

DISCUSIÓN

En la primera parte de esta tesis se describe el aislamiento, purificación parcial y caracterización estructural de una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* LP31, cepa aislada de embutidos cárnicos santafesinos.

Como se puede observar en los resultados obtenidos mediante la caracterización preliminar realizada sobre el sobrenadante de cultivo sin purificar (Tabla 1-1) el compuesto activo pierde su actividad luego de tratamientos con distintas proteasas. La pérdida de actividad inhibitoria es total frente a la acción de tripsina y pepsina, al igual que algunas bacteriocinas ya descritas tales como Plantaricina 149 (Kato y col., 1994), y es sólo parcial frente a papaína. El péptido presenta estabilidad al tratamiento térmico, manteniendo su actividad luego de ser sometido a 100° C durante 10 y 30 minutos. Se descarta que el efecto inhibitorio del sobrenadante de cultivo sea debido a la presencia de peróxido de hidrógeno, ya que el tratamiento del mismo con catalasa no afecta el diámetro de las zonas de inhibición que presenta frente a las cepas sensibles.

Los resultados de los ensayos enzimáticos con lipasa, α -amilasa, lisozima y amiloglicosidasa demuestran que el compuesto peptídico podría estar asociado a otros de naturaleza lipídica o bien a carbohidratos (en la forma de lipopéptidos ó glicopéptidos) para ejercer su actividad, ya que la misma se vio modificada parcialmente luego del tratamiento con dichas enzimas. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes, dado que también se los puede atribuir al margen de error que pueden presentar los ensayos enzimáticos realizados con sobrenadantes de cultivos sin purificar, ampliamente mencionado en la bibliografía específica; es probable también que la disminución de actividad inhibitoria que se observa en algunos ensayos se deba a que las enzimas utilizadas (lipasa y glicosidasa) no eran totalmente puras, conteniendo mínimas proporciones de enzimas proteolíticas. La actividad de la bacteriocina producida por *L. plantarum* LP31 es pH dependiente y presenta un máximo a pH 5, al igual que algunas Lactoestreptocinas (Kozak y col., 1978), Plantaricina A (Nissen-Meyer y col., 1993), Plantaricina 149 (Kato y col., 1994) y la bacteriocina producida por *L. plantarum* ST31 (Todorov y col., 1999).

Se han descrito numerosas bacteriocinas producidas por cepas de *Lactobacillus plantarum*. Entre las más importantes se pueden mencionar: 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 423 (van Reenen 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) y Plantaricina NC8 (Jiménez-Díaz y col., 2003).

La mayoría de estas bacteriocinas son activas hacia cepas pertenecientes a especies cercanas taxonómicamente, pero además algunas actúan frente a otras especies. Por ejemplo: Plantaricina C19 y Plantaricina D son activas frente a *L. monocytogenes*; Plantaricina-149 es activa contra *Enterococcus hirae*; Plantaricina C y la bacteriocina producida por *L. plantarum* ST31 son activas contra cepas de *Staphylococcus* y *Bacillus*; Plantaricina 423 es activa frente a *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria* spp. y *Staphylococcus* sp.

Recientemente se ha reportado actividad antimicrobiana de bacteriocinas producidas por *L. plantarum* hacia bacterias Gram-negativas. Entre ellas se encuentran: *Lactobacillus plantarum* ST23LD y ST341LD; otras son activas sobre bacterias Gram-positivas (*E. faecalis*, *L. casei* y *Streptococcus pneumoniae*) y Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Todorov y col., 2005); también se ha dado a conocer actividad de *L. plantarum* sobre enterobacterias (Laniewska-Moroz y col., 2001).

Los resultados del presente trabajo son concordantes con los reportados por Tagg y col., 1976; Talarico y col., 1988; Sobrino y col., 1991 y Vignolo y col., 1993, en cuanto al espectro antimicrobiano amplio detectado para sustancias inhibitorias producidas por *Lactobacillus* y otros géneros de bacterias del ácido láctico, que resultaron activas frente a bacterias Gram-positivas y algunas especies Gram-negativas.

La bacteriocina producida por *L. plantarum* LP31 ha demostrado ser activa frente a especies patógenas y alterantes Gram-positivas de origen alimentario tales como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, y también frente a bacterias Gram-negativas alterantes de alimentos como *Pseudomonas* sp. (Tabla 2-1); presenta modo de acción bactericida (Figuras 1-1 y 2-1) hacia algunos de los microorganismos ensayados y su efecto inhibitorio frente a células bacterianas Gram-negativas es mayor que frente a los organismos Gram-positivos ensayados.

La utilización de la extracción en fase sólida de C18, realizada al inicio en el esquema de purificación, resultó un método adecuado para lograr eliminar componentes del medio de cultivo coloreados e hidrofóbicos del sobrenadante crudo. La Fracción I activa obtenida de este primer paso de purificación, correspondió a la fase acuosa del eluido de la columna (0% de ACN). Este resultado indicó en forma preliminar que el péptido activo era de naturaleza hidrofílica (Tabla 3-1 y Figura 3-1). La actividad específica obtenida en este paso de purificación fue de 5.95 AU/ μ g (5 veces mayor a la actividad específica detectada en el sobrenadante crudo de cultivo de *L. plantarum* LP31 (Tabla 5-1).

Teniendo en cuenta ensayos preliminares mediante la utilización de membranas dialíticas de 10 KDa de cut-off realizados en forma previa por el grupo del Dr. Simonetta, que indicaron que el peso molecular del compuesto activo presente en el sobrenadante de cultivo crudo era menor a 10.000 Da, se realizaron ensayos de ultrafiltración sobre la Fracción I activa mediante Membranas Amicon con cut-off de 3 kDa. Éstos demostraron que la parte activa se encontraba en el filtrado (peso molecular menor a 3 KDa) (Figura 4-1).

La cromatografía de filtración por geles sobre la Fracción I activa, permitió detectar dos Fracciones activas (Fracciones IIA y IIB) (Figura 5-1). Estas fracciones presentaron mecanismos de acción bactericida y bacteriostático respectivamente, frente a un cultivo proliferante de *Pseudomonas* sp. (Figura 6-1). En la misma figura puede apreciarse un ligero efecto sinérgico entre ambas fracciones cuando fueron ensayadas como una mezcla del 50% de cada una.

Sin embargo la Fracción IIB, que eluyó de la cromatografía fuera del rango de fraccionamiento de la columna, no fue afectada significativamente en su actividad luego del tratamiento con proteasas (Tabla 4-1), resultado que indicó que dicha fracción no era de naturaleza proteica. Además, presentó poca estabilidad en el tiempo al ser conservada a -20° C (aproximadamente 1 mes).

Por todo esto se dedujo que la actividad antimicrobiana estaba asociada fundamentalmente a la Fracción IIA, la cual presentó la misma sensibilidad a proteasas que el sobrenadante crudo del cultivo original (Tabla 4-1), efecto bactericida frente a las cepas sensibles usadas de rutina (*Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*), una actividad específica de 5.93 AU/ μ g y buena estabilidad en función del tiempo de conservación. Los controles analíticos mediante HPLC y Electroforesis capilar indicaron una composición compleja de la fracción activa, con 5-6 compuestos mayoritarios de naturaleza hidrofílica (Figuras 7-1 y 8-1).

En paralelo al esquema de purificación se realizó una cromatografía de intercambio iónico sobre la Fracción IIA activa obtenida de la cromatografía de filtración por geles. En particular, se empleó intercambio catiónico, ya que la mayoría de las bacteriocinas presentan carga positiva. Se obtuvieron fracciones retenidas al 40 y 70 % de solvente B, sin embargo, el péptido activo no interaccionó con la resina, eluyendo al 100% solvente A (buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 6.8) (Figura 9-1). El control analítico por HPLC muestra un menor número de compuestos de naturaleza hidrofílica en la muestra activa obtenida del intercambio iónico (Figura 10-1). Por otro lado, si comparamos los electroferogramas, se puede apreciar en la fracción activa obtenida luego del intercambio iónico, dos picos mayoritarios de altos tiempos de migración, de 8.33 y 8.47 minutos (Figura 11-1).

La falta de interacción del péptido activo con la resina de intercambio catiónico y los tiempos de retención elevados cercanos a 10 minutos observados en el electroferograma sugieren que los péptidos eluidos presentan carga nula o negativa en las condiciones de pH usadas (pH.6.8).

Posteriormente se realizó HPLC semipreparativo sobre la fracción de interés (IIA), obteniéndose un pico que retuvo toda la actividad (IIA₁) (Figura 12-1), con una actividad específica de 506 AU/μg (Tabla 5-1).

Mediante el empleo de una columna analítica de HPLC apropiada para este tipo de péptidos hidrofílicos, se pudo determinar que la Fracción IIA₁ presentaba un compuesto mayoritario (Figura 13-1). Los análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) de las fracciones obtenidas (denominadas t₁ a t₆), demostraron la presencia de un compuesto de masa 1558.84 Da y otro pico de masa 3115,75 Da, que podría corresponder a su dímero, ambos en la Fracción IIA_{1-t6}. Todas las fracciones obtenidas de este cromatograma, fueron controladas nuevamente por Electroforesis capilar. En los electroferogramas correspondientes se observa la aparición progresiva (con un máximo en la fracción IIA_{1-t6}) de un pico con tiempo de migración 8.37 (Figura 15-1a, b y c), detectado previamente en las fracciones activas obtenidas de la cromatografía de filtración por geles e intercambio catiónico (Figuras 8-1 y 11-1). Teniendo en cuenta la reproducibilidad de los tiempos de retención de la técnica de EC empleada, se considera que el péptido encontrado en la fracción activa de tiempo de migración 8.33-8.37 corresponde al pico de masa 1558.84 Da encontrado mediante MALDI-TOF.

La mayoría de las bacteriocinas pertenecientes a las clases I y II presentan carga neta positiva y son hidrofóbicas y/o anfifílicas (Ennahar y col., 2000). Contrastando con lo reportado, la composición aminoacídica hallada para el péptido activo consiste en al menos 14 residuos aminoacídicos, de los cuales un 70% corresponden a aminoácidos polares con predominancia de residuos ácidos (Tabla 6-1).

La presencia de altos porcentajes de aminoácidos polares y ácidos es consistente con la baja capacidad para interaccionar con los soportes de C18 y con la resina de intercambio catiónico.

El péptido presenta al menos 2 ó 3 posibles puntos de corte tríptico, ya que contiene dos lisinas (K) y una arginina (R). Este resultado fue concordante con la pérdida total de actividad detectada para las fracciones activas (IIA y IIA₁) luego del tratamiento con tripsina.

Mediante espectrometría de masas se pudo determinar que existía una diferencia de 128 Da entre el peso molecular calculado a partir del análisis de aminoácidos (1430 Da) y el peso molecular obtenido por MALDI-TOF (1558.84 Da). Esta diferencia coincide con la masa de glutamina (Q) o lisina (K), pero esos residuos se detectan bien con el análisis de aminoácidos empleado, de manera que podría tratarse de un aminoácido no natural, o se podría estar frente a un péptido con algún tipo de ciclización en su estructura. La ausencia de aminoácidos aromáticos fue confirmada por la falta de absorbancia de la muestra activa a 280 nm mediante Electroforesis capilar (Figura 16-1). El secuenciamiento de este péptido en un sistema nano-HPLC-MS/MS (Cromatografía líquida de alta performance acoplada a Espectrometría de masas en tandem) no arrojó resultados positivos. Posiblemente debido a una cantidad insuficiente de péptido en la muestra y/o a la presencia de contaminantes de bajo peso molecular que interferían con este tipo de análisis.

CONCLUSIONES

El compuesto antimicrobiano producido por *Lactobacillus plantarum* LP31 es de naturaleza proteica y cumple con los requisitos mínimos incluidos en la definición de bacteriocina: sensibilidad a proteasas, estabilidad térmica y capacidad para inhibir el desarrollo de bacterias Gram-positivas.

Las características estructurales que se han encontrado en el péptido activo producido por *L. plantarum* LP31 en cuanto a su peso molecular, carga neta aproximada y espectro de acción (fundamentalmente su actividad hacia *Pseudomonas*) son semejantes al tipo B de lantibióticos tales como Cinamicina (Kaletta y col., 1991) y Mersacidina (Chatterjee y col., 1992).

Estos son péptidos pequeños (20 aminoácidos aproximadamente), de estructura rígida, globular, neutros o aniónicos, y que ejercen su acción antimicrobiana inhibiendo la función de enzimas mediante la formación de complejos con componentes específicos integrantes de membrana (Oscáriz y col., 2001)

El péptido activo producido por *L. plantarum* LP31 presenta un interesante espectro inhibitorio que comprende a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas; tiene además buenas propiedades tecnológicas, tales como su pH de acción, alta estabilidad en el tiempo y resistencia a elevadas temperaturas. Todas estas características señalan la relevancia de esta bacteriocina para futuras aplicaciones como biopreservador en la industria de alimentos. El compuesto activo se encuentra dentro de las bacteriocinas de menor peso molecular que han sido reportadas hasta la fecha, a saber: Lacticina 481, de 1,7 kDa (Piard y col., 1992), Lactococcina de 2.3 kDa (Dufour y col., 1991), Pediocina AcH, de 2,7 kDa (Bhunja y col., 1988), y Plantaricina 149, de 2,2 kDa (Kato y col., 1994); carece de residuos de Trp, y posee un predominio de aminoácidos ácidos. Si bien los avances logrados en cuanto a la caracterización estructural son relevantes, los bajos rendimientos obtenidos durante las etapas de purificación y la complejidad de los medios de cultivo a partir de los cuales fue aislada, fueron limitantes para poder realizar una completa caracterización estructural.