



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



Identificación de actividad de alfa-amilasa en geles 2D

Jocelin Rizo-Villagrana, Catalina Cárdenas, Carmen Wachter y Romina Rodríguez-Sanoja. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad Universitaria, C.P. 04519, Apto. Postal 70228, México, D.F.
e-mail: romina@biomedicas.unam.mx, marari_qa@hotmail.com

Palabras clave: Pozol, fermentaciones tradicionales, bacterias lácticas, amilasas, proteómica.

Introducción. El pozol es una bebida de maíz nixtamalizado y fermentado que se consume al sur y sureste de México (1). La única fuente de carbono fermentable que se encuentra presente en esta bebida es el almidón, no obstante, los estudios microbiológicos encaminados a encontrar la actividad amilolíticas en otras bacterias, hongos y levaduras son muy escasos y los que se han llevada a cabo en bacterias lácticas muestran que estas son débilmente amilolíticas si se comparan con otras bacterias, incluso lácticas. Así, es necesario explicar como un contenido tan bajo de azúcares libres puede determinar una microbiota tan diversa y abundante (10^{10} bacterias lácticas, mesófilas aerobias, enterobacterias, levaduras y hongos). Para realizarlo, se decidió realizar una aproximación al sistema de alfa-amilasas que interviene en este proceso utilizando como herramienta el análisis proteómico, lo que nos permitiría identificar a las enzimas directamente *in situ*, sin pasar por un cultivo previo. Sin embargo, la preparación de extractos proteicos para proteómica requiere de un tratamiento con agentes caotrópicos y detergentes los cuales desnaturalizan a las proteínas destruyendo la actividad enzimática.

Así, el objetivo de este trabajo es diseñar un método que permita recuperar la actividad enzimática *in situ* usando como control positivo a la alfa-amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

Metodología. *L. amylovorus* NRRL B-4540 (Agriculture Research Service Culture Collection, EEUU) fue utilizado para la producción de la amilasa. El bacilo fue crecido en medio MRS-almidón a 29°C durante 16 horas. La enzima se recuperó del sobrenadante y la actividad se determinó por el método de I/I₀ (2). La muestra fue sometida a las condiciones establecidas como óptimas para la extracción de la proteína del pozol (3): 2.4U de actividad se disolvieron en el tampón de extracción (Urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 2% y ASB14 2%), la proteína se precipitó con 3 volúmenes de etanol acetona 1:1 y se resuspendió en el tampón de rehidratación para el isoelectroenfoco (urea 7M, tiourea 2M, ASB14 2%, CHAPS 2%, DTT 50mM y anfolitos pH 3-10). Se realizó la rehidratación activa y las proteínas se focalizaron de acuerdo al protocolo establecido (3). La segunda dimensión se realizó de acuerdo al protocolo reportado para SDS-PAGE (4). La renaturalización se realizó con 6 lavados sucesivos con amortiguador citratos- fosfatos 0.1M pH5.

Resultados. La enzima se recuperó en el momento que se observó la mayor actividad en el cultivo (12.82 U/ml) (Fig. 1).

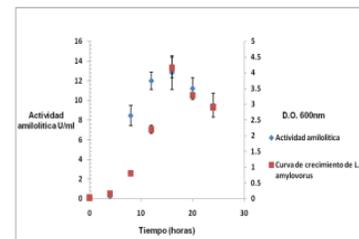


Fig. 1. Cinética de crecimiento y actividad enzimática de *L. amylovorus* en medio MRS-almidón.

Se realizó la electroforesis en dos dimensiones, lográndose recuperar la actividad enzimática con el método propuesto. La figura 2 muestra a la enzima en geles en 1 y 2D. Se observa un peso aproximado de 105 KDa y un punto isoelectrico de 4.7 que coinciden con los valores teóricos de 104.9 KDa y pI de 4.73 (Fig. 2).

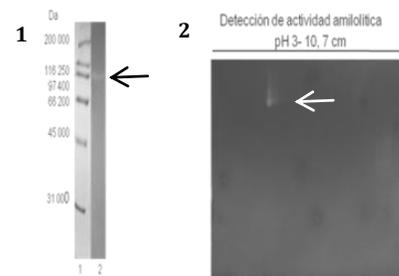


Fig. 2. Identificación *in situ* de la α -amilasa de *L. amylovorus*. Gel 1 SDS-PAGE y 2) Zimograma 2D.

Conclusiones. Se logró la renaturalización de la α -amilasa modelo, recuperándose su actividad *in situ*. Se encontró que la cantidad mínima necesaria para identificar la actividad es de 0.17U.

Bibliografía.

1. Wachter, C. (1999). *Cuadernos de nutrición*. Vol (22): 125-127.
2. Giraud, E., Gosselin, L., Marin, B., Parada, J.L., Raimbault, M. (1993). *Appl. Bacteriol.* Vol. (75): 276-282.
3. Cardenas, C., Wachter, C. Rodríguez-Sanoja (2011) En preparación.
4. Laemmli, U. K. (1970). *Nature*. Vol. (227): 680-685.