

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA DE *Streptococcus infantarius* 25124 AISLADA DEL POZOL

Carolina Rodríguez Saavedra¹, Ma. Del Carmen Wachter Rodarte¹, Romina Rodríguez Sanoja² y Gloria Díaz-Ruiz¹.
 1. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM; 2. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México, México. gloriadr@unam.mx

Palabras clave: pozol, *Streptococcus infantarius*, amilasas.

Introducción. El pozol es una bebida fermentada a base de maíz nixtamalizado, cuyas especies predominantes son las bacterias ácido lácticas (BAL). En investigaciones previas se logró aislar e identificar a *S. infantarius* subsp. *infantarius* 25124 (*Sii-25124*) como una BAL presente en todas las etapas de fermentación, capaz de producir una amilasa asociada a célula (1). Este trabajo se enfocó en el estudio de las amilasas generadas por *Sii-25124* y su capacidad de utilizar sustratos ramificados y no ramificados.

Metodología. A partir de cultivos celulares de *Sii-25124* se obtuvo un lisado celular concentrado, con el cual se llevó a cabo un ensayo de unión a almidón insoluble (2). Las fracciones del ensayo se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE (3) y a un zimograma, del cual se escindieron las bandas con actividad amilolítica para obtener péptidos, secuenciarlos por LC-MS/MS (4), e identificarlos por comparación de su secuencia con la base de datos del NCBI usando BLAST. Finalmente, se caracterizó la actividad amilolítica de las enzimas presentes en el lisado celular de *Sii-25124* para conocer su estabilidad frente a temperatura y pH, su actividad frente a diferentes iones metálicos y el efecto de diferentes sustratos en su actividad.

Resultados. Los ensayos de unión al almidón insoluble permitieron visualizar mediante el zimograma dos bandas de actividad amilolítica: una de ~250 kDa (Amy4) y otra de ~50 kDa (Amy3) (Fig. 1). Los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS arrojaron ocho péptidos secuenciados para la enzima Amy4 y cinco péptidos para la enzima Amy3, que tras el análisis por BLAST correspondieron en un 100% con la amilopululanasa extracelular y con la α -amilasa intracelular, respectivamente, de *Streptococcus infantarius* ATCC BAA-102 (EDT46783 y EDT47408, respectivamente).

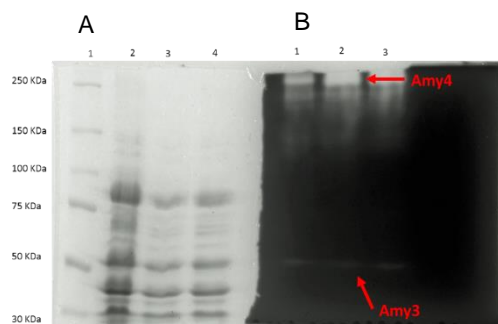


Fig. 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la separación de las amilasas de *Sii-25124* por unión al almidón insoluble. **A:** SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Carril 1: MMM; carril 2: protoplastos; carril 3: lisado celular; carril 4: lisado celular después de incubar con almidón insoluble. **B:** Zimograma. Carril 1: protoplastos; carril 2: lisado celular; carril 3: lisado celular después de incubar con almidón insoluble. Las

flechas rojas indican las bandas que fueron cortadas para su secuenciación.

La caracterización de las enzimas en el sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124* mostró que la actividad amilolítica de ambas enzimas se mantuvo estable entre 30°C y 45°C y en un intervalo de pH entre 6.8 y 8.0, mientras que los ensayos con diferentes iones metálicos revelaron una activación en presencia de Mg²⁺ (Fig. 2A). Finalmente, se evaluó la actividad de las amilasas frente a almidón y amilopectina, con lo que se observó una mayor velocidad de reacción frente al almidón que frente a la amilopectina (Fig. 2B).

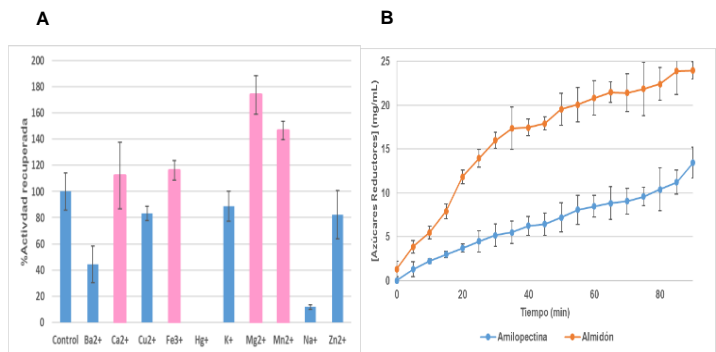


Fig. 2. Caracterización de la actividad amilolítica de las enzimas presentes en el sobrenadante del lisado celular de *Sii-25124*: **2A:** actividad en presencia de diferentes iones metálicos (10 mM); **2B:** producción de azúcares reductores a partir de almidón (naranja) y amilopectina (azul) a 80 mg/mL.

Conclusiones. La producción de una amilopululanasa (Amy4) por parte de *Sii-25124* podría conferirle a esta cepa la capacidad de prevalecer durante todo el proceso de fermentación del pozol, así como para permitir a otras bacterias colonizar y llevar a término el proceso.

Agradecimientos. Agradecemos a CONACyT por la Beca Nacional 131615 otorgada a estudios de posgrado y al proyecto PAPIIT/UNAM IN-223917.

Bibliografía.

- Díaz-Ruiz, Guyot, Ruiz-Terán, Morlon-Guyot y Wachter (2003) *AEM*. 69 (8): 4367–4374.
- Guillén, Santiago, Linares, Pérez, Morlon, Ruiz, Sánchez y Rodríguez-Sanoja (2007) *AEM* 73(12) 3833-3837.
- Laemmli (1970) *Nature* 227: 680-685.
- Cárdenas, Barkla, Wachter, Delgado-Olivares y Rodríguez-Sanoja (2014) *J. of Prot.* 111 139-147.