

RESUMEN

En la búsqueda de nuevas sustancias antibióticas y de biopreservadores alimentarios, los péptidos antimicrobianos producidos por las Bacterias Lácticas (BAL) conocidos como bacteriocinas, han sido identificados como nuevos y promisorios candidatos, y es por ello que han recibido particular atención. Estos compuestos inhiben con elevada eficiencia el crecimiento de bacterias patógenas y/o alteradoras de alimentos, y constituyen un buen sistema modelo para análisis estructura-función de péptidos antimicrobianos en general.

Los objetivos de esta Tesis fueron investigar características estructurales y actividades antimicrobianas de plantaricinas naturales y sintéticas, y además diseñar una bacteriocina híbrida Pediocina-Plantaricina, a fin de evaluar sus potenciales aplicaciones como preservadores alimentarios.

Lactobacillus plantarum Lp31, cepa aislada a partir de un embutido cárnico artesanal de la región Santa Fe (Argentina) por Simonetta y col. (1997), produjo una sustancia antimicrobiana activa hacia patógenos de grado alimentario tales como *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*, pero no presentó acción antimicrobiana frente a cepas de bacterias del ácido láctico, pertenecientes a la colección de las Cátedras de Microbiología y Biotecnología (FIQ–UNL). Esta sustancia antimicrobiana fue inactivada por enzimas proteolíticas, fue estable al calentamiento y a la acción de catalasa, y presentó actividad máxima en el rango de pH 5-6. Consecuentemente, la misma fue caracterizada en forma preliminar como una bacteriocina. Su concentración máxima se obtuvo en la fase exponencial de crecimiento del microorganismo productor. En este trabajo, la bacteriocina fue secuencialmente purificada mediante extracción en fase sólida (C18), Cromatografía de filtración por geles y Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en fase reversa. Hemos encontrado que la bacteriocina producida por *L. plantarum* LP31 es un péptido con un peso molecular de 1558.85 Da, determinado mediante EM-MALDI-TOF, y que tiene un efecto bactericida frente a los organismos mencionados anteriormente. El análisis de aminoácidos indicó la presencia de Ala (2), Arg (1), Asn (1), Glu (4), Gly (1), Lys (2) Ser (1) y Thr (1).

Plantaricina 149 es una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* NRIC 149, cepa aislada de muestras de ananá [Kato, T y col. (1994)], consistente en una cadena polipeptídica de 22 residuos de aminoácidos (YSLQMGATAIKQVKKLFKKKG).

En el presente trabajo se sintetizó mediante química Fmoc en fase sólida, un análogo funcionalizado como amida en su extremo C-terminal, que fue denominado PIn149a, y se determinó su actividad antagonista frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Su estructura secundaria fue estudiada mediante Dicroísmo circular (DC) y el entorno del residuo de Tyr₁ mediante Espectroscopía de fluorescencia, en diferentes condiciones, obteniéndose resultados relativos a la interacción de PIn149a con micelas inversas preparadas a partir del compuesto anfifílico bis (2-etilhexil)- sulfosuccinato de sodio (AOT) en ciclohexano. PIn149a resultó activa frente a una cepa de *Staphylococcus aureus* y cuatro cepas de *Listeria* a pH 5.5 y 7.4, y al igual que su variante natural fue inhibitoria frente a la cepa de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Los experimentos de DC en muestras constituidas por PIn149a y micelas inversas de AOT sugirieron que la estructura helicoidal anfipática de PIn149a se estabiliza mediante interacciones electrostáticas entre los residuos de Lys cargados positivamente (carga neta del péptido +7) y el surfactante aniónico. Los experimentos de Fluorescencia en buffer fosfato pH 7.4 indicaron que el residuo N-terminal, Tyr₁ se ubica cercano a las cabezas polares de las moléculas de AOT.

Considerando los resultados obtenidos con PIn149a y su especificidad hacia *Listeria* se diseñó un híbrido formado por el extremo N-terminal de Pediocina PA-1 (residuos 1-18) y PIn149a (residuos 6-22) (YYGNGVTCGKHSCSVDWGATAIKQVKKLFKKKGG), que fue identificado como PH (PHL, lineal; PHC, cíclico). Tanto la molécula híbrida como sus partes constitutivas fueron sintetizadas empleando la química SQFS-Fmoc. En concordancia con los resultados encontrados para PH y PIn149a, la secuencia correspondiente al extremo C-terminal del PH, denominado C-T (residuos 19-35), resultó activa hacia cepas de *Listeria*. Sin embargo, se determinó que el péptido C-T fue menos activo que PIn149a. Este resultado sugiere que la secuencia YSLQM, presente en PIn149a pero ausente en C-T, facilita la interacción del péptido con la membrana de la célula bacteriana, particularmente a través de los residuos hidrofóbicos Leu₃ y Met₅. Los ensayos de inhibición realizados sobre la secuencia N-terminal del híbrido (1-18, denominado N-T) indicaron que el mismo no presenta actividad antimicrobiana, tanto en su forma lineal como cíclica. De acuerdo a este resultado, el extremo N-terminal del híbrido mediaría la unión inicial del mismo a la membrana de la célula blanco, a través de interacciones de tipo electrostáticas, pero no estaría involucrado en la actividad antilisteria. Además, los resultados confirmaron que

el puente disulfuro entre los residuos de Cys₉ y Cys₁₄ no es esencial para la actividad antimicrobiana del híbrido, ya que se obtuvieron similares resultados con PHL y PHC. En comparación con Pediocina PA-1, el híbrido posee algunas propiedades fisicoquímicas y biológicas que remarcan su potencial interés tecnológico: la ausencia de residuos de Met, la presencia de un solo puente disulfuro, un número reducido de His, y una mayor cationicidad a pH 7 (PH= +8, Pediocina PA-1=+4), debida al alto contenido de Lys. Por otro lado, el cambio de pH de 5.5 a 7.4 aumentó la actividad antilisteria, sugiriendo que las interacciones electrostáticas gobiernan la unión del híbrido a la membrana de la célula blanco. Considerando los resultados obtenidos sobre estructura secundaria del péptido híbrido cíclico estudiada por DC y los similares reportados para Pediocina AcH en agua, es importante remarcar la elevada similitud encontrada en el contenido de estructura secundaria de ambos péptidos (Híbrido-H20: 4% α -hélice, 16.9% lámina- β , 9.2% turn, 69.8% no ordenada; Pediocina Ac-H-H20: 8% α -hélice, 20% lámina- β , 15 % turn, 56 % no ordenada). Las constantes de Stern-Volmer determinadas en los ensayos de apagamiento de la fluorescencia mediante ioduro sobre el PH, en buffer y en presencia de micelas inversas de AOT, sugieren que el residuo Trp₁₈ se inserta en la parte hidrofóbica profunda de la micela. Todos los péptidos sintetizados en este trabajo han demostrado ser selectivamente activos hacia las membranas de las células bacterianas, ya que ninguno de ellos demostró habilidad significativa para producir la lisis de glóbulos rojos.

En conclusión, la actividad bactericida de Pln149a frente a las cepas Gram-positivas, reconocidas como patógenos alimentarios, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, es un resultado promisorio que debe ser estudiado en mayor profundidad, a fin de evaluar su potencial aplicación biotecnológica en la preservación de alimentos.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la bacteriocina híbrida concluimos que la molécula contiene dos dominios: un dominio N-terminal, lámina beta y catiónico, que participa como mediador de la unión de la misma a la superficie de la célula blanco y un dominio de C-terminal, con estructura de α -hélice anfipática que posiblemente esté involucrado en la penetración dentro de la región hidrofóbica de la membrana de la célula blanco.

Como consecuencia de los resultados y avances logrados, nuevas áreas de investigación se están explorando relativas al diseño de nuevos análogos modificados y bacteriocinas híbridas que puedan ser activos frente a bacterias reconocidas como agentes de enfermedades de transmisión alimentaria.