

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	i
INTRODUCCIÓN	1
1- Bacterias del Ácido Láctico	2
2- Bacteriocinas	6
2.1 Definición	6
2.2 Clasificación	7
2.2.1 Bacteriocinas de Clase I	7
2.2.2 Bacteriocinas de Clase II	8
2.2.3 Bacteriocinas de Clase III	10
2.3 Espectro de Inhibición	10
2.3.1 Espectro de inhibición de las bacteriocinas Clase I	11
2.3.2 Espectro de inhibición de las bacteriocinas Clase IIa	11
2.3.3 Espectro de inhibición de las bacteriocinas Clase III	12
2.4 Características fisicoquímicas	12
2.5 Mecanismo de Acción	13
2.5.1 Mecanismo de acción de las bacteriocinas Clase I	13
2.5.2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas Clase IIa	14
2.5.3 Mecanismo de acción de las bacteriocinas Clase IIb	16
2.5.4 Mecanismo de acción de las bacteriocinas Clase III	16
2.6 Purificación	16
3. Métodos de Screening para detectar la actividad antimicrobiana	18
4. Síntesis química en fase sólida de péptidos antimicrobianos	19
5. Estudios estructura-función	20
6. Estudios conformacionales por Dicroísmo circular y Fluorescencia	22
6.1 Dicroísmo circular	23
6.2 Espectroscopía de fluorescencia	25
6.2.1 Intensidad y posición espectral de la longitud máxima de emisión o excitación.	26
6.2.2 Anisotropía	26
6.2.3 Apagamiento o quenching	26
OBJETIVOS GENERALES - JUSTIFICACIÓN DE LOS OBJETIVOS PROPUESTOS	28
Objetivos Generales	29
Justificación de los Objetivos Propuestos	30
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. MATERIALES Y MÉTODOS CAPÍTULO 1	36
Aislamiento, purificación y caracterización de una bacteriocina producida por <i>Lactobacillus plantarum</i> LP31	36
1.1 Cepas y conservación de cultivos	36
1.2 Obtención del sobrenadante libre de células	37
1.3 Detección de la actividad antimicrobiana	37
1.4 Purificación	38
1.4.1 Extracción en fase sólida de C18	38
1.4.2 Determinación del contenido total de proteína	38
1.4.3 Estimación del peso molecular del compuesto activo	39
1.4.4 Cromatografía de filtración por geles.	39

1.4.5 Sensibilidad a proteasas de la Fracción IIA y IIB	40
1.4.6 Análisis de la Fracción IIA mediante Cromatografía líquida de alta performance (HPLC).	40
1.4.7 Electroforesis capilar	41
1.4.8 Modo de acción de las Fracciones IIA y IIB	41
1.4.9 Cromatografía de intercambio catiónico	41
1.4.10 Purificación de la Fracción IIA mediante HPLC	42
1.5 Caracterización del péptido mayoritario	43
1.5.1 Espectrometría de masas (Técnica MALDI-TOF)	43
1.5.2 Análisis de aminoácidos	43
2. MATERIALES Y MÉTODOS CAPÍTULOS 2 (a) y 3 (b)	44
(a) Síntesis química y estudios conformacionales de un análogo sintético de Plantaricina 149 (PIn149a).	44
(b) Diseño de una bacteriocina híbrida y Estudios Estructura-Función.	44
2.1 Síntesis química en fase sólida de los péptidos antimicrobianos	44
2.1.1 Reactivos utilizados	44
2.1.2 Etapas de la síntesis	47
2.1.3 Desprotección y clivaje	49
2.2 Purificación	49
2.3 Caracterización de los productos de síntesis	50
2.3.1 Control Analítico por HPLC	50
2.3.2 Espectrometría de masas	50
2.3.3 Secuenciamiento	50
2.4 Ciclización de los péptidos sintéticos por formación de puentes disulfuro.	50
2.5 Cepas sensibles y evaluación de la actividad antimicrobiana	51
2.5.1 Cepas utilizadas y conservación de cultivos	51
2.5.2 Condiciones de cultivo	52
2.5.3 Detección de la actividad antimicrobiana	52
2.5.4 Determinación de la CIM (concentración inhibitoria mínima)	53
2.5.5 Estudio del Modo de acción de los péptidos activos	54
2.6 Determinación de la actividad hemolítica	54
2.7 Estudios conformacionales	55
2.7.1 Análisis predictivos de estructura secundaria	55
2.7.2 Determinación de la estructura secundaria por Dicroísmo circular	55
2.8 Espectroscopia de fluorescencia	56
2.8.1 Desplazamientos de la longitud máxima de emisión.	56
2.8.2 Ensayos de apagamiento o quenching	56
2.8.3 Preparación de micelas	57
2.9 Cálculos de Hidrofobicidad	57
RESULTADOS CAPÍTULO 1	
Aislamiento, purificación y caracterización de una bacteriocina producida por <i>Lactobacillus plantarum</i> LP31	58
Caracterización preliminar	59
Purificación	62

Extracción en fase sólida	62
Estimación del peso molecular de la Fracción I	64
Cromatografía de filtración con geles de la Fracción I	64
Sensibilidad a proteasas de la fracción IIA y IIB	65
Modo de acción de las Fracciones IIA y IIB sobre un cultivo proliferante de <i>Pseudomonas</i> sp	65
Análisis mediante HPLC y Electroforesis capilar de la Fracción IIA	66
Cromatografía de intercambio catiónico	68
Purificación de la Fracción IIA por HPLC Semipreparativo	69
Caracterización del péptido mayoritario	71
Espectrometría de masas y Electroforesis capilar	71
Análisis de aminoácidos y Secuenciamiento	74
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES CAPÍTULO 1	75
Discusión	76
Conclusiones	81
RESULTADOS CAPÍTULO 2	
Síntesis química y estudios conformacionales de un análogo sintético de Plantaricina 149 (PIn149a).	82
Síntesis y caracterización de PIn149a	83
Espectro antimicrobiano y Modo de acción de PIn149a	84
Determinación de la actividad hemolítica de PIn149a	86
Análisis predictivos de estructura secundaria	86
Estudios conformacionales por Dicroísmo circular	86
Espectroscopía de fluorescencia	88
Desplazamientos de la longitud máxima de emisión	88
Ensayos de Apagamiento	89
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES CAPÍTULO 2	92
Discusión	93
Conclusiones	99
RESULTADOS CAPÍTULO 3	
Diseño de una bacteriocina híbrida y Estudios Estructura-Función	101
Síntesis química y caracterización de los péptidos diseñados	102
Síntesis química y caracterización del péptido híbrido lineal (PHL) y su extremo C-terminal	102
Síntesis química y caracterización del péptido N-terminal (N-T)	106
Síntesis química y caracterización del pentapéptido N-terminal de PIn149a	107
Ciclización de los péptidos PHL y N-T por formación de puentes disulfuro intramoleculares.	107
Espectro antimicrobiano de los péptidos diseñados	108
Modo de acción de los péptidos diseñados	110
Determinación de la CIM (concentración inhibitoria mínima)	111
Determinación de la actividad hemolítica	112
Estudios conformacionales por Dicroísmo circular	112
Dicroísmo circular del PHL y cíclico (PHC)	112
Dicroísmo circular del péptido C-terminal protegido (C-TP)	113
Dicroísmo circular del péptido C-terminal desprotegido (C-TD)	114
Dicroísmo circular del péptido N-terminal lineal y cíclico	114

Dicroísmo circular del péptido N- terminal lineal (N-TL)	115
Dicroísmo circular del péptido N- terminal cíclico (N-TC)	116
Espectroscopía de fluorescencia	116
Desplazamientos de la longitud máxima de emisión	117
Ensayos de Apagamiento	118
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES CAPÍTULO 3	119
Discusión	120
Conclusiones	130
RESUMEN	132
SUMMARY	135
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
TRABAJOS PUBLICADOS – PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS.	154