

Caracterización parcial de una actividad fosfatasa alcalina excretada por *Bacillus stearothermophilus*

Vincenzo Storaci¹, Liliana Kurz² y Jeff Wilkesman^{3*}

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología.

²Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería.

³Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología.

Universidad de Carabobo. Apartado 3433, Trigal (2001). Valencia, Venezuela.

Recibido: 28-04-08 Aceptado 02-12-09

Resumen

La fosfatasa alcalina (AP; EC 3.1.3.1) desfosforila compuestos monofosfatados a pH básico y es usada en estuches comerciales para el diagnóstico de enfermedades hepáticas, intestinales, óseas y endocrinas (hiperparatiroidismo). Una actividad AP excretada al medio de cultivo por *Bacillus stearothermophilus* fue aislada, identificada, purificada parcialmente y caracterizada. Las bacterias fueron inoculadas en medio líquido con triptona, extracto de levadura, adenosin-5-monofosfato y tampón glicina de sodio pH 10 a 55°C. La actividad AP obtenida de un filtrado libre de células luego de 120 h de cultivo, fue ensayada con 2 mM *p*-nitrofenilfosfato en 50 mM tampón glicina de sodio, pH 10 y 1,5 mM MgCl₂. A los 20 min de incubación, la reacción fue detenida con 0,2 M NaOH y se cuantificó la liberación de *p*-nitrofenol a 410 nm. La AP fue purificada parcialmente por DEAE-celulosa, con una actividad específica de 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$. La actividad fue máxima a 60°C y pH 10, aunque se registró actividad hasta 80°C. La actividad AP fue estimulada por 1 mM MgCl₂ e inhibida por 0,1 mM ZnCl₂, 0,1 mM EDTA y 10 mM fosfato inorgánico. Se determinó un peso molecular (PM) de ~90 kDa mediante zimografía. Los resultados indican que la enzima aislada pudiera ser relevante en aplicaciones industriales, clínicas y biotecnológicas, por su resistencia térmica y alcalina.

Palabras clave: electroforesis, fosfatasa alcalina, termófilos, zimografía

Partial characterization of an alkaline phosphatase activity secreted by *Bacillus stearothermophilus*

Abstract

Alkaline phosphatase (AP; EC 3.1.3.1) dephosphorylates monophosphated compounds at basic pH and is used in several commercial kits for the diagnosis of diseases related with liver, intestines, bones and hyperparathyroidism. The goal of this research was to isolate and partially characterize an AP activity secreted to the culture medium by the thermophilic bacteria *Bacillus stearothermophilus*. Venezuelan thermophiles were inoculated in liquid medium containing tryptone, yeast extract, adenosine-5-monophosphate and glycine buffer pH 10 at 55°C. AP activity obtained after 120 h growth was assayed with 2 mM *p*-nitrophenylphosphate in 50 mM sodium glycine buffer, pH 10 and 1.5 mM MgCl₂. Hydrolysis reaction was stopped with 0.2 M NaOH after 20 min incubation and the released *p*-nitrophenol was quantified at 410 nm.

* Autor para la correspondencia: jwilkesm@uc.edu.ve

AP was partially purified by DEAE-cellulose, with a specific activity of $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ per mg of protein. Enzymatic activity was maximal at 60°C and pH 10, though activity was detected up to 80°C . AP activity was stimulated by 1 mM MgCl_2 , but inhibited by 0.1 mM ZnCl_2 , 0.1 mM EDTA and 10 mM inorganic phosphate. A molecular weight of ~ 90 kDa was determined by zymography. These results indicate this enzyme might have major industrial, clinical and biotechnological roles due to its thermal and alkaline resistance.

Key words: electrophoresis, alkaline phosphatase, thermophiles, zymography.

Introducción

Los organismos termófilos viven a altas temperaturas, pudiéndose subclasificar en termófilos reales (temperatura óptima $40\text{-}70^\circ\text{C}$), y en hipertermófilos ($>70^\circ\text{C}$) (1). Los biotopos a temperaturas mayores a 70°C no son muy abundantes y poseen en su mayoría un origen geotérmico, como el caso de las aguas termales Las Trincheras (Edo. Carabobo, Venezuela). Se ha reportado que las enzimas termófilas muestran pequeñas diferencias en su secuencia de aminoácidos (2), en comparación con enzimas homólogas en organismos mesófilos. Apparently, la clave para la termoestabilidad enzimática es la sustitución de uno o varios aminoácidos en la secuencia, permitiendo el plegamiento de la proteína en una diferente conformación (3). Se cree que el mayor determinante de la actividad enzimática en temperaturas extremas es un cambio en la flexibilidad de la proteína. De igual manera, se ha determinado que las proteínas provenientes de hipertermófilos también son resistentes a solventes orgánicos, detergentes, agentes desnaturalizantes y valores extremos de pH (2, 4, 5).

La fosfatasa alcalina (AP; EC 3.1.3.1) cataliza la hidrólisis en medio alcalino de sustancias orgánicas monofosfatadas produciendo un alcohol y fosfato inorgánico. Su función biológica principal es la hidrólisis del enlace fosfoéster de compuestos orgánicos fosforilados, liberando así el grupo fosfato terminal (6-9). En este trabajo, se pudo aislar, purificar parcialmente y analizar la actividad AP excretada por una cepa termófila aislada de las aguas termales Las Trin-

cheras (Venezuela), tipificadas como *Bacillus stearothersophilus* mediante sistema de identificación multipruebas (galería API).

Materiales y métodos

Materiales

Se usaron los siguientes reactivos marca SIGMA: marcador de pesos moleculares, triptona, albúmina de suero bovino (BSA), dietil aminoetil (DEAE)-celulosa, Sephadex G-100-50, *para*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), *para*-nitrofenol (*p*-NP), fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina, 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato (BCIP), y azul nitro tetrazolio (NBT). El agar cuenta estándar fue marca Hi-Media. Todos los demás reactivos usados fueron grado pro análisis.

Cultivo bacteriano

La cepa bacteriana *Bacillus stearothersophilus*, aislada de las aguas termales de Las Trincheras (piscina de 80°C), fue adaptada a 55°C y cultivada en caldo nutritivo (Hi-Media) y su crecimiento se evidenció a través de placas de Petri con agar cuenta estándar (10). Las bacterias se inocularon en medio líquido (triptona 0,12%, extracto de levadura 0,001%, adenosin-5-monofosfato 0,05 mM y tampón glicina de sodio 50 mM pH 10) durante 120 h a 55°C . El crecimiento del cultivo se cuantificó mediante turbidimetría a 540 nm. Las bacterias fueron tipificadas por galería API (Biomérieux).

Purificación de AP

Se siguieron las metodologías previamente reportadas en la literatura (8, 11, 12)

con algunas modificaciones. Luego de 120 h de crecimiento, el cultivo bacteriano fue centrifugado a 14.000×g por 10 min (Labnet, Spectrafuge 16 M) y el sobrenadante libre de células obtenido se concentró por calor a 55°C hasta obtener la mitad del volumen inicial. Los demás pasos de purificación se realizaron a 25°C. Una fracción de 5 mL del sobrenadante concentrado se introdujo en una columna de intercambio aniónico DEAE-celulosa (40 mL) previamente equilibrada con tampón glicina de sodio 160 mM, pH 8,6. La elución de la muestra se realizó con un gradiente discontinuo entre 0 y 1 M NaCl. Se determinó la presencia de proteínas en las diferentes fracciones mediante registro de la absorbancia a 280 nm. En aquellas fracciones ricas en proteína, se determinó la actividad AP mediante zimografía. Los diferentes pasos de la purificación de la enzima se analizaron por SDS-PAGE y la actividad enzimática se analizó mediante zimografía.

Para determinar el coeficiente de partición correspondiente a la elución de la AP, se aplicó 1 mL del sobrenadante concentrado por una columna de Sephadex G-100-50 (25 mL), previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0. La columna fue calibrada con los siguientes estándares: azul de dextrano (2.000 kDa), BSA (68 kDa), ovoalbúmina (43 kDa) y hemoglobina (16 kDa). Se construyó la curva de calibración $\log PM = aK_{av} + b$, donde $\log PM = \log$ aritmo del peso molecular de las proteínas estándares y K_{av} = coeficiente de partición. K_{av} se definió como $(V_e - V_m)/(V_t - V_m)$, donde V_e = volumen de elución; V_m = volumen muerto; y V_t = volumen total de la columna (7 mL) (13). A las fracciones enriquecidas en proteínas, se les determinó la actividad AP y se analizaron por SDS-PAGE.

Determinación de actividad AP por fotometría

Se siguió el método descrito en la literatura (8, 9, 12) con algunas modificaciones. Alícuotas de 200 μ L de la enzima parcial-

mente purificada se incubaron con 120 μ L de 10 mM *p*-NPP, 90 μ L de 10 mM $MgCl_2$ y 190 μ L de 160 mM tampón glicina de sodio, pH 10. Se incubó a 60°C por 20 min y se detuvo la reacción añadiendo 600 μ L de 0,2 M NaOH. Los valores de absorbancia a 410 nm obtenidos por la liberación de *p*-NP fueron convertidos a equivalentes de *p*-NP usando una curva de calibración empleando *p*-NP (0,3 g/L en 0,02 M NaOH) como estándar. Como condiciones controles se siguieron los pasos anteriormente descritos, sin inclusión de sustrato ni de enzima.

Electroforesis

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (14). Las proteínas fueron visualizadas por tinción con plata (15). Los geles fueron posteriormente secados o fotografiados para su registro y almacenamiento.

Determinación de actividad AP por zimografía

Las fracciones con actividad AP se diluyeron en tampón de muestra 4x (Tris 200 mM pH 6,8; SDS 4%; glicerol 40% y azul de bromofenol 0,02%) sin 2-mercaptoetanol, y se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE (Mini-Protean II, Bio-Rad). Luego de la corrida, el gel se incubó por 30 min a 60°C en una solución de 0,2 M tampón glicina de sodio pH 10 y 5 mM $MgCl_2$. Se descartó la solución y se incubó en oscuridad durante 2 h a 60°C en una solución de 0,1 M glicina de sodio, 0,7 mM BCIP (disuelto en 100% dimetilformamida) y 0,3 mM NBT [disuelto en 70% (v/v) dimetilformamida]. Se lavó con agua destilada y las bandas reveladas se fijaron con ácido acético al 3% (v/v) (7).

Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad AP

A alícuotas de 200 μ L de la enzima purificada parcialmente por la columna de intercambio aniónico DEAE-celulosa se les

determinó la actividad a diferentes temperaturas (25, 40, 50, 55, 60, 70 y 80°C) a un pH constante de 10 durante 20 min. Concluida la incubación, se midió la actividad enzimática mediante fotometría a la temperatura en estudio. Para determinar el efecto del pH sobre la actividad AP se trabajó a una temperatura constante de 60°C empleando tampón Tris-HCl para el pH 7,0 y tampón glicina de sodio para los pH 8,6; 9,0; 9,6; 10,0 y 10,6. La actividad enzimática se determinó por fotometría.

Efecto de iones divalentes e inhibidores sobre la actividad AP

Para observar el efecto de algunos iones metálicos divalentes sobre la actividad AP determinada por fotometría, se agregó a la mezcla de reacción, de manera independiente, diferentes concentraciones de MgCl₂, CaCl₂ o ZnCl₂ (0,01; 0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10, 30 y 100 mM). Asimismo, se determinó el efecto de EDTA (0,1; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 5 y 10 mM) y de KH₂PO₄ (0,75; 1,5; 10, 20, 50, 100 y 200 mM) sobre la actividad enzimática. Se trabajó a pH 10 y a una temperatura constante de 60°C.

Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método descrito por Bradford (16), usando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar.

Resultados y discusión

Las bacterias termófilas identificadas como *Bacillus stearothermophilus* mediante galerías API, fueron capaces de secretar una actividad AP al ser cultivadas en medio líquido con triptona, extracto de levadura, adenosin-5-monofosfato y tampón glicina de sodio, similar a lo previamente reportado (8). Otros medios fueron probados sin éxito (resultados no mostrados), como el medio con glucosa y extracto de levadura (17), o un medio mínimo modificado (tampón glicina, AMP, NaCl, KCl, NH₄Cl y almidón).

Una vez elegido el medio, se logró expresar la máxima producción de AP a 120 h de cultivo (resultados no mostrados). La purificación de la AP se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico en columna DEAE-celulosa. La elución se realizó aplicando 0,4 M NaCl a 0,25 mL/min. Se obtuvieron 4 fracciones con actividad AP (3 mL cada una). Éstas se agruparon (volumen final 12 mL) y se tomó una alícuota de 1 mL, la cual fue sometida a cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-100-50). Pero, luego de la elución, no se obtuvieron fracciones con actividad AP (resultados no mostrados). No se logró detectar la actividad AP, seguramente por la baja concentración de proteínas totales iniciales en la muestra aplicada (<0,06 g/L), la cual disminuyó aún más por el proceso de dilución asociado a la elución. Para mejorar el proceso de purificación, se hizo pasar el sobrenadante libre de células concentrado a través de la columna de Sephadex G-100-50, obviando el paso previo en columna DEAE. La elución se efectuó con Tris-HCl pH 8,0, recolectándose fracciones de 1 mL, a un flujo de 0,05 mL/min. La fracción con actividad AP eluyó a los 5 mL, estimándose un *PM* ~95 kDa para la enzima, a partir de una extrapolación de la curva de calibración obtenida con los estándares utilizados (resultados no mostrados).

La tabla 1 muestra los pasos de purificación empleados. Se observó que al concentrar el sobrenadante mediante calor, se perdió un 44% del contenido de proteínas totales iniciales, pero aumentó la actividad específica. La purificación del sobrenadante concentrado mediante columna DEAE-celulosa, logró duplicar la actividad específica y aumentar 2,2 veces el grado de purificación (tabla 1). Por otra parte, también aumentaron la actividad específica y el grado de purificación del sobrenadante concentrado eluido de la columna Sephadex G-100-50, pero en menor proporción en comparación con la columna DEAE.

Tabla 1
Purificación parcial de la actividad AP a partir del sobrenadante libre de células de *Bacillus stearothermophilus*

Paso	Proteínas totales (mg)	Actividad total ⁽¹⁾ (U)	Actividad específica (U/mg)	Recuperación (%)	Grado de purificación ⁽²⁾
Sobrenadante libre de células	1,20	0,17	0,15	100	1
Sobrenadante libre de células concentrado ⁽³⁾	0,67	0,12	0,17	67	1,2
DEAE-celulosa ⁽⁴⁾	0,08	0,03	0,33	15	2,2
Sephadex G-100-50 ⁽⁵⁾	0,05	0,01	0,26	8	1,8

⁽¹⁾ (U) se define como un micromol de *p*-nitrofenol-min⁻¹ a pH 10 y 60°C.

⁽²⁾ Calculado a partir del sobrenadante libre de células previo a su concentración mediante calor.

⁽³⁾ Sobrenadante libre de células concentrado a la mitad del volumen inicial mediante evaporación a 55°C.

⁽⁴⁾ Fracción obtenida de la cromatografía de intercambio aniónico en columna DEAE-celulosa del sobrenadante concentrado mediante calor.

⁽⁵⁾ Fracción obtenida de la cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-100-50) del sobrenadante libre de células concentrado mediante calor.

Estos resultados poseen valores de rendimientos más bajos que otros procesos de purificación reportados en la literatura, en parte por los pocos pasos utilizados, y en parte por tratarse de una purificación parcial y no total. Un estudio de AP en el hongo *Cenococcum graniforme*, usó cuatro pasos de purificación: diálisis del extracto celular, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía con DEAE-celulosa y Sephadex G-150, logrando obtener un grado de purificación de 265 veces con 3% de recuperación de la enzima (18). Otro trabajo reporta la purificación de la AP del elefante *Elephas trogontherii*, donde utilizando cromatografía con Sephadex-200 y TEAE-celulosa, se obtuvo una recuperación de 82 veces, con 65% de actividad remanente (19). Igualmente, se conoce de una AP termoestable obtenida de un extracto de micelio de *Aspergillus caespitosus*, la cual fue purificada 42 veces con 32% de recuperación usando cromatografía con DEAE-celulosa y concanavalina A-Sepharose (20). También se reporta la AP de nematodos *Onchocerca*, la cual fue purificada 71 veces con 8,7% de recuperación, usando precipitación con polietilén glicol y

cromatografía con DEAE-celulosa (21). Un artículo reciente reporta la purificación de AP proveniente del hongo *Terfezia clavertyi*, la cual fue purificada 5 veces después de precipitarla con polietilén glicol (22).

Para visualizar el avance de la purificación de la AP, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes de cada uno de los pasos ejecutados (figura 1A). Se observó que el sobrenadante libre de células tiene al menos 10 bandas bien definidas, las cuales se intensificaron en el sobrenadante concentrado (carriles 2 y 3), la fracción eluida de la columna DEAE con actividad AP posee un perfil similar, pero en donde se observan desaparición de las bandas ubicadas por encima del marcador de 116 kDa (carril 4). La fracción con actividad AP obtenida mediante filtración en gel originó un perfil similar al obtenido en columna DEAE (carril 5). El pellet bacteriano mostró un menor número de bandas visibles (carril 6). Nótese que la muestra original aplicada en la columna DEAE y la sometida a filtración en gel es la misma (sobrenadante concentrado, carril 3), evidenciándose una purificación parcial de la enzima. Lamentablemente, la fil-

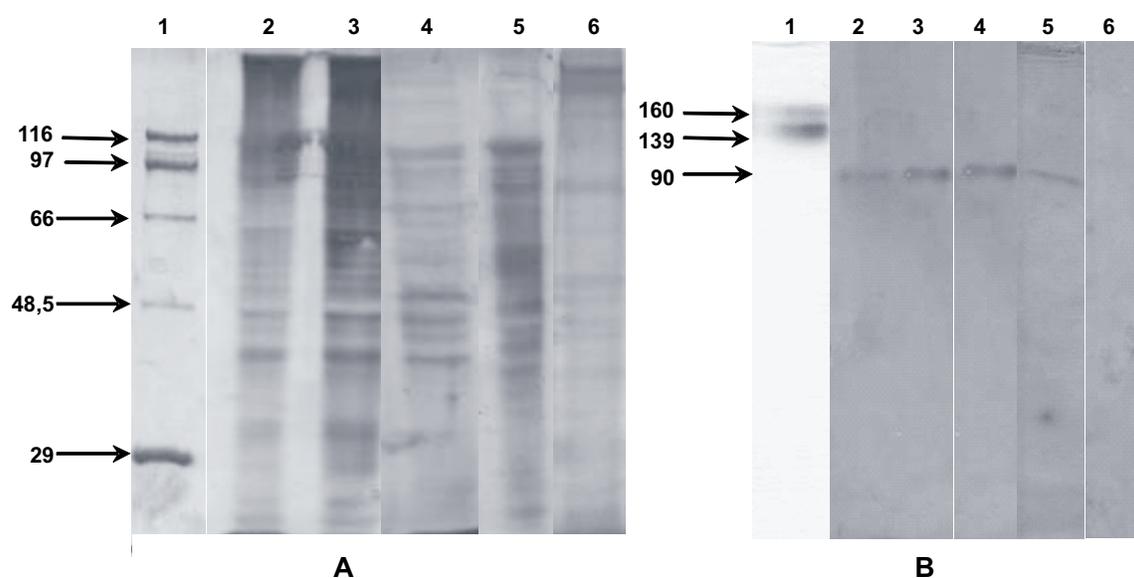


Figura 1. Electroferogramas del proceso de purificación parcial de AP mediante SDS-PAGE al 10% y zimografía. (A) SDS-PAGE teñido con plata. Carril 1, marcador de peso molecular (en kDa); carril 2, sobrenadante libre de células sin purificar (2,4 μg de proteínas); carril 3, sobrenadante concentrado libre de células sin purificar (2,7 μg de proteínas), carril 4, fracción con máxima actividad AP de la columna de intercambio aniónico (1,1 μg de proteínas); carril 5, fracción con máxima actividad AP de la cromatografía de exclusión molecular (2,7 μg de proteínas); y carril 6, pellet bacteriano. (B) Zimografía en gel SDS-PAGE al 10% revelado con NBT y BCIP. Carril 1, patrón de AP de mucosa intestinal bovina (20 μg); carril 2, sobrenadante libre de células (2,4 μg de proteínas); carril 3, sobrenadante concentrado (2,7 μg de proteínas); carril 4, fracción activa purificada parcialmente por cromatografía de intercambio aniónico (1,1 μg de proteínas); carril 5, fracción con máxima actividad AP de la cromatografía de exclusión molecular (2,7 μg de proteínas); y carril 6, pellet bacteriano. Los pesos moleculares (kDa) estándares se indican en el margen izquierdo.

tración en gel no tuvo el efecto deseado, evidenciado por el número de bandas presentes en la fracción y sus distintos pesos moleculares.

Se comprobó que la actividad AP es excretada al medio, al ser aislada y purificada parcialmente a partir del sobrenadante libre de células. No se pudo comprobar, empero, actividad AP en el pellet bacteriano, sugiriendo que la concentración de la enzima intracelular debe ser muy baja o que para el momento del ensayo, la enzima estaba inhibida. Bajo las condiciones experimentales ensayadas, se pudiera inferir que la AP se expresa preferentemente para ser transpor-

tada al exterior de la célula, y no para permanecer de manera activa en su interior. De esta manera, pudiese facilitarse el proceso de desfosforilación de los diversos sustratos existentes en el medio de cultivo bacteriano.

El análisis del párrafo anterior se complementa con estudios previos (23), donde se conoce que para *B. stearothermophilus*, la AP está asociada con la membrana, y es estable hasta 70°C. Pero al ser liberada por tratamiento con EDTA, la termoestabilidad disminuye por debajo de 60°C. Esto muestra información acerca de la estabilidad térmica lograda a través de posibles interacciones con otras proteínas o lípidos presentes

en la membrana. No obstante, llama la atención la falta de actividad AP registrada en el pellet bacteriano.

Además de la cuantificación de la actividad AP por ensayos de fotometría, se demostró su presencia a través de geles de poli-acrilamida teñidos con el sistema NBT/BCIP. La figura 1B muestra la presencia de bandas que indican actividad catalítica en zimogramas. Se demostró mediante zimografía, luego de la incubación con el sustrato durante 1 min a 25°C, la aparición de dos bandas con *PM* de 160 y 139 kDa, correspondientes a la actividad AP procedente de mucosa intestinal bovina, usada como control positivo (figura 1B, carril 1). El resto de las muestras analizadas mediante zimografía (figura 1B, carriles 2-5), fueron incubadas con el sustrato durante 2 h a 60°C, y mostraron que la AP expresada por los termófilos consistió en una única banda de *PM* ~90 kDa. En el carril 6 (figura 1B), correspondiente al pellet bacteriano, no se observaron bandas.

El *PM* determinado por zimografía se complementó con el estimado por filtración de gel (~95 kDa) (resultados no mostrados). Este valor se encuentra dentro del intervalo de *PM* reportados en la literatura (24), donde las AP monoméricas oscilan entre 15,5 kDa y 160 kDa, y se observa similitud con la AP producida por *Thermotoga neapolitana* (87 kDa) (25) y por una cepa de *Arthrobacter* (80 kDa) (12). El hecho de que los valores de *PM* obtenidos por métodos distintos (zimografía y cromatografía de exclusión en gel) indican de que la AP en estudio es un homodímero, sin tendencia a la dimerización (o polimerización) luego de su purificación parcial, como es a veces descrito en la literatura (21).

A la AP purificada por DEAE se le midió su actividad a diferentes temperaturas (figura 2A), observándose una actividad máxima a 60°C. Igualmente, se cuantificó la actividad AP a diferentes valores de pH (figura 2B), donde se observó una actividad má-

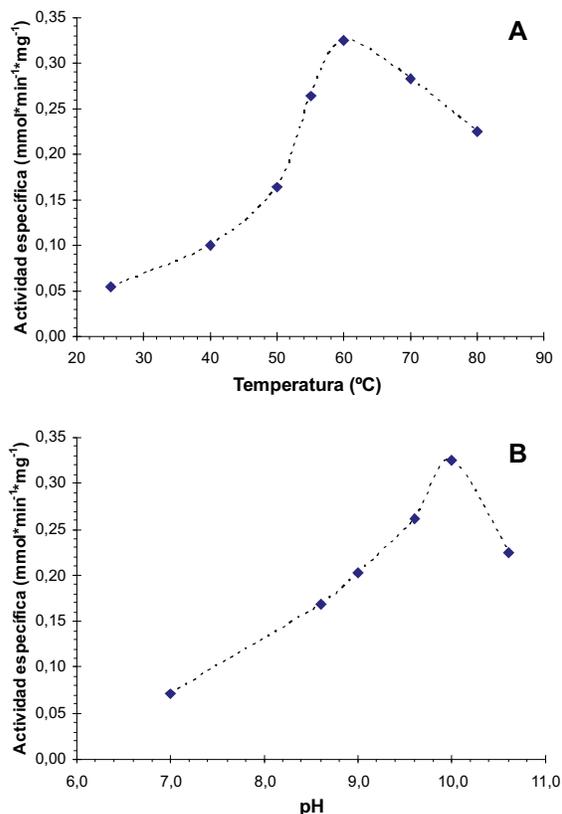


Figura 2. Efecto de la temperatura (A) y el pH (B) sobre la actividad AP purificada parcialmente mediante cromatografía de intercambio aniónico. (A) El efecto de la temperatura se ensayó en tampón glicina a pH 10. (B) El efecto del pH se realizó a 60°C.

xima a pH 10. La temperatura óptima de la enzima es similar a valores reportados para actividades AP provenientes de otras bacterias termófilas (26). El pH óptimo también resultó ser similar a valores de otras AP reportadas (12, 17, 19, 25-27).

Para estudiar el efecto de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} sobre la actividad AP, se realizó un barrido de concentraciones de 0 a 100 mM. El Mg^{2+} resultó esencial para la actividad AP, estimulándola a partir de 0,5 mM, mientras que entre 0,5 y 10 mM Ca^{2+} estimuló poco la actividad, y resultó inhibitoria por encima de 10 mM. El Zn^{2+} tuvo un efecto inhibitorio

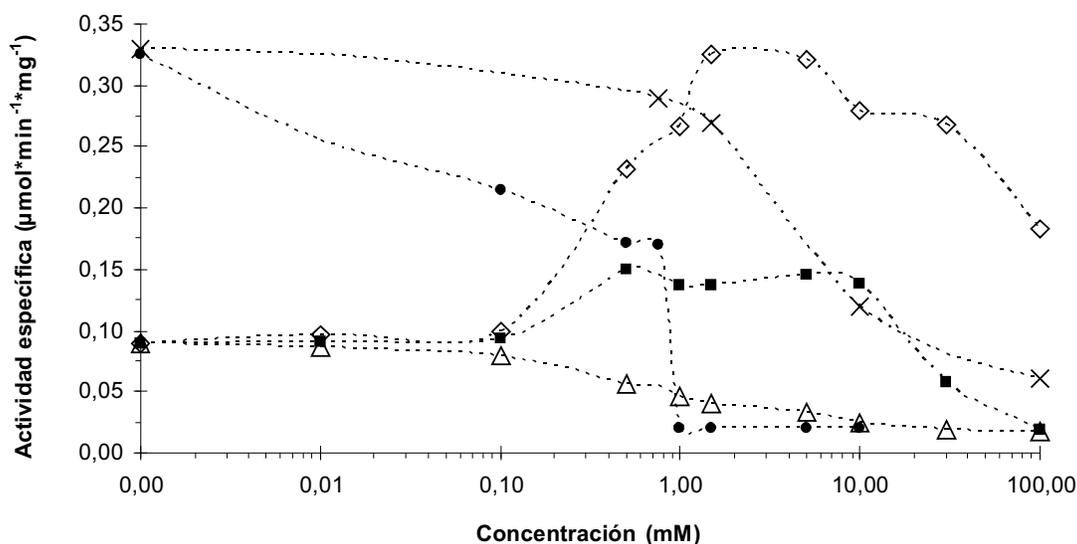


Figura 3. Efecto en la variación de la concentración de metales divalentes, EDTA y fosfato sobre la actividad AP purificada parcialmente mediante cromatografía de intercambio aniónico. (◇) Mg²⁺, (■) Ca²⁺, (△) Zn²⁺, (●) EDTA, (×) fosfato.

a partir de 0,01 mM. Por su parte, EDTA causó un 50% de inhibición a partir de 0,75 mM y el fosfato inhibió en un 70% a partir de 10 mM (figura 3). El comportamiento observado ante los metales divalentes ensayados fue similar al reportado en la literatura (28, 29). Igualmente, el comportamiento inhibitorio ante EDTA (quelación de metales divalentes esenciales para la actividad) y fosfato (uno de los productos de la reacción de hidrólisis) fue el esperado, según lo reportado (9, 12).

La AP tiene gran importancia clínica y la actividad de esta enzima suele determinarse ante afecciones hepáticas, enfermedades óseas y enfermedades primarias que afectan al esqueleto (9, 30). El estudio de la AP puede permitir en un futuro controlar y quizá detener estas enfermedades, conociendo su modo de activación e inhibición. Los microorganismos termófilos pudieran ofrecer grandes ventajas para los procesos clínicos y biotecnológicos, debido a su resistencia a altas temperaturas (hasta 80°C) y alcalinidad. La AP purificada parcialmente en este estudio es una enzima monomérica

potencialmente novel que deberá ser estudiada con mayor profundidad. Además, se pudo demostrar la facilidad de detección enzimática en geles de poliácridamida utilizando la metodología convencional con NBT y BCIP.

Conclusiones

Se estudió la actividad AP en sobrenadantes libres de células provenientes de un cultivo de termófilas, lográndose su purificación parcial por DEAE, su identificación y caracterización ante activadores e inhibidores. A la AP parcialmente purificada se le determinó un *PM* de ~90 kDa mediante zimografía. La AP mostró termoestabilidad, con una actividad óptima a 60°C y pH 10, pero manteniendo su actividad a 80°C por 20 min. El Mg²⁺ resultó indispensable para la actividad enzimática, Ca²⁺ no tuvo un efecto notable sobre la actividad, mientras que Zn²⁺, EDTA y fosfato fueron inhibitorios. El estudio de esta enzima representa un avance para sus aplicaciones biotecnológicas, clínicas e industriales.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (N° CDCH-1567-2002, al Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Biología (FACYT-UC) y al Prof. L. Medina (UMA-FCS-UC). Agradecemos igualmente los aportes de la Dra. L.M. Contreras y el Dr. O. Valbuena.

Referencias bibliográficas

1. LENGELER J., DREWS G., SCHLEGEL H. **Biological of the Prokaryotes**. Georg Thieme Verlag. Stuttgart (Germany). 784-788. 1999.
2. VIEILLE C., ZEIKUS G. **Microbiol Mol Biol Rev** 65(1): 1-43. 2001.
3. DANIEL R., COWAN D. **Cell Mol Life Sci** 57(2): 250-264. 2000.
4. VIEILLE C., BURDETTE D., ZEIKUS J. **Biotechnol Annu Rev** 2: 1-83. 1996.
5. BRUINS M., JANSSEN A., BOOM R. **Appl Biochem Biotechnol** 90(2): 155-86. 2001.
6. ZEIKUS J., VIEILLE C., SAVCHENKO A. **Extremophiles** 2(3): 179-83. 1998.
7. MANCHENKO G. **A handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels**. CRC Press LLC (USA). 187-191, 216-217. 1994.
8. MORI S., OKAMOTO M., NISHIBORI M., ICHIMURA M., SAKIYAMA J., ENDO, H. **Biotechnol Appl Biochem** 29(Pt 3): 235-239. 1999.
9. ZAPPA S., ROLLAND J., FLAMENT D., GUEGUEN Y., BOUDRANT J., DIETRICH J. **Appl Environ Microbiol** 67(10): 4504-4511. 2001.
10. QUINTERO D., VELASCO V., HURTADO-GÓMEZ E., NEIRA J., CONTRERAS L. **Biochim Biophys Acta** 1774(4): 510-518. 2007.
11. PANTAZAKI A., KARAGIORGAS A., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M., KYRIAKIDIS D. **Appl Biochem Biotechnol** 75 (2-3): 249-259. 1998.
12. DE PRADA P., BRENCHLEY J. **Appl Environ Microbiol** 63(7): 2928-2931. 1997.
13. OHNO H., BLACKWELL J., JAMIESON A., CARRINOT D., CAPLANT A. **Biochem J** 235(2): 553-557. 1986.
14. LAEMMLI U. **Nature** 227(5259): 680-685. 1970.
15. MERRIL C., PRATT M. **Anal Biochem** 156(1): 96-110. 1986.
16. BRADFORD M. **Anal Biochem** 72: 248-254. 1976.
17. MOURA R., MARTÍN J., MARTÍN A., LIRAS P. **Microbiology** 147(Pt 6): 1525-1533. 2001.
18. BAE K., BARTON L. **Appl Environ Microbiol** 55(10): 2511-2516. 1989.
19. DEMIRY., YILDIRIM S., DEMIR N. **Indian J Biochem Biophys** 42(3): 182-185. 2005.
20. GUIMARAES L., JUNIOR A., JORGE J., TERENCE H., POLIZELI M. **Folia Microbiol (Praha)** 52: 231-236. 2007.
21. CHO-NGWA F., MBUA E., NCHAMUKONG K., TITANJI V. **Mol Biochem Parasitol** 156(2): 136-143. 2007.
22. NAVARRO-RODENAS A., MORTE A, PEREZ-GILABERT M. **Plant Biol (Stuttg)** 11(5): 678-685. 2009.
23. GUPTA M. **Thermostability of enzymes** Springer Verlag (Germany). 44-73. 1993.
24. DE PRADA P., LOVELAND-CURTZE J., BRENCHLEY J. **Appl Environ Microbiol** 62(10): 3732-3738. 1996.
25. DONG G., ZEIKUS J. **Enzyme Microb Technol** 21(5): 335-340. 1997.
26. SHARIPOVA M., BALABAN N., MARDANOVA A., NEKHOTYAEVA N., DEMENTYEV A., VERSHININA O., GARUSOV A., LESHCHINSKAYA I. **Biochemistry (Mosc)**. 63(10): 1178-1182. 1998.
27. YURCHENKO J., BUDILOV A., DEYEV S., KHROMOV I., SOBOLEV A. **Mol Genet Genomics** 270(1): 87-93. 2003.
28. GUIMARÃES L., TERENCE H., JORGE J., POLIZELI M. **J Ind Microbiol Biotechnol** 27(4): 265-270. 2001.

-
29. MORALES A., NOZAWA S., THEDEI G., MACCHERONI W., ROSSI A. ***Braz J Med Biol Res*** 33(8): 905-912. 2000. ***importancia clínica.*** 3° Edic.Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires (Argentina). 368-375. 2003.
30. MAC FADDIN J. ***Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de***