



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



CARACTERIZACION DE FERULOIL ESTERASA PRODUCIDA POR EL ALCALOFILO FACULTATIVO *Bacillus flexus* NJY2

^aAllan Blanco, ^bClarita Olvera, ^cRoberto Parra, ^aAlberto Gómez, ^aMónica Sánchez.

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, San Nicolás de los Garza, Nuevo León;
^bInstituto de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Cuernavaca, Morelos; ^cCentro del Agua para América Latina y el Caribe, Monterrey, Nuevo León.
allan_blanco@yahoo.com.mx

Palabras clave: Feruloil esterasa, *Bacillus flexus*, alcalófilo.

Introducción. Las feruloil esterases son enzimas que participan en la degradación de la pared celular de los vegetales al hidrolizar el enlace éster presente entre los azúcares y los compuestos fenólicos. Enzimas de este tipo tienen una gran aplicación en el aprovechamiento de productos y residuos agro-industriales ⁽¹⁾. La cepa de *Bacillus flexus* NJY2 fue aislado a partir del nejayote de maíz, residuo de un elevado pH (10-14) por lo que este microorganismo tiene la capacidad de desarrollarse en condiciones alcalinas extremas ⁽²⁾. El presente trabajo tiene como objetivo la caracterización de la feruloil esterasa del *Bacillus flexus* NJY2.

Metodología. El microorganismo fue conservado en medio IOWA II modificado utilizando pericarpio de maíz (20 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y Ca(OH)₂ (15 g/L). Para los ensayos se realizaron fermentaciones en dos etapas, la primera de 24 horas y la segunda por 48 horas para obtener las células por centrifugación y lavadas con buffer MOPS 100 mM pH 7. Para el estudio de inducción se emplearon medios con fuentes complejas de carbono como xilano, pericarpios de maíz, trigo y arroz y medio LB. La actividad enzimática fue determinada utilizando *p*-nitrofenilferulato (PNFF) como sustrato ⁽³⁾. La masa molecular se determinó mediante SDS-PAGE en geles de acrilamida al 16% en buffer de Tris. Se realizaron zimogramas usando etilferulato como sustrato ⁽⁴⁾.

Resultados. La actividad enzimática fue determinada en el sobrenadante de fermentación (2.2 mU/mg proteína) y principalmente asociada a células (56 mU/mg proteína). Se determinó la actividad esterasa asociada a células cuando el microorganismo se creció en medios cuya fuente de carbono contenía ácido ferúlico (AF) como el pericarpio de maíz, trigo y arroz, y medio LB adicionado con AF (1 g/L) y se encontró que la actividad no difería encontrándose alrededor de 67 U/mg de proteína. Sin embargo, cuando se utilizaron medios sin ácido ferúlico como xilano y medio LB, la actividad enzimática se redujo entre 40 y 50%. Se determinó el efecto del pH sobre la actividad enzimática. Para lo anterior se utilizaron células en reposo metabólico obtenidas a pH 7 y 10. El pH óptimo para la hidrólisis de PNFF en el caso de las células obtenidas bajo condiciones neutras fue de 6 mientras que el de las obtenidas bajo condiciones

alcalinas fue de 8. El pH óptimo de la enzima libre fue de 6 independientemente del pH del medio donde fueron obtenidas. Lo anterior indica que el microorganismo no produce feruloil esterases resistentes a pH alcalino, pero crea mecanismos para protegerlas de la alcalinidad manteniendo su actividad. Los alcalófilos facultativos crecidos bajo condiciones neutras se autolizan en pH alcalino dejando expuestas las enzimas al medio de reacción. Por otro lado, cuando crecen en condiciones alcalinas, la pared celular es más gruesa y con cargas negativas para soportar la alcalinidad ⁽⁵⁾. A través de SDS-PAGE se determinó que la masa molecular de la proteína con actividad esterasa ferulílica es de 9.8 kDa.

Conclusiones. La feruloil esterasa de *Bacillus flexus* se encuentra asociada posiblemente a la membrana celular. El ácido ferúlico en concentraciones menores a 1 g/L tiene un efecto estimulador en la producción de la enzima. La feruloil esterasa de *B. flexus* no actúa a pH's alcalinos, la célula crea mecanismos para protegerla del medio de reacción manteniendo su actividad. La masa molecular de la enzima es de 9.8 kDa. La enzima hidrolizó ésteres sintéticos como el metilferulato, etilferulato y MUTMAC. Este es el primer reporte de una feruloil esterasa procedente de una bacteria alcalófila.

Agradecimiento.

Se agradece el apoyo económico de CONACYT proyecto 83263 y a la UANL por beca de doctorado de Allan Blanco Gámez

Bibliografía.

1. Sindhu M, Abraham E. (2004). *Crit. Rev. Biotechnol.* (24) 59–83.
2. Sanchez M, Blanco A, Escalante A, Valladares AG, Olvera C, Parra R. *Letters in Applied Microbiology. In press.*
3. Mastihuba V, Kremnický L, Mastihubova M, Willet JL, Côté GL. (2002). *Analytical Biochemistry*, (309) 96-101.
4. Donaghy J, Kelly PF, McKay AM. (1998). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (50) 257-260
5. Horikoshi K (1999). Cell Structure. *Alkaliphiles*. Kodansha Ltd. & Harwood Academic Publishers. Japón - Países Bajos. 40-56.