

Preferencia conformacional y actividad antimicrobiana de un análogo sintético de Plantaricina 149

Müller, D.M.¹; Carrasco, M.S.²; Simonetta, A.C.²; Campana, P.T.³; Beltramini, L.M.³; Tonarelli, G.G.¹

1- Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (U.N.L). Ciudad Universitaria - Paraje El Pozo, C.C. 242- Santa Fe, Argentina.

2- Cát. de Microbiología y Biotecnología, Dpto. de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral (U.N.L). Santiago del Estero 2829. Santa Fe, Argentina.

3- Dpto. de Física e Informática, Grupo de Biotísica Molecular, Instituto de Física de São Carlos-São Paulo-Brazil.

RESUMEN: Plantaricina 149 es una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* NRIC 149, cepa aislada de muestras de ananá [Kato, T y col. (1994)]. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la estructura conformacional y el espectro de inhibición de un análogo sintético identificado como Pin149a, a fin de contribuir al conocimiento de este tipo de bacteriocinas, considerando sus potenciales aplicaciones como biopreservadores de alimentos. El análogo presentó actividad inhibitoria hacia una cepa de *Staphylococcus aureus* coagulasa (+) y cuatro cepas del género *Listeria*, a pH 7.4 y 5.5. Los estudios por DC indican que el péptido no está estructurado en solución acuosa, pero que en presencia de trifluoretanol y particularmente en micelas inversas de AOT se produce un notable aumento en el contenido de α -hélice.

El elevado carácter catiónico de Pin149a conjuntamente con su estructura helicoidal anfipática estarían relacionados con su actividad antimicrobiana.

Palabras clave: péptido antimicrobiano; Plantaricina 149; dicroísmo circular; α -hélice.

SUMMARY: Conformational preference and antimicrobial activity of a synthetic analog of Plantaricin 149. Müller, M.M.¹, Carrasco, M.S.², Simonetta, A.C.², Campana, P.T.³, Beltramini, L.M.³, Tonarelli, G.G.¹. Plantaricin-149 is a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149 which was isolated from pineapple [Kato, T et al (1994)]. The aim of this work was to study the conformational structure and the inhibition spectrum of a synthetic Plantaricin 149 analog identified as Pin149a in order to contribute to the general knowledge of this type of bacteriocins, which have potential applications as food biopreservatives. The analog showed inhibitory activity against one strain of *Staphylococcus aureus* coagulase (+) and four strains of *Listeria* at pH 7.4 and 5.5.

CD studies have shown that the peptide is unstructured in aqueous solution, but in the presence of trifluoroethanol and reversed micelles of AOT in particular, a remarkable increase in the α -helix content was detected.

The high cationicity combined with an amphipathic alpha helical structure may be related to Pin149a antimicrobial activity.

Keywords: antimicrobial peptide; Plantaricin 149; circular dichroism; α -helix.

* Correspondencia:

Georgina G. Tonarelli, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, U.N.L., C.C. 242, C.P. 3000 Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina.
E-mail: tonarelli@fcb.unl.edu.ar
Tel: 54-342-4575206 int.224, Fax: 54-0342-4575221

Introducción

Las bacterias del ácido láctico (LAB) producen extracelularmente péptidos antimicrobianos denominados bacteriocinas. La familia de las bacteriocinas incluye una gran diversidad de péptidos en términos de peso molecular, estructura primaria, secundaria y espectro antimicrobiano [1, 2].

Dada su potencial aplicación como biopreservadores alimentarios, es importante estudiarlas a nivel estructural a fin de entender mejor el modo en que actúan. Entre las LAB, existe particular interés en las cepas de *Lactobacillus plantarum*, debido a su uso como bacterias *starter* para la fermentación de productos vegetales, cárnicos y de pescados [3]. Se han aislado y caracterizado parcialmente algunas bacteriocinas de cepas de *Lactobacillus plantarum*, procedentes de diversos alimentos tales como carne y productos derivados; entre las más importantes se encuentran: Plantaricina A [4], Plantaricina E/F y J/K [5], Plantaricina C [6], Plantaricinas S y T [7], Plantaricina SA6 [8], Plantaricina KW30 [9], Plantaricina D [10], Plantaricina 149 [11], Plantaricina 1.25 (alfa y beta) [12], Plantaricina C19 [13], Plantaricina W (alfa y beta) [14], Plantaricina 35D [15] y Plantaricina NC8 [16].

En general son activas contra especies bacterianas relacionadas estrechamente a la cepa productora desde el punto de vista taxonómico, presentando una amplia variedad estructural, lo que no permite agruparlas en una única clase de bacteriocinas.

Solamente algunas plantaricinas han sido purificadas y secuenciadas en forma completa; consecuentemente, a excepción de Plantaricina A, Plantaricina E/F, Plantaricina J/K, y Plantaricina C, la información disponible sobre estructura secundaria de bacteriocinas producidas por cepas de *Lactobacillus plantarum* es limitada.

Plantaricina 149 es producida por la cepa de *Lactobacillus plantarum* NRIC 149 aislada de muestras de ananá. Es un péptido de 22 residuos aminoácidos, de naturaleza catiónica, termoestable, sensible a papaina, tripsina y pepsina y su actividad es pH-dependiente (máxima a pH 5). Su espectro inhibitorio es amplio frente a géneros y especies de bacterias ácido lácticas: *L. plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*,

Lactobacillus helveticus, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *P. cerevisiae*, *Enterococcus hirae* y *Lactococcus* [11].

L. plantarum C11 produce tres variantes de Plantaricina A con 26, 23 y 22 residuos aminoácidos, denominadas Pln A-26, Pln A-23 y Pln A-22. Los tres péptidos presentan actividad antimicrobiana y de ferohormona [17]. Pln A-22 posee un espectro de inhibición dirigido fundamentalmente hacia cepas cercanas a la cepa productora (*L. plantarum* C11): *L. plantarum*, *L. casei*, *L. sake*, *Pediococcus pentosaceus*, *Carnobacterium piscicola*, y estructuralmente presenta un 89 % de homología de secuencia con Plantaricina 149 [4].

Para la mayoría de estas bacteriocinas, el mecanismo de interacción péptido-membrana involucra la adsorción sobre la superficie de la célula bacteriana y el paso de una conformación no estructurada soluble a una de tipo α -hélice; luego ocurre la inserción de dicha hélice en la membrana celular y en algunos casos la asociación con otras moléculas de bacteriocina cercanas [18]. El estudio de todos estos eventos requiere del desarrollo de técnicas específicas, como sistemas micelares, las que difieren de otras más convencionales usadas en soluciones homogéneas. El sistema de micelas inversas representa una de las estructuras intermedias que se observan durante el acomodamiento de la bicapa lipídica de la célula viva [19, 20].

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la actividad antimicrobiana y la estructura conformacional de un análogo sintético de Plantaricina 149, identificado como Pln149a, en diferentes medios (acuosos y orgánicos), a fin de contribuir al conocimiento general de este tipo de bacteriocinas. La síntesis se realizó de acuerdo con la secuencia reportada por Kato y col. [11], mediante química en fase sólida, empleando la estrategia del 9-fluorenil-metiloxycarbonilo (Fmoc), funcionalizándose el extremo C-terminal como amida, a diferencia del péptido nativo. La actividad antimicrobiana se ensayó mediante el método de difusión en agar. Se realizaron estudios conformacionales por DC en medios acuosos, en presencia de solventes orgánicos y de micelas inversas de AOT, un sistema que simula a la membrana celular bacteriana.

Materiales y métodos

Síntesis de Plantaricina 149

El análogo de Plantaricina 149 (Pln149a) fue sintetizado mediante química en fase sólida [21] empleando la estrategia del 9-fluorenil-metiloxycarbonilo (Fmoc), bajo la forma de péptido C-terminal carboxamida, según la secuencia reportada en la bibliografía [11]: YSLQMGATAIKQVKKLFKKKGG. Como soporte sólido se utilizó una resina tipo Rink 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi-resina (Novabiochem, USA) y la síntesis se realizó en forma manual. Los Fmoc aminoácidos (Novabiochem, USA) se acoplaron al soporte sólido utilizando PyBOP, en presencia de NMM como catalizador. El grupo Fmoc fue eliminado en las etapas de desprotección empleando piperidina al 20% en DMF. Los solventes usados fueron de calidad grado HPLC. El monitoreo de las reacciones se realizó por los métodos convencionales para este tipo de síntesis [22, 23].

El péptido fue desprotegido y simultáneamente separado de la resina en un único paso empleando una mezcla de TFA/EDT/H₂O/TIS (94.5/2.5/2.5/1) (v/v). El producto de síntesis fue separado de la mezcla de reacción por precipitación con éter etílico a 4°C, centrifugación y liofilización.

Purificación y caracterización del producto de síntesis

El producto de síntesis fue analizado y purificado por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) en un Equipo analítico-semipreparativo marca Gilson (USA), con detector UV-Vis.

Para la purificación se empleó una columna Vydac C18 (250 x 10 mm, 300 Å, 10µ), equilibrada con dos sistemas solventes: (A) TFA/H₂O 0.1% y (B) ACN/H₂O conteniendo 0.1%TFA. Se utilizó el siguiente programa de gradientes: 10-25 % B, 5 min; 25-40 % B, 20 min. y 40-60 % B, 5 min; velocidad de flujo 2mL/min, volumen de inyección 1 mL, detección UV a 220 nm.

Los diferentes picos fueron colectados y se ensayó su actividad antimicrobiana.

El análisis de pureza se realizó por HPLC empleando una columna analítica de C₁₈ (Delta Pak, 5 µ, 300 Å, 3.9 x 150 mm), equilibrada con los solventes A y B, y empleando condiciones de elución similares a las descritas para su purificación.

Espectrometría de masas y Secuenciamiento

El espectro de masas MALDI-TOF de Pln149a pura se obtuvo en un equipo Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Perseptive Biosystems), equipado con un láser de nitrógeno que opera a 337 nm.

Se empleó una solución matriz preparada mediante disolución de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en una mezcla de ACN/agua (70/30, v/v) con 1 µL de TFA. Se utilizaron 2 µL de una mezcla 1:1 de solución matriz a muestra para la realización del espectro. El equipo se calibró externamente con una mezcla de péptidos standards, Cal Mix 1 y 2 de Applied Biosystems. La secuencia de Pln149a pura fue confirmada mediante degradación de Edman automática empleando un secuenciador Shimadzu PPSQ-23 A.

Ensayos de actividad antimicrobiana

Cepas utilizadas y modo de conservación:

De la colección de la Cátedra de Microbiología (FIQ, Universidad Nacional del Litoral, Argentina) se utilizaron: cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum* identificadas como DBFIQ LP 22, DBFIQ LP 28, DBFIQ LP 38 y DBFIQ LP 41; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DBFIQ LB 42; *Pseudomonas* sp. DBFIQ P 55; *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21; *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3; *Bacillus cereus* DBFIQ B 28; y cuatro cepas del género *Enterococcus* identificadas como DBFIQ E 13; DBFIQ E 23; DBFIQ E 24 y DBFIQ E 25. De la colección de CERELA (CONICET, Argentina): *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL G3. De la American Type Culture Collection: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. De la colección del Departamento de Tecnología (Universidad Nacional de Luján, Argentina): tres cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* identificadas como NCDO 529, DTUNLu 223 y DTUNLu 245; *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* NCDO 543; *Listeria monocytogenes* tipo I DTUNLu 328; *Listeria monocytogenes* DTUNLu 335 BsAs; *Listeria seeligeri* DTUNLu 340.

Todas estas cepas fueron liofilizadas y conservadas en freezer a -20° C en Caldo Nutritivo (Merck) para las bacterias no lácticas, mientras que para las bacterias lácticas se usó Caldo MRS (Merck) o Caldo M17 (Merck), en todos los casos con el agregado de 15 % de glicerol a los respectivos medios, como agente crioprotector.

Condiciones de Cultivo

Previo a su uso, las bacterias no lácticas fueron propagadas 12-16 h a 37°C en Caldo Nutritivo (Merck), mientras que las LAB usadas como indicadores se propagaron también 12-16 h a 37°C en Caldo MRS (Merck) o en Caldo M17 (Merck).

Ensayo de difusión en agar

Para la detección de actividad antimicrobiana se usó el ensayo de difusión en agar [24], para lo cual se agregó 1 mL del cultivo de 12-16 h de cada cepa prueba usada a 19 mL de Agar Nutritivo (Difco), vertiéndolos luego en una placa de Petri estéril. Después de solidificar a temperatura ambiente, se realizaron pozos de 7 mm de diámetro en las placas, y se colocaron 80 μ L de solución acuosa de Pln149a 0.42 M, pH 5, en cada pozo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y luego se midieron los diámetros correspondientes a los halos de inhibición. La actividad antimicrobiana se determinó siempre a pH 5, excepto para las cepas de *L. monocytogenes* DBFIQ LM 3 y *S. aureus* DBFIQ S 21, con las cuales se realizaron además ensayos de inhibición a pH 7.4, en buffer fosfato de sodio 50 mM. Cada ensayo fue realizado por triplicado, y los resultados se expresaron como el promedio de los valores medidos.

Se determinó también el título del análogo sintético frente a *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3 y *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21, el cual se define como la recíproca de la mayor dilución de una solución de la muestra, con la cual se observa inhibición de la cepa indicadora. Se partió de una solución 1 mg/mL de Pln149a y las diferentes muestras obtenidas por dilución fueron evaluadas por el ensayo de difusión en agar, siguiendo la metodología descrita anteriormente. El título se expresó como unidades arbitrarias de actividad por mililitro de solución de Pln 149a (AU/mL) [1, 25].

Ensayos de inhibición de cultivos bacterianos en medio líquido

A fin de estudiar el efecto de Pln149a sobre las células sensibles, se agregó 1 mL de una solución 0.84 M del péptido disuelto en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4, sobre 10 mL de cultivos en fase logarítmica en Caldo Nutritivo (Merck) de *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21 y *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3, con concentraciones

celulares iniciales del orden de 10⁶ UFC/ mL, determinándose el número de células viables por el método de conteo en placas de Petri a intervalos de tiempo de 2h 30min. y durante 24 h.

Se realizaron cultivos controles preparados mediante el agregado de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.4 sobre 10 mL de cultivos en fase logarítmica de cada uno de los microorganismos indicadores en Caldo Nutritivo (Merck). Cada ensayo fue realizado por triplicado, y los resultados se expresaron como promedio de los valores medidos [25-28].

Dicroísmo Circular

Los espectros de DC fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J715 (Jasco Corporation, Japón), trabajando en el rango de longitudes de onda de 190 a 250 nm, a 25°C, mediante el empleo de una celda de cuarzo de 1 mm de paso óptico, a concentraciones 20 μ M de Pln149a en agua, TFE al 20% en agua (v/v), buffer fosfato de sodio pH 5.5, y en presencia de micelas inversas de AOT con $W_o = 16$. Todos los espectros fueron obtenidos luego de la acumulación de los datos de 16 medidas. A fin de eliminar efectos de ruido se restaron los espectros de DC correspondientes a un blanco de micelas inversas.

Estimación del contenido de estructura secundaria

La deconvolución de los espectros obtenidos se realizó empleando el programa Self Consistent Method (SELCON), desarrollado por Sreerama y Woody, que permite determinar las fracciones de estructura secundaria en las distintas secuencias. Los espectros se expresaron en escala de elipticidad en mdegree (θ). Para el análisis de estructura secundaria los espectros fueron transformados en elipticidad molar [θ], considerando el peso molecular del residuo medio y la concentración [29-31].

Preparación de las micelas inversas

Las micelas inversas se prepararon mediante simple solubilización de AOT en la cantidad necesaria de ciclohexano para obtener una concentración final de 50 mM, agitando la suspensión mediante vortex, a temperatura ambiente [32].

Se partió de una solución concentrada de péptido, 10⁻³M, en buffer fosfato de sodio pH 7.4; se agregaron

pequeñas alícuotas del orden de los μL de esta solución sobre 1 mL de la suspensión 50 mM de AOT en ciclohexano, agitando vigorosamente hasta homogeneizar y clarificar. La cantidad de solución stock que se agregó fue controlada de manera de obtener el valor deseado de W_o , el cual se define como la relación entre el número de moléculas de agua y el número de moléculas de AOT presentes en la micela. Se trabajó con un valor de $W_o = 16$, que corresponde a un tamaño intermedio de micela.

Resultados y discusión

Síntesis y caracterización del análogo Pln149a

El rendimiento de la síntesis fue del orden del 34%, obteniéndose 95 mg de péptido crudo (YSLQMGATAIKQVKLFFKKGG-amida) a partir de 200 mg de resina, escala de síntesis 0.116 mmol. Luego de la purificación mediante HPLC se obtuvo un único pico con pureza mayor al 95 % (Figura 1). El peso molecular teórico de plantaricina 149 es de 2423.96 Da; en el espectro MALDI-TOF se pueden observar los picos con relación masa/carga (m/z) 2424.9, 2446.8 y 2462.6, que corresponden a los iones $(M+H)^+$, $(M+Na)^+$ y $(M+K)^+$ respectivamente (Figura 2). Posteriormente la secuencia completa fue confirmada mediante secuenciamiento luego de 23 ciclos de degradación por la técnica de Edman.

Pln149a posee un 36 % de residuos aminoacídicos hidrofóbicos y 6 % de residuos de Gly, con una carga neta de +7; el péptido nativo (Plantaricina 149) tiene carga neta +6, dado que su extremo C-terminal se encuentra funcionalizado como ácido carboxílico.

Teniendo en cuenta que la interacción inicial de estos compuestos catiónicos con las membranas de las bacterias sensibles es de naturaleza electrostática, la carga es un factor que incide sobre la actividad, como ha sido informado en la literatura [33,34].

Actividad antimicrobiana y modo de acción de Pln149a

En la Tabla 1 se observa el espectro inhibitorio de Pln149a. La misma presentó efecto antimicrobiano contra 6 de las 22 cepas ensayadas, siendo mayor su actividad frente a patógenos

de origen alimentario Gram-positivos tales como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

De acuerdo a lo informado por los autores que aislaron la Plantaricina 149 [11], no detectaron actividad inhibitoria de la bacteriocina contra la cepa de *Listeria monocytogenes* VTU 206 ni contra *Staphylococcus aureus* ATCC 4012 y ATCC 14498.

En este trabajo hemos encontrado que el análogo sintético Pln149a resultó ser muy activo frente a 4 cepas del género *Listeria* y una cepa de *Staphylococcus aureus* coagulasa (+), pertenecientes a la colección propia y a la del Dpto. de Tecnología de la Univ. Nac. de Luján.

Frente a estas bacterias, el título de la actividad antimicrobiana fue de 100 UA/mL, correspondiente a una concentración de Pln149a de 125 $\mu\text{g/mL}$.

La actividad antimicrobiana de Pln149a frente a *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 a pH 5 fue mucho menor que la determinada para el péptido aislado a partir de la cepa productora.

A fin de determinar si Pln149a tenía una acción bactericida o bacteriostática frente a *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3 y *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21, se siguió la evolución de la viabilidad de las dos cepas bacterianas en presencia del péptido en una concentración de 0.84 M y a pH 7.4. Se pudo determinar que cuando se agregaba la solución de Pln149a a un cultivo en fase logarítmica de *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus*, el número de células viables por mL disminuía desde $3.8 \cdot 10^6$ a valores menores a 10^2 UFC/mL, luego de 6 h de incubación. El descenso de las poblaciones microbianas continuó hasta que, a partir de las 12 h de cultivo y hasta las 24 h (tiempo máximo ensayado), ya no se detectaron células viables por cultivo y conteo en placas de las muestras obtenidas en los diferentes tiempos ensayados. En el cultivo control, el número de células viables de las mismas cepas indicadoras por mL se incrementó progresivamente desde 10^6 hasta aproximadamente $3.6 \cdot 10^8$ UFC/mL, luego de un período de incubación de 24 horas (Figura 3). Estos resultados indican que Pln149a es marcadamente bactericida frente a las cepas de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* ensayadas.

Estudios conformacionales por Dicroísmo circular

Pln149a presenta en medio acuoso una estructura desordenada, como es de esperar para un péptido

pequeño en solución (Figura 4). La deconvolución del espectro de DC, confirmó lo expuesto, con resultados de 83 % de estructura no ordenada y 17 % de estructura tipo β , lo cual es consistente con el mínimo pronunciado que se observa en el espectro a 198 nm. Para la deconvolución de espectros de péptidos con alto contenido en estructura no ordenada, se requiere el uso de un set especial de referencia integrado por 48 proteínas, el cual también incluye espectros de proteínas desnaturalizadas [31].

En medio buffer fosfato pH 5.5, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con agua, con un 80% de estructura no ordenada, 18% de elementos tipo β y 2% de estructura α -hélice. Si bien se observó que a pH 7.4 la estructura era ligeramente más ordenada, quedó claramente evidenciada la flexibilidad conformacional del péptido en medio acuoso.

El espectro de DC de Pln149a se modificó con el agregado de TFE, solvente que tiene la capacidad de inducir la formación de estructuras secundarias, así como en presencia de micelas inversas de AOT. En TFE al 20 %, se observaron dos mínimos cercanos a 205 y 223 nm, y un máximo a 190 nm, lo cual está asociado básicamente a contribuciones de estructuras tipo α -hélice [35]. En estas condiciones se determinó un 37% de α -hélice, 3% de estructura β y un 60 % de no ordenada. Datos obtenidos recientemente han permitido detectar porcentajes de α -hélice más altos utilizando mezclas con mayores porcentajes de TFE (resultados no mostrados).

En presencia de micelas inversas de AOT ($W_o=16$) también se observaron cambios conformacionales. El espectro de DC presentó dos mínimos a 207 y 222 nm, y un máximo a 194 nm (Figura 4). Los resultados de la deconvolución evidencian para el caso de buffer fosfato pH 5.5 un incremento en el contenido de α -hélice de hasta un 78% y 22% de estructura no ordenada.

La estructura tridimensional de Plantaricina A de 26 residuos aminoacídicos (KSSAYSLQMGATAIKQVKKLFKKWGW) ha sido recientemente dilucidada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), habiéndose encontrado que el péptido no está estructurado en agua y se estructura parcialmente en presencia de micelas de dodecilsulfocolina [17]. La región 12-23 de Plantaricina A adopta una estructura de α -hélice anfipática en presencia de estas micelas, existiendo

un 100% de homología de secuencia en esta región (TAIKQVKKLFKK) con relación a Pln149a.

Pln149a en presencia de micelas inversas de AOT, surfactante aniónico, adopta una estructura predominantemente helicoidal; la deconvolución de los datos espectrales de DC sugieren que 16 ó 17 residuos aminoacídicos estarían formando parte de la hélice, en estas condiciones experimentales.

La interacción electrostática inicial de este péptido catiónico (carga neta +7) con los fosfolípidos de las membranas bacterianas cargados negativamente, y la posibilidad de adoptar una estructura helicoidal en un ambiente hidrofóbico, podrían estar relacionados con el mecanismo de acción de esta bacteriocina, en concordancia con lo informado para otros péptidos antimicrobianos. En particular, se considera que la combinación de una alta cationicidad con estructura helicoidal anfipática son requerimientos para la existencia de actividad inhibitoria frente a bacterias Gram-positivas y hongos [36,37].

Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que el análogo sintético de Plantaricina 149 (Pln149a) presenta un espectro antimicrobiano diferente a la bacteriocina nativa. En particular, Pln149a mostró actividad antimicrobiana frente a una cepa de *Staphylococcus aureus* coagulasa (+) y cuatro cepas del género *Listeria* a pH 7.4 y 5.5, en contraste con los resultados obtenidos por otros autores con la molécula aislada de fuentes naturales [11]. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las cepas utilizadas en este trabajo son diferentes a las utilizadas por Kato et al (1994) y que los compuestos difieren en la funcionalización del extremo C-terminal, y consecuentemente en su carga neta.

Ha sido demostrado en este trabajo que Pln149a adopta una estructura predominantemente helicoidal en micelas inversas de AOT, siendo probable que su actividad antimicrobiana esté asociada con la formación de una hélice de naturaleza anfipática al interaccionar con las membranas de las células bacterianas, en concordancia con lo descrito en la literatura para otros péptidos antimicrobianos de similar estructura.

Estudios adicionales por DC y RMN de Pln149a en micelas constituidas por diferentes clases de

fosfolípidos podrían aportar información relevante sobre la estabilidad conformacional de esta bacteriocina en diferentes sistemas biomiméticos.

El bajo peso molecular de Pln149a y fundamentalmente su actividad a pH 5 hacia bacterias patógenas causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) la hacen atractiva tecnológicamente para ser utilizada como preservador alimentario.

Por otra parte, la actividad detectada a pH 7.4 despierta interés en estudiar su potencial utilidad a nivel terapéutico. Son necesarias nuevas pruebas con un gran número de cepas diferentes de las especies bacterianas frente a las cuales Pln149a mostró en este trabajo actividad inhibitoria, con el objeto de dejar establecida su importancia para un futuro desarrollo como antibiótico.

Tabla 1: Espectro antimicrobiano del péptido sintético Pln149a (0.42 M)

Cepas indicadoras	Diámetro de inhibición (mm) a pH= 5	Diámetro de inhibición (mm) a pH=7.4
<i>Lactobacillus plantarum</i> DBFIQ LP 28	-	NE
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP 41 ^a	-	NE
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP 22 ^a	-	NE
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP 38 ^a	-	NE
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	8	NE
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DBFIQ LB 42 ^a	-	NE
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CRL G3 ^c	-	NE
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NCDO 529 ^b	-	NE
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO 543 ^b	-	NE
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DTUNLu 223 ^b	-	NE
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DTUNLu 245 ^b	-	NE
<i>Pseudomonas</i> sp. DBFIQ P 55 ^a	-	NE
<i>Staphylococcus aureus</i> DBFIQ S 21 ^a	12	13
<i>Listeria monocytogenes</i> DBFIQ LM 3 ^a	9	10,5
<i>L. monocytogenes</i> ^b DTUNLu 335 BsAs	10.5	11
<i>L. monocytogenes</i> tipo I DTUNLu 328 ^b	8	8
<i>Listeria seeligeri</i> DTUNLu 340 ^b	8	8
<i>Bacillus cereus</i> DBFIQ B 28 ^a	-	NE
<i>Enterococcus</i> DBFIQ (E25, E13; E23,E 24) ^a	-	NE

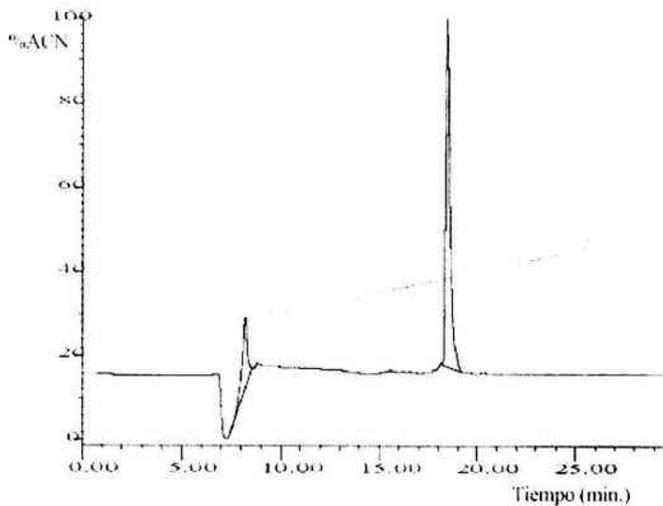
Diámetro de los pozos: 7 mm; NE: No Ensayado; -: Ausencia de halo de inhibición

a- Colección de la Cátedra de Microbiología, Fac. Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral, Argentina (DBFIQ).

b- Colección del Departamento de Tecnología, Univ. Nac. de Luján, Argentina, (DTUNLu).

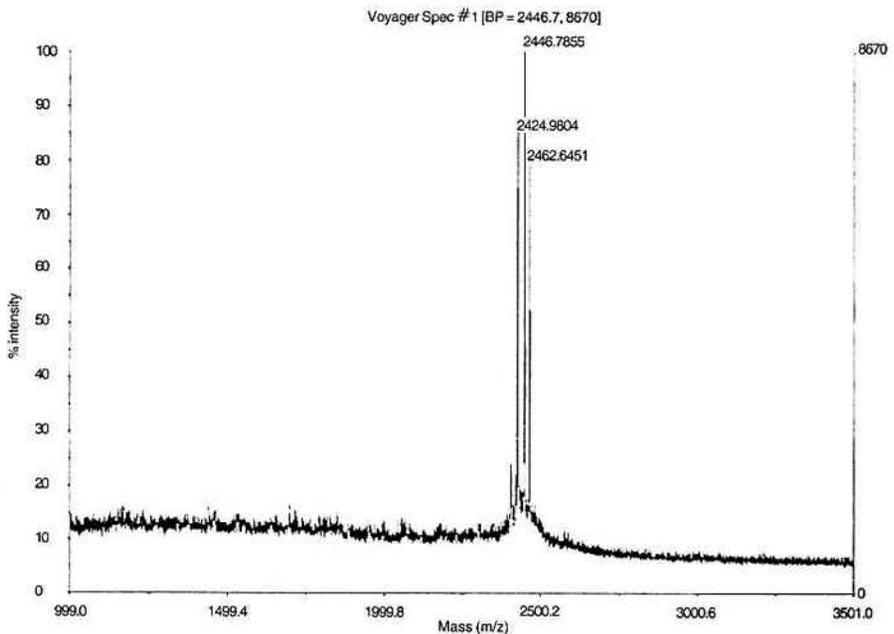
c- Colección de CERELA, CONICET, Argentina (CRL).

Figura 1: HPLC analítico de Pln149a purificada



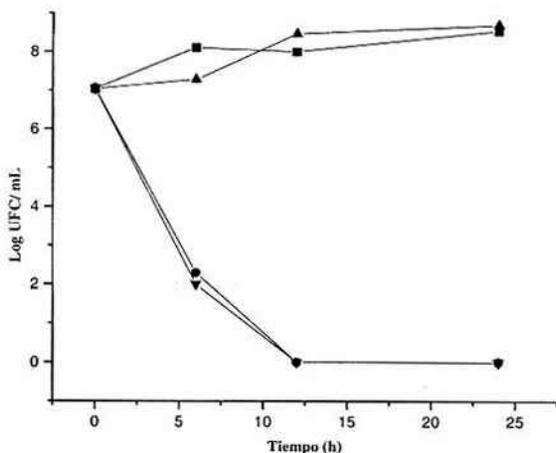
Condiciones experimentales: columna Delta-Pak C18, 5 μ m, 300 Å, 3.9 x 150 mm (Waters); gradiente: 10-25 % B (5 min), 25-40 % B (20 min), 40-60 % B (5 min); velocidad de flujo 0.8 mL/min; detección: UV a 220 nm.

Figura 2: Espectro MALDI-TOF de Pln149a.



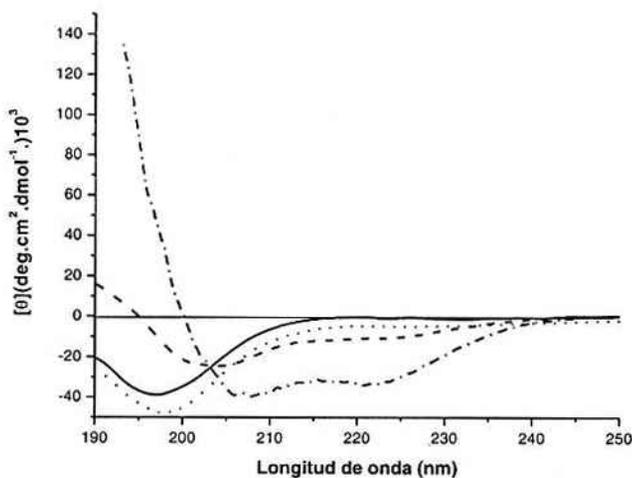
Se observan los valores experimentales de los picos con relación masa/carga (m/z) 2424.9, 2446.8 y 2462.6, que corresponden a los iones $(M+H)^+$, $(M+Na)^+$ y $(M+K)^+$ respectivamente.

Figura 3: Efecto bactericida de Pln149a sobre el desarrollo de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* a pH 7.4



Concentración de péptido: 0.84 M. (■) Cultivo control de *Listeria monocytogenes*; (●) Cultivo de *L. monocytogenes* luego de adicionarle Pln149a; (▲) Cultivo control de *Staphylococcus aureus*; (▼) Cultivo de *S. aureus* luego de adicionarle Pln149a.

Figura 4: Espectros de DC de Pln149a



(—) en agua; (....) en buffer fosfato pH 5.5; (- - -) 20 % de TFE (v/v); (---+) en buffer fosfato pH 5.5 + micelas inversas de AOT ($Wo = 16$);

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco de los Proyectos CAI+D 2002 N°18-Prog. 126 (UNL), PICTR2002-00063 (ANPCyT) y PICTO2003-14-13215 (UNL-ANPCyT).

Agradecemos al Dr. David Andreu del laboratorio de Proteómica-Química de Proteínas, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España por la realización de los análisis MALDI-TOF y a la Dra María Cristina Mans del Departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján (UNLu), Argentina, por proveernos de las cepas de *Listeria* y *Leuconostoc*.

Bibliografía

1. Tagg, J.R., Dajani, A.S and Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**, 3: 722-756.
2. Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 3: 337-349.
3. Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* **84**, 5-6: 357-364.
4. Hauge, H.H., Mantzilas, D., Moll, G.N.; Konings, W.N., Driessen, A.J., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J., 1998. Plantaricin A is an amphiphilic alpha-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry* **37**, 46: 16026-32.
5. Hauge, H.H., Mantzilas, D., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J., 1999. Membrane-mimicking entities induce structuring of the two-peptide bacteriocins plantaricin E/F and plantaricin J/K. *J. Bacteriol.* **181**, 3: 740-747.
6. Turner, D.L., Brennan, L., Meyer, H.E., Lohaus, C., Siethoff, C., Costa, H.S., Gonzalez, B., Santos, H., Suárez, J.E., 1999. Solution structure of plantaricin C, a novel lantibiotic. *Eur. J. Biochem.* **264**, 3: 833-839.
7. Jiménez-Díaz, R., Ríos Sánchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz Barba, J.L., Plard, J., 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1416-1424.
8. Rekhif, N., Atrih, A., Lefebvre, G., 1995. Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 4: 349-358.
9. Kelly, W.J., Asmundson, R.V., Huang, C.M., 1996. Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum* KW30. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 657-662.
10. Franz, C.M., Du Toit, M., Olasupo, N.A., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H., 1998. Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat-salad. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 3: 231-235.
11. Kato, T., Matsuda, T., Ogawa, E., Ogawa, H., Kato, H., Dol, U., Nakamura, R., 1994. Plantaricin-149 a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 3: 277-282.
12. Remiger, A., Eijsink, V.G., Ehrmann, M.A., Sletten, K., Nes, I.F., Vogel, R.F., 2000. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin 1.25 alpha and 1.25 beta, two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 6: 1053-1058.
13. Atrih, A.; Rekhif, N.; Moir, A.J.; Lebrihi, A.; Lefebvre, G., 2001. Mode of action, purification and aminoacid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int. J. Food Microbiol.* **68**, 1-2: 93-104.
14. Holo, H.; Jeknic, Z.; Daeschel, M.; Stevanovic, S., and Nes, I F., 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* **147**: 643-651.
15. Messi, P.; Bondi, M.; Sabia, C.; Battini, R.; Manicardi, G., 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (Plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 1-2: 193-198.
16. Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R.; 2003. Purification and genetic characterization of Plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-Peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1: 383-389.
17. Kristiansen, P.E., Fimland, G., Mantzilas, D. and Nissen-Meyer; 2005. Structure and Mode of Action of the Membrane-permeabilizing Antimicrobial Peptide Pheromone Plantaricin A. *J. Biol. Chem.* **280**: 22945-22950
18. Abee, T., 1995. Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**, 1: 1-10.
19. Siegel, D.P., 1984. Inverted micellar structures in bilayer membranes. Formation rates and half-lives. *Biophys. J.* **45**, 2: 399-420.
20. Chang, G.G, Huang, T.M., Hung, H.C., 2000. Reverse Micelles as Life-Mimicking Systems. *Proc. Natl. Sci. Council. Repub. China B.* **24**, 3: 89-100.
21. Merrifield, R.B., 1995. "Solid- phase peptide synthesis". In

"Peptides: Synthesis, Structures, and Applications". Academic Press (San Diego, USA), 93-169.

22. Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P.I., 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 2: 595-608.

23. Atherton, E. and Sheppard, R., 1989. "Solid Phase Synthesis: A Practical Approach". IRL Press (Oxford), 115-117.

24. Tagg, J.R.; Mcgivan, A.R., 1971. Assay systems for bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **21**: 943-947.

25. Kang J.H. and Lee M.S., 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 1169-1176.

26. Suma, K., Misra, M.C., Varadaraj, M.C., 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.* **40**: 17-25.

27. Carrasco, M.S., Scarinci, H.E. and Simonetta, A.C., 2002. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.*, **57**: 15-19.

28. Simonetta A.C., Moragues de Velasco L.G. and Frison L.N., 1997. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Letters Appl. Microbiol.* **24**: 139-143.

29. Sreerama N. and R.W. Woody ,1993. A self consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochemistry*, **209**: 32-42.

30. Woody, R.W., 1996. "Theory of circular dichroism of proteins"- In G.D. Fasman (ed), "Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules", Plenum Press, (New York), 25-67.

31. Sreerama N. and R.W. Woody, 2000. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **282**: 252-260.

32. Souto, A.L, Ito, A.S, 2000. Tryptophan fluorescence studies of melanotropins in the amphiphile-water interface of reversed micelles. *Eur. Biophys. J.* **29**, 1: 38-47.

33. Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., Bienert, M., 2001. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* **501**, 2-3: 146-50.

34. Sitarum, N., Najjaraj, R., 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity *Biochim. Biophys. Acta* **1462**: 29-54.

35. Sönnichsen, F.D.; Van Eyk, J.E.; Hodges, R.S.; Sykes, D.B., 1992. Effect of trifluoroethanol on protein secondary

structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry*, **31**, 37: 8790-8798.

36. Giangaspero, A., Sandri, L., Tossi, A., 2001. Amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5589-5600.

37. Shai, Y., 2002. From innate immunity to de-Novo designed antimicrobial peptides. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 715-725.

Presentaciones a Congresos

- XXIV Congreso Argentino de Química, FBCB-UNL, 2002, Santa Fe, Argentina, 7-9 de agosto. "Bacteriocina sintética activa contra *Staphylococcus aureus*". Müller, D., Carrasco, M., Simonetta, A., Beltramini, L. y Tonarelli, G.

- Primer Simposio Argentino-Italiano de Bacterias Lácticas, Aplicación en Alimentos y Salud. 2002, San Miguel de Tucumán, Argentina, 21-23 de Octubre. "Inhibición de *Staphylococcus aureus* mediante un péptido mimético de plantaricina149." D.M Müller, M.S. Carrasco, A.C. Simonetta y G. Tonarelli.

- Jornadas de Actualización en Microbiología de Alimentos 2002, Santa Fe, Argentina, 24 de agosto, FIO, UNL. Disertación del Dr. Arturo Simonetta sobre el tema "Bacteriocinas producidas por Bacterias Lácticas".

- XIV Simposio Nacional de Química Orgánica (SAIQO) 2003, Rosario, Argentina, 9-12 de Noviembre: "Correlación entre estructura y actividad biológica de bacteriocinas sintéticas mediante dicroísmo circular y fluorescencia del Triptofano". Müller D. M., Metz G., Carrasco M.S., Simonetta A.C., Beltramini L. y Tonarelli G.

- 2^o International Workshop on Spectroscopy for Biology 2004, Rio de Janeiro, Brasil, 25-29 de Abril. "Conformational studies of synthetic Plantaricin 149: a short active peptide against food-borne pathogens." Müller D.M., Carrasco M.S., Simonetta A.C., Campana, P.T., Beltramini L. y Tonarelli G.