



## PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ENZIMA RECOMBINANTE YKUU DE *BACILLUS PUMILUS*

Leticia Castañeda-Abundez, Carolina Peña Montes, Augusto González-Canto, Amelia Farrés. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Avenida Universidad, 3000, México D.F., 04510. Correo electrónico: [leticia.c.89@hotmail.com](mailto:leticia.c.89@hotmail.com)  
*Palabras clave:* Peroxiredoxina, esterasa promiscuidad enzimática.

**Introducción.** *Bacillus pumilus* GMA1 es un microorganismo que fue aislado de aguas termales mexicanas. Los sobrenadantes de su cultivo poseen actividades enzimáticas capaces de llevar a cabo diversas reacciones de importancia en la industria de alimentos, como la obtención de ácido linoleico conjugado o lipofilización de flavonoides (1), normalmente atribuidas a lipasas o esterases. Durante el proceso de caracterización y purificación de las enzimas presentes en el extracto crudo de *B. pumilus* se encuentra en forma reiterada a una enzima de 22 kDa con actividad de carboxilesterasa, la que fue identificada por análisis de péptidos internos como peroxiredoxina *ykuU* (2). El gen *ykuU* se clonó en *E.coli* y se detectó una actividad de esterasa y otra de peroxiredoxina en diferentes fracciones celulares (3). Por tanto, el objetivo de este trabajo es purificar la enzima recombinante e identificar si la misma molécula posee actividad como peroxiredoxina y de carboxilesterasa.

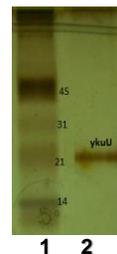
**Metodología.** Se analizaron cinco clonas de *E. coli* recombinantes, se hicieron crecer en medio líquido Luria Bertani (LB) con ampicilina por 24 h y se indujeron con IPTG por 3 horas. Se midió cantidad de proteína por método de Bradford de acuerdo al proveedor (BioRad), se midió su actividad como peroxiredoxina con el método de tiocianato de potasio (4) y su actividad de carboxilesterasa (5). Se verificó la actividad esterasa por crecimiento de las clonas agar tributirina y generación de halos de hidrólisis. Se eligió la clona con mayor actividad y se purificó la enzima obtenida en el sobrenadante por el método de electroforesis preparativa (SDS-PAGE) con el sistema de Prep Cell. Para verificar la purificación se hicieron geles SDS-PAGE y zimogramas y se cuantificó la actividad de carboxilesterasa. (5). A la enzima pura se le determinó actividad de peroxiredoxina.

**Resultados.** Las clonas analizadas fueron Pet ykuU (H1, H2, 5-5, 11-4 y 11-5) y las que presentaron actividad de esterasa fueron las tres últimas. Al evaluarlas con tiocianato, las clonas que tengan actividad de peroxiredoxina consumirán el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y como se observa en la tabla 1, las clonas con actividad de peroxiredoxina fueron las mismas que dieron actividad de esterasa\* (Tabla 1). La prueba de halos de hidrólisis de tributirina coincidió con las dos pruebas anteriores. Sin embargo, en los geles SDS-PAGE y zimograma se observó una banda más intensa con actividad y en el peso molecular esperado para la clona 11-5, por lo que ésta clona se utilizó para purificar la enzima.

**Tabla 1.** Actividad de peroxiredoxina

Muestra	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> residual (%)
Blanco (sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100%	100
Pet ykuU H1	51
Pet ykuU H2	58
*Pet ykuU 5-5	0
*Pet ykuU 11-4	0
*Pet ykuU 11-5	0

En la figura 1 se observa el resultado del proceso de purificación, donde en el carril 2 se observó solo una banda para la fracción 38, de aproximadamente 22 kDa que corresponde con el peso molecular teórico. En la tabla 2 se muestran las actividades de la enzima pura.



**Fig. 2.** Peroxiredoxina pura en gel teñido con plata. Carril 1 marcador de peso molecular low range Bio Rad, carril 2 fracción 38 de prep cell.

**Tabla 2.** Actividades de la enzima pura.

Muestra	Actividad específica de esterasa (U/ mg)	Actividad específica de peroxiredoxina (U/ mg)
<i>E. coli</i> BL21	0	0
Clona 11-5	13.08	45.89

**Conclusiones.** La clona 11-5 de *E. coli* recombinante produce la enzima YkuU con un peso molecular de 22 kDa. La enzima pura tiene actividad de peroxiredoxina y de carboxilesterasa, por lo que puede considerarse una enzima promiscua.

### Agradecimiento

Subprograma 121 de la Facultad de Química, UNAM por la beca otorgada a Leticia Castañeda.

### Bibliografía.

- Bermúdez, P. 2010. Modificación enzimática de flavonoides con las carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM.
- Ayala H. 2011. Purificación e identificación de enzimas de *Bacillus pumilus* GMA1 con potencial en biocatálisis. Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM
- Peña Montes, C., Salazar Cabrera, N., Jacinto G y Farrés, A. 2013. Heterologous expression of a peroxiredoxin of *Bacillus pumilus* with promiscuous esterase activity. SMBB-GIM memorias.
- QuanJiang et al. (2005) Nature 407: 211-215
- Karpushova A, Brümmer F, Barth S, Lange S, RD Schmid. (2005). *Appl Microbiol Biotechnol.* 67: 59-69.