



DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ZIMOGRÁFICO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD DE N-acetilglucosaminidasa DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Paola Barbosa-González, Israel García-Cano y Amelia Farrés. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Lab 312. Conjunto "E". Facultad de Química. UNAM. Ciudad de México, CP 04510. E-mail: farres@unam.mx

Palabras clave: N-acetilglucosaminidasa, *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, zimografía,

Introducción. Las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) son enzimas involucradas en diversas funciones celulares. La actividad antibacteriana que presentan ha sido utilizada como una herramienta para el control de patógenos en diferentes ámbitos industriales. La detección rápida de la actividad, la identificación del peso molecular, la especificidad por sustrato y la caracterización bioquímica, son parámetros indispensables para la aplicación y uso de las PGHs.

El objetivo de este trabajo fue diseñar un método zimográfico que permita la detección y determinación de enzimas con actividad de N-acetilglucosaminidasa (NAG), así como el peso molecular de las mismas, mediante la hidrólisis de 4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina (4-NP-GlcNAc) de forma específica, rápida y sencilla.

Metodología. Se realizaron SDS-PAGE [1] con la incorporación del 4-NP-GlcNAc (0.35 mg/mL). Para revelar la actividad, al terminar la electroforesis el gel se incubó con diferentes amortiguadores y diferentes pHs. Dos enzimas con actividad de NAG fueron utilizadas, la primera enzima proveniente de *P. acidilactici* ATCC 8042 [2] y la segunda, la misma proteína pero expresada en un sistema heterólogo (*E. coli* pET 19) (ambas de 99-kDa) [3]. Como control positivo y para validar la técnica se utilizó una enzima comercial (N-acetilglucosaminidasa de *Canavalia ensiformis* de Sigma Aldrich®). Para la caracterización bioquímica y especificidad por sustrato se siguieron las condiciones descritas en [3].

Resultados.

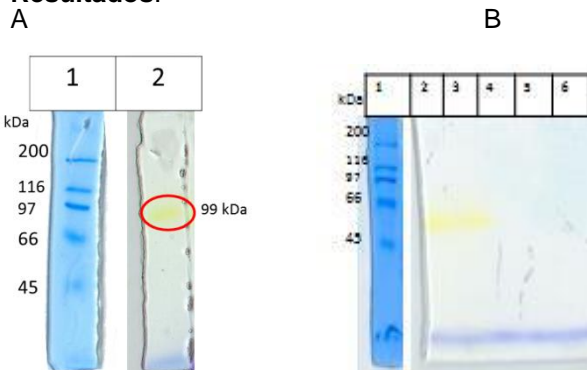


Figura 1. Zimograma de actividad con 4-NP-GlcNAc (A) carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, NAG de *P. acidilactici* ATCC 8042. (B) Carril 1, marcador de alto peso molecular; carril 2 y 3, NAG recombinante; carril 4, N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa [4]; carril 5, Lisozima; carril 6, Lisostafina.

Enzima NAG de 99-kDa	Condición					
	Temperatura			pH		
	29	37	50	4	6	8
Nativa	=	=	=	-	=	=
Recombinante	=	=	=	-	=	=

Tabla 1. Caracterización bioquímica de las enzimas de estudio en función de la temperatura y pH. (=) no hubo efecto en la actividad, (-) la actividad decreció.

Enzima NAG de 99-kDa	Condición							
	Sales							
	NaCl		MgCl ₂		CaCl ₂		ZnCl ₂	
[mM]	1	10	1	10	1	10	1	10
Nativa	+	+	=	-	=	-	-	-
Recombinante	+	+	=	-	=	-	-	-

Tabla 2. Caracterización bioquímica de las enzimas de estudio en función de la presencia de sales. (+) la actividad aumento, (=) no hubo efecto en la actividad, (-) la actividad decreció.

Enzima NAG de 99-kDa	Condición					
	Quelantes				Inhibidor	
	EDTA		EGTA		PMSF	
[mM]	1	10	1	10	1	10
Nativa	=	=	-	-	=	=
Recombinante	=	=	-	-	=	=

Tabla 3. Caracterización bioquímica de las enzimas de estudio en función de la presencia de agentes quelantes e inhibidores, (=) no hubo efecto en la actividad, (-) la actividad decreció.

Conclusiones. La actividad de NAG puede ser detectada por medio de SDS-PAGE con 4-NP-GlcNAc; esta técnica resultó ser altamente específica para PGHs tipo NAG, pues la lisozima, la lisostafina y la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa no hidrolizaron el sustrato

Los resultados de la caracterización bioquímica concuerdan con los obtenidos con técnicas espectrofotométricas en estudios anteriores [3].

Bibliografía

- [1] Laemmli U.K. (1970). *Nature* 15, 680-685
- [2] García-Cano I, Velasco-Pérez L., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Mendoza-Hernández G., Llorente-Bousquets A., Farrés A. (2011). *J Appl Microbiol.* 111, 607-615
- [3] García Cano I. (2013). Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM.
- [4] Campos Gómez M. (2013). Tesis de Maestría (en desarrollo). Facultad de Química. UNAM.