

OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa PRODUCIDA POR *Lactobacillus sakei*

Luz-Adriana López-Arvizu¹, José Reyes-Cortés¹, Israel García-Cano², Amelia Farrés³ y Edith Ponce-Alquicira¹,
¹Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Departamento de Biotecnología, México, CDMX, 09340.
²The Ohio State University, Department of Food Science and Technology, Columbus OH, USA. ³UNAM, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, México, CDMX 04510 pae@xanum.uam.mx

Palabras clave: Peptidoglucano hidrolasa (PGH), N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, optimización.

Introducción. Las péptidoglucano hidrolasas (PGH) son enzimas capaces de hidrolizar enlaces covalentes del peptidoglucano (PG), principal componente de la pared celular bacteriana, que se constituye de unidades alternadas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilmurámico (MurNAc) (1). Podrían utilizarse como antimicrobianos efectivos en productos alimenticios debido a su actividad inhibitoria contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*, entre otras bacterias patógenas (2). Algunas PGH contienen en su secuencia dominios LysM. Pequeños dominios globulares que le confieren anclaje a la membrana de microorganismos sensibles (3).

La PGH producida por *L. sakei* y que corresponde a una N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, fue clonada en su secuencia completa (AmiC) y en su secuencia recortada sin uno de los dominios LysM (AmiLysM4) para realizar un análisis comparativo de sus actividades específicas, optimizando las condiciones de temperatura, pH y concentración del ion KCl, para alcanzar sus valores máximos de actividad.

Metodología. La actividad de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, se determinó siguiendo el protocolo descrito por García-Cano 2015 (4), utilizando L-alanina-o-nitroanilín hidrocloreto como sustrato específico. La reacción se incubó a 37°C durante 30 min determinando la absorbancia a 405 nm. Se evaluó la actividad específica a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 y 70°C), diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7, 8 y 9) y diferentes concentraciones de KCl (100-1000 mM) para obtener los picos máximos de actividad, realizando la optimización con el diseño Box Behnken en el programa Statgraphics Centurion (Versión 18.1.06).

Resultados.

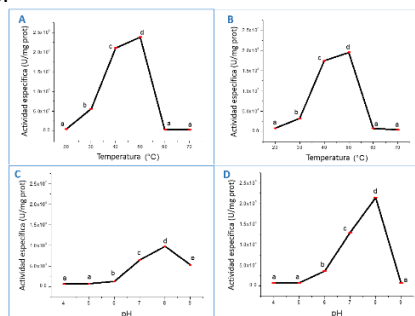


Fig. 1. Efecto de la Temperatura y pH en la actividad específica de proteínas recombinantes A y C) AmiC; B y D) AmiLysM4.

El punto máximo de actividad con respecto a la temperatura fue a 50°C y pH 8 para ambas proteínas (**Fig.1**), a una concentración

de KCl a 100 mM para AmiC y 200 mM para AmiLysM4; condiciones bajo las que se realizó la optimización de la actividad. En la **Fig.2** se muestra un ejemplo del efecto combinado de 2 de los factores evaluados; en la cúspide se observan los valores óptimos para cada combinación.

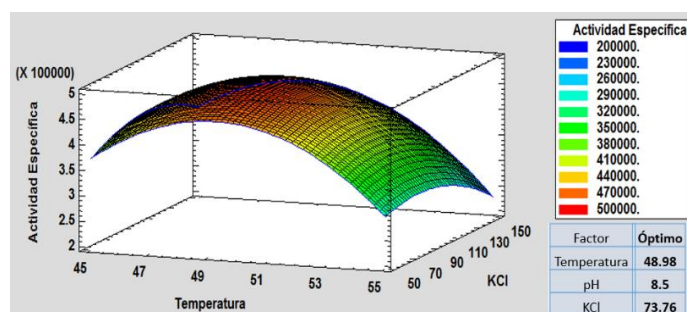


Fig. 2. Superficie de respuesta en el efecto combinado de Temperatura y concentración de KCl para AmiC.

La **Tabla 1** muestra el incremento total de la actividad específica obtenida bajo las condiciones óptimas determinadas a través del diseño Box Behnken. Para ambas proteínas el incremento fue mayor del 100%.

Tabla 1. Incremento de la actividad específica bajo las condiciones óptimas con respecto al control.

Proteína Recombinante	Actividad específica CONTROL (U/mg prot)	Actividad específica ÓPTIMA (U/mg prot)	Incremento de la Act. específica (%)
AmiC	1.95E05	4.80E05	146
AmiLysM4	9.52E04	2.65E05	178

Conclusiones. La proteína AmiC presentó valores de actividad mayor que AmiLysM4, sin embargo, el incremento de la actividad por la optimización fue mayor para AmiLysM4 (178%) con respecto a AmiC (146%). En ambos casos la optimización de las proteínas podría incrementar su uso potencial en diferentes procesos biotecnológicos.

Agradecimientos. Al CONACYT por la beca para estudios de posgrado otorgada durante la realización de este proyecto.

Bibliografía.

- Vollmer W, Blanot D y de Pedro MA (2008) *FEMS Microbiol Rev.* 32:149-67.
- Fusco V et al. (2015) *Front Microbiol.* 6:155.
- Mesnage S et al. (2014) *Nat Commun.* 10:1038:1-11.
- García-Cano I et al. (2015) *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:8563-8573.