

**Informe anual  
Proyecto I+D y T**

# **PEPTIDOS**

**Cliente: Dirección de  
Innovación e Industrias  
Alimentarias. DMAPTAP.  
Gobierno Vasco**

<b>Contacto Neiker:</b>	<b>Contacto Cliente:</b>
Sonia Castañón de la Torre scdelatorre@neiker.net 945 121 344	Luis Javier Tellería lj-telleria@ej-gv.es 94 501 63 14

**Ref. NEIKER:** 61.0192.0

Ejercicio: 2011

**Ref. DMAPTAP:**

Fecha: 10/2/2012

<b>Clasificación del proyecto:</b>	<b>Unidad de negocio:</b> Innovación Agraria
<b>Departamento:</b> Biotecnología	<b>Campos de aplicación:</b> Producción de Biomoléculas
<b>Área estratégica:</b> Biotecnología	<b>Línea:</b> Biomoléculas
<b>Tipo de proyecto:</b> Estratégico	<b>Origen:</b> NEIKER

**Acrónimo:** PEPTIDOS

**Título:** Identificación, aislamiento y producción de péptidos antimicrobianos para su uso como moduladores del crecimiento microbiano ruminal.

**Jefe de proyecto:** Sonia Castañón de la Torre

**email:** scdelatorre@neiker.net

**Palabras clave:** Péptidos antimicrobianos, biomoléculas, microorganismos

**Objeto:** Péptidos antimicrobianos

**Aspecto:** microorganismos de la flora del rumen

**Finalidad:** Biomoléculas

**Objetivo:**

El proyecto pretende identificar, aislar y producir péptidos antimicrobianos orientados a mejorar la eficiencia fermentativa del rumen, y por consiguiente, a reducir las emisiones de gases con efecto invernadero. Una vez seleccionados y sintetizados se determinará su mecanismo de acción y su efecto sobre el crecimiento de microorganismos ruminales.

Este proyecto se desarrolla en el marco de un proyecto más amplio del Departamento de Producción Animal de Neiker

**Objetivos específicos:**

1. Identificación de péptidos antimicrobianos de interés.
2. Caracterización de los péptidos seleccionados
3. Ensayos de actividad antimicrobiana
- 4.-Obtención de péptidos antimicrobianos

*2.4.1. Purificación de bacteriocinas*

*2.4.2. Expresión heteróloga de péptidos antimicrobianos de origen animal o vegetal*

**Duración:** 36 meses

**Fecha de inicio:** 1/01/2011

**Fecha final:** 30/12/2013

## 1. Equipo participante de NEIKER - Tecnalia

Participantes de NEIKER - Tecnalia

- Jefe de Proyecto: Sonia Castañón de la Torre
- Otros participantes: Ainara Crespo

Otras entidades participantes o colaboradoras:

Universidad de Oviedo: Luis Manuel Quirós

## 2. Informe sobre las actividades más destacadas de la investigación en el proyecto y resultados obtenidos

Incluir en este apartado

- + Actividades más destacadas por objetivo
- + Otros resultados obtenidos (si es necesario)

### 1. Identificación de péptidos antimicrobianos de interés.

Para la identificación se realizará una revisión exhaustiva de la literatura y las bases de datos con objeto de identificar péptidos presentes de forma natural en especies animales, vegetales y microbianas que pudieran ser de interés. Así mismo, se analizarán las bases genéticas existentes de PAMs para valorar su potencial interés para nuestro objetivo concreto.

### 2. Caracterización de los péptidos seleccionados

En el caso de los péptidos antimicrobianos de origen animal o vegetal, para realizar los primeros ensayos de actividad, antes de la purificación o expresión heteróloga de los mismos, se recurrirá a la obtención de péptidos sintéticos.

En el caso de los péptidos antimicrobianos de origen microbiano, como son las bacteriocinas, se cultivarán los microorganismos productores en medio líquido y se centrifugará el medio de cultivo, para la separación de las células.

### 3. Ensayos de actividad antimicrobiana

Los ensayos de actividad antimicrobiana se desarrollarán en colaboración con el Departamento de Producción animal.

### 4.-Obtención de péptidos antimicrobianos

#### *2.4.1. Purificación de bacteriocinas*

#### *2.4.2. Expresión heteróloga de péptidos antimicrobianos de origen animal o vegetal*

## 1.1. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE INTERÉS.

La acidosis constituye una enfermedad muy habitual en los rumiantes de cebo actualmente, originada por el consumo de cantidades excesivas de hidratos de carbono de fácil digestión, o granos ricos en almidón, que dan lugar a una disfunción ruminal. Está causada por una rápida producción y absorción de ácidos a través de las paredes del rumen y es reconocida como origen de estrés en el ganado.

Existen dos tipos de acidosis: la clínica o aguda y la subclínica.

### Acidosis Ruminal Aguda

La acidosis ruminal aguda, o acidosis láctica, se caracteriza por un pH ruminal muy reducido ( $\leq 5,0$ ), un aumento importante en la concentración de ácido láctico, un aumento de la concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs) y la disminución de la población de protozoos y de determinadas bacterias ruminales.

Los factores que determinan el desarrollo de la acidosis ruminal aguda son:

- Composición de alimento: alimentos que presentan altas concentraciones de hidratos de carbono de fácil digestión.
- Tipo de grano: los granos con un mayor contenido en almidón resultan más peligrosos que aquellos que tienen cantidades inferiores.
- Integridad física del grano: Los piensos y granos molidos, son más fácil y rápidamente degradables y favorecen la aparición de acidosis.
- Contenido de humedad del grano: Los granos húmedos o artificialmente humedecidos poseen una tasa de fermentación más rápida que los secos.

Con el incremento de carbohidratos solubles en la dieta de los rumiantes, aumenta inicialmente el crecimiento de todas las bacterias ruminales, lo que conlleva un incremento de los AGVs, un ligero descenso del pH y un mayor crecimiento de *Streptococcus bovis*. *S. bovis*, es el principal productor de ácido láctico en el rumen, de forma que al aumentar su número en el rumen, se produce más ácido láctico, que da lugar a un descenso del pH y la disminución de la tasa de crecimiento de parte de la microflora ruminal, como son bacterias gram-negativas, levaduras y protozoos, por inhibición del bajo pH, aumentando las bacterias gram-positivas, principalmente los coccoides y, en mayor medida, *S. bovis*. Si el pH del rumen alcanza valores inferiores a 5,2, también disminuye el número de *S. bovis* y los microorganismos presentes que pueden crecer a bajos pHs, *Lactobacillus*, se reproducen con facilidad invadiendo el rumen. Los lactobacilos también producen ácido láctico, de forma que aumenta nuevamente la producción de éste ácido y disminuye más aún el pH del rumen, con un aumento de la presión osmótica ruminal.

Para restablecer la presión osmótica en el rumen, hay una entrada de líquidos hacia éste, a la vez que el ácido láctico y los AGVs atraviesan la pared ruminal, incorporándose al torrente circulatorio. Resulta interesante destacar que la microflora del retículo ruminal elabora dos isómeros de lactato: las formas D y L. Mientras la forma L se metaboliza a piruvato en el hígado se elimina por vía renal de forma rápida, el D-lactato, se absorbe con mucha facilidad y, sin embargo, se metaboliza muy lentamente, alcanzando niveles sanguíneos que pueden resultar neurotóxicos.

El descenso del pH en el rumen y la acumulación de D-lactato en sangre, conducen a la acidosis metabólica y la aparición de síntomas clínicos claramente visibles en el animal: deshidratación,

pérdida del apetito, estasis ruminal, diarrea y paresia, pudiendo incluso provocar la muerte del animal.

### Acidosis Ruminal Subclínica

La acidosis ruminal subclínica o crónica consiste en un descenso del pH en el rumen, no tan marcado como en la acidosis clínica. Esta también ocasionada por una ingestión prolongada de hidratos de carbono fácilmente digeribles, y pueden o no aparecer síntomas, en su caso, más leves que en la acidosis aguda. Una de las formas de diagnóstico de grupo de este tipo de acidosis es la aparición de laminitis en el rebaño con una incidencia superior al 10% anual.

### *Objetivo*

Encontrar una bacteriocina capaz de actuar selectivamente frente a los lactobacilos que colonizan masivamente el rumen en la acidosis láctica, para evitar una mayor acidificación de éste y de la sangre, que ocasionan las principales consecuencias de esta patología.

## 1.2. OBTENCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS RUMINALES

### *Preparación de medio de cultivo MRS complementado*

Para la preparación del medio de cultivo condicionado para bacterias lácticas del rumen se consultaron los protocolos descritos por Scott y Dehority (1965) y Yanke y Cheng (1998), con las correspondientes modificaciones para ajustarse al material existente.

Así, se realizó una extracción de fluido ruminal de oveja, del que se tomaron 200 ml que fueron autoclavados durante 20 minutos a 121°C. En campana de flujo vertical se recogió el sobrenadante obtenido, se trasvasó a viales de 50 ml y se centrifugó durante 1 hora a 3500 rpm. Nuevamente en campana de flujo vertical, se recogió el sobrenadante obtenido en la centrifugación, se trasvasó a viales estériles de 50 ml y se almacenó en refrigeración a 4°C, hasta su uso para complementar el medio Man, Rogosa and Sharpe (MRS) para crecimiento de bacterias lácticas.

El medio de cultivo MRS es un medio para lactobacilos, que utiliza el acetato de sodio para inhibir el crecimiento de posibles competidores. No es un medio selectivo dado que no inhibe otros géneros del mismo orden como *Leuconostoc* y *Pediococcus*, cuyo crecimiento también podría ser interesante porque son también productores de ácido láctico. Se utilizó el medio MRS Broth de Oxoid, con la composición que se describe a continuación:

- 1.0 % peptona
- 0.8 % extracto de carne
- 0.4 % extracto de levadura
- 2.0 % glucose
- 0.5 %  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 0.1 % Tween 80
- 0.2 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$
- 0.2 %  $(\text{NH}_4)_3 \text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$
- 0.02 %  $\text{Mg}_2(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.005 %  $\text{Mn}_2(\text{SO}_4) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

El medio de cultivo fue resuspendido en una proporción 5,2 % (m/V) en agua destilada y mantenido a 50°C con agitación magnética. Se trasvasó a botellas y fue autoclavado durante 15 minutos a 121°C.

Tras enfriar el medio, se suplementó con un 5% del fluido ruminal clarificado y autoclavado.

### *Aislamiento de bacterias lácticas*

Como inóculo en el medio MRS complementado se utilizó 0,05% de fluido ruminal extraído sin clarificar y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 horas, tras las cuales se introdujo en estufa a 37°C con una atmósfera 5% CO<sub>2</sub>(g), donde se incubó durante 48 horas.

El medio de cultivo se utilizó para realizar diluciones seriadas 1.10<sup>-1</sup> hasta 1.10<sup>-6</sup>, en medio MRS, de las cuales se inocularon 100 µl en medio MRS sólido (MRS + 1,5% agar bacteriológico). Las placas se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>(g) durante 24 horas.

Se seleccionaron las placas correspondientes a las diluciones 1.10<sup>-5</sup> y 1.10<sup>-6</sup>, ya que las superiores tenían demasiada densidad para poder seleccionar colonias únicas. En estas diluciones, se escogieron colonias con distinta apariencia, escogiendo siempre un mínimo de tres colonias con morfolología similar, que se sembraron en medio MRS nuevamente y fueron incubadas en las condiciones descritas previamente. Tras 16 horas de incubación, se centrifugaron a 3500 rpm durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante en campana de flujo vertical y se añadió medio MRS nuevo + 25% glicerol, previamente autoclavado, para almacenar las células a -80°C.

## 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS

### 2.1. Péptido seleccionado: *PLANTARICINA C*

La Plantaricina C es una bacteriocina producida por el microorganismo *Lactobacillus plantarum* LL441, aislado de queso Cabrales. Este lantibiótico, se clasificó durante mucho tiempo como tipo A, por ser un péptido de 2880 Da, de estructura terciaria tipo sacacorchos (Turner *et al.*, 1999), sin embargo, estudios más recientes, parecen clasificarla en un estado intermedio entre el tipo A y el tipo B (Wiedemann *et al.*, 2006) por su interacción con las membranas; en la clase II (Todorov, 2009), clasificación que no sería posible dado que requiere que no tenga lantioninas en su estructura; y en un subgrupo dentro del tipo A, el tipo A.II, que se diferenciaría del tipo A.I únicamente por el número de enzimas que producen las modificaciones post-transcripcionales de los lantibióticos, más de uno en el tipo A.I, sólo uno en el tipo A.II (Chatterjee *et al.*, 2005).

La plantaricina fue probada frente a múltiples microorganismos, entre ellos, alterantes en alimentos, y demostró tener actividad bactericida con muchos de ellos e incluso, en ocasiones, bacteriolítica, como en *Lactobacillus fermentum* (González *et al.*, 1994). Además, se comprobó que tenía actividad antibacteriana frente a microorganismos sensibles en concentraciones de orden nanomolar.

#### *Estabilidad*

González *et al.*, 1994, comprobaron que con tratamientos enzimáticos la Plantaricina C perdía actividad frente a la pronasa, la tripsina y la α-quimotripsina pero era estable frente a pepsina, proteinasa K, α-amilasa y lipasa en concentraciones de 1 mg/ml. En almacenamiento se mantenía estable tanto a 4°C como a -20°C. La plantaricina C es estable térmicamente, característica que comparte con los lantibióticos, tanto cuando se la somete a un calentamiento



progresivo como a ebullición, a 100°C durante una hora o a 121°C durante 10 minutos. El tratamiento con solventes orgánicos como metanol, cloroformo, acetonitrilo, etc., no afecta a la bacteriocina ni a su actividad antibacteriana. También es estable en medios ácidos y neutros, perdiendo actividad a en medios alcalinos.

### Estructura

La Plantaricina C es un lantibiótico de estructura equivalente a la presentada en la figura 1.4., según lo descrito por Turner *et al.*, 1999. Tiene una secuencia de 27 aminoácidos, y puede dividirse en dos partes: la primera es una cadena lineal de 6 aminoácidos, 4 de los cuales son lisinas, con una fuerte carga positiva. La segunda parte tiene conformación globular, causada por la formación de un puente lantionina entre las alaninas presentes en las posiciones 7 y 27 de la cadena. Se establecen también otros tres puentes sulfuro en la molécula, concretamente, puentes  $\beta$ -metil-lantionina, entre la alanina y el aminobutírico, en las posiciones 12 - 15, 13 - 18 y 23 - 26, respectivamente.

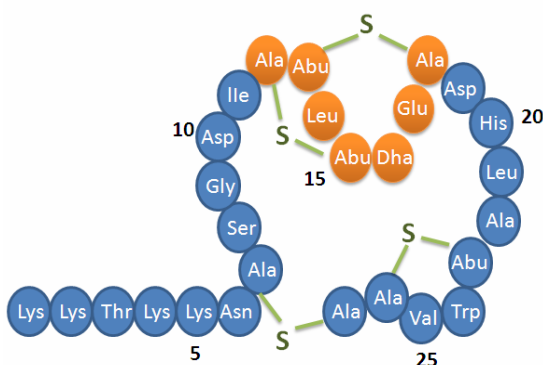


Figura 1.1: Estructura de la plantaricina C

### Purificación de la Plantaricina C

Para la purificación de esta bacteriocina, en la primera publicación en que se hace mención de la misma de González *et al.*, 1994, se creció *Lactobacillus plantarum* LL441 en medio líquido MRS (ver *Abreviaturas*) con 0,6% de glucosa a 30°C con agitación hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Dado que la Plantaricina C forma agregados de 100 kDa, fue necesario tratarla con disoluciones de urea 7 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1% o hervirla para desagregarla y posteriormente ultrafiltrarla en un diámetro de poro de 10 kDa. El filtrado se ajustó a un pH de 6,5 y se añadió sulfato amónico al 55% para la precipitación de la bacteriocina. Tras la centrifugación, el precipitado fue resuspendido en una disolución acuosa de acetonitrilo al 25% y tricloroacético (TCA) al 0,1% y se sometió a una cromatografía de fase reversa en una columna C<sub>8</sub>, empleando como fase móvil una disolución de acetonitrilo al 50% y TCA al 0,1%, eluyendo el péptido a un volumen de retención de 50 ml. Las fracciones que contenían la bacteriocina fueron recogidas y concentradas e inyectadas en un cromatografía de intercambio catiónico FPLC (significado de las siglas en *Abreviaturas*) con una columna Mono S, que fue equilibrada con un tampón 0,020 M de acetato de amonio a pH 5,3. La elución se realizó empleando el tampón de acetato de amonio 0,02 M a pH 5,3 y un gradiente en cloruro sódico de 0 a 1 M, con el que se realizó un gradiente del 0 al 100% y la bacteriocina eluyó aproximadamente al 50%.



La pureza de la plantaricina fue confirmada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, obteniéndose para ella un peso molecular aproximado de 3500 kDa por comparación con la cadena  $\beta$  de la insulina, de 3400 kDa, aunque en publicaciones posteriores (Turner *et al.*, 1999) se comprobó por espectrometría de masas que el peso molecular real de la molécula era de 2880 kDa.

## 2.2. ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS CON OTRAS BACTERIAS LÁCTICAS

Se hicieron ensayos con distintas cepas de los lactobacilos: *L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. paraplantarum*, *L. casei*, para comprobar si producían algún tipo de péptido que pudiese inhibir el crecimiento de los aislados del rumen. En el caso de las cepas de *L. reuteri*, a pesar de que producen reuterina mediante un método que se describirá más adelante, se ensayaron también sus caldos de cultivo, por si producían algún otro péptido que pudiera ser de utilidad.

Para ello, se inocularon cada una de las cepas en medio MRS en viales de 10 ml con 5 ml de medio y se dejaron creciendo en estufa de 37°C con 5% CO<sub>2</sub>(g) durante 24 horas. Dado que, en ocasiones, los lactobacilos no producen los péptidos antimicrobianos, se volvió a inocular a partir del primer cultivo nuevamente en las mismas condiciones sobre medio MRS. A partir del segundo cultivo se inocularon 500  $\mu$ l del cultivo crecido en 100 ml de medio MRS en matraces de 250 ml con tapón poroso y se dejaron crecer durante 24 y 48 horas en estufa de CO<sub>2</sub>(g) a 37°C. Estos dos tiempos de crecimiento se debieron a que la producción del péptido depende de cada una de las cepas y podría no observarse inhibición si el tiempo de crecimiento era demasiado corto o que el péptido perdiese actividad con un tiempo excesivo de cultivo.

Los cultivos se recogieron en viales de 50 ml y se centrifugaron a 35000 rpm durante 30 minutos para separar sobrenadante y células. El sobrenadante se ajustó a pH=6,2, de forma que no se pudiese observar inhibición por el pH del sobrenadante (que desciende en el medio de cultivo a pH $\leq$ 4,5). Se recogió una parte de dicho sobrenadante y se calentó a 60°C durante 15 minutos, para eliminar posibles fagos que pudiesen estar presentes en el sobrenadante, dado que también podrían dar lugar a halos de inhibición y a falsos resultados positivos.

Con los cultivos líquidos de las colonias aisladas, se prepararon placas de 5 cm con MRS sólido y tras su enfriamiento, se realizaron poros con pipetas pasteur estériles. En los poros, se añadieron los distintos sobrenadantes, tras el calentamiento y sin calentamiento. Las placas se dejaron incubando durante 24 horas en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>(g).

Al cabo de las 24h, en ninguno de los casos se observó la presencia de halos de inhibición.

### *Ensayos de producción de reuterina*

Para la obtención de reuterina, se siguió el protocolo descrito por Talarico *et al.*, 1988, con ligeras modificaciones.

Las cepas de *L. reuteri* se pusieron a crecer en medio MRS + 25  $\mu$ M de glucosa durante 16 horas a 37°C con agitación de 250 rpm.

Se inoculó 1 ml del cultivo de las cepas de *L. reuteri* en matraces de 250 ml sobre 100 ml de medio MRS y 25  $\mu$ M de glucosa y se incubaron durante 16 horas a 37°C sin agitación.

Tras su incubación, los cultivos fueron centrifugados a 2500 rpm durante 30 minutos en viales de 50 ml, eliminando el sobrenadante. Se realizaron dos lavados del precipitado que contenía las células con fosfato de sodio, y posteriores centrifugaciones a 3500 durante 10 minutos para

eliminar restos del medio de cultivo. Se eliminó el buffer fosfato y se añadieron 25 ml de una disolución de glicerol 250 mM sobre el pellet, se descompactó dicho pellet con pipeta y incubó a 37°C en la estufa de CO<sub>2</sub>(g) durante 48 horas.

Se centrifugaron los tubos a 3500 rpm durante 30 minutos para retirar el pellet formado por las células y obtener con el sobrenadante, en el que debería de mantenerse la reuterina, en caso de haberse producido. Se utilizaron Vivaspin de 30 kDa MWCO para el filtrado de dicho sobrenadante, dado que la reuterina tiene un peso molecular de 145 g/mol y podría atravesar el filtro, manteniendo las moléculas de mayor tamaño que pudieran interferir en el concentrado. El filtrado se almacenó en refrigeración a 4°C en viales estériles hasta su uso en las placas de inhibición.

Con los cultivos líquidos de los aislados del rumen, se prepararon placas de 5 cm con agar MRS. En el agar, tras enfriamiento, se realizaron poros con pipetas pasteur estériles, en los que se añadieron 50 µl de cada filtrado. Se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> (g) y no se observó ningún tipo de halo de inhibición en ninguno de los aislados.

### **3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

#### **3.1. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PLANTARICINA C**

##### ***Cultivo de *Lactobacillus plantarum* LL441***

*Lactobacillus plantarum* LL441 se cultivó en medio líquido MRS suplementado con 1% de glucosa en matraces estériles de 2 litros con un litro de medio de cultivo, a 200 rpm de agitación en un agitador orbital y a 30°C durante toda la noche.

##### ***Purificación de Plantaricina C***

Para proceder a la purificación de la plantaricina C se intentó seguir el protocolo referido en el artículo de González *et al.* (1995), pero se encontraron diversos inconvenientes, debido principalmente a que no se disponía exactamente del mismo material descrito en el trabajo. Por tanto se comenzó produciendo la proteína en las condiciones del apartado “Materiales y Métodos”, pero ajustándose al medio de cultivo y condiciones referidos en el artículo de Turner *et al.* (1999). El tiempo de incubación para obtener la densidad óptica necesaria correspondiente a la máxima cantidad de Plantaricina C fue en nuestro caso de 14 horas en lugar de las 21 horas citadas por González *et al.* (1995).

Para la separación de células y del medio de cultivo, dado que el volumen generado fue de 2 litros, en lugar de ultrafiltrar a 10000 de diámetro de corte, se procedió a realizar una centrifugación a 7000 rpm. Tras la centrifugación, se ajustó el pH del sobrenadante a 6,5, se realizó un ensayo de actividad y se precipitó con 55% de sulfato amónico, centrifugando y resuspendiendo el precipitado en tampón 20 mM de Bis-Tris a pH=6,5. El precipitado resuspendido fue dializado durante toda la noche, a 4°C, con agitación, en el mismo tampón.

Tras la diálisis, se añadió SDS al 0,1% para desagregar la plantaricina y se intentó ultrafiltrar con un diámetro de corte de 30 kDa, pero tras prueba de actividad en placa se observó que la bacteriocina quedaba en el concentrado en lugar de quedar en el filtrado. Se consideró que podía ser debido al incremento de tamaño ocasionado por la asociación con el SDS, ya que se unen 1,4 gramos de tensoactivo por cada gramo de proteína, y teniendo en cuenta que la proteína es altamente hidrofóbica, podría no haberse desagregado de zonas apolares de otras proteínas, con lo que el peso molecular sería muy superior al diámetro de poro mencionado.

Así, se recogió el concentrado y se intentó realizar una cromatografía FPLC basada en interacción hidrofóbica con una columna C<sub>8</sub>, para sustituir la cromatografía de fase reversa descrita por González *et al.* (1995), apareciendo dos nuevos problemas, por una parte la

aparición de un precipitado en la muestra y en el tampón A, ambos conteniendo SDS al 0,1%, al añadir sulfato amónico 1 M y un incremento en la presión del FPLC, debida a la obturación del filtro. Este efecto se debe presumiblemente a la alta concentración salina, dado que el SDS precipita en presencia de sales.

La muestra fue entonces dializada en las condiciones descritas previamente y se intentó nuevamente la misma cromatografía en ausencia de SDS, pero la Plantaricina no eluyó, sino que apareció en las fracciones de carga de la columna, también recogidas, hecho que se comprobó con ensayos de actividad en placa. No obstante esta fracción resultó ser más pura que la muestra original y por tanto se decidió proceder directamente a la cromatografía FPLC intercambio catiónico sobre ella, utilizando como tampones los descritos en el apartado Materiales y Métodos. Pero, nuevamente, la bacteriocina no fue retenida por la columna eluyendo con el volumen muerto.

Se preparó entonces un gel para ver en qué condiciones de pureza se encontraba la plantaricina, observándose en la zona de desarrollo electroforético de la muestra la ausencia de bandas definidas apareciendo sólo una distorsión a lo largo de toda la superficie (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), sin embargo en la zona de desarrollo en la que fue cargado el marcador se aprecia una banda clara y definida. En general, cuando en un gel de electroforesis aparecen distorsiones de este tipo, éstas pueden deberse a la alta concentración proteica, la presencia de sales o la presencia de lípidos en la muestra. Como la concentración de proteína cargada había sido limitada adecuadamente y la presencia de sales no era posible puesto que la muestra estaba dializada, se dedujo que había una alta concentración lipídica proveniente posiblemente de la ruptura de células durante el proceso de centrifugación. De esta forma, se decidió limpiar la muestra empleando metanol y cloroformo (Deutscher y Abelson, 1990), con una relación de volúmenes de 1:4:1:3 para muestra, metanol, cloroformo y agua respectivamente, conservándose una parte de ella para ver si tras este tratamiento no había cambios en la actividad. Se repitió entonces la electroforesis observándose la banda propia de la plantaricina C y muchas otras, de forma que la proteína no había quedado retenida en la columna cromatográfica, debido a la presencia de los lípidos, pero si conservaba la actividad, de forma que se decidió emplear este paso para la purificación.

Para lograr una desagregación efectiva de la proteína, se pensó entonces en emplear cloruro de guanidina 6 M, en sustitución de la urea 7 M tal y como estaba descrito por González *et al.* (1995), debido al riesgo que esta última puede representar sobre la actividad de la Plantaricina por la formación de iones cianuro tras la reacción. Así, tras la adición de cloruro de guanidina se ultrafiltró con un diámetro de poro de 10 kDa, observando que aparecía actividad en el filtrado en los ensayos de placas.

Tras realizar la ultrafiltración, se dializó durante toda la noche en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos* y se procedió a la cromatografía FPLC de Intercambio Catiónico. Se dializaron las fracciones nuevamente, se realizó una prueba de actividad (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.) para la selección de las fracciones adecuadas y se midió el diámetro del halo producido por cada fracción, se cuantificó la proteína en dichas fracciones (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.) y se procedió a la realización de una electroforesis en gel para comprobar si se había obtenido la purificación completa de la proteína.

Tras estas comprobaciones, se concentró el péptido mediante ultrafiltración en un diámetro de poro de 10 kDa.

#### *Prueba de actividad de la plantaricina: Test de difusión en agar*

Sobre una placa de Petri se inocularon con micropipeta y puntas estériles 100  $\mu$ l de un cultivo de *L. fermentum* (microorganismo control para comprobar la actividad de la Plantaricina C), sobre el que se añadió MRS agar, que se dejó previamente enfriar tras haberlo introducido en el microondas para que licuase. Se agitó unos minutos para homogeneizar la mezcla. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente y, una vez frío, se crearon pocillos en el medio sólido de la placa usando pipetas Pasteur de vidrio estériles. En los pocillos, se añadió el extracto de proteína y se introdujo en la estufa a 30°C durante 16 - 18 horas para su incubación.

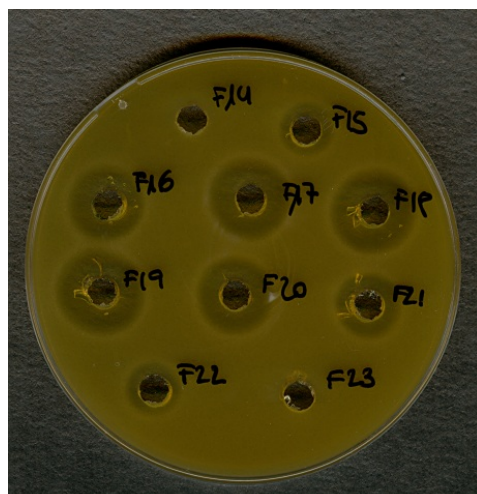


Figura 2.2.: Test de difusión en agar para selección de fracciones con actividad.

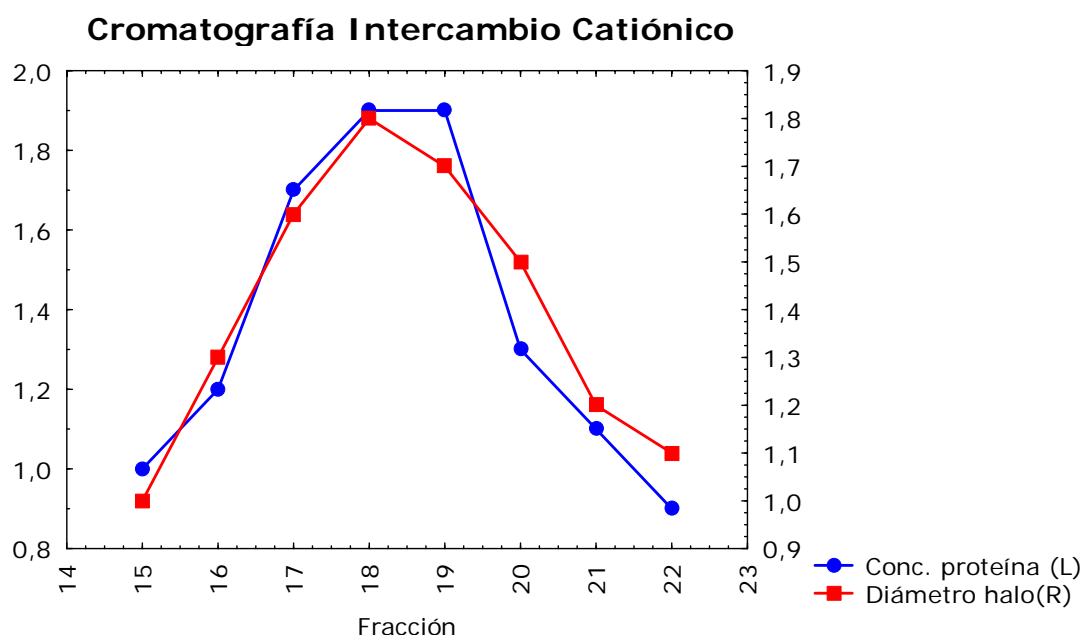


Figura 2.3: Representación gráfica concentración proteína (mg/ml) vs. Diámetro de halo en las fracciones de la cromatografía de Intercambio Catiónico.

De esta forma, el microorganismo crece en el medio de cultivo, dejando el medio opaco, dado que es microaerófilo y no precisa de mucho oxígeno para crecer. Si la plantaricina que hemos añadido en los pocillos es activa, habrá una zona alrededor del pocillo, en el agar, en que no podrá crecer *L. fermentum*, por la formación de poros en su membrana, y se observará un halo de inhibición transparente a su alrededor.

#### *Electroforesis en gel de Tricina SDS PAGE*

Las electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se realizaron en presencia de SDS (0,1%) y con tricina como componentes catódicos, (Schägger y von Jagow, 1987). Los parámetros T (% acrilamida y bisacrilamida) y C (% de la relación bisacrilamida/acrilamida) fueron 16,5% T - 3% C para el gel separador y 4% T - 3% C para el gel empacador. Se aplicó una corriente constante de 60 mA. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie durante 30 minutos y se destiñeron en disolución de metanol al 20%, ácido acético al 10 % en agua destilada, hasta obtener el contraste adecuado.

Con los cultivos líquidos de las colonias aisladas, se prepararon placas de 5 cm con MRS sólido y tras su enfriamiento, se realizaron poros con pipetas pasteur estériles. En los poros, se añadieron distintas concentraciones de plantaricina C purificada a homogeneidad, partiendo de una  $C_0 = 6,3$  mg/ml de péptido y con diluciones posteriores, tras el calentamiento y sin calentamiento. Las placas se dejaron incubando durante 24 horas en estufa a 37°C con 5% de  $CO_2(g)$ .

Al cabo de las 24h, en ninguno de los casos se observó la presencia de halos de inhibición.