

## **OBJETIVOS GENERALES**

1. Aislar, purificar y caracterizar estructuralmente una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* LP31, cepa perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, aislada de embutidos cárnicos santafesinos y caracterizada fisicoquímicamente en forma preliminar (Simonetta y col., 1997).

2. Obtener mediante síntesis química un análogo (PIn149a) de la bacteriocina Plantaricina 149, producida por la cepa *Lactobacillus plantarum* NRIC 149 aislada del ananá (Kato y col., 1994). Evaluar su actividad antimicrobiana y compararla con la descrita por la bibliografía para el péptido natural, estudiar aspectos conformacionales que estarían relacionados con su actividad biológica específica, mediante técnicas de Espectroscopía de fluorescencia y Dicroísmo circular (DC) en distintos medios solventes.

3. Diseñar un péptido híbrido (PH) a fin de evaluar su potencial aplicación como preservador alimentario, mediante síntesis química entre el extremo N-terminal (residuos 1-18) de Pediocina PA-1 (bacteriocina análoga de clase IIa, de amplio espectro antimicrobiano) y los residuos 6-22 de Plantaricina 149 (bacteriocina que no pertenece a la clase IIa y presenta reducido espectro antimicrobiano).

Realizar estudios estructura-función mediante la correlación de los resultados obtenidos mediante análisis conformacional por Dicroísmo circular y fluorescencia del PH en sus versiones lineal (PHL) y cíclica (PHC) y de sus fragmentos N- y C-terminales, con la actividad antimicrobiana de dichos péptidos.

## **JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS PROPUESTOS**

Entre las bacterias del ácido láctico, la especie *Lactobacillus plantarum* tiene mucha importancia, ya que se utiliza como uno de los principales integrantes de cultivos iniciadores en la fermentación de vegetales, carnes y pescados (Mackay y col., 1990).

Se han reportado numerosas cepas productoras de bacteriocinas pertenecientes a la especie *Lactobacillus plantarum*, procedentes de diversos alimentos, especialmente carne y productos derivados. Entre las más importantes se encuentran: Plantaricina A (Daeschel y col., 1990 ;Nissen-Meyer y col., 1993 ), Plantaricinas S y T (Jiménez Díaz y col., 1993 ), Plantaricina C (González y col., 1994), Plantaricina 149 (Kato y col., 1994), Plantaricina SA6 (Reknif y col., 1995), Plantaricina KW30 (Kelly y col., 1996), Plantaricinas EF y JK (Andersen y col., 1998), Plantaricina D (Franz y col., 1998), Plantaricina 1,25 alfa y beta (Remiger y col., 2000), Plantaricina C19 (Atrih y col., 2001), Plantaricina W alfa y beta (Holo y col., 2001), Plantaricina 35 D (Messi y col., 2001), Plantaricina NC8, (Jiménez Díaz y col., 2003).

*L. plantarum* C11 produce tres variantes de Plantaricina A con 26, 23 y 22 residuos aminoacídicos, denominadas PIn A-26, PIn A-23 y PIn A-22. Los tres péptidos presentan actividad antimicrobiana y de ferormona, los cuales desencadenan la producción de otras dos bacteriocinas: Plantaricinas EF y JK, producidas por la misma cepa (Hauge y col., 1998 y 1999).

PIn A-22 posee un espectro de inhibición dirigido fundamentalmente hacia cepas cercanas a la cepa productora (*Lactobacillus plantarum* C11): *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sake*, *Pediococcus pentosaceus*, *Carnobacterium piscicola*) y estructuralmente presenta un 89 % de homología de secuencia con Plantaricina 149, diferenciándose únicamente en tres aminoácidos del extremo C-terminal (-WGW-, para PIn A 22, y -KGG- para Plantaricina 149) (Hauge y col., 1998). Plantaricina C es el primer lantibiótico descrito dentro de las plantaricinas, con una masa molecular de 3500 Da, de amplio espectro de acción (Turner y col., 1999).

Plantaricina C19 (PM: 3845 Da) es la primera Plantaricina descubierta que se ubica en la clase IIa de bacteriocinas, es decir del tipo de las Pediocinas, ya que posee la secuencia consenso " YYGNGL" en su extremo N-terminal (con la excepción de tener valina en vez de leucina, como se encuentra en las otras bacteriocinas de este grupo); es activa hacia el género *Listeria*.

Plantaricina 149, producida por la cepa aislada de ananá *Lactobacillus plantarum* NRIC 149, es un péptido de 22 aminoácidos, catiónico e hidrofóbico, termoestable, sensible a papaína, tripsina y pepsina y con actividad que es pH-dependiente (máxima a pH 5). Su espectro inhibitorio no es amplio (es activa hacia cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus cerevisiae*, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*) y presenta acción bactericida.

Plantaricinas S y T son dos péptidos antimicrobianos producidos por *Lactobacillus plantarum* LPCO10, y ambos actúan en forma complementaria para ejercer la acción antimicrobiana.

Plantaricina W (alfa y beta) es una novedosa bacteriocina constituida por dos péptidos lantibióticos sinérgicos, producidos por la misma cepa bacteriana.

Se han secuenciado parcialmente las Plantaricinas 1,25 (alfa y beta), las cuales son dos bacteriocinas no sinérgicas producidas por la misma bacteria, de 5000 a 6000 Da. De la cadena alfa se han secuenciado 25 aminoácidos y la cadena beta tiene una elevada similitud en su secuencia con la bacteriocina Brevicina 27.

Plantaricina NC8 consiste en dos péptidos denominados PLNC8 $\alpha$  y PLNC8 $\beta$ , que contienen 28 y 34 aminoácidos respectivamente, los cuales actúan complementariamente.

Todas estas plantaricinas difieren entre sí en el espectro de acción. En general son activas contra especies bacterianas relacionadas estrechamente a la cepa productora, excepto las Plantaricinas C19 y D, las cuales son activas contra *L. monocytogenes*. Plantaricina-149, es activa contra *Enterococcus hirae*; Plantaricina C y la bacteriocina producida por *L. plantarum* ST31 (Todorov y col., 1999) son activas contra cepas de *Staphylococcus* y *Bacillus*. Ninguna de ellas presenta actividad frente a *Pseudomonas*.

Presentan estructuras muy heterogéneas, lo que no permite agruparlas en una única clase de bacteriocinas. Sólo algunas de ellas han sido purificadas y secuenciadas en su totalidad: Plantaricina A, Plantaricinas E/F y J/K, Plantaricina C, Plantaricina C19, Plantaricina 149, Plantaricinas S y T, Plantaricinas W alfa y W beta y Plantaricina NC8.

A excepción de Plantaricina A, aún no se dispone de información genética suficiente sobre el resto de las Plantaricinas.

El aislamiento, purificación y caracterización estructural parcial de una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* LP31, cepa aislada de embutidos cárnicos santafesinos, que se describe en el presente trabajo, tiene como finalidad aportar al conocimiento general de estos péptidos antimicrobianos y en particular de esta bacteriocina, en virtud de su importancia como inhibidor del crecimiento de microorganismos patógenos de origen alimentario (Simonetta y col., 1997).

Únicamente las Plantaricinas E/F y J/K han sido obtenidas en forma sintética y hasta el momento, dentro del grupo de las Plantaricinas, sólo las Plantaricinas A y Plantaricinas E/F y J/K se han estudiado conformacionalmente.

El segundo objetivo de este trabajo ha sido la síntesis química de un análogo de la bacteriocina Plantaricina 149 (denominada Pln149a), para proceder luego a evaluar su actividad antimicrobiana, compararla con la descrita por la bibliografía para el péptido natural aislado a partir del sobrenadante de cultivo y estudiar aspectos conformacionales que estarían relacionados con su actividad biológica específica. Se aplicarán para ello técnicas de Espectroscopía de fluorescencia [presenta dos fluoróforos intrínsecos: Tirosina (Y) y fenilalanina (F) situados en las posiciones 1 y 17 de la cadena peptídica] y Dicroísmo circular.

Uno de los objetivos principales de los estudios estructura-función que se realizan sobre los péptidos antimicrobianos es diseñar análogos mejorados en su actividad, de menor o igual peso molecular en relación a las estructuras de los péptidos nativos que los constituyen. Existen en la bibliografía trabajos reportados sobre híbridos diseñados a partir de bacteriocinas pertenecientes a una misma clase (Clase IIa) (Fimland y col., 1996). Sobre esta clase, además, hay estudios de estructura-función realizados mediante modificaciones químicas e hidrólisis enzimáticas de las secuencias nativas (Bhugaloo-Vial y col., 1999).

En el presente trabajo se realizó el diseño de un nuevo híbrido (PH), cuya originalidad se centra en que está formado por fragmentos de estructura primaria pertenecientes a dos bacteriocinas de diferentes clases y fundamentalmente de diferentes espectros inhibitorios.

El mismo está formado en su región N-terminal por los residuos aminoacídicos 1 a 18 de Pediocina PA-1 (Clase IIa, de amplio espectro inhibitorio), y en su región C-terminal por los residuos aminoacídicos 6 a 22 de Pln149a, bacteriocina no homóloga, de reducido espectro antimicrobiano. La molécula fue diseñada de modo tal de mantener los motivos estructurales que caracterizan a las bacteriocinas de la Clase IIa.

El género *Pediococcus* comprende un grupo muy grande de bacterias que son usadas comercialmente en fermentaciones de carnes y vegetales. Las cepas de *Pediococcus* productoras de bacteriocinas son muy buenas candidatas para la conservación de alimentos frescos y procesados (Berry y col. 1990).

Pediocina PA-1 es una bacteriocina de amplio espectro producida por *Pediococcus adilactici* PAC 1.0 (González y col., 1987), tiene un peso molecular de 4500 Da, posee 44 aminoácidos y es un péptido altamente hidrofóbico y catiónico, con dos puentes disulfuros en su estructura; es termoestable y sensible a pepsina, papaína, quimotripsina, tripsina y proteinasa K.

Su amplio espectro antimicrobiano está dirigido hacia bacterias del ácido láctico: *L. plantarum*, *Lactobacillus sake*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc cremoris*, y a otras especies como: propionibacterias, *Bochotrix* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, y presenta una actividad particularmente fuerte frente a *Listeria monocytogenes*, una bacteria patógena de especial importancia en la industria alimentaria. Este péptido antimicrobiano es uno de los más estudiados dentro de las bacteriocinas de la clase IIa (o familia de las pediocinas), y ha sido caracterizado lo suficiente como para ser utilizado como biopreservador alimentario (Rodríguez y col., 2002).

La correlación entre los análisis conformacionales por Dicroísmo circular y fluorescencia (posee dos fluoróforos intrínsecos: Trp en posición N° 18 y Phe en posición N° 35) del PH en sus versiones lineal (PHL) y cíclica (PHC) y la actividad antimicrobiana de dichos péptidos, puede permitirnos confirmar o refutar ciertos

aspectos de lo que se sabe hasta el momento sobre relación estructura-función de las bacteriocinas de la clase IIa, y que ha sido detallado previamente.