



## DESARROLLO DE UN METODO RAPIDO PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE *Bacillus cereus* CON ACTIVIDAD ASPARTASA

Alma Idalia Soria-Ortiz\*, Yolanda Garza-García, Gerardo Gaona-Lozano, Jesús Rodríguez-Martínez.  
Blvd., V. Carranza y José Cárdenas Valdez S/N, Fax (844)415 57 52, \*almasorio@yahoo.com

*Palabras clave:* Aspartatoamoniacoiliasa, *Bacillus cereus*, Ultracentrifugación.

**Introducción:** La L-aspartasa (L-aspartatoamoniacoiliasa E.C. 4.3.1.1) cataliza la aminación reversible del ácido fumárico y a excepción de iones metálicos divalentes, no requiere la presencia de otros cofactores (1). La Enzima aspartasa de *Bacillus cereus* es una proteína intracelular por lo que requiere de un método eficaz para la obtención de extractos libres de células. La elección de este método depende del microorganismo que se esté utilizando y la cantidad de proteína requerida y del tipo de análisis que se va a llevar a cabo (2).

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método rápido y simple para la obtención de un extracto enzimático con actividad aspartasa de *Bacillus cereus* utilizada para la biosíntesis del aminoácido L-aspartico, empleando la técnica de ultracentrifugación sin el uso de enzimas líticas.

**Metodología.** El cultivo de las células de *Bacillus cereus* y la obtención del paquete celular fueron realizadas de acuerdo a técnicas previamente establecidas (3). El paquete celular obtenido se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos y sometido a ultracentrifugación a 127,127Xg por un tiempo de 30 minutos (metodología 1) y 60 minutos (metodología 2) a una temperatura de 0°C. Posteriormente se determinó la actividad enzimática aspartasa del extracto y el debris celular obtenidos así como de células completas que sirvieron como control. El estudio cinético se llevó a cabo, en reactores tipo batch. La reacción se monitoreo espectrofotométricamente por el consumo de sustrato (fumarato de amonio) a 240 nm, bajo agitación constante a 250 rpm a 37°C. Se tomaron alícuotas de 250µL a determinados intervalos de tiempo. Se realizó la determinación de proteína por el método de Peterson y PAGE-SDS para monitorear y determinar la presencia de la aspartasa derivada de la extracción.

**Resultados.** En las figura 1 y 2 se muestran los resultados comparativos de las metodologías probadas (1 y 2) que muestra valores semejantes de consumo de sustrato tanto para extracto celular como para debris, pero con una pequeña ventaja en la metodología 1 que muestra valores mayores de biotransformación del ácido fumárico en ácido aspártico. Los resultados de la electroforesis también fueron satisfactorios ya que se observa la presencia de la banda correspondiente a peso molecular 76 Kd semejante a los reportados en la literatura (1).

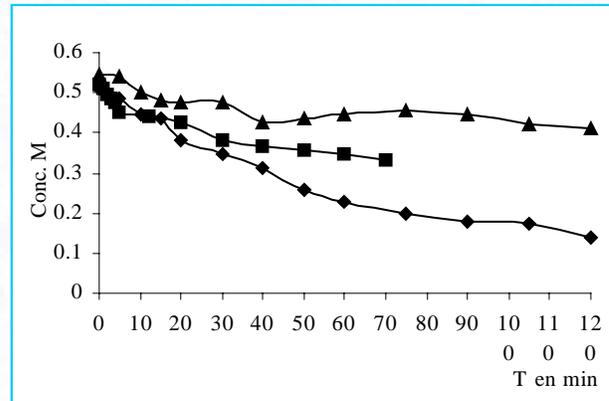


Figura 1 Cinética de consumo de sustrato utilizando la metodología 1: células nativas (□), extracto celular (■), debris (▲)

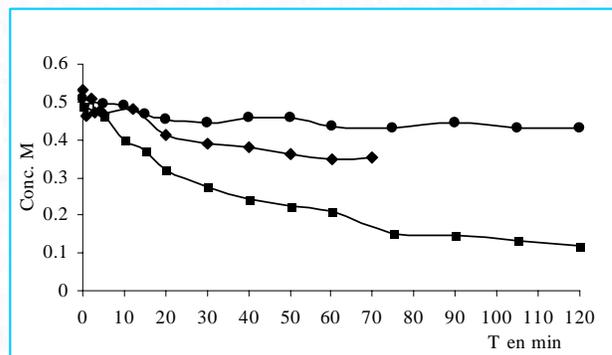


Figura 2 Cinética de consumo de sustrato utilizando la metodología 2: células nativas (■), extracto celular (□), debris (●).

**Conclusiones:** El extracto enzimático con actividad aspartasa obtenido por ultracentrifugación a 127,127Xg, por 30 minutos, presenta una actividad enzimática de  $2.6E-05$  M.mg/ml equivalente al 68.4%, la actividad para debris fue  $1.07E-05$  M.mg/ml equivalente al 28.15% comparadas con la actividad presentada por las células completas de  $3.8E-05$  M.mg/ml.

### Bibliografía.

1. Zhang H.Y., Zhang, J., Lin, L., Du, W.Y., and Lu, J. (1993) Enhancement of the stability and activity of aspartase by random and site-directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Común.* 192, 15-21.
2. X. Kong, Z. Li, X. Gou, S. Zhu, H. Zhang, X. Wang, and J. Zhang. (2002) A monomeric L-Aspartase obtained by in vitro selection. *J. Biol. Chem.*, 277 24289-24293.
3. Y.G. Garza, M.G. Rodríguez, C.L. Hernández and J.M. Rodríguez. (2000) Optimization of aspartate ammonia lyase production by *Bacillus cereus*. *J. Of Ind. Microbiol & Biotech.* 25, 225-228