo de cultivo con glicerol anhidro (J.T.Baker. Lt. 2136-02) en tubos Eppendorf de 1.5 mL, que se sellaron con Parafilm y se almacenaron a -80°C.

8.1.2 Extracción del ADN.

La extracción de ADN se realizó a partir de un cultivo fresco empleando un kit de purificación de ADN Wizard® Genomic (catálogo A1120, PROMEGA, Madison, WI, EUA) acorde con las instrucciones del proveedor, tomando 1mL de un cultivo de 16 horas. La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un lector de placas Synergy Ht, Biotek (Vermont, Estados Unidos), colocando 2 µL de la muestra en una placa Take3 de la misma marca, midiendo la concentración con el programa GEN5 versión 1.11. La integridad del ADN obtenido se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, utilizando Buffer TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) a 80V por 40 minutos (Alberts et al., 2002, Strathdee & Free ,2013). Después del lavado se capturó la imagen en el fotodocumentador Gel Doc™ XR+ Imagin System BIO-RAD (California, EUA), utilizando el programa Imagen Lab versión 5.1.

8.1.3 Amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr

A partir del ADN purificado se realizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para amplificar la región del 16s ARNr usando cebadores universales fD1 y RD1(Sigma-Aldrich, Tabla 3) para corroborar el género y especie del microorganismo en estudio. La técnica consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización a 95 °C e hibridación a 51 °C, permitiendo que los cebadores (Tabla 3) se adhieran a sus posiciones de reconocimiento y por último la amplificación del fragmento del 16S ARNr por acción de la polimerasa (Brown, 2002). Los amplicones fueron purificados y concentrados utilizando el kit de purificación de PCR GeneJET (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) y enviados a secuenciar a los laboratorios de Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Finalmente, la secuencia obtenida fue analizada mediante un alineamiento utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en inglés) en la base de datos de NCBI (National Centre for Biotechnology Information).

Los componentes que se utilizaron para la mezcla utilizada en la Reacción en cadena de la DNA polimerasa se muestran en el anexo 1

Tabla 3. Cebadores universales de amplificación del 16s ARNr.

Cebador	Secuencia 5' – 3'
Forward primer (FP)	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTG GCTCAG
Reverse primer (RP)	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAG CC

8.1.4 Identificación por espectrometría de masas

El proceso de identificación mediante espectrometría de masas se realizó en el Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas de la UAM Unidad Iztapalapa con el sistema MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics, Alemania), en un espectrómetro MALDI-TOF/TOF (Modelo Autoflex speed TOF/TOF, Bruker Alemania).

A partir de colonias aisladas de la cepa mediante la técnica de agotamiento por estría sobre placas de agar MRS de 12 horas de incubación en condiciones óptimas de crecimiento. Se tomó una colonia y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 300 µL de agua bidestilada, a la cual se le añadió 900 µL etanol, seguida de centrifugación y decantación del sobrenadante. Al precipitado se le adicionó 10 µL de ácido fórmico al 70% y 10 µL acetonitrilo como lo describe Freiwald & Sauer (2009) para la inactivación, ruptura y precipitación de la membrana celular (Nguyen et al., 2013), recuperando el sobrenadante después de la centrifugación. La muestra para análisis se preparó en una placa MALDI, colocando 1 µL del sobrenadante en un pozo de la placa, seguida de 1 µL de matriz (ácido α-Ciano-4-hidroxycinnámico) para favorecer la ionización y desorción de energía en la muestra obtenida de la ruptura celular (Jang & Kim., 2018). El espectro de masas obtenido se analizó para género y especie en la base de datos de espectros de referencia MBT Compass.

8.2 Identificación y extracción de compuestos antimicrobianos

8.2.1 Fracciones de *Pediococcus pentosaceus* 1101

Un cultivo fresco de *P. pentosaceus* preparado como se describe en el apartado 8.1.1 se colocó en tubos falcón estériles de 50 mL y se centrifugó a 7,500 rpm por 15 min recuperando el sobrenadante libre de células al que se le denominó extracto crudo (EC). Una fracción del EC fue adicionada con inhibidor de proteasas denominándose extracto crudo con inhibidor de proteasas (ECI).

Por otra parte, las células se sometieron a un proceso de tres lavados consecutivos con solución buffer de fosfatos (BFS) pH 7 (NaCl 1.37 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 Mm, KH₂PO₄ 20 Mm) y centrifugación para eliminar el medio de cultivo. El botón de células resultante se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se resuspendió en 1 mL de buffer de fosfatos pH 7, esta fracción se denominó fracción de células de *P. pentosaceus* (CPP).

Finalmente, se determinó la concentración de proteína utilizando la técnica de Bradford (Bradford, 1976) y la actividad antimicrobiana de estas fracciones (EC, ECI Y CPP) utilizando la técnica difusión en agar en las mismas condiciones que se describen en el apartado 8.3 midiendo los halos de inhibición.

8.2.2 Obtención de la fracción extracelular de *Pediococcus pentosaceus* 1101

La extracción del compuesto antimicrobiano extracelular se llevó a cabo mediante la técnica de adsorción y desorción dependiente del pH (Yang et al., 1992), con algunas modificaciones de acuerdo con el método propuesto por Schneider (2005). Se inoculó caldo MRS al 1% (v/v) con un cultivo de *Pediococcus pentosaceus* 1101 y se mantuvo en incubación hasta alcanzar la fase estacionaria (Escobar 2019), a la cual, se le adicionó inhibidor de proteasas para la inactivación de las enzimas que pudiesen estar presentes en el medio (Handtke et al, 2018). Posteriormente, se ajustó el cultivo a un pH 5 con una solución de 10 M de NaOH y se mantuvo en agitación moderada durante 24 h permitiendo la adsorción del compuesto

antimicrobiano a la membrana celular bacteriana. Transcurrido este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 3,100 rpm durante 20 min a 4 °C y se recuperó el precipitado celular, que se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos (5mM fosfato de sodio, pH 6.5). Las células se resuspendieron en una solución 100 mM de NaCl a pH 1 ajustada con ácido fosfórico al 5%; este valor de pH favorece la desorción del compuesto antimicrobiano desde la membrana celular de las bacterias hacía el medio; se mantuvieron durante 24 horas en agitación a 4 °C en las condiciones antes descritas. Una vez transcurrido el tiempo, las células se centrifugaron a 3100 rpm durante 20 min a 4 °C, recolectando el sobrenadante, el cual se dializó empleando membranas de celulosa (Spectra/Por7®, Arizona US, con un tamaño de poro de 1000 Da) con cambios frecuentes de agua destilada hasta eliminar las sales presentes, posteriormente el dializado se filtró a través de membranas estériles con un poro de 0.22 µm. Por último, se determinó la concentración de proteína por el método Bradford y se almacenó en congelación a -8°C hasta su uso.

8.2.3 Ruptura Celular y extracción de proteínas intracelulares

De un cultivo celular de *Pediococcus pentosaceus* 1101 incubado por 10 horas en medio MRS a 37°C, las células se recuperaron por centrifugación a 7,000 rpm por 10 min. El pellet de células se sometió a tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos, el pellet del último lavado se resuspendió en una solución de 50mM Tris-HCl, 6M de Urea, 5mM DTT, pH 7.4 y 1.4 mM de inhibidor de proteasas (PMSF) (Carrasco et al., 2016; Handtke et al., 2018). Un volumen de 1.5 mL del pellet resuspendido se colocó en un vial de 2mL y se llevó al disruptor mecánico celular (Mini-bedbeater 16, Biospec Products, Oklahoma, USA). La lisis celular se realizó aplicando 25 ciclos intermitentes de trabajo por 30 segundos cada uno y reposo en un baño de hielo para bajar la temperatura interna del vial, al término de los ciclos el vial fue centrifugado obteniendo así un precipitado de la fracción de restos celulares, el sobrenadante o citosol.

La fracción soluble del citosol se trató con una solución al 20% de ácido tricloroacético (TCA) y 0.14% de DTT en acetona en una relación 1:3, con la finalidad de estabilizar las proteínas y separar los restos de polisacáridos (Saravanan & Rose, 2004) a una temperatura de -20 °C por 18 horas. El precipitado se lavó dos veces con acetona al 100 % y un último lavado con acetona al 80 % como lo describe Carrasco et al. (2016). La cepa *Pediococcus pentosaceus* 1101 se sometió a diferentes condiciones de crecimiento como se muestra en la tabla 4 con la finalidad de observar si existen cambios en la expresión de los compuestos proteicos obtenidos en la fracción soluble del citosol (se realizó la misma técnica de extracción de proteínas antes descrita para todas las condiciones de crecimiento).

Tabla 4. Condiciones de crecimiento para la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101.

Condiciones de crecimiento	
Variación de Temperatura (°C)	30, 44
Adición de extracto de levadura sobre la formulación base del medio de cultivo (%)	1
Variación de pH	5 y 6

8.3 Actividad antimicrobiana

8.3.1 Difusión en agar por pozos

El método utilizado fue difusión en agar descrito por Schillinger y Lücke (1989) con modificaciones correspondientes. En una caja Petri se depositaron 15 ml de medio CGB conteniendo 1.5% de agar, una vez que solidificó se aplicó una segunda capa del mismo medio suave conteniendo 0.8% de agar y previamente inoculado con 100µL de un cultivo de *Listeria innocua* con una DO=0.15 ($\lambda_{600\text{ nm}}$). Sobre esta segunda capa de agar y ya solidificado se realizaron pozos con ayuda de una punta de micropipeta estéril de 1000 µL y se adicionaron 100µL de extracto a probar su actividad antimicrobiana, dejando al menos un pozo como blanco. La placa se mantuvo en refrigeración por 1 hora para permitir la difusión del extracto y

posteriormente se llevó a incubación a 37 °C por 24 horas, midiendo los halos de inhibición generados por el extracto. La actividad antimicrobiana se estableció como la relación de mm de halos de inhibición entre la concentración de proteína expresada en mg después de incubar el medio a 37 °C por 24 como se muestra a continuación.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{mm halo de inhibición} * fd}{\text{mg de proteína}}$$

8.3.2 Difusión en agar con discos

Se utilizó la técnica descrita por Ruíz (2017) con modificaciones. Se preparó medio CGB al 15% de agar el cual fue inoculado con 100µL de un cultivo de *Listeria innocua* con una DO=0.15 (λ600 nm) posteriormente se dejó solidificar de forma invertida. Para la preparación de la prueba de difusión en agar con discos, se acondicionó papel filtro estéril a un diámetro de 4 mm, en el que se colocaron 20 µL del extracto a probar su actividad antimicrobiana. Se colocaron dos discos con extracto en el medio CGB sólido inoculado con *Listeria innocua* previamente preparado y uno más al que se le colocó agua destilada como blanco de forma espaciada y distribuida. La placa se colocó en incubación a las mismas condiciones de incubación que en el apartado 8.3.1 para establecer la actividad antimicrobiana de los extractos probados. Posterior a la incubación se midieron los halos de inhibición con la fórmula siguiente:

$$Hi = \frac{D_T - D_D}{2}$$

Hi=Halo de inhibición en mm

DT=Diámetro total (diámetro del disco + diámetro del halo) en mm

DD=Diámetro del disco (4mm)

8.4 Cinética de crecimiento

La cinética se llevó a cabo por triplicado en medio MRS a una temperatura de 37 °C, midiendo la densidad óptica del cultivo inoculado al 1% con la cepa *Pediococcus pentosaceus* de 24 horas, registrando la absorbancia a 600nm en intervalos de tiempo de 1 hora durante la incubación para determinar las fases de crecimiento en un lector de placas BIOTEK SINERGY HT (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Al mismo tiempo se determinó la inhibición contra *Listeria innocua* con los extractos obtenidos en las diferentes lecturas de la cinética expresada como mm de halo de inhibición. Los datos de crecimiento se sometieron a un ajuste con el modelo logístico con el programa Statistica 12 obteniendo los parámetros cinéticos de la tasa de crecimiento y densidad óptica máxima ($D.O._{max}$) como lo describe Escobar Sánchez (2023).

8.5 Análisis estadístico.

Para el análisis de los resultados de las cinéticas de crecimiento antes descritas se realizaron análisis de varianza empleando el paquete estadístico SigmaPlot V.12.5 con un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el método de Kruskal-Wallis para la comparación de la densidad óptica y actividad inhibitoria medida en intervalos de 1 hora por triplicado.

8.6 Determinación del efecto antimicrobiano de las proteínas intracelulares de *Pediococcus pentosaceus* 1101 sobre el crecimiento de *Listeria*.

Se utilizó *Listeria innocua* como microorganismo objetivo para conocer el efecto bacteriostático de las proteínas intracelulares de *Pediococcus pentosaceus* 1101 de acuerdo con el procedimiento reportado por De Azevedo et al. (2018) y Guirao et al (2015) con modificaciones. *Listeria innocua* fue cultivada en medio TSB al 1 % por 16 horas, se tomó una alícuota del cultivo que se resembró de nuevo en el medio TSB, incubando a 37 °C por 16 h hasta alcanzar una $DO_{(\lambda 600\text{ nm})} = 0.5$. A partir de

este cultivo se realizaron diluciones hasta obtener una $DO_{(\lambda 600 \text{ nm})} = 0.3$ (equivalente a una población en un rango de 5 a 6 log UFC/mL), depositando 150 μL de este cultivo diluido en pozos de una microplaca estéril seguido de la adición de 150 μL del extracto de proteínas intracelulares de *Pediococcus pentosaceus* 1101. La placa se colocó en el lector de microplacas y se incubó por un período de 22 h a 37 °C monitoreando el cambio en la densidad óptica a 600 nm.

8.7 Electroforesis de las proteínas extracelulares y detección de la actividad antimicrobiana por zimograma.

Se prepararon geles de electroforesis de SDS-Tris-tricina empleando geles de separación de acrilamida-bisacrilamida al 12 % T como lo describe Haider et al. (2012), para los geles de concentración se prepararon al 2.6 % C y 4 % T. Los geles fueron ensamblados en una cámara de electroforesis Mini-Protean® Tetra System (Bio-Rad, California, E.U.A.). Las muestras de los extractos de proteínas extracelulares fueron tratadas en condiciones no desnaturizantes colocados en buffer de carga depositando volúmenes de 20 μL en cada pozo, con una corrida a 80 V por 30 minutos seguido de un voltaje de 120 V por 100 minutos empleando una fuente de poder PowerPac (Bio-Rad, California, E.U.A.). Terminada la corrida se sacaron los geles de la cámara de electroforesis para su posterior fijación con glutaraldehído al 5 % durante 20 minutos en agitación constante y posterior tinción durante 20 minutos con una solución al 0.02 % de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 100 mL de ácido acético glacial al 10 % durante 20 minutos. Finalmente, se destiñeron los geles con una solución de ácido acético al 10 %. El peso molecular aparente se determinó utilizando un marcador preteñido de amplio espectro (10-250kDa), SDS-PAGE Standards (Precision Plus Protein™ Bio-Rad, 161-0318).

Para la preparación del zimograma, se utilizó *Micrococcus lisodeikticus* como sustrato y fue incorporado durante la copolimerización en una concentración del 0.2 % sobre el volumen total de gel de acrilamida-bisacrilamida. El gel se corrió bajo las mismas condiciones del SDS-PAGE y terminada la electroforesis los geles se

lavaron dos veces con agua destilada por 30 minutos. Posteriormente, se procedió a la renaturalización mediante inmersión en el amortiguador (100 mM Tris-HCl, pH 8.0 con 1% v/v Tritón X-100) e incubación a 37 °C por 16 horas con agitación suave. Transcurrido el tiempo se tiñen los geles con azul de metileno al 0.1 % y KOH al 0.001 % y finalmente se destiñeron hasta apreciar las zonas claras correspondientes a las bandas con actividad lítica.

8.8 Análisis bioinformático de bandas con actividad antimicrobiana

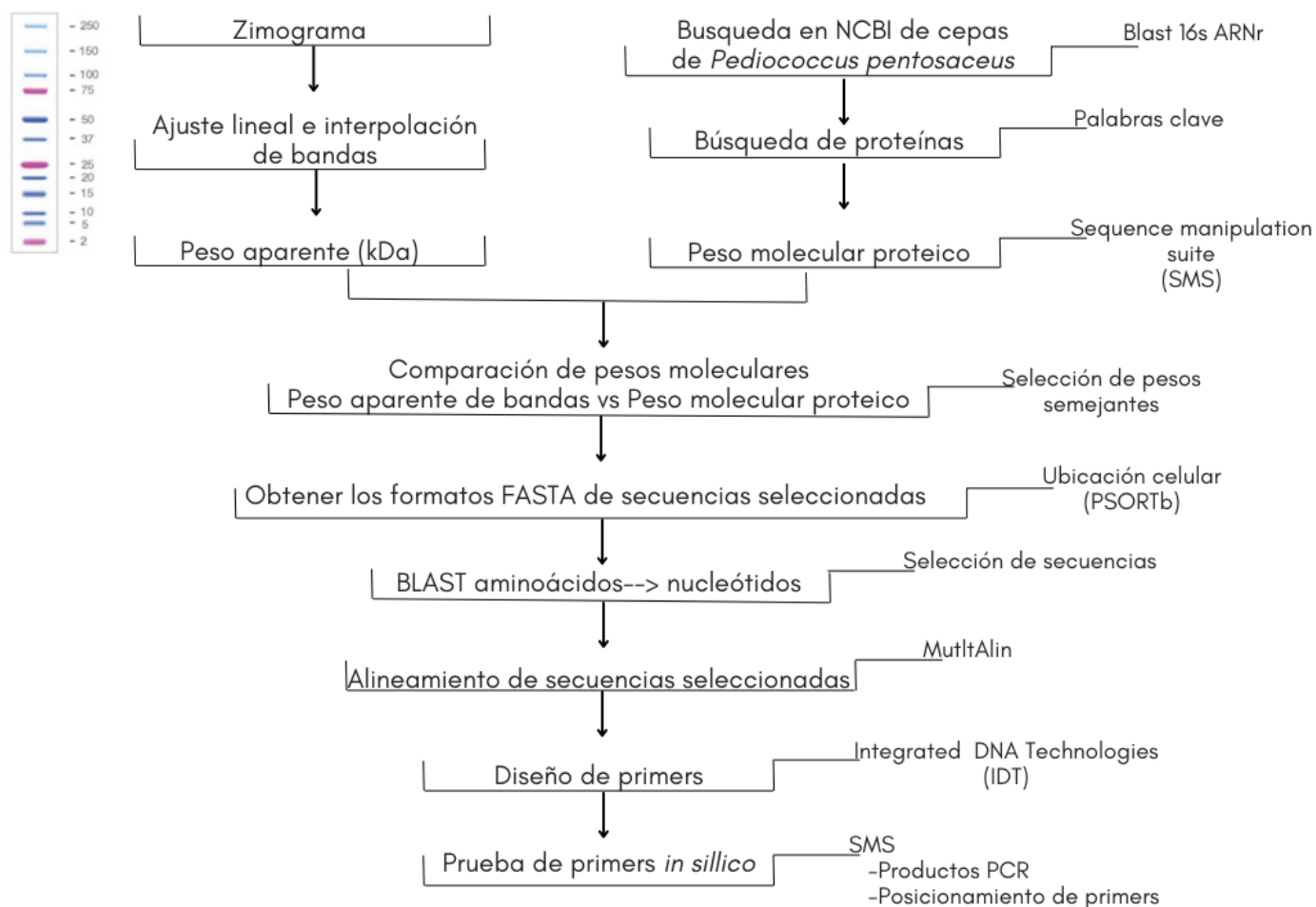


Figura 5. Metodología de análisis bioinformático.

El análisis bioinformático se realizó para aquellas bandas de proteínas con actividad antimicrobiana, empleando diferentes estrategias para la identificación teórica de las proteínas con actividad antimicrobiana, considerando en primera instancia el peso aparente de las bandas con actividad a partir de los geles de electroforesis y el zimograma (Shapiro et al., 1967, Weber et al., 1972). El peso molecular de las proteínas con actividad se obtuvo determinando la movilidad relativa (Rf) de cada banda con actividad y las correspondientes del marcador con la siguiente ecuación:

$$Rf = \frac{\text{distancia de migración de la proteína}}{\text{distancia de migración del frente del gel}}$$

Posteriormente, se graficó el logaritmo del peso molecular y el Rf de las proteínas del estándar para obtener la curva de calibración y la ecuación del ajuste lineal. Con la que se calculó el peso molecular aparente de las bandas de proteínas con actividad interpolando los valores del Rf de cada una.

Una vez que se obtuvo el peso molecular aparente se procedió a realizar una búsqueda de proteínas con peso similares en los genomas completos de *Pediococcus pentosaceus* reportados en las bases de datos del National Library of Medicine de NCBI, junto con las palabras clave: Peptidoglucano, N-acetilmuramidasa, N-acetilglucosaminidasa, Endopeptidasa y Carboxipeptidasa para su análisis como lo muestra la figura 5.

8.9 Diseño de primers

Una vez observadas las regiones de similitud en las secuencias de las proteínas de *Pediococcus pentosaceus* se llevó a cabo el diseño de los primers por grupos de proteínas de peso molecular similar con la herramienta PrimerQuest Tool de la plataforma INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, Inc (San Diego, CA, USA). Por último, se realizó una simulación de PCR de los primers diseñados con las secuencias de proteínas por peso molecular utilizando la herramienta PCRproducts y conocer el posicionamiento de los primers en las secuencias de nucleótidos con la herramienta Primer Map, ambas herramientas de la plataforma Sequence Manipulation Suite (SMS) (Anzaldi et al., 2012).

9 Resultados

9.1 Identificación de cepa

9.1.1 16s ARNr

La cepa 1101 se identificó por secuenciación del gen que codifica para el 16s ARNr; en la figura 6 muestra los geles de agarosa del ADN extraído el cual se utilizó posterior para la amplificación del gen 16S ARNr que fue purificado y enviado a secuenciar.

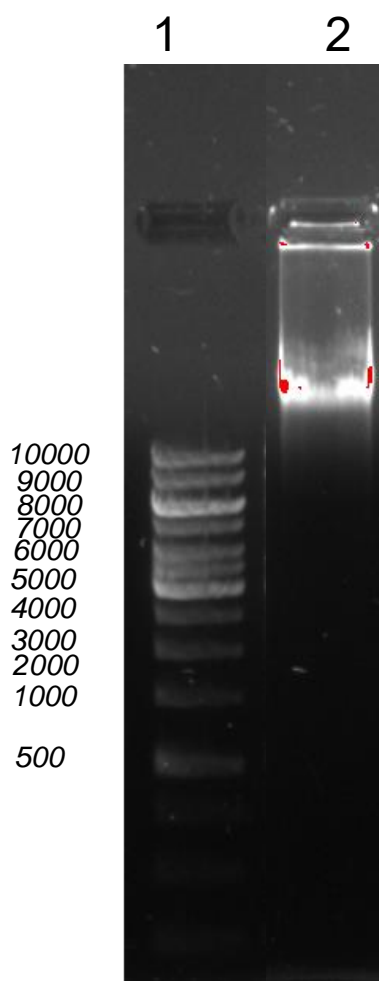


Figura 6. ADN total de la cepa en gel de agarosa al 0.8%.
Carril 1: Marcador de 10Kb (GeneRule, Thermo Scientific),
Carril 2: ADN extraído de la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101

En la figura 6 se muestra el gel de agarosa obtenido de la electroforesis del ADN total extraído de la cepa 1101. En el gel se muestra una banda por arriba de las

10Kb, que demuestra su integridad para proceder con la amplificación del gen que codifica para el ARN16s. La cantidad de ADN total fue de 1041 ng/ μ l medido en la placa Take3 y con el programa GEN5 versión 1.11. De la misma manera, se obtuvo la relación de absorbancia 260/230 que fue de 1.8, esta relación nos da un valor representativo en el cual indica si nuestro producto de ADN es puro o tiene algunos componentes de contaminación como pueden ser proteínas y compuestos fenólicos, los valores para cada uno de ellos son de 1.65 a 1.9 para compuestos puros y por debajo de ese rango se tiene un productos contaminada (Kumari et al., 2019), por lo que la muestra de ADN de *Pediococcus pentosaceus* 1101 entra en el rango de valores de producto puro.

La cepa 1101 fue aislada por Juárez Castelán (2019) de un chorizo tipo español, la cual fue identificada por Escobar Sánchez (2023) como una cepa de *Pediococcus pentosaceus* por secuencia parcial del gen 16S ARNr que fue depositado en GeneBank con número de acceso MZ265376., por lo que en este trabajo se obtiene el gen 16S ARNr de la cepa 1101 con la finalidad de corroborar el género y especie, purificando y secuenciando el gen.

En la figura 7A se muestra el producto de la PCR de amplificación del gen 16S ARNr obtenida con cebadores universales en un gel de agarosa al 0.8% aplicada a la muestra de ADN total de la cepa 1101, en la cual se observa en el carril 2 la integridad de la secuencia del 16s ARNr con un peso de aproximadamente de 1500 pb que concuerda con dichos cebadores, que, de acuerdo con lo reportado por Rosario & Mendoza (2004) es un peso correcto para una amplificación de este gen, por lo que se cortó, purifico y mando a secuenciar a Macro Gen Inc en Seul, Corea del Sur.

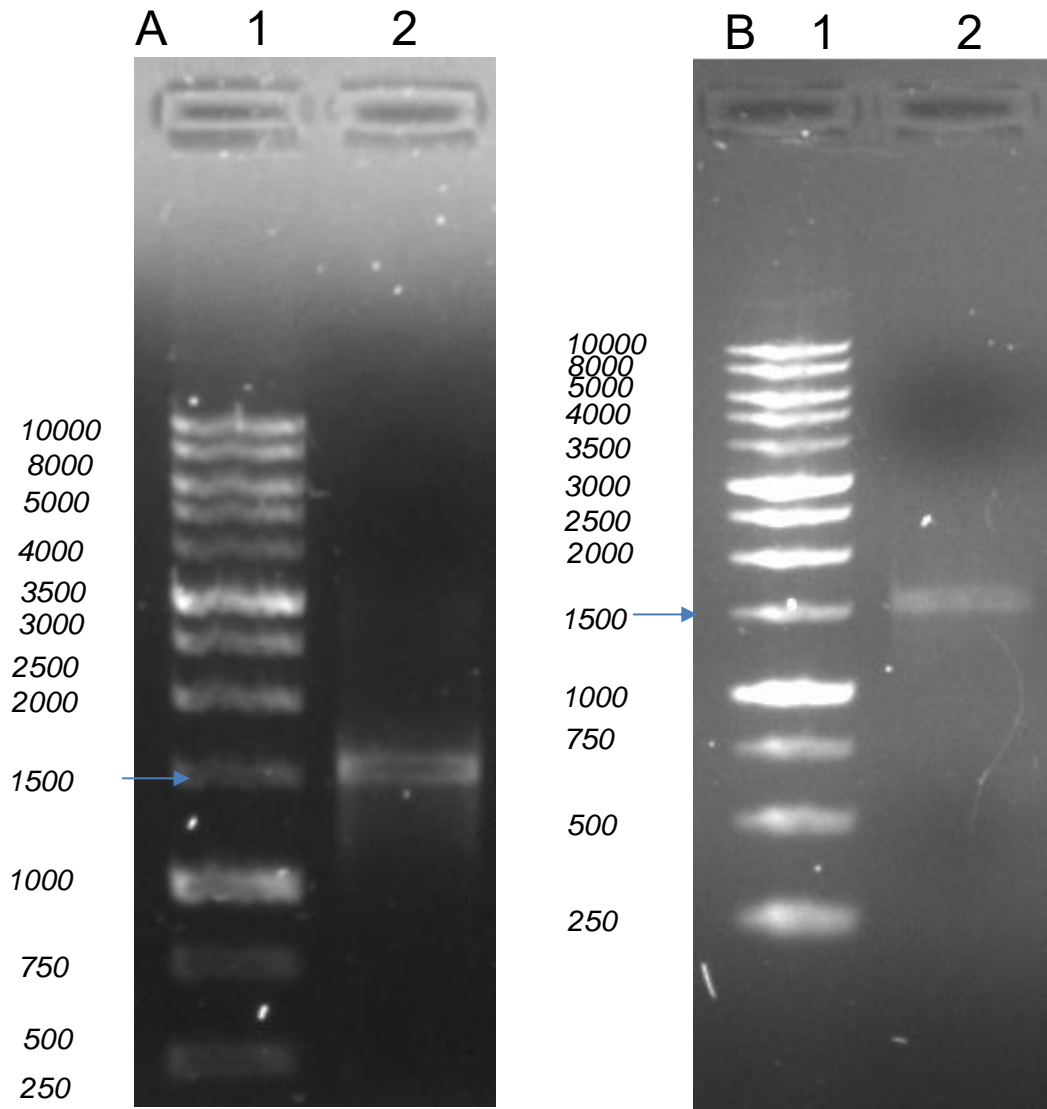


Figura 7. Productos de PCR en gel de agarosa al 0.8%.
 A) Carril 2: Producto de PCR del 16s ARNr.
 B) Carril 2: Producto de la purificación de PCR del gen 16s ARNr.
 Carril1 de la figura A y B: Marcador de 1kB (GeneRule, Thermo Scientific)

En el carril 2 de la figura 7B se observa el producto de PCR de la purificación de la amplificación del gen 16s ARNr, el cual tuvo una concentración de 16.63ng/ μ l medida de igual manera que la concentración del ADN total. Las secuencias obtenidas del gen 16s ARNr purificado para la cepa 1101 se analizaron en la base de datos de NCBI, obteniendo una similitud en porcentaje de identidad de 99% y un valor de expectancia cero con la cepa *Pediococcus pentosaceus* DSM20336 que se

muestran en la tabla 5, dando una identificación de género y especie (Wang et al., 2015) para esta cepa, nombrándola a partir de esta identificación como *Pediococcus pentosaceus* 1101

Tabla 5. Resultados de BLAST en la plataforma de NCBI para cepa 1101

Cepa	Descripción de BLAST	% cobertura	% de identidad
1101	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336 gen ARN ribosomal 16S, secuencia parcial	100	99

9.1.2 Espectrometría de masas

En la identificación por espectrometría de masas por medio del MALDI-TOF se realizaron en el laboratorio divisional de espectrometría de masas en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, la cual se realizó a partir colonias aislada en medio MRS sometidas a un tratamiento previo al análisis de proteínas mediante un comparativo de espectros, uno de referencia para la cepa en estudio y el espectro de la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101 obtenida en el análisis. Esta comparativa nos da diferencia en los picos de los iones de proteínas más abundantes en el espectro de masas, por lo que a través de las proteínas con más abundancia en la muestra y en la cepa de referencia podemos conocer el género y especie de la cepa de estudio.

Dicha comparación se realiza mediante la plataforma MBT Compass, la cual genera valores utilizando los picos de los iones de proteínas presentes con una ecuación logarítmica, que van de 0 a 3, los cuales cuantifican la similitud de la muestra con la base de datos en la plataforma MBT Compass, esta cuantificación está acompañada de índices de consistencia, A, B y C, que nos un parámetro en identificación de género y especie, para el índice A da identificación de género y especie, para el índice B nos da identificación de género y C no cumple requisitos

para identificar los picos de iones de proteínas de la muestra comparada con la base de datos.

El valor de puntuación que arroja el análisis está referido a la comparación que realiza la plataforma MBT Compass con su base de datos, como se observa en la tabla 6B las muestras por duplicado tiene una alta comparación con género y especie a *Pediococcus pentosaceus*, esto, visualizándose para la primera así como la segunda muestra respectivamente (D6 y D7) arrojando un índice de consistencia A y con un valor por arriba de 2.20 , por lo que el organismo identificado tiene una alta confianza, dicha confianza se reafirma en la tabla 6C en la cual se puede apreciar un resultado comparado con la base de datos de NCBI el cual se refiere al código taxonómico 1255 en la muestra por duplicado.

Tabla 6. Resultados para espectrometría de masas usando MALDI-TOF.

Gama de valores	Descripción	Símbolos	Color
2.00 - 3.00	Identificación de alta confianza	(+++)	verde
1.70 - 1.99	Identificación de baja confianza	(+)	amarillo
0.00 - 1.69	Sin identificación posible	(-)	rojo

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Organismo (mejor candidato)	Puntuación Valor	Organismo (segundo mejor candidato)	Puntuación Valor
D6 (+++)(A)	Act1 (standard)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2.29	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2.08
D7 (+++)(A)	Act2 (standard)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2.20	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2.03

Rango (Calidad)	Patrón concordante	Puntuación Valor	Código NCBI
1 (+++)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20206 DSM	2.19	1255
1 (+++)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20206 DSM	2.20	1255

A) Significado de puntuación- valores, color de identificación y símbolos.

B) Resultado de comparación de los picos de la muestra vs picos de base de datos.

C) Identificación con parámetro de calidad, valor de puntuación y código de cepa en NCBI

Realizando la búsqueda en la base de datos del código 1255 en el buscador taxonómico, da como referencia a 4 cepas de *Pediococcus pentosaceus* como se puede apreciar en la figura 8 por lo que se reafirma la identificación por el gen 16S ARNr, colocando como cepa identificada la de *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, que quedó como una de las cepas de referencia para su uso posterior en el análisis *in silico*. Cabe mencionar que la técnica de espectrometría de masas se ha reportado como una referente de identificación apoyado de otras técnicas convencionales como lo es el 16S ARNr (Foschi et al., 2017), y en su integración se tiene cerca de 97% de concordancia entre los resultados de las diferentes técnicas complementarias como lo son el gen 16S ARNr y MALDI-TOF, por otro lado Jang y Kim (2018), en su reporte sobre el uso de MALDI-TOF, mencionan que esta técnica tiene características robustas y fáciles de usar, y que el desarrollo de técnicas avanzadas de procesamiento y puntuación de datos han permitido una identificación y caracterización rápida y exitosa de microorganismos, permitiendo a los investigadores identificar de forma precisa y fiable los microorganismos objetivo.






Figura 8. Búsqueda taxonómica de código obtenido por espectrometría de masas MALDI-TOF.

9.2 Actividad antimicrobiana en fracciones del medio de cultivo

La actividad específica se evaluó en diferentes fracciones del medio de cultivo, debido a que Escobar (2019) reporta actividad antimicrobiana en células de *Pediococcus pentosaceus*. De acuerdo los datos observados en la tabla 7 de actividad antimicrobiana, la fracción que obtuvo mayor actividad fue la de ECI seguida de EC debido a la adición el inhibidor de proteasas disminuyendo la degradación de los compuestos de origen proteico en esta fracción (Woraprayote et al, 2016), dicha actividad antimicrobiana se puede presentar debido a que

posiblemente se tengan compuestos con actividad antimicrobiana de tipo bacteriocina, ya que se han reportado la presencia de este tipo de compuestos en los metabolitos extracelulares producidos por *Pediococcus pentosaceus* como lo mencionan Todorov y Dicks (2009), que encontraron la bacteriocina Pediocina PA-1 en un producto fermentado la cual tuvo actividad antimicrobiana contra bacterias ácido lácticas.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de diferentes fracciones del medio de cultivo de *Pediococcus pentosaceus*.

Fracción de medio de cultivo	Actividad específica ($\frac{\text{mm halo inhibición} \times \text{fd}}{\text{mg prot}}$)	Imagen
Células de <i>Pediococcus pentosaceus</i> (CPP)	336.4	
Extracto crudo (EC)	661.4	
Extracto con inhibidor de proteasas (ECI)	873.4	

Otro ejemplo de producción de bacteriocinas en el género *Pediococcus* spp. es el reportado por Gutiérrez et al., (2018), en donde comprobaron la producción de este tipo de metabolitos al variar los nutrientes en el medio de cultivo, observando su aumento en la actividad antimicrobiana, resultados similares los mencionan Jang et

al., (2015) en el que observaron efecto contra *Listeria monocytogenes* y contra algunas BAL como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei*.

Cabe mencionar que la especie *Pediococcus pentosaceus* puede presentar baja producción de bacteriocinas ya que Diep et al., (2006) estudiaron la cepa *Pediococcus pentosaceus* ATCC25745, encontrando que dicha cepa no presenta dos genes para el transporte transmembranal y regulación de su actividad, dichos genes son necesarios para la producción de bacteriocina ocasionando la baja producción de este compuesto en comparación con otros géneros de *Pediococcus* spp.

La fracción de células de *Pediococcus pentosaceus* presentó menor actividad antimicrobiana en comparación con el extracto crudo, sin embargo, de acuerdo al reporte presentado por Dicks & Endo (2014) menciona, que el género *Pediococcus* spp. ha presentado proteínas transmembranales con actividad antimicrobiana de PGH, este tipo de proteínas con actividad antimicrobiana tiene un amplio espectro de inhibición de crecimiento en microorganismos patógenos en alimentos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* (Escobar, 2019). Adicionalmente, García et al., (2011) identificaron una proteína con actividad lítica de PGH en el género *Pediococcus* spp., específicamente de N-acetilmuramidasa, la cual tuvo un efecto inhibitorio de crecimiento contra *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*. Otros reportes mencionan actividad antimicrobiana contra microorganismos alterantes en alimentos, por lo que el espectro de inhibición de las PGH es más amplio en comparación de las bacteriocinas.

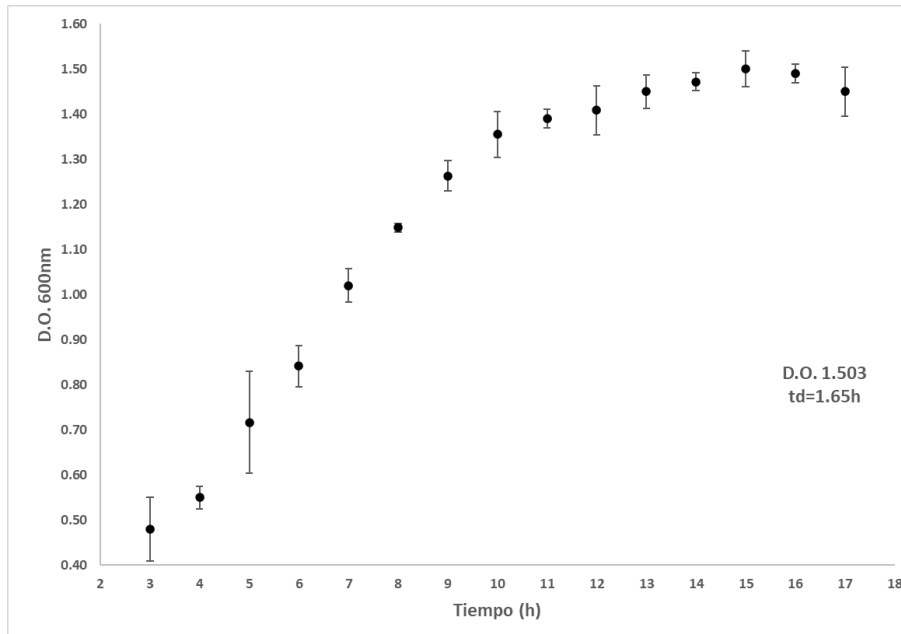
Debido a lo anterior es de interés conocer los compuestos de origen proteico con posible actividad de peptidoglucano hidrolasa que pudiesen estar en las diferentes fracciones de la célula, por lo que se continúa con el estudio de las células de la cepa *Pediococcus pentosaceus* 1101 en sus diferentes fracciones, sumando que ya existen varios reportes sobre los compuestos que pudiesen estar presente en la fracción del extracto crudo.

9.3 Cinética de crecimiento

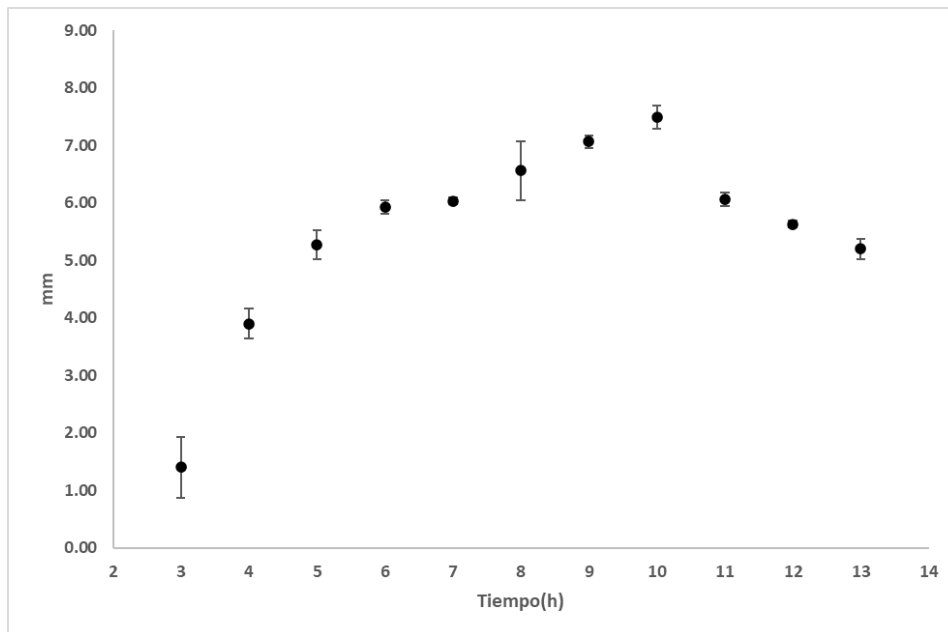
La cinética de crecimiento se llevó a cabo midiendo la densidad óptica a 600 nm, observando un crecimiento microbiano de la fase de adaptación, exponencial y estacionaria desde la hora 3 hasta la hora 18 (Gráfica 1), dato comparable con lo que reporta Escobar (2019) en donde se tiene un alza de la densidad óptica (D.O) al término de la fase exponencial, en la que se alcanza una D.O. máxima de 1.503, una tasa de crecimiento de $0.42h^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 1.65h, datos obtenidos al realizar un ajuste de los datos usando el modelo sigmoide en el programa Statistica V12.

Al mismo tiempo de la cinética se verificó la actividad antimicrobiana en cada medición de absorbancia obteniendo el concentrado de células como lo menciona el apartado 8.2.1 resuspendidas en BFS, dicha actividad se llevó a cabo por difusión en agar midiendo los halos de inhibición.

El gráfico 2 muestra la variación que se presentó a lo largo de la cinética de crecimiento con respecto a la actividad antimicrobiana medida en mm de halos de inhibición, se observa un máximo de inhibición a la hora 10, punto que coincide con los reportes de Gutiérrez et al., (2018) donde menciona una mayor actividad antimicrobiana al finalizar la fase exponencial. El máximo de inhibición presentó un halo de 0.75 mm de inhibición de acuerdo con la tabla 22, por lo que se tomará como referencia este punto para obtener la CMI de esta bacteria ácido láctica.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento por triplicado *Pediococcus pentosaceus* 1101.



Gráfica 2. Actividad inhibitoria por triplicado de las células de *Pediococcus pentosaceus* contra *Listeria Innocua*.

Se observa que el crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* presenta cambios en la actividad antimicrobiana medida en halos de inhibición en la fracción de las

células resuspendidas en BFS, confirmado por el análisis de varianza mostrando diferencia significativa ($\alpha=0.05$) (ver anexo 2, tabla 20), se nota un aumento de la actividad antimicrobiana hasta la hora 10, la cual es diferente de acuerdo con el análisis entre grupos (anexo 2, tabla 21), teniendo menor actividad de la hora 1 a 5 y posterior a la hora 12, por lo que la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana se encuentra en la terminación de la fase exponencial (Bugg & Walsh, 1992., Anastasiadou et al., 2008).

9.4 Concentración mínima inhibitoria

De acuerdo con los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de la cinética de crecimiento, se consideró la hora 10 para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es el punto donde se tiene un pico máximo de inhibición, aunado a que es la hora que presenta más diferencias con respecto a las demás horas, por lo que se toma como referencia para obtener la CMI del compuesto antimicrobianos en las células resuspendidas en BFS.

Del concentrado de células resuspendidas en BFS, se realizan tres diluciones consecutivas, la cepa objetivo utilizada para esta determinación de la actividad antimicrobiana fue *Listeria innocua* inoculada en medio CGB utilizando la técnica de difusión en agar. Los valores de las concentraciones de proteína, así como los mm de halos de inhibición se observa en el anexo 3 tabla 24.

Los cálculos se realizaron utilizando las concentraciones de proteína presente, así como los halos de inhibición menores a 1.5 mm en cada dilución, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como en la que el microorganismo ya no es capaz de crecer en el medio de cultivo, la dilución que presento esta característica fue de 1:20, por lo que estos valores se retomaron para la obtención de la CMI de la cepa 1101 contra *Listeria innocua* que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. CMI en el concentrado celular resuspendido en BFS a la hora máxima de actividad antimicrobiana.

CMI	Actividad específica.
$\frac{mg\ proteína}{ml}$	$\left(\frac{mm\ halo\ inhibición}{mg\ prot}\right)$
0.7186	9.1

10 Evaluación de la actividad antimicrobiana en las fracciones de la célula de *Pediococcus pentosaceus* 1101.

10.1 Compuestos adheridos a la pared celular

La técnica de adsorción y desorción dependiente de pH se realizó a las células suspendidas en BFS con la finalidad de evaluar la actividad antimicrobiana por efecto de las bacteriocinas. Se ha reportado la presencia de estos compuestos en el término de la fase exponencial presentando adherencia a la pared celular (Shin et al., 2008; Dimov et al., 2010), un ejemplo de ello es como lo reporta Gutiérrez et al. (2018), aislaron e identificaron 4 cepas de *Pediococcus pentosaceus* (63,145,146 y 147) de un producto fermentado, de las cuales presentan sensibilidad a enzimas proteolíticas y estabilidad al tratamiento con lipasa, catalasa y α -amilasa. Los autores realizaron cinética de crecimiento mostrando una producción de bacteriocina a 37 °C durante el final de la fase de crecimiento exponencial (25,600 AU / mL) y la producción fue estable durante 24 h de incubación. Por lo antes mencionado, se evaluó a la hora 10 de crecimiento derivado de la cinética de crecimiento antes descrita para ver los efectos de compuestos de este tipo con la técnica de adsorción y desorción.

En la tabla 9 se muestran los valores obtenidos del efecto antimicrobiano del concentrado obtenido de la técnica de adsorción y desorción aplicado en la técnica de difusión en agar, en la que se muestra nula actividad por parte de los compuestos iónicos adheridos a la pared celular, sucediendo todo lo contrario reportado por Dimov et al (2010) que menciona la producción de compuestos antimicrobianos al término de la fase exponencial, sin embargo, estudios indican la presencia de

compuesto de tipo PGH's presente en la parte transmembranal o intracelular que inician su actividad en la fase exponencial tardía y estacionaria ocasionando lisis de membrana liberando estos compuestos (Vermassen, et al., 2019).

Tabla 9. Resultados de la técnica de absorción y desorción de los compuestos en la pared celular.

600 ml de Medio MRS, 37°C, 10 hrs (Triplicado).	Concentración de proteína en pozo (mg/ml)	mm de halo de inhibición
Volumen de concentrado final 1.5 ml	0.42	Sin halo

10.2 Ruptura Celular

La ruptura celular se verificó cualitativamente mediante un sembrado en placa en medio MRS colocando 100µL de la fracción de restos celulares a una dilución 10^{-3} en solución amortiguadora de fosfatos.

La figura 9a muestra las células viables antes de la ruptura celular en el que se obtuvieron colonias incontables en el medio de cultivo, mientras que el concentrado de la ruptura celular (Figura 9b) mostró una disminución de colonias en comparación a la figura 9^a, obteniendo un conteo de 1.9×10^6 UFC/ml, corroborando de esta manera que los 25 ciclos al que se someten las células de *Pedicoccus pentosaceus* en el disruptor mecánico reduce el número de células viables en el concentrado celular.

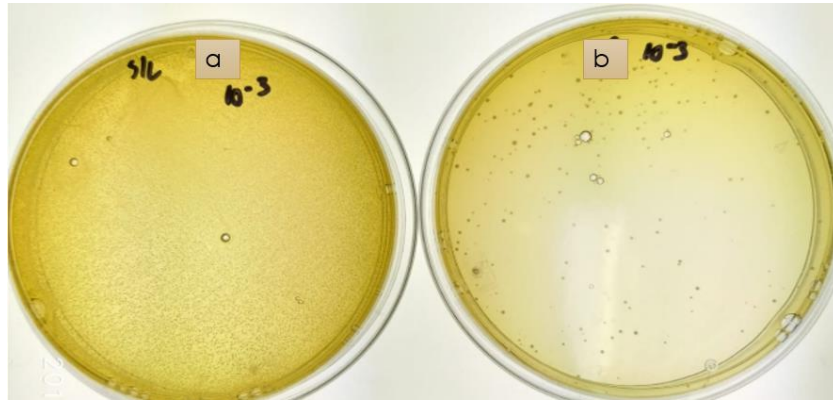
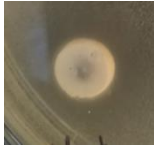





Figura 9. Siembra en placa de la lisis celular de la cepa *Pediococcus pentosaceus* 1101.
 a.-Concentrado de células sin ruptura celular
 b.-Concentrado de células con ruptura celular.

Tabla 10. Actividad antimicrobiana en fracción de restos celulares.

	Difusión en agar		Sensibilidad en discos	
	Actividad específica (mm halo de inhibición/mg proteína)	Imagen	Actividad específica (mm halo de inhibición/mg proteína)	Imagen
Fracción de ruptura celular				
Fracción Restos celulares (FRC)	456.9		1522.8	
Fracción soluble intracelular (FSI)	120.5		451.80	

Posterior a la ruptura celular, se verifica la actividad antimicrobiana en la fracción de restos celulares y fracción soluble del citosol por la técnica en difusión en agar y

sensibilidad por discos. En la fracción de restos celulares presenta mayor actividad antimicrobiana por ambas técnicas, sin embargo, aún se tenía células viables que pudieran estar participando en el descenso del pH del medio de cultivo aumentando la actividad antimicrobiana de las posibles proteínas presentes en los restos celulares, ya que como se ha mencionado con anterioridad, de acuerdo con los reportes de Dicks & Endo, (2014), se pueden tener proteínas transmembranales del tipo de las PGH.

Respecto a la fracción soluble intracelular se obtuvo menor actividad antimicrobiana la cual puede estar provocada por proteínas intracelulares, reportes han mencionado dicha actividad inhibiendo el crecimiento celular de *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus cereus* y *Pediococcus acidilactici* (Gandhi et al., 2020), estas proteínas intracelulares son participes en la lisis celular ligadas al crecimiento bacteriano (Zamora., 2017, Vermassen et al., 2019) que han sido detectadas y caracterizadas en bacterias como *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus sakei* y *Staphylococcus aureus*, esta última la más estudiada y referenciada a este tipo de enzimas (Trotonda et al., 2009).

Algunos autores han mencionado la presencia de enzimas del tipo autolíticas en la especie de *Pediococcus* spp. como Mora et al, (2003) donde muestra una correlación de sensibilidad a la pared celular con mutanolisina y enzimas autolíticas de *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici*, así mismo García et al., (2019) menciona que proteínas intracelulares de algunas bacterias ácido lácticas como *L. casei*, *L. plantarum*, *L. paracasei* y *P. acidilactici* muestran actividad de peptidoglucano hidrolasas por lo que existe evidencia que las enzimas participante en la autólisis pueden tener un efecto con actividad antimicrobiana, cabe mencionar que *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici* están estrechamente relacionadas genéticamente (Hammes & Hertel, 2006; Singla et al., 2018), por lo que se podría encontrar actividad antimicrobiana por enzimas autolíticas en la fracción intracelular de la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101 derivado de los resultados anteriores en la técnica de difusión en agar y sensibilidad por discos.

11 Perfil de proteínas por SDS-Tris-tricina y Zimograma

11.1 Condición óptima de crecimiento

De los resultados de la actividad antimicrobiana en las pruebas de difusión en agar y sensibilidad en discos, se llevó a cabo una concentración de proteínas por el método descrito por Carrasco et al., (2016) a la fracción soluble del citosol, esto para asegurar la actividad por parte de estas proteínas intracelulares presentes en esta fracción, posterior a la concentración de proteínas, la suspensión proteica se sometió a un electroforesis en gel de agarosa para observar el perfil proteico, así mismo se probó su actividad antimicrobiana mediante zimograma utilizando *Micrococcus lysodeikticus* como célula objetivo como lo describe Hardt et al., (2003).

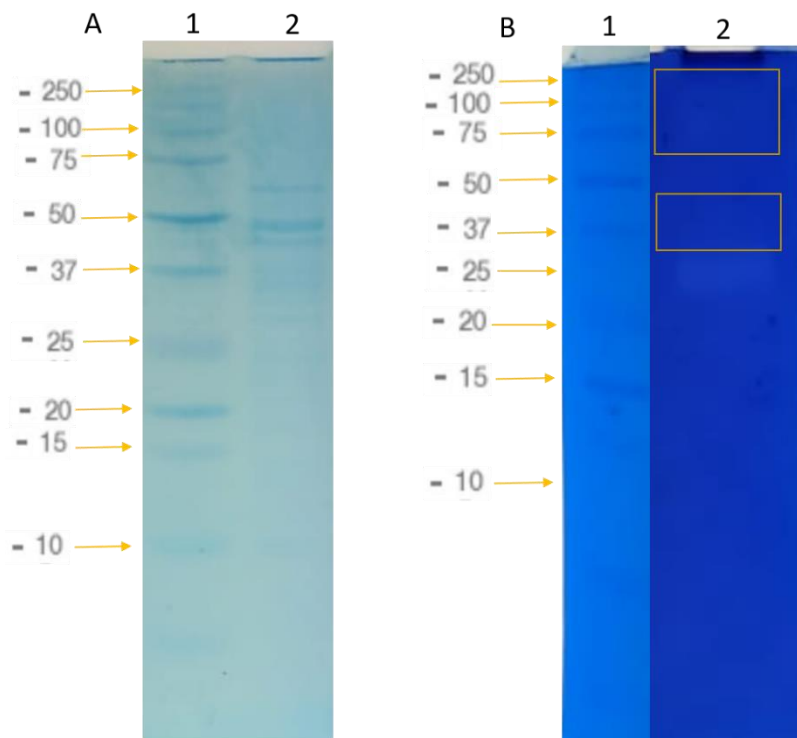


Figura 10. Perfil proteico y zimograma, a temperatura de incubación de 37°C.

A) Carril 2.- Perfil proteico del concentrado de proteínas proveniente de la fracción soluble del citosol,

B) Carril 2.- Bandas de zimograma con actividad antimicrobiana del concentrado de proteínas provenientes de la fracción soluble del citosol.

Carril 1 de figura A y B Marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa.
Las bandas con actividad antimicrobiana se resaltan en cuadro amarillo.

En la Figura 10A, correspondiente al perfil proteico podemos observar bandas que van desde los 10 kDa hasta los 250 kDa, sin embargo, no todas las proteínas presentes en ese perfil proteico presentan actividad antimicrobiana, eso lo podemos visualizar en la imagen 10B, en la cual se observan bandas con un peso cercano a los 25 kDa y otras más por arriba de los 50 kDa hasta los 100 kDa aproximadamente. Con este perfil de actividad antimicrobiana obtenida por zimograma se deduce la presencia de proteínas intracelulares participantes con dicha característica, por otro lado, recordemos que se han encontrado enzimas con actividad autolítica, que también presentan actividad antimicrobiana contra la cepa *L. monocytogenes* MACa1 (Mora *et al.*, 2003), el mismo autor reporta actividad contra microorganismos que conviven con *Pediococcus pentosaceus* en diferentes procesos de fermentación, inhibiendo a microorganismos que pueden causar alteraciones en el sabor y olor característico de dichos procesos fermentativos (Taylor, 2015).

Autores han reportado presencia de proteínas intracelulares con efecto antimicrobiano al realizar modificaciones al medio de cultivo, variando los porcentajes de las fuentes de nitrógeno y carbono ocasionando un tipo de estrés al microorganismo, lo que conlleva a una mayor producción de este tipo de proteínas con actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos y alterantes en alimentos (De Azevedo *et al.*, 2018, Hurtado., 2019, Leisner *et al.*, 2007) por lo que se someterá a diferentes condiciones de crecimiento a la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101 para observar si existen diferencias en cuanto la actividad antimicrobiana visualizada en un zimograma utilizando como sustrato a *Micrococcus lysodeiticus*.

11.2 Variación en la condición de crecimiento

De acuerdo con los resultados mostrados en el apartado 10.1, se sometió a la cepa *Pediococcus pentosaceus* 1101 a diferentes condiciones de crecimiento mencionadas en la tabla 4, exponiendo a la cepa a condiciones de estrés para

observar la expresión que pudiesen tener las proteínas intracelulares y su impacto en la actividad antimicrobiana.

A partir de las diferentes condiciones a la que se sometió a la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101, se realizó la extracción de proteínas intracelulares como se menciona en el numeral 8.2.3., para posteriormente realizar un perfil de proteínas a la fracción llamada proteínas solubles del citosol mediante SDS-tris-tricina, de los cuales se observan en la figura 11.

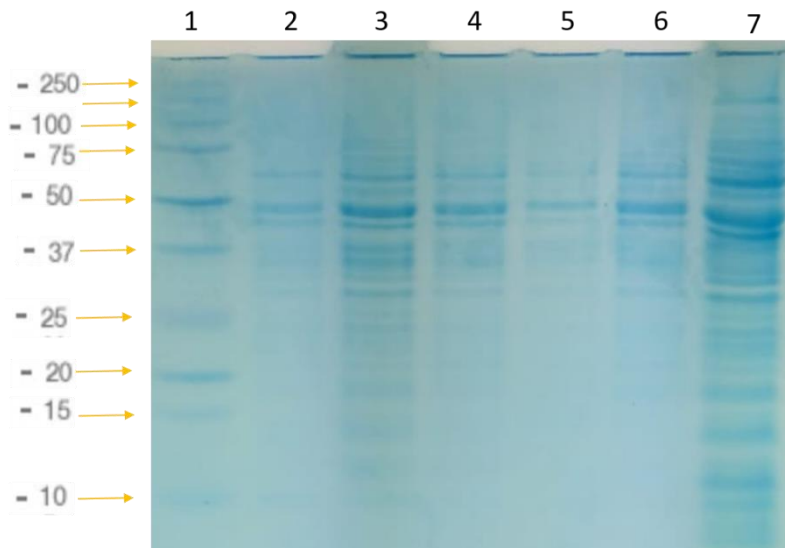


Figura 11. Perfil proteico de la fracción precipitación de proteínas obtenidas de diferentes condiciones de crecimiento.

Carril 1- Marcador de peso molecular 10 a 250kDa, Carril 2.- 30°C, Carril 3.-44°C, Carril 4.- 1%Extracto de levadura, Carril 5.- pH 5, Carril 6.- pH 6, Carril 7.- Condición óptima de crecimiento.

En los carriles 2 al 6 de la figura 11 se presentan la fracción de proteínas solubles del citosol en las diferentes condiciones de crecimiento a la que se sometió la cepa *Pediococcus pentosaceus* 1101, mientras que el carril 7 (figura 11) se observan la fracción soluble intracelular a la condición óptima de crecimiento (37°C, pH 7, medio MRS). En el carril 7 se ve un bandeo más abundante e intenso en comparación a los demás carriles, esto puede ser por la modificación de las condiciones de crecimiento como se ha reportado que algunas proteínas se expresan o dejan de expresarse cuando el microorganismo entra en estrés Respecto a la condición de

temperatura de 44°C se observa mayor bandeo seguida por la adición de extracto de levadura al 1%, esto se relaciona con los reportes de Shin et al., (2007), De Azevedo et al., (2018), los cuales mencionan que la expresión de proteínas varía de acuerdo con las condiciones de temperatura, pH y exposición a fuentes de nitrógeno como lo es el extracto de levadura en el género *Pediococcus spp.*

11.2.1 Zimograma

El precipitado de proteínas de cada condición de crecimiento se colocó en un gel SDS-Tris-tricina la cual se emplea para separar las proteínas de peso molecular por debajo de los 80 kDa, montado con la técnica de electroforesis, esto para poder separar las proteínas que se visualizaron en el apartado 11.1, en el que se observan diferentes bandas entre los 10 kDa hasta los 150 kDa en condiciones óptimas de crecimiento, esto con la finalidad de visualizar de mejor manera el impacto que tiene sobre las bandas las diferentes condiciones de crecimiento.

En la figura 12 se observa la actividad antimicrobiana del concentrado de proteínas proveniente de la lisis celular a diferentes condiciones. La primera banda que se observa en orden de menor a mayor peso molecular es una de 15 kDa en todas las condiciones de crecimiento, posterior se tiene dos bandas cercanas la marca de los 37 kDa seguidas de dos bandas más, una a los 50 kDa y otra a los 75 kDa en condición de 44°C, estas dos últimas bandas también se visualizan en la condición de 1% de extracto de levadura. En la condición optima de crecimiento se tienen diferentes bandas que van de los 15 kDa hasta los 100 kDa siendo amplias ocasionando que no se puedan distinguir una de otra como sucedió en las condiciones de 44°C y 1% de extracto de levadura. Con respecto a las condiciones de pH no se observa banda alguna con actividad antimicrobiana, por lo que el descenso de pH no favorece la producción de este tipo de proteínas con actividad antimicrobiana. Todos los pesos antes mencionados se observan de manera visual, por lo que más adelante se calcula el peso aparente de cada una de ellas.

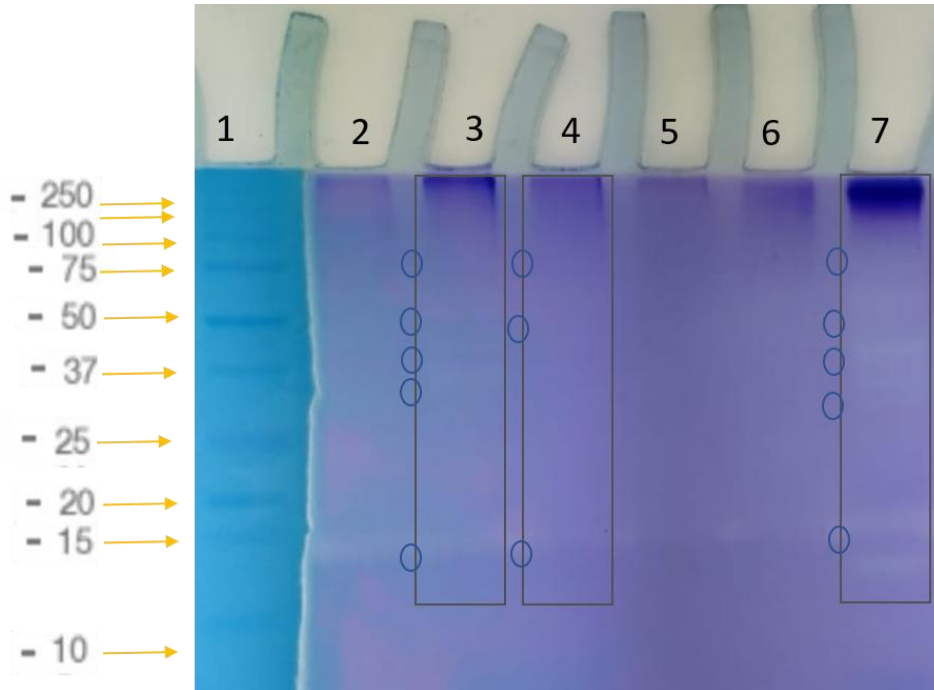


Figura 12. Zimograma de la fracción precipitación de proteínas obtenidas a diferentes condiciones de crecimiento.

Carril 1- Marcador de 10 a 250kDa, Carril 2.- 30°C, Carril 3.-44°C, Carril 4.- 1%Extracto de levadura, Carril 5.- pH 5, Carril 6.- pH 6, Carril 7. 37°C.

Las bandas visualizadas en zimograma están marcadas con círculos azules en las condiciones de crecimiento.

Cabe mencionar que este perfil en zimograma del carril número 3 y 4 es muy similar a lo reportado por Mora et al. (2003), donde muestra bandas que van desde los 40 kDa hasta los 116 kDa las cuales tienen actividad antimicrobiana visualizada en un zimograma usando a *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato, esta actividad se observó después de una renaturalización de 13hrs, mostrando las bandas antes mencionadas, sin embargo, este trabajo también demuestra una correlación que tienen las enzimas intracelulares con la actividad de mutanolisina, proteína que tiene características de una peptidoglucano hidrolasa, por lo que de acuerdo a los resultados anteriores de la actividad de la cepa *Pediococcus pentosaceus* 1101, se tiene la posibilidad de que las enzimas intracelulares puedan tener doble función, la primera de ellas es la de participar en la lisis celular dentro del ciclo de la bacteria

en los procesos fermentativos, y la segunda como inhibidores de microorganismos tanto patógenos como alterantes en alimentos.

Estas actividades antimicrobianas se han demostrado en varios estudios, uno de ellos y tomado como primera referencia es lo que reporta Escobar (2022) en su análisis de actividad antimicrobiana de proteínas intracelulares de la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101 en el que menciona bandas de actividad antimicrobiana con un peso de los 10 a 250 kDa, perfil de actividad que se vio afectado por condiciones de pH 2, 3 y 0.5 % de sales biliares adicionadas al medio (condiciones gastrointestinales) en los que las bandas disminuyen su intensidad excepto una con un peso de 29 kDa mencionando que la actividad fue identificada por análisis proteómico como N-acetilmuramoil-L-alalina- amidas, estas enzimas líticas son miembros del sistema bacteriano y llevan un péptido señal en su N-terminal que permite su transporte a través de la membrana citoplasmática.

Continuando con el reporte Mora *et al.* (2003) demuestra actividad antimicrobiana contra células de *Lactobacillus Helveticus* y *Lactobacillus delbruecki subsp. Bulgaricus* observándose bandas que van de los 30 a los 110 kDa, así mismo usaron células de *Listeria monocytogenes*, las cuales obtuvieron bandas líticas adicionales a las anteriores con un peso molecular aproximado de 25 a 35 kDa, todas estas bandas muy similar a las obtenidas en este trabajo; dicha actividad la explican suponiendo que las enzimas líticas responsables pueden ser de dos tipos, la primera de ella del tipo peptidasas y una segunda con actividad N-acetil-muramidasa; cerrando su trabajo mencionan que las autolisinas con actividad de peptidoglucano hidrolasas pueden tener un efecto potencial en la comunidad bacteriana mixta, en procesos de bioconservación en diferentes productos derivados de la carne, lácteos y vegetales.

Esta misma información lo corrobora Gandhi *et al.*, (2020), en el que caracterizaron proteínas intracelulares del género *Pediococcus* spp., mostrando actividad antimicrobiana usando zimograma con el mismo sustrato usado en este trabajo, arrojando un espectro de inhibición cerca de los 11, 15, 23 y 35 kDa, las dos últimas

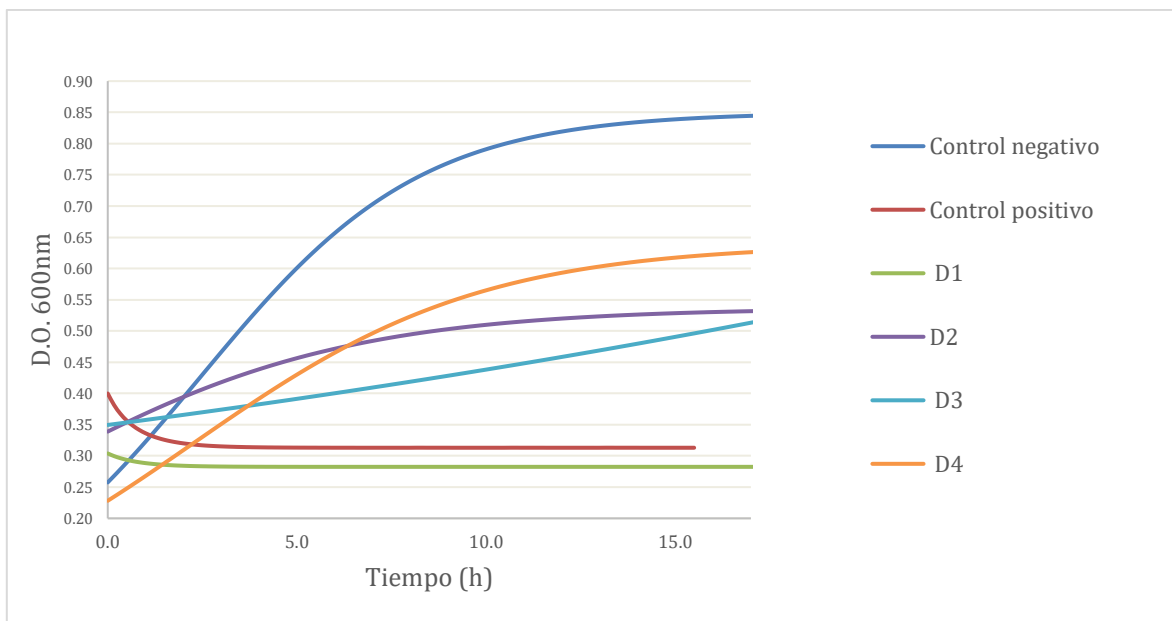
con mayor actividad lítica; en este mismo trabajo se llevó a cabo una prueba de autólisis con el concentrado de proteínas usado en el zimograma, obteniendo una autólisis del 30% para *P. acidilactici*.

Recordemos que *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* tienen una estrecha relación filogenética, Poonam y col., (2019) realizaron una caracterización secuencial del genoma de *Pediococcus acidilactici* y la comparó con diferentes bacterias ácido lácticas, obteniendo una similitud con la proteína ribosomal con diferentes cepas de *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, esta última en específico de la cepa ATCC 25745, la cual tiene relación de acuerdo con la identificación por 16S ARNr y espectrometría usadas en este trabajo para la cepa en estudio.

11.2.2 Efecto de la actividad antimicrobiana

Se observó el efecto inhibitorio de las proteínas obtenidas por precipitación utilizando *Listeria innocua* como célula objetivo a una densidad óptica de 600 nm, obteniendo lecturas durante 20 h como lo describe el apartado 8.3. Los resultados obtenidos indican un efecto bacteriostático, como lo menciona Paredes & Roca (2004) este efecto se define cuando un agente antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano, manteniendo al microorganismo viable, de forma que, cuando se suspende el agente antimicrobiano puede volver a multiplicarse manteniéndola en la fase estacionaria (Pankey & Sabath, 2004).

El efecto bacteriostático de las proteínas intracelulares de *Pediococcus pentosaceus* 1101 se puede observar en la gráfica 3. en la cual hay una disminución de la densidad óptica con respecto al control positivo (C+) y manteniendo a *Listeria innocua* en su fase estacionaria en D2, D3 Y D4, este gráfico se obtuvo a partir de las lecturas en los diferentes tiempos con un ajuste sigmoide, obteniendo la densidad óptica máxima alcanzada en cada una de las diluciones probadas (ver tabla 11).



Gráfica 3. Efecto bacteriostático de proteínas intracelulares.

Tabla 11. Diluciones para observar el efecto de las proteínas intracelulares.

	Proteína (µg/ml)	Densidad óptica máxima (600nm)	% disminución de la D.O
Control negativo (C-)	----	0.850	0%
Dilución 1 (D1)	10.65	----	----
Dilución 2 (D2)	1.065	0.515	40
Dilución 3 (D3)	0.1065	0.537	37
Dilución 4 (D4)	0.01065	0.639	25

La densidad óptica máxima alcanzada de *Listeria innocua* fue de 0.850, la cual fue disminuyendo al ser incubada con diferentes concentraciones de proteínas, la dilución D2 alcanzó una disminución del 40% con respecto al control negativo, cabe mencionar que este fue una primera aproximación para conocer la concentración mínima inhibitoria 50 (CMI50), por lo que valores de concentración de proteína cercanos en la D2 nos da un indicativo de poder obtener dicha concentración, por definición la CMI50 es la concentración necesaria para disminuir una población bacteriana en un 50% después de 24 horas de incubación (Horna et al., 2005). Es de interés identificar las concentraciones antes mencionadas ya que no se tiene

reporte de este tipo de proteínas con actividad antimicrobiana de efecto bacteriostático por bacterias ácido lácticas.

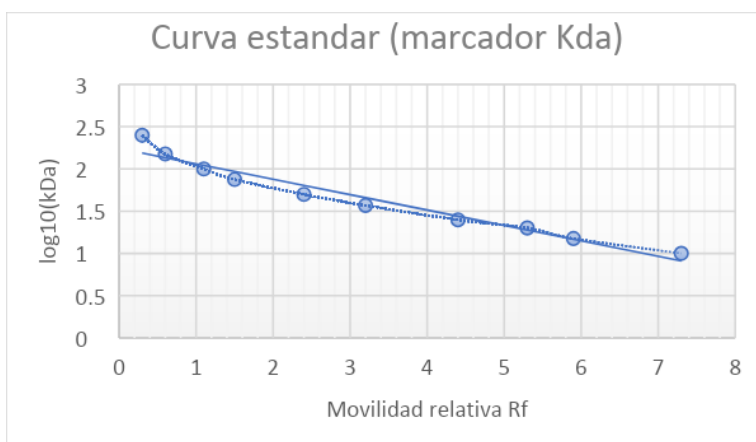
12 Análisis Bioinformático

12.1 Determinación del peso molecular aparente

A las bandas observadas y mencionadas en el numeral 11.2.1 correspondientes a las proteínas intracelulares de la condición de crecimiento de 44°C (Figura 12, carril 3) se midió su avance de migración en centímetros, o movilidad relativa de acuerdo con Neville (1971), las cuales tuvieron actividad antimicrobiana contra *Micrococcus lisodeycticus* para la determinación de su peso molecular aparente con una curva de calibración.

La curva se realizó con los datos obtenidos del recorrido del marcador preteñido y el peso de cada uno (cm, log(kDa)), para posteriormente obtener la ecuación del ajuste lineal e interpolar los pesos moleculares de las bandas problema (Gráfica 4).

Los pesos aparentes de las bandas problema se interpolaron con la ecuación de ajuste lineal, las cuales se muestran en la tabla 12 junto con la movilidad relativa (Rf) en el gel y el código que se colocó a cada banda problema provenientes del Zimograma (Figura 12, carril 4).



Gráfica 4. Ajuste lineal para interpolación de las bandas problema.

Tabla 12. Interpolación de bandas problema mostrando los centímetros recorridos y sus pesos aparentes.

Interpolación		
Bandas problema (cm)	Rf Movilidad relativa (cm)	Peso aparente kDa
a	1.25	103.42
b	2.15	70.89
c	2.85	52.84
d	3.35	42.83
e	6	14.08

12.2 Búsqueda de proteínas

Se seleccionaron las cepas de *Pediococcus pentosaceus* de acuerdo con la identificación previa, tomando como referencia el genoma completo de la cepa 1101 el cual fue secuenciado en el trabajo doctoral de Escobar (2022) en el laboratorio W207 de la UAM-I con número de acceso a GeneBank JAOAND000000000, además se seleccionaron cepas dentro del banco de NCBI las cuales tienen similitud con la secuencia de la cepa 1101; cepa ATCC25745, SL001, y GDIAS001. En estas cepas de genoma completo se hizo la búsqueda utilizando las palabras claves referentes a peptidoglucano hidrolasas (Peptidoglucano, N-acetilmuramidasa, N-acetylglucosaminidasa, Endopeptidasa, Carboxypeptidasa) ya que como lo menciona Mora et al., (2003) este tipo de proteínas son responsables de actividad autolítica como actividad antimicrobiana con enzimas de tipo peptidasas, de los cuales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 13. Cepas con genomas cerrados buscados en la base de datos de NCBI.

CEPA	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	ID GEN BANK	PESO MOLECULAR EN BASE DE DATOS KDA	
UAM 1101	Oligoendopeptidasa	WP_11515504 8.1	68.30	
	Proteína de la familia de las Peptidasas S66	WP_11515511 6.1	40.54	
	Metal-endopeptidase de la familia ImmA/IrrE	WP_06074332 9.1	15.89	
ATCC25745	Peptidoglucano específico de división celular	ABJ68209.1	44.44	
	Peptidoglucano-N-acetilmuramato acetiltransferasa	O- ABJ68761.1	73.17	
	Peptidasa procesadora de bacteriocinas	ABJ67196.1	81.54	
	Lizozima M1(1,4-beta-N-acetilmuramidasa)	ABJ67868.1	48.19	
	Lizozima M1(1,4-beta-N-acetilmuramidasa)	ABJ68041.1	42.58	
	Nuetral endopeptidasa	ABJ67399.1	71.98	
	Amidasa/carboxipeptidasa metal-dependente	ABJ67241.1	42.09	
	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa	ABJ68736.1	45.93	
	Proteína que contiene dominio de unión a peptidoglucano LysM	QDZ70213.1	48.24	
	Metal-endopeptidase de la familia ImmA/IrrE	QGZ70104.1	15.22	
	N-acetilmuramidasa	QDZ69788.1	80.31	
	Metal-endopeptidase de la familia ImmA/IrrE	QDZ69434.1	15.17	
	SL001	Metal-endopeptidase de la familia ImmA/IrrE	QDZ69542.1	16.71
		Oligoendopeptidasa F	QDZ70437.1	68.38
		Metal-endopeptidase de la familia ImmA/IrrE	QDZ71034.1	46.64
Metal-endopeptidase de la familia ImmA/IrrE		QDZ71037.1	15.74	

GDIAS001	LD-carboxipeptidasa	QDZ70263.1	40.47
	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa	QDZ70363.1	46.00
	1,4-beta-N-acetilmuramidasa	QGZ70045.1	48.81
	1,4-beta-N-acetilmuramidasa	QGZ70144.1	46.69
	Metal-endopeptidase de la familia ImmA/IrrE	QGZ69994.1	15.49
	Metal-endopeptidase de la familia ImmA/IrrE	QGZ70104.1	15.22
	Peptidoglucano DD-metaloendopeptidasa	QGZ70137.1	109.58
	Oligoendopeptidasa F	QGZ70770.1	68.30

De las proteínas encontradas en los genomas, se calculó el peso molecular proteico en kDa con la herramienta Protein Molecular Weight de la plataforma Sequence Manipulation Suite (SMS) que se muestran en la tabla 14. Posteriormente, se descartaron las proteínas que no coincidieron con el peso aparente que se calcularon de las proteínas provenientes del zimograma (Figura 12) con la finalidad de obtener las proteínas que se acercan al peso aparente para utilizar la plataforma psortb 3.0 y predecir su localización celular (Yu et al., 2011).

Tabla 14. Relación de pesos aparentes de las bandas problemas y peso proteico de las proteínas seleccionadas de la búsqueda en base de datos de NCBI.

Banda problema /Peso aparente	CEPA	ID Aminoacidos	Nombre	Peso molecular proteico (kDa)	Ubicación celular (Psortb 3.0)
a / 103.42kDa	GDIAS001	QGZ70137.1	Peptidoglucano DD-metaloendopeptidasa	109.58	Citoplasma/pared celular/extracelular
b / 70.89 kDa	UAMI1101	WP_115155048.1	Oligoendopeptidasa F	68.30	Citoplasma

c / 52.84 kDa	ATC257 45	ABJ67868.1	Lysozyme M1(1,4-beta-N- acetylmuramida se)	48.19	Pared celular/Extracelula r
d / 42.83	UAMI 1101	WP_115155 116.1	Lizozima M1(1,4-beta-N- acetilmuramidas a)	40.54	Citoplasma
e / 14.08	UAMI 1101	WP_060743 629.1	Metalo- endopeptidasa de la familia ImmA/IrrE	15.89	Citoplasma

En la tabla 14 se presentan los pesos moleculares, tanto de los obtenidos a partir de las bandas del zimograma como los datos buscados en la base de datos de NCBI, los cuales son correspondientes a peptidoglucano hidrolasas, ya que como lo menciona Zolls *et al.*, (2010) las autolisinas son enzimas que participan en mecanismos de división celular, peptidoglucano hidrolasas, que pueden jugar dos papeles importantes, participación en la lisis celular y como antimicrobianos, los cuales también pueden inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables y mejoran las propiedades organolépticas del producto final (García *et al.*, 2015).

Las autolisinas antes mencionadas están presentes en el género *Pediococcus* como lo han reportado de Mora *et al.* (2003), donde muestran autólisis en dos especies, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*, las cuales presentan un rango del 65-95%, además demuestran actividad semejante a la mutalolisina (N-acetilmuramidasa), ambas actividades demuestran una correlación entre la sensibilidad de la pared celular a la mutalolisina y la actividad autolítica.

Es por ello el interés que se tiene en este tipo de proteínas con doble actividad lítica, ya que puede inhibir microorganismos patógenos como pueden ser *Listeria monocytogenes* (Mora *et al.*,2003) y *Listeria innocua*. Por otro lado, García *et al.*,

(2019) menciona que el género *Pediococcus* puede presentar N-Acetilmuramidasa, N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa o actividades de N-acetilglucosaminidasa contra un amplio espectro de bacterias patógenas encontradas en los alimentos.

Por todo lo antes mencionado en la tabla 14 se presentan las proteínas buscadas en los genomas completos de *Pediococcus pentosaceus* en las plataforma de NCBI, las cuales tienen actividades de PGH's como lo es la N-acetil muramidasa, similar a la que reporta Mora et al, (2003) con una actividad cercana a los 116 kDa y un espectro de inhibición por bandas secundarias desde los 30 a los 100 kDa contra *Listeria monocytogenes* y *Micrococcus lysodeikticus* tanto para *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*, estos mismos rangos de actividad reportan Gandhi et al. (2020) con bandas de pesos aproximados de 11 kDa (menor actividad lítica), 15, 23 y 35 kDa (mayor actividad lítica) contra *Micrococcus lysodeikticus* para una cepa de *Pediococcus acidilactici*. Cabe mencionar que se ha demostrado la cercanía filogenética entre estas dos especies (*P. acidilactici* y *P. pentocaseus*) como lo reporta Poonam et al. (2019) en un estudio de secuenciación de nueva generación donde presentan similitud de la proteína ribosomal.

12.3 Diseño de primers

De las secuencias obtenidas de acuerdo con los pesos proteicos de las bandas presentadas en el zimograma se realiza el diseño de primers utilizando la plataforma de IDT inc., como lo menciona Chuang et al., (2013) en el diseño del cebador, muchas condiciones limitantes deben considerarse simultáneamente, como consideraciones típicas que se muestran en la siguiente tabla (15).

Tabla 15. Criterios para el diseño de primers.

%CG	Temperatura de alineamiento	No. Pares de bases
40-60	55-65	18-23

Los primers obtenidos a partir de las secuencias seleccionadas después de realizar un multialineamiento con cepas de *Pediococcus pentosaceus* para cada una de las proteínas que tuvieron semejanza a las bandas presentes en el zimograma son los que se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Primers diseñados para cada uno de las proteínas con actividad de peptidoglucano hidrolasa.

Peso molecular proteico (kDa)	CEPA/ ID Aminoácidos	Nombre	BLAST CEPA/ ID nucleotidos	Primers Forwad / Reverse	Tamaño de amplicon (pb)
109.58	GDIAS001 QGZ70137.1	Peptidoglucano DD-metaloendopeptidasa	ATCC 25745 CP000422.1	GGTGAGTGGTACTGG TATCT / AATTGGGCTGGGTCTTTG	215
68.30	UAMI 1101 WP_115155048.1	Oligoendopeptidasa F	SS1-3 CP023008.1	GATATGCGGCTCGGG TTAAT/ CTTCAGCAGGAGTAAG GGTATG	243
48.19	ATC25745 ABJ67868.1	Lizozima M1(1,4-beta-N-acetilmuramida sa)	GDIAS001 CP046938.1	AGTTGCTAGTGCGCTT AAT / CAGCAATGATAGCGTC TGT	200
40.54	UAMI 1101 WP_115155116.1	Proteína de la familia de las peptidasas S66	SS1-3 CP023008.1	GCACTAGTACGCGGT GATAAA / CGCCTGAACTGCCCTA ATAA	315
15.89	UAMI 1101 WP_060743629.1	Metalo-endopeptidasa de la familia ImmA/IrrE	SS1-3 CP023008.1	CTGCTGATCCGTTTGT CATTG / GTCTGATTCGTGCTCT AGCTTA	257

Los primers obtenidos se prueban en la plataforma SMS con las herramientas PCR products y PCR map, en el cual dan como resultado la amplificación de los amplicones esperados para cada una de las secuencias y la ubicación de posicionamiento de inicio y final de cada cebador respectivamente, por lo que se debe de dar primero la amplificación para que se pueda observar el posicionamiento posteriormente. Se tomó en cuenta un total de 33 cepas de genoma completo en la plataforma de NCBI de *Pediococcus pentosaceus* para este ejercicio, de las cuales se informa los códigos de acceso, así como el nombre en el anexo 4, tabla 25.

Los productos obtenidos *in sillico* en las diferentes cepas muestran una amplificación con el número de pares de bases esperados para cada uno de los cebadores diseñados (tabla 16), de acuerdo al peso molecular se mencionan de mayor a menor con su número de amplificaciones obtenidas; proteína Peptidoglucano DD-metaloendopeptidasa 109.5 kDa 2 amplificaciones, Oligoendopeptidasa 68.30 kDa 13 amplificaciones, Lizozima M1 (1,4 N-acetilmuramidasa) 48.1 kDa 2 amplificaciones, Proteína de la familia de las peptidasas S66 40.51 kDa 17 amplificaciones, por último, la Metalo-endopeptidasa de las familia Imma/IrrE 15.89 kDa 4 amplificaciones del total de cepas de genoma completo de NCBI que se probaron.

Las amplicones obtenidos de la proteína identificada para la banda B (Neutral endopeptidasa) se les realizó un alineamiento para observar las regiones consenso en ellas, por lo que se puede visualizar en la figura 13 que dichos amplicones se alinean posicionándose en forward- reverse (9 amplicones) y reverse- forward (10 amplicones), estos últimos siendo los reversos complementarios del gen que codifica a dicha proteína.

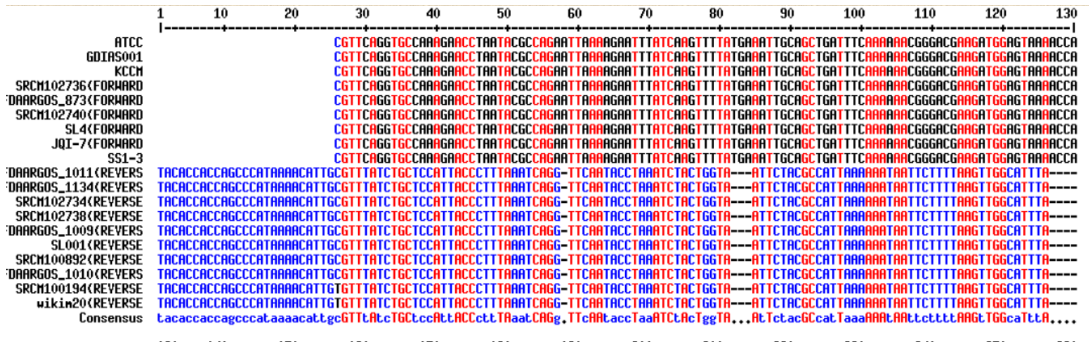


Figura 13. Alineamiento de productos de PCR usando los primers diseñados para la banda B en los genomas completos de *Pedioroccus pentosaceus*

En el blast (nucleótido-proteína) realizado a los amplificaciones obtenidos mostró una identificación a una familia de peptidasas (M13), que de acuerdo con la información de la base de datos de superfamilias de proteínas homólogas en la plataforma InterPro, esta familia es un grupo de metalo-endopeptidasas que incluyen una variedad de endopeptidasas que pueden estar en una amplia gama de bacterias, además de que son proteínas metalodependientes de zinc (Bland et al., 2008), estas metaloendopeptidasas se reporta que se pueden unir con uno a cinco iones metálicos, que en la mayoría de los casos pueden ser zinc, también se incluye a cobalto, manganeso, hierro o cobre. Las proteínas dentro de esta familia pueden ser endopeptidasas, pero también se presentan las aminopeptidasas, carboxipeptidasas, dipeptidasas, peptidildipeptidasas, dipeptidilpeptidasas y tripeptidilpeptidasas (Rawlings & Bateman, 2019).

De acuerdo con Rawlings y Bateman (2019) dentro de esta familia se encuentran 28 homólogos de proteínas en bacterias que codifica el gen pepO (oligopeptidasas), de la cual se ha reportado que este tipo de proteínas codificadas por el gen antes mencionado tiene una participación proteolítica en los procesos de maduración y desarrollo del sabor en queso (Christensson et al., 2002) y aumentan las propiedades benéficas de las leches fermentadas, fórmulas infantiles y helados (Jeaner et al., 2005), hasta el momento no se tiene reporte de la participación de este tipo de proteínas codificados por el gen pepO en productos cárnicos madurados.

Es de interés el identificar la proteína que se observa en la banda B con un peso de 71.9 kDa posiblemente perteneciente a la familia M13, puesto que podría ser la primera reportada en este género de bacterias ácido lácticas, ya que como lo menciona *Sridhar et al.*, (2005) estas enzimas proteolíticas intracelulares tienen funciones fisiológicas primarias implicadas en la adquisición de aminoácidos esenciales para apoyar el crecimiento bacteriano, además de que promueven la hidrólisis de péptidos que son resistentes a la actividad aminopeptidasa. Estos datos son similares a los reportados de las funciones del peptidoglucano hidrolasas, que promueven a la ruptura de la pared celular para el crecimiento, división bacteriana, aunado a ello, se reportan que proteínas intracelulares de bacterias ácido lácticas presentan actividad antimicrobiana contra agentes patógenos y alterantes en alimentos, como se han reportado para el género *Pediococcus spp.* y en otras bacterias ácido lácticas (Mora et al., 2003; García et al., 2011; Gandhi et al., 2020).

Christensson et al. (2002) reportan la clonación y expresión de una oligopeptidasa perteneciente a la familia M13 de *Lactobacillus rhamnosus HN001* con un peso de 70.9 kDa (peso similar a la calculada en la banda B de este trabajo) demostrando actividad específica para la α -caseína, así mismo *Sridhar et al.*, (2005) reportan la expresión de tres proteínas similares utilizando la secuencia de genes pepO de *Lactobacillus helveticus* (GENBANK AF019410) y de *Lactobacillus gasei* (GENBANK NC_008530.1) para tal fin, demostrando especificidad para β -caseína y α S1-caseína de la leche. Janer et al., (2005) identificaron, caracterizaron y expresaron una endopeptidasa intracelular de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (GENBANK AJ844608) con un peso cercano a los 74 kDa, mencionando que esta proteína pertenece a la familia de las peptidasas M13.

Los códigos de acceso antes mencionados de los genes que codifican a las proteínas se utilizaron para obtener la secuencia en nucleótidos y probar los primers diseñados para la banda B, en el cual no se obtuvieron amplificaciones en ellos (ver anexo 4, tabla 26) sin embargo, las secuencias del gen pepO de *Lactobacillus helveticus* y de *Lactobacillus gasei* muestran regiones consenso con la secuencia de la familia de las peptidasas M13 (Figura 14), por lo que se muestra

mayor interés por la proteína marcada en la banda B en el gel de zimograma que presenta actividad antimicrobiana (Figura 12) ya que hasta la fecha, no se ha reportado proteína perteneciente a la familia M13 en bacterias ácido lácticas presente en el proceso de fermentación en productos cárnicos como lo demuestra tener la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101 aislada de un chorizo tipo español (Juárez 2019).

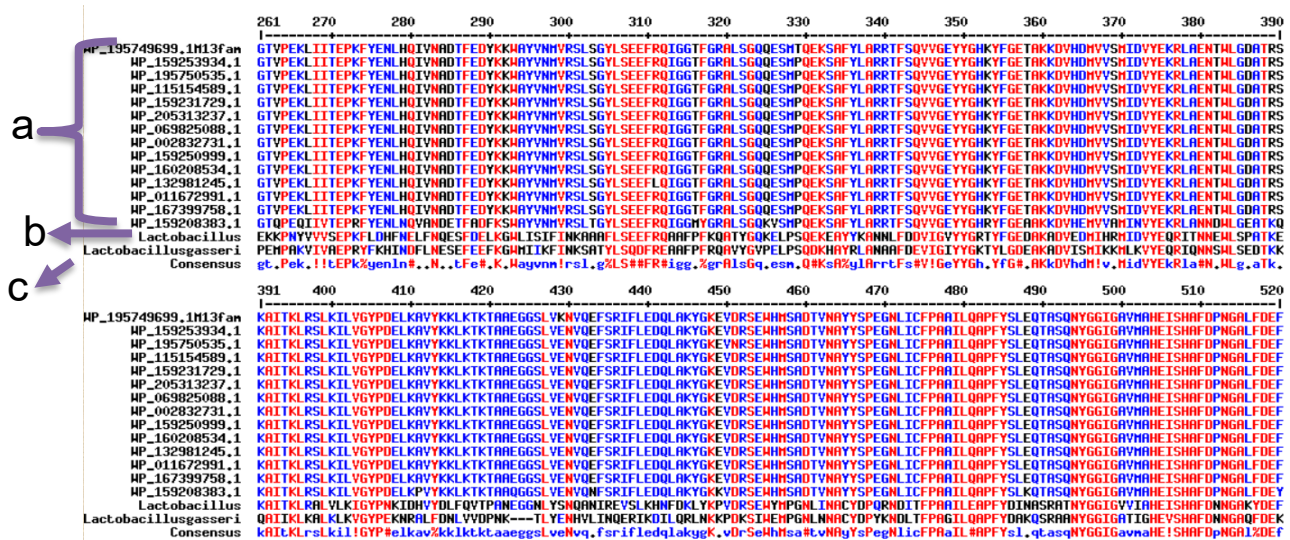


Figura 14. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia M13 de *Pediococcus Pentosaceus* (a) con la secuencia del gen pepO de *Lactobacillus helveticus* (b) y *Lactobacillus gaseri* (c).

Los amplicones obtenidos *in silico* usando los primers diseñados para para las diferentes bandas, la que obtuvo mayor número de réplicas fue la neutral endopeptidasa con un peso de 71.9 kDa (banda B), seguido de las proteínas Peptidoglucan DD-metalloendopeptidase con peso de 109.5 kDa (banda A) y Lysozyme M1 M1(1,4-beta-N-acetylmuramidase con un peso de 48.19 kDa (banda C) por último las proteínas Lysozyme M1(1,4-beta-N-acetylmuramidase) con un peso de 42.58kDa (banda D) y ImmA/IrrE family metallo-endopeptidase con un peso de 15.22kDa (banda E); por consiguiente de acuerdo a los datos obtenidos en la identificación de estas proteínas sería conveniente comprobar los productos

esperados de cada uno de los cebadores diseñados mandando a sintetizarlos y utilizarlos en la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101, los cuales se obtuvieron a partir de las bandas con los diferentes pesos moleculares de acuerdo al zimograma realizado con las diferentes condiciones de crecimiento, las proteínas correspondientes de cada banda hasta ahora no se ha encontrado reporte donde identifiquen y prueben su expresión mediante PCR con el uso de cebadores específicos, sin embargo, se han encontrado un espectro con actividad antimicrobiana similar como lo que reporta Mora et al, (2003) que demuestra autólisis por PGH's y actividad antimicrobiana en un rango de 30 kDa a 110 kDa contra *Listeria monocytogenes*, así mismo García et al. (2019) menciona que las peptidoglucano hidrolasas bifuncionales pueden ser muy prometedoras en el campo de antimicrobianos en la industria alimentaria, las cuales pueden provenir de bacterias ácido lácticas que han abierto campo de investigación en proteínas nuevas con esta doble función.

13 Conclusiones

- Se corroboró la identificación de la cepa 1101 como *Pediococcus pentosaceus* con métodos moleculares y espectrometría de masa.
- De las 6 fracciones obtenidas de la cepa 1101, 5 mostraron actividad contra *Listeria innocua*, así también las proteínas intracelulares .
- Las proteínas intracelulares presentaron actividad con efecto bacteriostático, en zimograma a condición de 44°C se observaron bandas con pesos aparentes de 103.4, 70.8, 52.8, 42.8 y 14.8kDa.
- Las bandas observadas se identificaron como proteínas con actividad específica de PGH que podrían inactivar BAL que alteran y deterioran las propiedades organolépticas en alimentos.
- Se logró identificar por análisis in vitro e in silico a las proteínas intracelulares con actividad antimicrobiana de la cepa *Pediococcus pentosaceus* 1101.

14 Perspectivas

- Secuenciar las bandas visualizadas en el perfil proteico de *Pediococcus pentosaceus* 1101 de la fracción intracelular bajo la condición de crecimiento a 44°C.
- Sintetizar los primers diseñados y verificar su amplificación de N-acetilmuramidasa y endopeptidasa en la cepa de *Pediococcus pentosaceus* 1101.
- Probar la actividad antimicrobiana de las proteínas intracelulares de *Pediococcus pentosaceus* 1101 contra diferentes microorganismo alterantes y patógenos en alimentos
- Trabajar los péptidos antimicrobianos de la fracción soluble del citosol de la cepa de *Pediococcus pontosaceus* 1101 en un producto alimenticio.
- Trabajar la fracción de restos celulares debido a que se encontró mayor actividad antimicrobiana que la fracción soluble del citosol, inactivando completamente las células viables y obteniendo los compuestos que pudiesen presentar actividad antimicrobiana.

15 Referencias

- Ahmad, V., Khan, M. S., Qazi, M. S. J., Alzohairy, M., Al Karaawi, M., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture, and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1–11. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016
- Anastasiadou S., Papagianni M., Filiouis G., Ambrosiadis I., & Koidis P. (2008). Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation: Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1, *Enzyme and Microbial Technology*, 43(6):448-454. doi: 10.1016/j.enzymictec.2008.05.007.
- Anzaldi, L. J., Muñoz-Fernández, D., & Erill. (2012). BioWord: A sequence manipulation suite for Microsoft Word. *BMC Bioinformatics*, 13:124. Doi: 10.1186/1471-2105-13-124
- Arakawa K. (2019). Basic Antibacterial Assay to Screen for Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria and to Elementarily Characterize Their Bacteriocins. *Methods in molecular biology* 1887, 15–22. Doi: 10.1007/978-1-4939-8907-2_2
- Bayat, A. (2002). Science, medicine, and the future: *Bioinformatics, BMJ, Clinical research*, 324(7344), 1018–1022. doi:10.1136/bmj.324.7344.1018
- Bintsis T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiology*, 4(4):665–684. Doi: doi: 10.3934/microbiol.2018.4.665.
- Bland, N.D., Pinney, N.D., Thomas J.W., Turner J.E., e Isaac, RE (2008). Bioinformatic analysis of the neprilysin (M13) family of peptidases reveals complex evolutionary and functional relationships. *BMC Evol Biol* 8, 16. Doi: 10.1186/1471-2148-8-16
- Boyanova, L., Gergova, G., Markovska, R., Yordanov, D. & Mitov, I. (2017), Bacteriocin-like inhibitory activities of seven *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* strains against antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 65(6), 469–474. Doi:10.1111/lam.12807
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. Doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Brown TA. (2002). Chapter 1, *The Human Genome* Oxford: Wiley-Liss Genomes. 2da.ed. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21134/>
- Bugg, T. D., & Walsh, C. T. (1992). Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Natural product reports*, 9(3), 199–215. Doi: 10.1039/np9920900199
- Carrasco N. U., Vera E. R., Barkla, B. J., Zúñiga-L. E., Reyes V. H., Fernández J.F., & Fierro, F. (2016). Proteomic analysis of the signaling pathway mediated by the heterotrimeric Gα protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum*. *Microbial cell factories*, 15(1):173. Doi: 10.1186/s12934-016-0564-x

- Chapot-Chartier M.P., & Kulakauskas S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid Bacteria. *Microbial Cell Factories* (Suppl 1), S9 (2014). Doi: doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
- Chen, C., Huang, H., & Wu, C. H. (2017). Protein Bioinformatics Databases and Resources. *Methods in molecular biology* 2017; 1558:3-39. Doi: 10.1007/978-1-4939-6783-4_1
- Chikindas M., Weeks R., Drider D., Chistyakov V. & Dicks L. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol 49:49:23–28. Doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.011.
- Choudhuri, S. (2014). The Beginning of Bioinformatics. Supratim Choudhuri *Bioinformatics for Beginners* Academic Press 73–76. Doi:10.1016/b978-0-12-410471-6.00004-9.
- Christensson, C., Bratt, H., Collins, L. J., Coolbear, T., Holland, R., Lubbers, M. W., O'Toole, P. W., & Reid, J. R. (2002). Cloning and expression of an oligopeptidase, PepO, with novel specificity from *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20). *Applied and environmental microbiology*, 68(1):254–262. Doi. 10.1128/aem.68.1.254-262.2002
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1541–1549. doi:10.1007/s10529-013-1249-8
- Corpet F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*, 16(22):10881–10890. Doi: 10.1093/nar/16.22.10881.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews. Microbiology*, 3(10):777–788. Doi: 10.1038/nrmicro1273
- De Azevedo, P.O., Converti, A., Gierus, M., & Oliveira, R.P.de S. (2018). Antimicrobial activity of bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Pediococcus pentosaceus*: from shake flasks to bioreactor. *Molecular biology reports*, 46(1):461–469. Doi:10.1007/s11033-018-4495-y
- De Carvalho, K. G., Bambilra, F. H., Kruger, M. F., Barbosa, M. S., Oliveira, J. S., Santos, A. M., Nicoli, J. R., Bemquerer, M. P., de Miranda, A., Salvucci, E. J., Sesma, F. J., & Franco, B. D. (2009). Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(4):381–390. Doi: 10.1007/s10295-009-0684-y
- De Man, J.C., Rogosa, M., & Sharpe, M.E.(1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135. Doi: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x
- Dicks, L., & Endo, A. (2014). The Family *Lactobacillaceae*: Genera Other than *Lactobacillus*. *The Prokaryotes*, 203–212. Doi:10.1007/978-3-642-30120-9_207
- Diep, D. B., Godager, L., Brede, D., & Nes, I. F. (2006). Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. *Microbiology* (Reading, England), 152(6):1649–1659. DOI: 10.1099/mic.0.28794-0

- Dimov, S.G., Peykov, S., Raykova, D., Ivanova, P., Kirilov, N., Dalgalarrodo, M., Chobert, J.M., Haertlé, T., & Ivanova, I. (2010). A newly discovered bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 3915. *Beneficial Microbes* 1(1), 43-51. Doi: 10.3920/BM2008.1004.
- Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., Leulier, F., Gänzle, M., & Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS microbiology reviews*, 41(1),27–48.Doi: 10.1093/femsre/fux030
- Escobar Sánchez. M. (2019). Análisis del transcriptoma de *Pediococcus pentosaceus* en respuesta a condiciones de estrés. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Escobar Sánchez. M. (2023). Propiedades probióticas y análisis proteómico de *Pediococcus pentosaceus* 1101. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Foschi, C., Laghi, L., Parolin, C., Giordani, B., Compri, M., Cevenini, R., Marangoni, A., & Vitali, B. (2017). Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of *Lactobacilli*: Integration of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and 1H-NMR. *PloS one*, 12(2), e0172483. Doi: 10.1371/journal.pone.0172483
- Freiwald, A., & Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature protocols*, 4(5):732–742. Doi: 10.1038/nprot.2009.37
- Gallo, R. L., & Nizet, V. (2003). Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Current Allergy and Asthma Reports*, 3(5):402–409. Doi:10.1007/s11882-003-0074-x
- Gandhi D., Chanalía P, Bansal P., & Dhanda S. (2020). Peptidoglycan Hydrolases of Probiotic *Pediococcus acidilactici* NCDC252: Isolation, Physicochemical and In Silico Characterization. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26: 2119–2127. DOI; 10.1007/s10989-019-10008-3
- García C.I, Velasco-P. L, Rodríguez-S. R, Sánchez S, Mendoza M. G, Llorente-B. A, & Farrés A, (2011). Detection, celular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *J Appl Microbiol* 111: 607–615.Doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05088.x
- García C.I., Campos G.M., Contreras C.M., Serrano M.C. E., González C. A., Peña M.C., Rodríguez S.R., Sánchez S., & Farrés A. (2015). Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(20), 8563–8573. Doi: 10.1007/s00253-015-6593-2
- García C.I., Rocha M. D., Ortega A, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez F. R. (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(13), 5243–5257. Doi: 10.1007/s00253-019-09844-6
- Guirao A. J. P., González-P. P., & Argüelles, J. C. (2015). Strong correlation between the antifungal effect of amphotericin B and its inhibitory action on germ-tube formation in a *Candida*

albicans URA⁺ strain. International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology, 18(1), 25–31. Doi: 10.2436/20.1501.01.231

- Gumbart J.C, Beeby M, Jensen G.J, & Roux B. (2014). *Escherichia coli* peptidoglycan structure and mechanics as predicted by atomic-scale simulations. PLoS Comput Biol.10(2):e1003475. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1003475
- Gutiérrez C. C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018). Enhanced Bacteriocin Production by *Pediococcus pentosaceus* 147 in Co-culture With *Lactobacillus plantarum* LE27 on Cheese Whey Broth. Frontiers in microbiology, 9, 2952. Doi: 10.3389/fmicb.2018.02952
- Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L., (2012). Methods in Molecular Biology. (869): 81–91. Doi: 10.1007/978-1-61779-821-4_8
- Hammes W.P., & Hertel C. (2006) The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. The *Prokaryotes*. Springer, New York, NY. Doi: 10.1007/0-387-30744-3_10
- Handtke S., Albrecht D., Otto A., Becher D., Hecker M., & Voigt B. (2018). The proteomic response of *B. pumilus* cells to glucose starvation. Proteomics. 18. (1), 1700109. Doi: 10.1002/pmic.201700109.
- Hardt, M., Guo, Y., Henderson, G. & Laine, R.A. (2003). Zymogram with Remazol brilliant blue-labeled *Micrococcus lysodeikticus* cells for the detection of lysozymes: example of a new lysozyme activity in Formosan termite defense secretions. Analytical Biochemistry. 312(1): 73–76. Doi: 10.1016/S0003-2697(02)00443-8.
- Horna G., Silva M., Vicente W., & Tamariz J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Revista Médica Herediana, 16(1): 39-45. ISSN: 1729-214X
- Hurtado R.J.J.; Carrasco N. U.; Almanza P.J.C. & Ponce A. (2022) E. Ribosomes: The New Role of Ribosomal Proteins as Natural Antimicrobials. International. Journal. Of Molecular. Science. 23, 9123. Doi: 10.3390/ijms23169123
- Hurtado Rios.J.J. (2019) Identificación y caracterización parcial de proteínas con actividad antimicrobiana producidas por *Lactobacillus paraplantarum* aislada de un producto cárnico. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Janer, C., Arigoni, F., Lee, BH, Peláez, C. & Requena, T. (2005). Enzymatic Ability of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis To Hydrolyze Milk Proteins: Identification and Characterization of Endopeptidase O. Applied and Environmental Microbiology, 71 (12):8460-8465; Doi: 10.1128/AEM.71.12.8460-8465.
- Jang, K. S., & Kim, Y. H. (2018). Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. Journal of microbiology, 56(4):209–216. Doi:10.1007/s12275-018-7457-0

- Jang, S., Lee, D., Jang, I. S., Choi, H. S., & Suh, H. J. (2015). The Culture of *Pediococcus pentosaceus* T1 Inhibits *Listeria* Proliferation in Salmon Fillets and Controls Maturation of Kimchi. *Food technology and biotechnology*, 53(1):29–37. Doi: 10.17113/ftb.53.01.15.3754
- Jiang, J., Yang, B., Ross, R. P., Stanton, C., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2020). Comparative Genomics of *Pediococcus pentosaceus* Isolated From Different Niches Reveals Genetic Diversity in Carbohydrate Metabolism and Immune System. *Frontiers in microbiology*, 11: 253. Doi: 10.3389/fmicb.2020.00253
- Juárez Castelán C. J. (2019). "Evaluación de la diversidad y dinámica bacteriana del chorizo tipo español durante su proceso de maduración, mediante DGGE y secuenciación masiva. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Kandler O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 209–224. Doi: 10.1007/BF00399499
- Klaenhammer T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), 39–85. Doi: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
- Kumari, S., Rani, R., Kumar, J., Ranjan, R. & Ranjan, T. (2019). A rapid and inexpensive method of DNA extraction from Palmyra Palm (*Borassus flabellifer*). *Current Journal of Applied Science and Technology*. 32(3): 1-5. Doi: 10.9734/cjast/2019/v33i230061
- Leisner, J. J., Laursen, B. G., Prévost, H., Drider, D., & Dalgaard, P. (2007). *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS microbiology reviews*, 31(5), 592–613. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x
- López A. A., García C. I., Pérez C. M. L., & Ponce A. E. (2019). Antimicrobial Bacteriocins and Peptidoglycan Hydrolases: Beneficial Metabolites Produced by Lactic Acid Bacteria, The Many Benefits of Lactic Acid Bacteria. Chapter 7. Nova Editors. ISBN: 978-1-53615-388-0
- Lortal S. y Chapot Chartier M.P. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, Elsevier, 16 (6-9), pp.857-871. Doi: 10.1016/j.idairyj.2004.08.024
- Maliničová, L., Píknová, M., Pristaš, P., & Javorský, P. (2010). Peptidoglycan hydrolases as novel tool for anti-enterococcal therapy. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. The Formatex. Microbiology Book Series, 1, 463-472.
- Md Sidek, N. L., Halim, M., Tan, J. S., Abbasiliasi, S., Mustafa, S., & Ariff, A. B. (2018). Stability of Bacteriocin-Like Inhibitory Substance (BLIS) Produced by *Pediococcus acidilactici* kp10 at Different Extreme Conditions. *BioMed Research International*, 2018, 1–11. Doi:10.1155/2018/5973484
- Mitchell C.,(1993) MultAlin–multiple sequence alignment, *Bioinformatics*,9 (5), 614, Doi: 10.1093/bioinformatics/9.5.614
- Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M. G., Senini, L., & Manachini, P. L. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus*

strains. Journal of applied microbiology, 94(4), 561–570. Doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01868.x

Neerincx P.B.T. and Leunissen A. M. (2005). Evolution of web services in bioinformatics. Henry Stewart Publications 1467-5463. Briefings in Bioinformatics. 6.(2). 178–188. Doi: 10.1093/bib/6.2.178

Neville D. M., Jr (1971). Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. The Journal of biological chemistry, 246(20), 6328–6334.

Nguyen D.T. L., Van H.K., Cnockaert M., De Brandt E., Aerts M., Binh T.L., & Vandamme P., (2013). A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. International Journal of Food Microbiology 163 (2013) 19–27. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.024

Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. Clinical Infectious Diseases, 38(6), 864–870. Doi:10.1086/381972

Paredes, F.S., & Roca, J.J. (2004). Acción de los antibióticos: perspectiva de la medicación antimicrobiana. Ambito farmaceutico Farmacología, OFFARM 3(23). 116-124.

Parra Huertas R. A. (2010) Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. Facultad de ciencias agropecuarias, Vol8. No.1. Recuperado el día 30 de enero de 2019, de: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>

Paxman, J. J., & Heras, B. (2016). Bioinformatics Tools and Resources for Analyzing Protein Structures. Proteome Bioinformatics, 209–220. Doi:10.1007/978-1-4939-6740-7_16

Pidutti, P., Federici, F., Brandi, J., Manna, L., Rizzi, E., Marini, U., & Cecconi, D. (2017). Purification and characterization of ribosomal proteins L27 and L30 having antimicrobial activity produced by the *Lactobacillus salivarius* SGL 03. Journal of applied microbiology, 124(2), 398–407. Doi: 10.1111/jam.13646

Poonam.B., Raman K., Jasbir S., & Suman D. (2019) Next generation sequencing, biochemical characterization, metabolic pathway analysis of novel probiotic *Pediococcus acidilactici* NCD 252 and its evolutionary relationship with other lactic acid bacteria. Mol Biol Rep 46, 5883–5895 Doi:10.1007/s11033-019-05022-z

Qu, B., Ma, Z., Yao, L., Gao, Z., & Zhang, S. (2020). Preserved antibacterial activity of ribosomal protein S15 during evolution. Molecular Immunology, 127, 57–66. Doi:10.1016/j.molimm.2020.08.024

Rawlings, N. D., & Bateman, A. (2019). Origins of peptidases. Biochimie, 166, 4–18. Doi: 10.1016/j.biochi.2019.07.026

Rey, S., Acab, M., Gardy, J. L., Laird, M. R., deFays, K., Lambert, C., & Brinkman, F. S. (2004). PSORTdb: a protein subcellular localization database for bacteria. Nucleic acids research, 33, 164–168. Doi: 10.1093/nar/gki027

- Reyes C. J. L. (2015). Identificación de la actividad antimicrobiana de cepas del género *Enterococcus*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Rice, K. C., & Bayles, K. W. (2003). Death's toolbox: examining the molecular components of bacterial programmed cell death. *Molecular microbiology*, 50(3), 729–738. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.t01-1-03720.x
- Rosario, M.R., & Mendoza, M.C. (2004). Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(4), 238-245. Doi: 10.1157/13059055
- Ruiz R. Y. (2017). Potencial probiótico y producción de péptidos antimicrobianos *in vitro* de bacterias ácido lácticas del pulque. Tesis de maestría. División de estudios de posgrado, Universidad tecnológica de la Mixteca.
- Saravanan, R. S., & Rose, J. K. C. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, 4(9), 2522–2532. doi:10.1002/pmic.200300789
- Schillinger, U., & Lucke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1901-1906. Doi: 10.1128/aem.55.8.1901-1906.1989
- Schneider S.R. (2005). Tesis de Doctorado. Caracterización bioquímica y molecular de las bacteriocinas producidas por *Pediococcus parvulus* MXVK133 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aisladas de productos cárnicos mexicanos. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Shapiro, A. L., Viñuela, E., & Maizel, J. V., Jr (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications*, 28(5), 815–820. Doi: 10.1016/0006-291x(67)90391-9
- Sharma, A. K., Kumar, S., K, H., Dhakan, D. B., & Sharma, V. K. (2016). Prediction of peptidoglycan hydrolases- a new class of antibacterial proteins. *BMC genomics*, 17, 411 Doi:10.1186/s12864-016-2753-8
- Shin, M.S., Han, S.K., Ji, A.R., Kim, K.S. & Lee, W.K. (2008). Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. *Journal of Applied Microbiology* 105: 2203-2212. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03935.x
- Shockman, G. D., Danea-Moore, L., Kariyama, R., & Massidda, O. (1996). Bacterial Walls, Peptidoglycan Hydrolases, Autolysins, and Autolysis. *Microbial Drug Resistance*, 2(1), 95–98. doi:10.1089/mdr.1996.2.95
- Sierra JM, Fusté E, Rabanal F, Vinuesa T, & Viñas M. (2017). An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert opinion on biological therapy*, 17(6), 663–676. Doi:10.1080/14712598.2017.1315402

- Singla, V., Mandal, S., Sharma, P., Anand, S., & Tomar, S. K. (2018). Antibiotic susceptibility profile of *Pediococcus spp.* from diverse sources. *3 Biotech*, 8(12), 489. Doi 10.1007/s13205-018-1514-6
- Sridhar, V. R., Hughes, J. E., Welker, D. L., Broadbent, J. R., & Steele, J. L. (2005). Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3025–3032. Doi: 10.1128/AEM.71.6.3025-3032.2005
- Steen, A., Buist, G., Horsburgh, G. J., Venema, G., Kuipers, O. P., Foster, S. J., & Kok, J. (2005). AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *The FEBS journal*, 272(11), 2854–2868. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04706.x>
- Strathdee, F., & Free, A. (2013). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Edit, Makovets, S. DNA Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, vol 1054. Humana Press. Doi: 10.1007/978-1-62703-565-1_9
- Taylor, T. M. (2015). Effects of Spray Drying on LAB Elsevier. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. 124:130. ISBN: 9781782420422
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. (2009). Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International journal of food microbiology*, 132(2-3), 117–126. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.010
- Trotonda, M. P., Xiong, Y. Q., Memmi, G., Bayer, A. S., & Cheung, A. L. (2009). Role of mgrA and sarA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* autolysis and resistance to cell wall-active antibiotics. *The Journal of infectious diseases*, 199(2), 209–218. Doi: 10.1086/595740
- Venegas O.M.G., Flores G.A.C., Martínez H.J.L., Aguilar C., & NevarezM. G.V. (2019). Production of Bioactive Peptides from *Lactic Acid Bacteria*: A Sustainable Approach for Healthier Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Institute of Food Technologists. 18(4);1039-1051 Doi: 10.1111/1541-4337.12455
- Vermassen, A., Leroy, S., Talon, R., Provot, C., Popowska, M., & Desvaux, M. (2019). Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. *Frontiers in microbiology*, 10, 331. Doi: 10.3389/fmicb.2019.00331
- Visweswaran, G. R., Steen, A., Leenhouts, K., Szeliga, M., Ruban, B., Hesseling-Meinders, A., Dijkstra, B. W., Kuipers, O. P., Kok, J., & Buist, G. (2013). AcmA, a Homolog of the Major Autolysin AcmA of *Lactococcus lactis*, Binds to the Cell Wall and Contributes to Cell Separation and Autolysis. *PLoS ONE* 8(8): e72167. Doi: 10.1371/journal.pone.0072167
- Vollmer W, Joris B, Charlier P, & Foster S.(2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(2);259–286. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x
- Volzing, K., Borrero, J., Sadowsky, M. J., & Kaznessis, Y. N. (2013). Antimicrobial peptides targeting Gram-negative pathogens, produced and delivered by lactic acid bacteria. *ACS synthetic biology*, 2(11), 643–650. Doi: 10.1021/sb4000367

- Wang, X., Jordan, I. K., & Mayer, L. W. (2015). A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. Academic Press. *Molecular Medical Microbiology*, 1:517–536. Doi: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00029-9
- Warner, J. R., & McIntosh, K. B. (2009). How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins?. *Molecular cell*, 34(1), 3–11. Doi:10.1016/j.molcel.2009.03.006
- Weber, K., Pringle, J., & Osborn, M. (1972). Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods in enzymology*, 26, 3–27. Doi:10.1016/s0076-6879(72)26003-7
- Wittouck S., Wuyts S., Meehan C.J, Noort V., & Lebeer S.(2019). A Genome-Based Species Taxonomy of the *Lactobacillus* Genus Complex. *American Society Microbiology, ASM Journals mSystems*. 4(5). Doi: 10.1128/msystems.00264-19
- Woraprayote W., Malila Y., Sorapukdee S., Swetwivathana A., Benjakul S., & Visessanguan W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science* 120;118–132. Doi: 10.1016/j.meatsci.2016.04.004.
- Yang, R., Johnson, M. & Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 58(10);3355-3359. Doi: 10.1128/aem.58.10.3355-3359.1992
- Yu, N. Y., Laird M. R., Spencer C., & Brinkman F. (2011) S.L. PSORTdb—an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea. *Nucleic Acids Research*,39(Database issue); 241–244. Doi:10.1093/nar/gkq1093
- Zamora Mecalco Javier. (2017). Trabajo monográfico de actualización, empleo de bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas como alternativa a conservadores en alimentos fermentados. Facultad de química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 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., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck 1901*, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782–2858. Doi: 10.1099/ijsem.0.004107
- Zhou, X., Liao, W. J., Liao, J. M., Liao, P., & Lu, H. (2015). Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of molecular cell biology*, 7(2), 92–104. Doi: 10.1093/jmcb/mjv014

16 Anexos

Anexo 1-. PCR componentes.

Tabla 17. Componentes de PCR

<i>Componente</i>	<i>μL</i>
Buffer PCR 10x (-Mg)	5
MgCl ₂	1.5
dNTP mix	1
Forward primer	1
Reverse primer	1
ADN genómico	1
ADN polimerasa Taq.Platinum	0.2
Agua libre de nucleasas	39.5

Anexo 2. Cinética de crecimiento y diferencias entre grupos

Tabla 18. Densidad óptica (600 nm) de cinética de crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* 1101.

Tiempo (hrs)	Promedio DO(600nm)	Desviación estándar
3	0.47	0.1
4	0.55	0.0
5	0.63	0.0
6	0.86	0.1
7	1.02	0.1
8	1.14	0.0
9	1.25	0.0
10	1.33	0.0
11	1.38	0.0
12	1.36	0.0
13	1.43	0.0
14	1.47	0.0
15	1.48	0.0
16	1.50	0.0
17	1.53	0.1

Medición de densidad óptica realizadas por triplicado en cada lectura.

Tabla 19. mm de halos de inhibición de células de *Pediococcus pentosaceus* 1101.

Tiempo (hrs)	Promedio mm halos de inhibición	Desviación estándar
3	0.14	0.053
4	0.39	0.026
5	0.53	0.025
6	0.59	0.012
7	0.60	0.006
8	0.66	0.051
9	0.71	0.012
10	0.75	0.020
11	0.61	0.012
12	0.56	0.006
13	0.52	0.017

Medición de halos de inhibición realizadas por triplicado en cada lectura.

Tabla 20. Análisis de varianza para la densidad óptica de *Pediococcus pentosaceus* 1101.

Fuente de variación	de Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	Radio-F	Rechazo de igualdad($\alpha=0.05$)
Tiempo (hrs)	14	5.49801	0.3927152	301.5731	Si
Error ajustado	30	0.03906	0.00120022		
Total ajustado	44				
Total	45				

Efecto significativo $P < 0.005$, Efecto no significativo $P > 0.005$

Tabla 21. Diferencias entre grupos para la densidad óptica de *Pediococcus pentosaceus* 1101.

Realizado por triplicados con una significancia del 5%

Tiempo (hrs)	Mediana	Diferencia con los grupos
3	0.44	10,11,12,13,14,15,16
4	0.55	11,12,13,14,15,16,17
5	0.63	13,14,15,16,17
6	0.83	13,14,15,16,17
7	1.0	14,15,16,17
8	1.1	14,15,16,17
9	1.2	16,17
10	1.3	3
11	1.3	3,4
12	1.3	3,4
13	1.4	3,4,5,6,7
14	1.4	3,4,5,6,7

15	1.4	3,4,5,6,7,8
16	1.5	3,4,5,6,7,8,9
17	1.4	3,4,5,6,7

Tabla 22. Análisis de varianza para la actividad inhibitoria de *Pediococcus pentosaceus* 1101.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	Radio-F	Rechazo de igualdad($\alpha=0.05$)
Tiempo (hrs)	10	0.83752	0.0837552	116.1269	Si
Error ajustado	22	0.01586	0.0007212		
Total ajustado	32				
Total	33				

Efecto significativo $P < 0.005$, Efecto no significativo $P > 0.005$

Tabla 23. Diferencias entre grupos por Kruskal-Wallis para la actividad inhibitoria de *Pediococcus pentosaceus* 1101.

Realizado por triplicados con una significancia del 5%

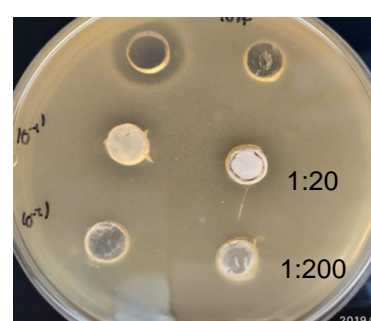
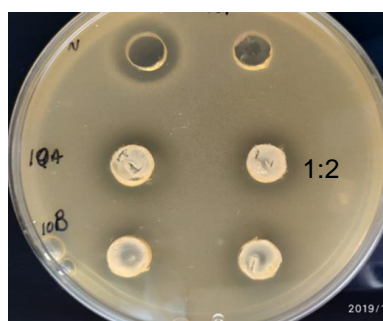
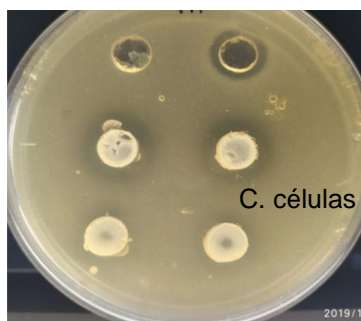
Tiempo (hrs)	mediana	Diferencia con los grupos
3	0.1	6,7,8,9,10,11
4	0.4	7,8,9,10,11
5	0.5	9,10
6	0.6	3
7	0.6	3,4

8	0.6	3,4,13
9	0.7	3,4,5,13
10	0.75	3,4,5,12,13
11	0.61	3,4,12
12	0.56	10
13	0.52	8,9,10

Anexo 3. Concentración mínima inhibitoria.

Tabla 24. Valores de concentración de proteína y mm de halos de inhibición en diluciones del concentrado de células de 10 horas resuspendidas en BFS.

	Concentrado de células	Dilución 1:2	Dilución 1:20	Dilución 1:200
Concentración de proteína en pozo (mg)	1.5372	0.7686	0.07686	0.007686
mm halo de inhibición	7.5	4.0	0.7	Sin inhibición



Anexo 4.

Tabla 25. Cepas de genoma completo para el análisis de proteínas.

Cepa de <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Código de acceso GENBANK
ATCC 25745	CP000422.1
GDIAS001	CP046938.1
SRCM102736	CP028259.1
FDAARGOS_1011	CP065967.1
JQI-7	CP023655.1
ZPA017	CP015206.1
FDAARGOS_1007	CP066046.1
SRCM103387	CP035154.1
SL4	CP006854.1
FDAARGOS_1134	CP068104.1
FDAARGOS_1010	CP066081.1
FDAARGOS_1009	CP066043.1
KCCM 40703	CP020018.1
FDAARGOS_873	CP065723.1
SRCM100194	CP021927.1
Wikim20	CP015918.1
SL001	CP039378.1
SRCM100892	CP021474.1
SS1-3	CP023008.1
FDAARGOS_1134	CP068104.1
Ca-4	CP118739.1
SMFM2016-NK1	CP127866.1
ZZ61	CP129525.1
SRCM102740	CP028269.1

SRCM102739	CP028266.1
SRCM102738	CP028264.1
SMFM2016-YK1	CP127868.1
MGB0620	CP085471.1
MGB0941	CP085178.1
SRCM102734	CP028254.1
EN5	CP115739.1
LA0061	CP137627.1
MR001	CP047081.1

Tabla 26. Resultado de aplicación de primers diseñadas para la banda B en el gen *pepO* de diferentes especies reportadas

GEN	Bacteria	GENBANK	Amplicones obtenidos
<i>pepO</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	AF019410	No
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	NC_008530.1	No
	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	AJ844608	No



Análisis in vitro e in silico de proteínas intracelulares con efecto antimicrobiano producidas por *Pediococcus pentosaceus* 1101.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 21 del mes de febrero del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA
DRA. MARIEL CALDERON OLIVER
DRA. CARMEN JOSEFINA JUAREZ CASTELAN
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ



ARQUIMIDES RAMOS PALMA
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA
DE: ARQUIMIDES RAMOS PALMA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

[Signature]
MTRA. ROSALIA BERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

[Signature]
DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA

VOCAL

[Signature]
DRA. MARIEL CALDERON OLIVER

VOCAL

[Signature]
DRA. CARMEN JOSEFINA JUAREZ CASTELAN

SECRETARIO

[Signature]
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ