

## **RESULTADOS CAPÍTULO 1**

### **Caracterización preliminar**

La bacteriocina cruda (sobrenadante de cultivo) producida por *Lactobacillus plantarum* LP31 fue caracterizada mediante pruebas enzimáticas y fisicoquímicas y estudiada en su actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas bacterianas. También se determinó el modo de acción hacia algunas cepas previamente seleccionadas (Simonetta y col.,1997). Los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización muestran que la actividad antimicrobiana del sobrenadante de cultivo es destruida totalmente mediante tratamiento con tripsina y pepsina, y parcialmente afectada por papaína, lipasa, lisozima, amiloglicosidasa y alfa amilasa, no siendo afectada por la acción de catalasa. (Tabla 1-1).

**Tabla 1-1: Caracterización enzimática y fisicoquímica del sobrenadante crudo de cultivo de LP31**

Tratamiento	Diámetro de la zona de inhibición (mm)					
	P. sp.	S.a.	L.m.	B.c.	B.m.	B.s.
Control	15	14	20	19	20	17
Catalasa	15	14	20	19	20	17
Papaína	10	11	(-)	13	12	12
<b>Pepsina</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lipasa	9	(-)	14	17	12	(-)
<b>Tripsina</b>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lisozima	11	(-)	10	16	16	14
Amiloglicos.	13	11	15	13	17	14
Alfa-amilasa	11	13	15	12	12	15
10 min 100 °C	15	14	20	19	20	17
30 min 100 °C	15	14	20	19	20	17
pH 4,5	20	17	23	25	25	24
pH 5,0	15	14	20	19	20	17
pH 5,5	15	14	20	19	20	17
pH 6,0	15	14	20	15	20	14
pH 6,5	15	14	20	(-)	(-)	(-)
pH 7,0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
etanol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Diámetro de los pozos: 7 mm. (-) No presenta zona de inhibición. P.sp.: *Pseudomonas* sp.; S.a.: *Staphylococcus aureus*; L.m.: *Listeria monocytogenes*; B.c.: *Bacillus cereus*; B.m.: *Bacillus megaterium*; B.s.: *Bacillus subtilis*.

La actividad antimicrobiana del sobrenadante de cultivo es estable a niveles de pH entre 5 y 6, sufriendo inactivación parcial a pH 6.5 y total a pH 7; a pH 4,5 la actividad inhibitoria se ve incrementada por efecto adicional de la acidez. La actividad inhibitoria no se reduce mediante tratamiento térmico a 100 °C durante 10-30 minutos y es eliminada por tratamiento con etanol (Tabla 1-1).

En cuanto al espectro antimicrobiano, la bacteriocina cruda producida por *Lactobacillus plantarum* LP31 no mostró actividad inhibitoria hacia el crecimiento de bacterias taxonómicamente próximas a ella, pertenecientes al género *Lactobacillus*, ni efecto antagónico hacia otras cepas de bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus*. Sin embargo, bajo las mismas condiciones, inhibió el crecimiento de bacterias Gram-positivas como: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, y Gram-negativas como *Pseudomonas* sp.; estos resultados están resumidos en la Tabla 2-1.

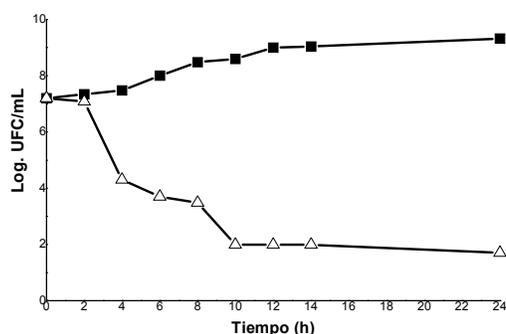
**Tabla 2-1: Espectro inhibitorio del sobrenadante crudo de cultivo de *L. plantarum* LP31**

Cepas indicadoras	Actividad antimicrobiana	Diámetro de la zona de inhibición (mm)
<i>Pseudomonas</i> sp. DBFIQ P 55 <sup>a</sup>	+	15
<i>Staphylococcus aureus</i> DBFIQ S 21 <sup>a</sup>	+	14
<i>Listeria monocytogenes</i> DBFIQ LM 3 <sup>a</sup>	+	20
<i>Bacillus cereus</i> DBFIQ B 28 <sup>a</sup>	+	19
<i>Bacillus megaterium</i> DBFIQ B19 <sup>a</sup>	+	20
<i>Bacillus subtilis</i> DBFIQ B11 <sup>a</sup>	+	17
<i>Lactobacillus plantarum</i> DBFIQ LP: 28 <sup>a</sup> , 41 <sup>a</sup> , 38 <sup>a</sup> , 22 <sup>a</sup>	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DBFIQ LB 42 <sup>a</sup>	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i> DBFIQ Lh15 <sup>a</sup>	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> DBFIQ <sup>a</sup> Sth33	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CRL G3 <sup>b</sup>	-	-

Diámetro de los pozos: 7 mm; (-): Ausencia de halo de inhibición. <sup>a</sup> Colección de la Cátedra de Microbiología, Fac. Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral, Argentina (FIQ-UNL). <sup>b</sup> Colección de CERELA, CONICET, Argentina (CRL).

A fin de determinar si el modo de acción del sobrenadante de cultivo crudo era bactericida o bacteriostático, se estudió la viabilidad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (*B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Pseudomonas* sp.) en presencia del sobrenadante. Cuando se añadió el sobrenadante de cultivo libre de células y concentrado de *L. plantarum* LP31 a un cultivo en fase logarítmica de una bacteria indicadora Gram-negativa como *Pseudomonas* sp., el número de células viables disminuyó desde  $2 \cdot 10^7$  a menos de  $10^2$  UFC/mL luego de 10 h de incubación. Se observó una rápida disminución en la viabilidad de *Pseudomonas* sp. entre las 2 y 4 horas de contacto, con una reducción progresiva de los sobrevivientes entre las 4 y 10 horas. Durante las últimas 14 horas de cultivo, la concentración celular permaneció prácticamente invariable. (Figura 1-1).

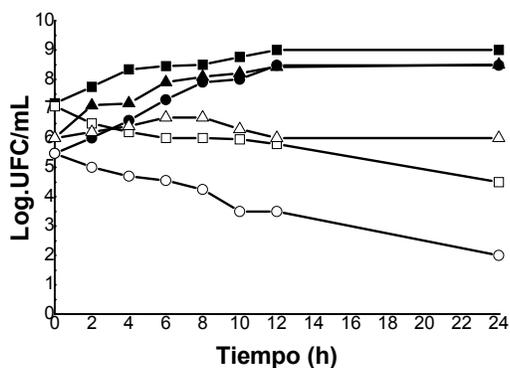
**Figura 1-1:** Modo de acción del sobrenadante crudo de cultivo de LP31 sobre un cultivo de *Pseudomonas* sp.



*Pseudomonas* sp. en Caldo Nutritivo (Cultivo testigo) (-■-)  
*Pseudomonas* sp. en caldo Nutritivo adicionado de sobrenadante crudo de LP31 (-△-)

En cuanto a la inhibición de cultivos proliferantes de cepas indicadoras Gram-positivas (*B. cereus*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*), durante las primeras 12 horas de incubación el número de células viables disminuyó desde  $2 \cdot 10^7$  a menos de  $1 \cdot 10^6$  UFC/mL para *S. aureus*, desde  $5 \cdot 10^5$  a menos de  $1 \cdot 10^4$  UFC/mL para *B. cereus*, y para *L. monocytogenes* se incrementó levemente (desde  $1 \cdot 10^6$  a  $7 \cdot 10^6$  UFC/mL) en las primeras 6-8 horas de cultivo, para descender al valor inicial de concentración celular luego de 12 horas de incubación. Entre las 12 y 24 horas los valores decrecieron hasta  $5 \cdot 10^4$  y  $1 \cdot 10^2$  UFC/mL, para *S. aureus* y *B. cereus* respectivamente, y la concentración celular permaneció invariable para *L. monocytogenes* (Fig. 2-1).

**Figura 2-1:** Modo de acción del sobrenadante crudo de LP31 sobre cultivos de bacterias Gram-positivas



*S. aureus* en Caldo Nutritivo (-■-), *B. cereus* en Caldo Nutritivo (-●-), *L. monocytogenes* en Caldo Nutritivo (-▲-), *S. aureus* en Caldo Nutritivo adicionado de sobrenadante de cultivo (-□-), *B. cereus* en Caldo Nutritivo adicionado de sobrenadante de cultivo (-○-), *L. monocytogenes* en Caldo Nutritivo adicionado de sobrenadante de Cultivo (-△-).

En los cultivos control el número de células viables de las cepas indicadoras aumentó progresivamente hasta aproximadamente  $1.10^8$ – $1.10^9$  UFC/mL luego de un período de incubación de 12 horas. Estos resultados muestran que el compuesto antibacteriano presenta un fuerte efecto bactericida frente a una cepa Gram-negativa (*Pseudomonas* sp) y a una Gram-positiva como *B. cereus*, un efecto bactericida menos intenso frente a una cepa de *S. aureus*, y sólo un efecto bacteriostático frente a una cepa de *L. monocytogenes*.

## **Purificación**

### **Extracción en fase sólida**

El líquido sobrenadante de cultivo crudo concentrado diez veces (50 mL), fue fraccionado empleando cartuchos Sep-Pak de C18 (Waters), volumen 35 mL, 10 g de adsorbente.

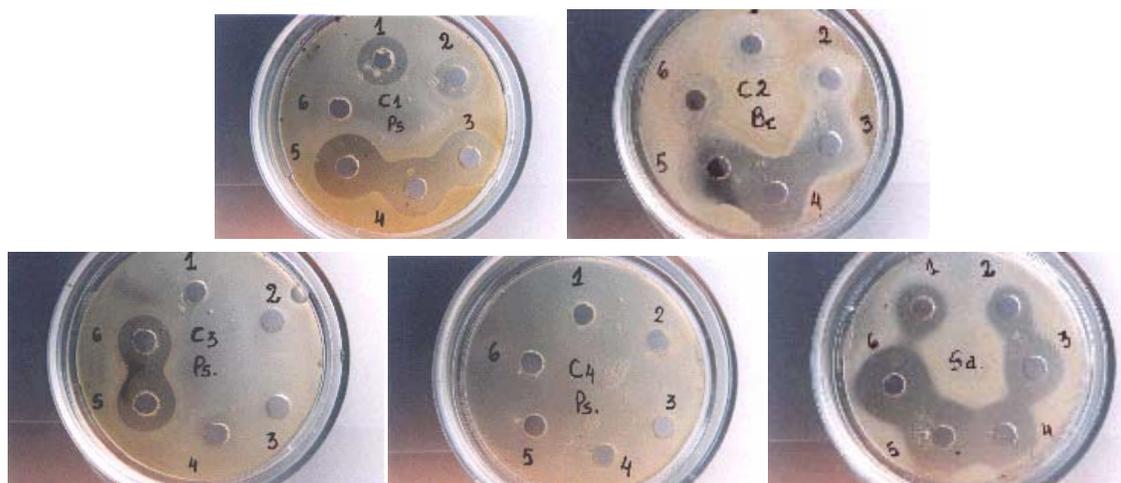
Las columnas fueron desarrolladas empleando mezclas (v/v) de agua y ACN, entre 0 y 80 % de solvente B. Solvente A: 0.1% TFA en agua; solvente B: 0.1% TFA en ACN. Las fracciones eluidas con las diferentes mezclas de solventes se concentraron y ensayaron en su actividad antimicrobiana frente a las cepas sensibles usadas de rutina (*Pseudomonas* sp., *B.cereus* y *S.aureus*). En total se realizaron 5 columnas sembrando 10 mL de sobrenadante de cultivo en cada una.

En la Tabla 3-1 se muestra la absorbancia a 215 y 280 nm de los diferentes eluatos de columna obtenidos durante el fraccionamiento con cartuchos de C18 y la actividad antimicrobiana de cada uno. Se puede observar en función de los resultados obtenidos, que durante el fraccionamiento se obtuvieron máximos de absorción a 215 y 280 nm en las fracciones correspondientes al 0%, 10%, 40% y 70 % de solvente B, los cuales son indicativos de un buen funcionamiento de la columna en cuanto a la separación; además, sólo se detectó actividad antimicrobiana significativa en la fracción acuosa (0% de solvente B).

**Tabla 3-1: Lecturas de absorbancia y actividad inhibitoria de los eluatos obtenidos del fraccionamiento con cartuchos sep-pack de C18.**

Fracción eluida (% de solvente B)	Absorbancia a 215 nm	Absorbancia a 280 nm	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
			<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
Eluido de siembra	0.037	0.005	(-)	(-)	(-)
<b>0</b>	<b>0.740</b>	<b>0.143</b>	<b>20</b>	<b>23</b>	<b>20</b>
5	0.211	0.033	(-)	(-)	(-)
10	0.568	0.100	(-)	(-)	(-)
20	0.355	0.052	(-)	(-)	(-)
30	0.212	0.028	(-)	(-)	(-)
40	1.822	0.506	(-)	(-)	(-)
50	0.448	0.114	(-)	(-)	(-)
60	0.344	0.070	(-)	(-)	(-)
70	0.546	0.076	(-)	(-)	(-)
80	0.362	0.045	(-)	(-)	(-)
Lavado de columna	1.760	0.255	(-)	(-)	(-)

En la Figura 3-1 se pueden observar los halos de inhibición correspondientes a las distintas fracciones eluidas de las columnas de C18.

**Figura 3-1: Halos de inhibición correspondientes a las fracciones obtenidas de las columnas de extracción en fase sólida de C18. Los pozos de cada caja están numerados en sentido horario**

**Caja 1** (césped de *Pseudomonas* sp.): pozos 1-5: fracciones de 0% de ACN (activas); pozo 6, lavado de las columnas.

**Caja 2** (césped de *Bacillus cereus*): pozos 1-5: fracciones de 0% de ACN (activas); pozo 6, actividad del sobrenadante de cultivo original.

**Caja 3** (césped de *Pseudomonas* sp): pozos 1 y 2, blancos de solvente A ( $H_2O$ ) y B (ACN) respectivamente; pozos 3 y 4, fracciones 10 y 20 % de ACN respectivamente; pozos 5 y 6, actividad del sobrenadante de cultivo original.

**Caja 4** (césped de *Pseudomonas* sp): fracciones 30 a 80 % de solvente ACN.

**Caja Sa**: (césped de *Staphylococcus aureus*): pozos 1-5: fracciones de 0% de ACN (activas), pozo 6, actividad del sobrenadante de cultivo original.

### Estimación del peso molecular de la Fracción I

Los ensayos de ultrafiltración realizados sobre la Fracción I mediante Membranas Amicon (valor de cut-off 3 kDa) permitieron recuperar el 80 % de la actividad en el filtrado (Figura 4-1). Este resultado sugirió que el peso molecular del compuesto activo era menor a 3000 Da.

**Figura 4-1:** Ensayo de inhibición sobre las muestras obtenidas de la ultrafiltración realizada sobre la Fracción I.

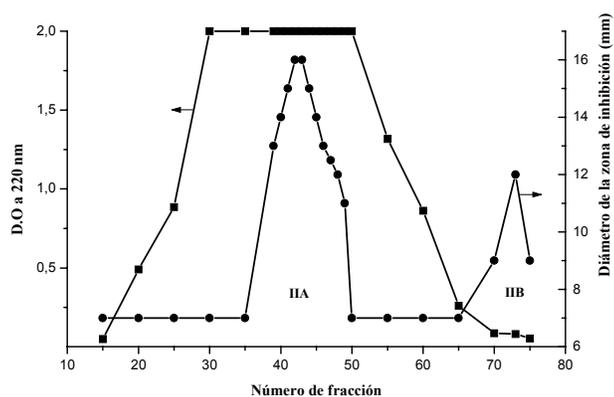


Los pozos se encuentran numerados del 1 al 6 en sentido horario: Pozos N° 1, 2, 3 y 4 de cada caja: halos de inhibición correspondientes al filtrado de la Membrana de Amicon (PM menor a 3000 Da): 18-10 mm para *Pseudomonas* sp. (Ps), 17-8 mm para *Staphylococcus aureus* (Sa) y 20-11 mm para *Bacillus cereus* (Bc). Pozos N° 5 y 6 de cada caja: volumen retenido de la misma membrana (PM mayor a 3000 Da).

### Cromatografía de filtración por geles de la Fracción I

Se realizó una cromatografía de filtración por geles empleando como soporte Sephadex G-25. El perfil de elución se monitoreó a 220 nm separando dos fracciones activas, Fracción IIA (tubos 37-50) y Fracción IIB (tubos 65-70) (Figura 5-1).

**Figura 5-1:** Cromatografía de filtración por geles (Sephadex G -25) de la Fracción I.



Absorbancia de las diferentes fracciones eluidas a 220 nm (■), perfil de la actividad antimicrobiana (-●-). Solvente de elución: buffer de acetato de amonio 30 mM, pH 5.

### Sensibilidad a proteasas de las Fracciones IIA y IIB

Sobre ambas Fracciones (IIA y IIB) se realizaron determinaciones de sensibilidad frente a enzimas proteolíticas. Los resultados (Tabla 4-1) indican claramente que la fracción IIA esta constituida por un compuesto de naturaleza proteica, ya que al igual que el sobrenadante de cultivo original, mostró que su actividad desaparece totalmente luego del tratamiento con tripsina y pepsina, y parcialmente luego del tratamiento con papaína. En la tabla 4-1 se muestran también nuevamente, para facilitar la comparación, los halos de inhibición obtenidos con el sobrenadante de cultivo tratado con las diferentes enzimas proteolíticas. Las fracciones IIA y IIB no tratadas (controles) y sometidas a tratamientos enzimáticos fueron evaluadas solamente frente a *Pseudomonas sp.* y *Bacillus cereus*.

**Tabla 4-1: Ensayos enzimáticos sobre las fracciones IIA y IIB.**

Tratamiento	Diámetro de la zona de inhibición (mm)					
	<i>P. sp.</i>	<i>S.a.</i>	<i>L.m.</i>	<i>B.c.</i>	<i>B.m.</i>	<i>B.s.</i>
Sobrenadante de cultivo (Control)	15	14	20	19	20	17
Sobrenadante de cultivo + Papaína	10	11	(-)	13	12	12
Sobrenadante de cultivo + Pepsina	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Sobrenadante de cultivo + Tripsina	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fracción IIA control	17	NE	NE	20	NE	NE
Frac. IIA + papaína	11	NE	NE	13	NE	NE
Frac. IIA + pepsina	(-)	NE	NE	(-)	NE	NE
Frac. IIA + tripsina	(-)	NE	NE	(-)	NE	NE
Frac. IIB control	17	NE	NE	20	NE	NE
Frac. IIB + papaína	17	NE	NE	19	NE	NE
Frac. IIB + pepsina	15	NE	NE	17	NE	NE
Frac. IIB + tripsina	14	NE	NE	16	NE	NE

Diámetro de los pozos: 7 mm. (-) No presenta zona de inhibición. NE: no ensayado. *P.sp.*: *Pseudomonas sp.*; *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *L.m.*: *Listeria monocytogenes*; *B.c.*: *Bacillus cereus*; *B.m.*: *Bacillus megaterium*; *B.s.*: *Bacillus subtilis*.

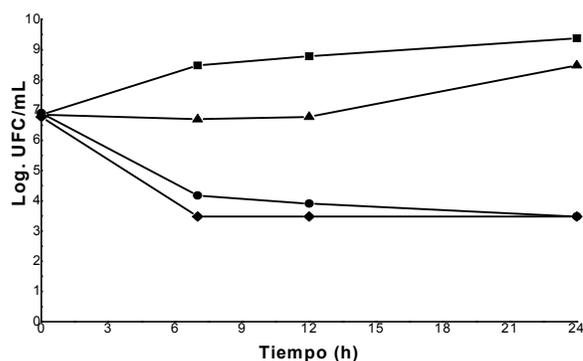
### Modo de acción de las Fracciones IIA y IIB sobre un cultivo proliferante de *Pseudomonas sp.*

De la misma manera, se monitoreó la viabilidad de *Pseudomonas sp.* frente a las fracciones IIA y IIB parcialmente purificadas; esta cepa fue seleccionada para los ensayos debido a que fue la más sensible frente al sobrenadante de cultivo crudo. Mediante esta evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de las dos fracciones se pudo observar que, para el cultivo proliferante de *Pseudomonas sp.* en

presencia de la Fracción IIA, en las primeras 12 h de incubación, el número de células viables disminuyó de  $8 \cdot 10^6$  a menos de  $8 \cdot 10^3$  UFC/mL.

Entre las 12 y 24 h estos valores permanecieron prácticamente constantes (Figura 6-1). En presencia de la Fracción IIB, la población celular disminuyó de  $7 \cdot 10^6$  a  $6 \cdot 10^6$  UFC/mL durante las primeras 12 h de cultivo, y frente a una mezcla de Fracción IIA y IIB (50 % de cada una), disminuyó de  $6 \cdot 10^6$  a  $3 \cdot 10^3$  UFC/mL. En el cultivo control, el número de células viables de la bacteria indicadora se incrementó progresivamente hasta aproximadamente  $6 \cdot 10^8$  UFC/mL, luego de un período de incubación de 12 h.

**Figura 6-1: Acción Inhibitoria de las fracciones IIA y IIB sobre un cultivo proliferante de *Pseudomonas* sp.**

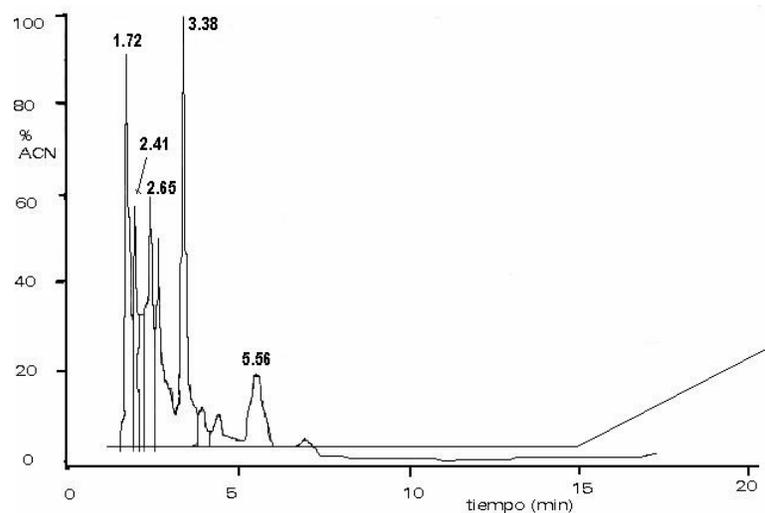


*Pseudomonas* sp (cultivo testigo) (■), *Pseudomonas* sp + Fracción IIA (●), *Pseudomonas* sp + Fracción IIB (▲), *Pseudomonas* sp + IIA (50%) + IIB (50%) (◆).

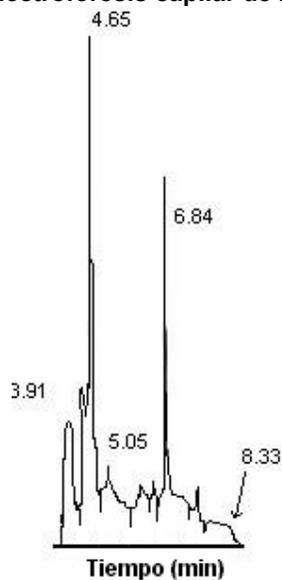
Estos resultados muestran que la actividad antimicrobiana estaría asociada con las dos fracciones. La Fracción IIA mostró un efecto netamente bactericida, la Fracción IIB un leve efecto bacteriostático y la mezcla de ambos (50% de cada una) una acción levemente sinérgica del efecto bactericida de la Fracción IIA sola. Sin embargo, debido a que la fracción IIB mantuvo su actividad a pesar del tratamiento con enzimas proteolíticas (Tabla 4-1) y a que presentó baja estabilidad (se conservó activa menos de un mes a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), se decidió centrar los estudios en la Fracción IIA.

### Análisis mediante HPLC y Electroforesis capilar de la Fracción IIA

En las figuras 7-1 y 8-1 se muestran los perfiles de elución correspondientes al análisis de la Fracción IIA mediante cromatografía líquida de alta performance y electroforesis capilar.

**Figura 7-1: HPLC analítico de la Fracción IIA.**

Tiempos de retención correspondientes a los picos de mayor porcentaje de área: 1.72 min (19 %); 2.41 min (14 %); 2.65 min (14 %); 3.38 min (21 %); 5.56 min (8%). Condiciones experimentales: Columna Waters de C18 (Delta Pak, 5 $\mu$ m, 300 Å, 3,9 x 150 mm). Modo isocrático, 3% solvente B (ACN/0.1 %TFA) (15 min), 3-60% solvente B (30 min). Velocidad de flujo 0.5 mL/min. Detección: 220 nm.

**Figura 8-1: Electroforesis capilar de la Fracción IIA.**

Tiempos de migración correspondientes a los picos de mayor porcentaje de área: 3.91 min (12 %); 4.65 min (33 %); 5.05 min (12 %); 6.84 min (17 %); 8.33 min (5%). Condiciones experimentales: Capilar de 70 cm x 45  $\mu$ m, buffer tetraborato de sodio 20 mM, pH 8. Tiempo de inyección: 2 seg. Detección: 220 nm.

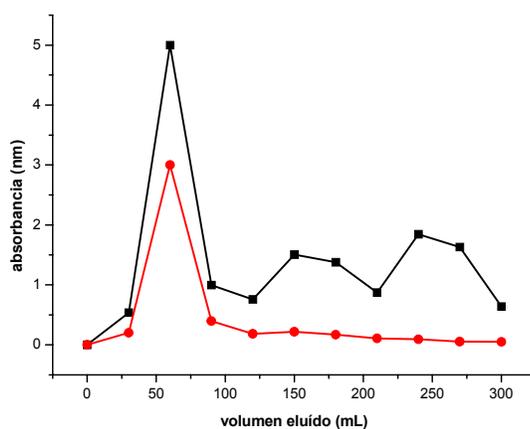
Se puede apreciar en el cromatograma y en el electroferograma anteriores que la Fracción IIA activa presenta composición compleja.

Si bien los fundamentos de ambas técnicas analíticas son diferentes, en ambos se aprecia que la Fracción IIA presenta entre 5 a 6 compuestos mayoritarios.

### Cromatografía de intercambio catiónico

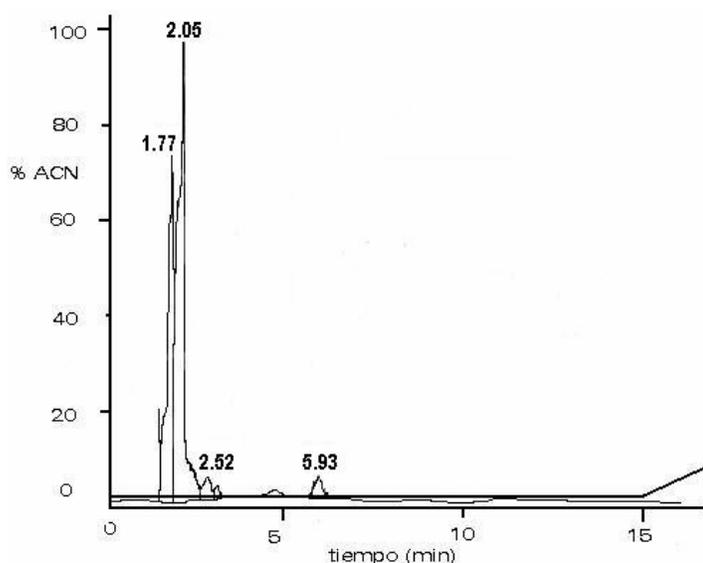
Se puede observar en la Figura 9-1 la evolución de la absorbancia de los eluatos obtenidos de la cromatografía de intercambio catiónico preparativa realizada sobre la Fracción IIA a 220 y 280 nm. La fracción con actividad antimicrobiana eluyó dentro de los primeros 25 mL, es decir al 0% de solvente B.

**Figura 9-1:** Fraccionamiento por Intercambio catiónico de la Fracción IIA (activa).

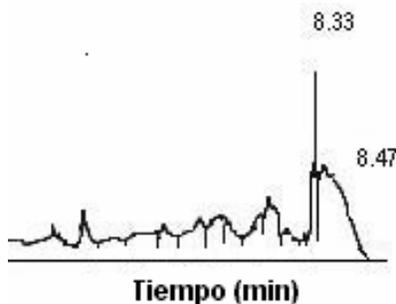


Condiciones experimentales: Absorbancia a 220 nm (-■-), absorbancia a 280 nm (-●-). Columna de intercambio catiónico débil CG-50 (resina de poliestireno de 100-200  $\mu\text{m}$ , Sigma), 2.4x10 cm, equilibrada con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6.8 (solvente A). Volumen de fracción IIA sembrada: 13 mL. La columna fue desarrollada a 20 °C, mediante un gradiente de 0 al 80 % de solvente B (buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6.8 en NaCl 1M) en solvente A (buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6.8). Velocidad de flujo: 1 mL/min.

La fracción activa presentó los siguientes halos de inhibición frente a las cepas sensibles usadas de rutina: 13 mm para *Pseudomonas* sp, 14 mm para *Bacillus cereus*, 12 mm para *Staphylococcus aureus*. En las figuras siguientes se muestra el perfil cromatográfico de la fracción activa obtenido mediante HPLC (Figura 10-1) y el electroferograma de la misma fracción (Figura 11-1).

**Figura 10-1: HPLC analítico de la fracción al 0% Solvente B (activa).**

Tiempos de retención correspondientes a los picos de mayor porcentaje de área: 1.77 min, (24 %), 2.05 min, (61 %); 2.52 min (3.7 %) y 5.93 min (4 %). Condiciones experimentales: Columna Waters de C18 (Delta Pak, 5 $\mu$ , 300 Å, 3,9 x 150 mm). Gradiente: isocrático, 3% solvente B (ACN/0.1 %TFA) (15 min), 3-60% solvente B (30 min). Velocidad de flujo: 0.5 mL/min. Detección: 220 nm.

**Figura 11-1: Electroforesis capilar de la fracción 0 % solvente B (activa).**

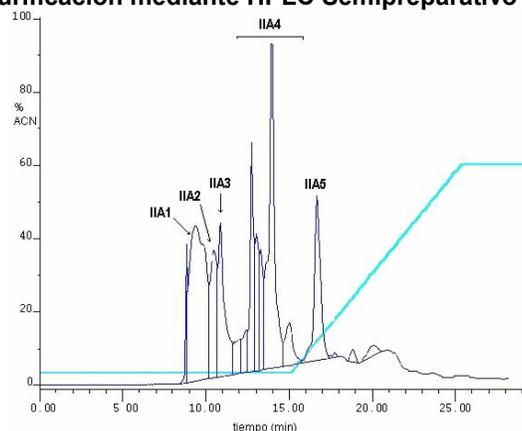
Tiempos de migración correspondientes a los picos de mayor porcentaje de área: 8.33 min, (10.2 %) y 8.47 min, (29.2 %). Condiciones experimentales: Capilar de 70 cm x 45  $\mu$ m, buffer tetraborato de sodio 20 mM, pH 8. Tiempo de inyección: 2 seg. Detección 220 nm.

### Purificación de la Fracción IIA por HPLC Semipreparativo

En la Figura 12-1 se puede apreciar el perfil de elución obtenido al realizar la cromatografía semipreparativa sobre la Fracción IIA. Se obtuvieron los tres primeros picos por separado (IIA<sub>1</sub>, IIA<sub>2</sub>, IIA<sub>3</sub>), ya que en esa zona se sospechaba que podía encontrarse la actividad, teniendo en cuenta que durante la extracción en fase sólida de C18 la fracción activa eluyó al 0 % de ACN.

Luego se reunieron los picos eluidos entre 11'-15' y entre 15'-20' en las fracciones IIA<sub>4</sub> y IIA<sub>5</sub> respectivamente. La máxima actividad antimicrobiana se obtuvo en la zona correspondiente al pico IIA<sub>1</sub>, con los siguientes resultados (halos de inhibición): 12 mm frente a *Pseudomonas* sp., 20 mm frente a *Bacillus cereus*, 16 mm frente a *Staphylococcus aureus*.

**Figura 12-1: Purificación mediante HPLC Semipreparativo de la Fracción IIA.**



Tiempos de retención correspondientes a los picos de mayor porcentaje de área: 9.31 min (14 %); 10.35 min (8 %); 10.85 min (7 %); 12.05 min (11 %); 13.57 min (12 %); 14.49 min (10 %); 17.97 min (23 %). Condiciones experimentales: Columna, C18 (Vydac, 10 x 250 mm, 10 µm, 300 Å). Gradiente: isocrático, 3% solvente B (ACN/TFA) (15 min), 3-60% solvente B (30 min). Velocidad de flujo: 0.5 mL/min. Detección: 220 nm.

En la Tabla 5-1 se presentan los datos obtenidos durante el seguimiento de la purificación desde el sobrenadante de cultivo inicial hasta la fracción IIA<sub>1</sub> activa, obtenida por HPLC.

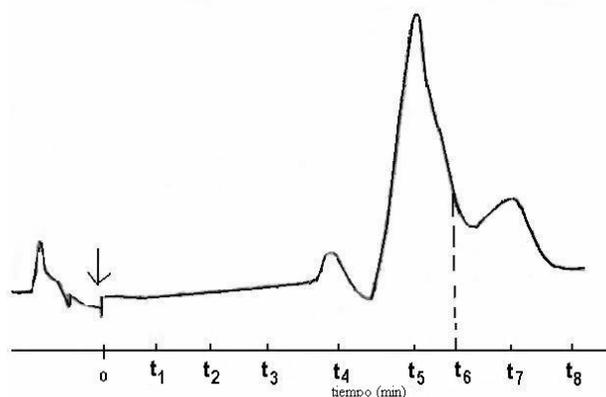
**Tabla 5-1: Monitoreo de la purificación mediante medición de la actividad específica**

Fracción	Volumen (mL)	Actividad (UA/mL)	Actividad Total <sup>1</sup> (UA)	Proteína <sup>2</sup> (µg/mL)	Proteína Total (µg)	Actividad Específica <sup>3</sup>	Recup. <sup>4</sup> (%)
Sobrenadante libre de células	50	125	6.250	1.461	73.073	0.08	100
Pool de Sep-Pack cartridges (C18)	38	125	4.750	21	798	5.95	76
Fracción(I)							
Pool de G-25							
Fracción (IIA)	22	250	5.500	4.2	92.6	59.3	88
Pool HPLC							
Fracción (IIA <sub>1</sub> )	8	375	3.000	0.74	5.92	506	48

<sup>1</sup>Actividad total: determinada frente a las cepas usadas de rutina, mediante la multiplicación del volumen por la actividad. <sup>2</sup>Concentración de proteína: determinado mediante el método Bradford. <sup>3</sup>Actividad Específica: unidades de actividad por la concentración de proteína. <sup>4</sup>Rec % (Recuperación): es la actividad total expresada como porcentaje de la actividad total inicial.

La pureza de la Fracción IIA<sub>1</sub> activa se controló mediante HPLC empleando una columna de C18, Kromasil (150 x 10 mm, 100 Å, 5µ), en modo isocrático con agua Milli Q conteniendo 0.1 %TFA (Figura 13-1). Se recolectaron manualmente, fracciones de 1,6 mL numeradas como t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub>, t<sub>3</sub>, t<sub>4</sub>, t<sub>5</sub>, t<sub>6</sub> y t<sub>7</sub>, sobre las cuales se realizaron análisis por Espectrometría de masas.

**Figura 13-1: HPLC Analítico de la Fracción IIA<sub>1</sub>.**

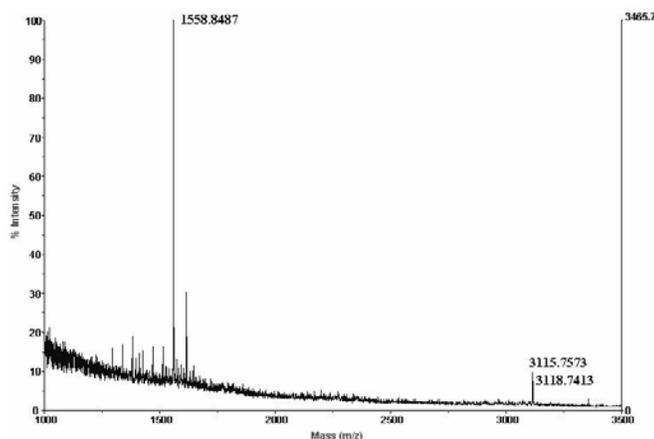


Condiciones experimentales: Columna Kromasil de C18 (150 x 10 mm, 100 Å, 5µm), con gradiente isocrático del 0% de solvente A (agua /0.1 %TFA). Velocidad de flujo 0.8 mL/min. Detección: 220 nm.

## Caracterización del péptido mayoritario

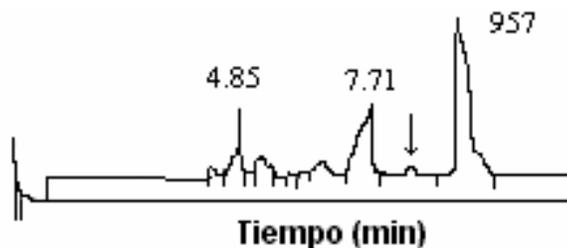
### Espectrometría de masas y Electroforesis capilar

Mediante análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF) de las fracciones t<sub>1</sub> a t<sub>7</sub>, solamente se encontraron en la fracción t<sub>6</sub> dos picos mayoritarios de masa 1.558 y 3115.75 Da, respectivamente (Figura 14-1). En Las fracciones restantes no se detectó la presencia de compuestos con peso molecular superior a 800 Da (límite de sensibilidad del equipo).

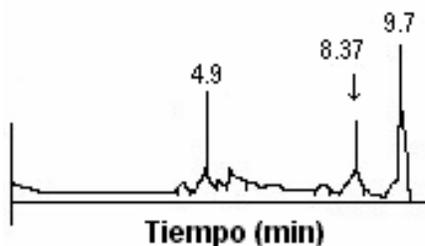
**Figura 14-1: MALDI-TOF de la Fracción IIA<sub>1-6</sub>.**

Las muestras  $t_4$ ,  $t_5$ ,  $t_6$  y  $t_7$  obtenidas de la columna Kromasil fueron redisueltas en el mínimo volumen de agua ultrapura y se les determinó del contenido proteico (método Bradford) con los siguientes resultados:  $t_4$ : 0  $\mu\text{g/mL}$ ,  $t_5$ : 1  $\mu\text{g/mL}$ ,  $t_6$ : 3,8  $\mu\text{g/mL}$  y  $t_7$ : inferior a 2,0  $\mu\text{g/mL}$ .

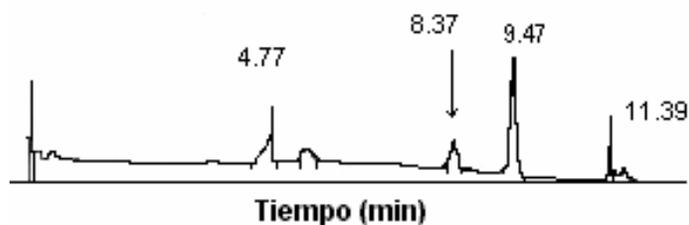
Por otro lado, mediante electroforesis capilar, solamente se pudo detectar absorbancia a 220 nm en las muestras correspondientes al pico que se presenta entre las fracciones  $t_5$ ,  $t_6$  y  $t_7$  (Figuras 15-1a, 15-1b, 15-1c).

**Figura 15-1a: Electroforesis capilar de la muestra  $t_5$ .**

Tiempos de migración correspondientes a los picos de mayor porcentaje de área: 4.85 min (5 %); 7.71 min (20 %); 9.57 min (60 %). Condiciones experimentales: Capilar de 70 cm x 45  $\mu\text{m}$ , buffer tetraborato de sodio 20 mM, pH 8. Tiempo de Inyección: 2 seg. Detección: 220 nm.

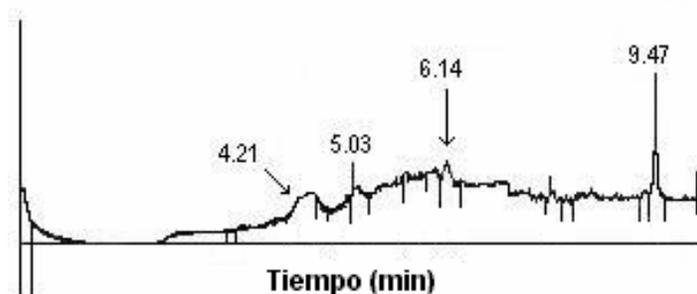
**Figura 15-1b: Electroforesis capilar de la muestra t<sub>6</sub>.**

Tiempos de migración correspondientes a los picos de mayor porcentaje de área: 4.9 min (4.2 %); 8.37 min (1.3 %); 9.7 min (30 %). Condiciones experimentales: Capilar de 70 cm x 45  $\mu$ m, buffer tetraborato de sodio 20 mM, pH 8. Tiempo de Inyección: 2 seg. Detección: 220 nm.

**Figura 15-1c: Electroforesis capilar de la muestra t<sub>7</sub>.**

Tiempos de migración correspondientes a los picos de mayor porcentaje de área: 4.77 min (8.1 %); 8.37 min (4.2 %); 9.47 min (23 %); 11.39 min (1.9 %). Condiciones experimentales: Capilar de 70 cm x 45  $\mu$ m, buffer tetraborato de sodio 20 mM, pH 8. Tiempo de Inyección: 2 seg. Detección: 220 nm.

En función de la importancia dada a la muestra t<sub>6</sub> se repitió el electroferograma pero con detección a 280, para determinar la presencia de aminoácidos aromáticos en la misma (Figura 16-1).

**Figura 16-1: Electroforesis capilar de la muestra t<sub>6</sub> a 280 nm.**

Tiempos de migración correspondientes a los picos de mayor porcentaje de área: 4.21 min (3.5 %); 5.03 min (1.5 %); 6.14 min (1.1 %); 6.39 min (1 %); 9.47 min (2.9 %). Condiciones experimentales: Capilar de 70 cm x 45  $\mu$ m, buffer tetraborato de sodio 20 mM, pH 8. Tiempo de inyección: 2 seg. Detección 280 nm.

Se observa en la figura anterior la ausencia de absorbancia a 280 nm del pico  $t_6$  en la zona comprendida entre los tiempos de migración 7-9.

### **Análisis de aminoácidos y Secuenciamiento**

El análisis de aminoácidos de una alícuota de la fracción  $t_6$  dio los siguientes valores en nmoles: N: 3.999; T: 3.392; S: 4.225; E: 14.420; G: 4.421; A: 7.794; V: 1.332; M: 0.356; H: 0.906; K: 8.584; R: 2.675. Estos valores son compatibles con la composición que se muestra en la Tabla 6-1, estableciéndose que dicha molécula contiene al menos 14 residuos aminoacídicos.

**Tabla 6-1: Composición aminoacídica del péptido mayoritario (Fracción  $t_6$ )**

Aminoácido	nmol	Residuos por molécula
A	7.79	2
R	2.67	1
N	3.99	1
E	14.4	4
G	4.42	1
H	0.90	-
K	8.58	2
M	0.35	-
S	4.23	1
T	3.39	1
V	1.33	-