



### INMOVILIZACIÓN DE UNA PROTEASA TERMOESTABLE Y ALCALINA (PrTA) DE *Aspergillus nidulans*.

Pilar Vergara B., Denise Castro O., Carolina Peña M., Arturo Navarro O. y Amelia Farrés G.  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Fac. Química, Depto de Alimentos y Biotecnología,  
Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México. [farres@servidor.una.mx](mailto:farres@servidor.una.mx), Tel y fax (55) 56225305

Palabras clave: *inmovilización, adsorción, proteasa, Aspergillus nidulans*

**Introducción.** El uso de enzimas como catalizadores presenta un gran potencial y su uso es extendido debido a su especificidad, su control regio o enantioselectivo y a la obtención de productos con un alto rendimiento sin la formación de subproductos. Muchos catalizadores presentan inestabilidad bajo condiciones de trabajo a nivel industrial. En el grupo de trabajo se ha purificado y caracterizado una proteasa termoestable y alcalina (PrTA) con gran potencial para ser usada en biocatálisis (1). La estabilidad de las enzimas se puede incrementar por medio de su inmovilización, además de que pueden ser reutilizadas (2). La adsorción ha sido considerada como un método simple y económico, además, no es agresivo con la enzima por lo que solo puede ocasionar ligeras modificaciones a la estructura nativa y funcionalidad de la enzima (3, 4).

El objetivo del presente trabajo fue la inmovilización de la proteasa alcalina y termoestable PrtA por medio de adsorción a un soporte.

**Metodología.** Obtención de la proteasa por crecimiento de la cepa *A. nidulans* PW1 en un medio optimizado de acuerdo a la metodología descrita por Peña *et al.* (2008). La obtención de la enzima se realiza por filtración del micelio después de 24 h de fermentación, liofilización y extracción con éter. El procedimiento de inmovilización se realiza sobre un soporte hidrofóbico de polipropileno (Accurel MP 1000). La actividad de esterasa se cuantifica espectrofotométricamente empleando como sustrato el *p*-nitrofenil laurato (PNPL). La concentración de proteína se determina por el método de Bradford a 595nm.

**Resultados y discusión.** En los primeros ensayos de inmovilización de la enzima PrtA se observó un bajo porcentaje de adsorción de ésta sobre el soporte, lo que conllevó a una baja actividad (Tabla 1). Posteriormente se realizaron pruebas de optimización de las condiciones de inmovilización y los resultados de estas pruebas indican que a pH 7 y a 20°C se presenta una mayor actividad, incluso mayor al 100%, probablemente debido a la estabilización de la enzima por su adsorción al soporte (Tabla 2). Es importante mencionar que no necesariamente esta condición mostró una mayor cantidad de proteína adsorbida.

Tabla 1. Concentración de proteína y actividad de la proteasa PrtA de *A. nidulans* en el proceso de inmovilización a pH 8, 4°C.

| Muestra             | Proteína (mg/mL) | Actividad volumétrica (U/mL) | Actividad (U/g soporte) | Actividad específica (U/mg prot) | Rendimiento proteína (% prot) | Rendimiento actividad (%U) |
|---------------------|------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Enzima libre        | 57.675           | 7.57                         | -                       | 131.22                           | 100                           | 100                        |
| Enzima Inmovilizada | 11.43            | -                            | 1.04                    | 90.73                            | 20                            | 69                         |

Tabla 2. Concentración de proteína y actividad específica de la proteasa Prt A bajo diferentes condiciones de inmovilización.

| pH | Temperatura |                     | Proteína (mg/mL) | Actividad específica (U/mg prot) | Rendimiento proteína (%prot) | Rendimiento actividad (%U) |
|----|-------------|---------------------|------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 7  | 4°C         | enzima libre        | 240.94           | 7.21                             | 100                          | 100                        |
|    |             | enzima inmovilizada | 188.74           | 10.33                            | 78                           | 143                        |
|    | 20°C        | enzima libre        | 86.46            | 18.05                            | 100                          | 100                        |
|    |             | enzima inmovilizada | 38.21            | 33.23                            | 44                           | 184                        |
| 8  | 4°C         | enzima libre        | 268.06           | 7.47                             | 100                          | 100                        |
|    |             | enzima inmovilizada | 245.17           | 5.98                             | 91                           | 80                         |
|    | 20°C        | enzima libre        | 121.05           | 17.66                            | 100                          | 100                        |
|    |             | enzima inmovilizada | 43.48            | 10.58                            | 36                           | 60                         |

**Conclusiones.** La optimización de las condiciones de inmovilización nos permitió obtener una actividad 2.6 veces mayor con respecto a la inmovilización inicial (Tabla 1). El biocatalizador puede ser utilizado en diversas reacciones de biocatálisis, como la hidrólisis de sustratos con actividad antioxidante.

**Agradecimiento.** PAPIIT IN2148092

#### Bibliografía.

- Peña-Montes C., González A., Castro-Ochoa D., Farrés A. (2008). Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78 (4): 603-612.
- Sánchez-Otero M., Valerio G., García H., Oliart R. (2008). Immobilization in the presence of triton X-100: modifications in activity and thermostability of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 lipase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (12): 1687-1693.
- Salis A., Sanjust E., Solinas V., Monduzzi M. (2003). Characterization of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 24 (25): 75-82.
- Ganesh A., Swarnalath S., Kamatchi P., Kirubakaran P., Perimbam K., Sekaran G. (2008). Immobilization of proteolytic enzyme on highly porous activated carbon derived from rice bran. *J. Porous. Mater.* Doi 10.1007/s10934-008-9216-9.