



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## IMPLEMENTACIÓN DE HERRAMIENTAS DE PROTEÓMICA AL ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE FERMENTACIÓN DEL POZOL

Catalina Cárdenas<sup>1</sup>, Carmen Wachter<sup>2</sup>, Bronwyn Barkla<sup>3</sup> y Romina Rodríguez-Sanoja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, 04510, D.F.

<sup>2</sup>Depto de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química UNAM. Ciudad Universitaria, 04510, D.F.,

<sup>3</sup>Instituto de Biotecnología, UNAM, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos, 62250 México.

e-mail: romina@correo.biomedicas.unam.mx, catycardenas@hotmail.com.

*Palabras clave: Pozol, Proteómica, 2-DE.*

**Introducción.** El pozol es una bebida fermentada elaborada a base de masa de maíz nixtamalizado (1, 2). Para el estudio de su fermentación se han empleado diversas metodologías que incluyen la identificación de la microbiota presente a través de técnicas dependientes de cultivo y algunas técnicas moleculares independientes de cultivo (3, 4) sin que a la fecha se tenga claro el mecanismo del desarrollo de la fermentación. Con el fin de elucidarlo, en el grupo de trabajo se planteó el uso de herramientas de proteómica para identificar las enzimas que permiten la utilización del sustrato y en última instancia el desarrollo de la microbiota y la fermentación. El primer reto para este tipo de estudios es la obtención de una muestra de proteína con la calidad adecuada y capaz de representar al sistema. Pese a que existen reportados diferentes métodos para la extracción del metaproteoma del suelo o de otras muestras ambientales, las características poco convencionales del pozol, en especial la presencia de altas concentraciones de almidón parcialmente gelificado, que encapsula macromoléculas y de las zeínas como proteínas de alta abundancia que enmascara a las proteínas de baja abundancia como las glucósido-hidrolasas, obligan al diseño de una nueva estrategia de extracción de proteína.

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar una técnica de extracción de proteínas que permitiera la obtención de muestras representativas del pozol con la calidad adecuada para su posterior uso en proteómica.

**Metodología.** La estrategia se basó en el "protocolo general para la preparación de muestras" reportado por Kraj y Silberring (5). Para cada uno de los pasos planteados en ella se probaron diferentes métodos (fig. 1). Se disminuyó el tamaño de partícula para favorecer la interacción del buffer de extracción con los gránulos insolubles de almidón. Por otro lado, las proteínas de alta abundancia, como las zeínas, fueron prácticamente eliminadas de la muestra aprovechando sus características de solubilidad en etanol.

**Resultados.** La metodología final para la extracción del proteoma del pozol quedó conformada por: la maceración con CO<sub>2</sub> sólido para la lisis celular; el buffer con ASB-14

para la extracción de proteínas; la centrifugación para la separación de almidón y la precipitación con EtOH/Acetona para la concentración.

Lisis celular	<ul style="list-style-type: none"><li>&gt; Maceración (CO<sub>2</sub> sólido)</li><li>&gt; Sonicación</li><li>&gt; Homogenización</li><li>&gt; Lisis enzimática</li></ul>
Extracción de proteína	<ul style="list-style-type: none"><li>&gt; Buffer urea</li><li>&gt; Buffer Urea/urea</li><li>&gt; Buffer Urea/urea/ASB-14</li><li>&gt; Buffer Tris/HCl</li><li>&gt; Buffer fosfatos</li><li>&gt; Buffer Tris/HCl/SDS</li></ul>
Separación	<ul style="list-style-type: none"><li>&gt; Filtración</li><li>&gt; Centrifugación</li></ul>
Concentración	<ul style="list-style-type: none"><li>&gt; Speed Vac</li><li>&gt; Centrición</li><li>&gt; Precipitación:<ul style="list-style-type: none"><li>&gt; Acetona</li><li>&gt; TCA/Acetona</li><li>&gt; DOC/Acetona</li><li>&gt; EtOH/Acetona</li></ul></li></ul>

Fig. 1. Protocolo general para la preparación de muestra (Columna izquierda). Métodos probados (Columna derecha)

Se evidenció la presencia de proteínas de alta abundancia en electroforesis de una y dos dimensiones y la deficiente focalización de éstas. La extracción con EtOH 70% y NaAcO 0.5% permitió la eliminación de aproximadamente el 70 % de las zeínas.

**Conclusiones.** Se logró obtener un protocolo de extracción reproducible, el cual permitió la simplificación del sistema, permitiendo la detección de las proteínas de menor abundancia.

**Agradecimiento.** A CONACYT por su apoyo en el proyecto 49687-Z. C. Cárdenas recibe beca de doctorado CONACYT.

### Bibliografía.

- (1) Wachter, C., Cañas A., Bárzana E., Lappe P., Ulloa M., and Owens D. (2000). *Food Microbiology*, 17, 251-256.
- (2) Guyot J., Trêche S., Rio D., Espinosa J., Centurión D. and Wachter C. (2003) Food-based approaches for a healthy nutrition. 11: 23-28.
- (3) Ampe F., ben Omar N., Moizan C., Wachter C., and Guyot J. (1999) *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5464-5473.
- (4) ben Omar N. and Ampe F. (2000) *Applied And Environmental Microbiology*. 66: 3664-3673.
- (5) Kraj A. y Silberring J. (2008) Sample Preparation. En *Proteomics Introduction to Methods and Applications*. Kraj A. y Silberring J. Wiley, EUA. Pag. 8 -10.