

EFFECTO DE LA INMOVILIZACIÓN EN DIFERENTES SOPORTES SOBRE LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA DE PROTEASAS TERMOESTABLES

Carolina Anaya-Peña¹, Ricardo Hernández-Martínez¹, Blanca Hernández-Rodríguez¹, Alberto Castillo-Morales² y Arely Prado-Barragan¹. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. 1 Depto. Biotecnología. 2 Depto. Matemáticas Av. San Rafael Atlixco N° 186, Col. Vicentina, C.P. 09340, México D.F. Tel. 58046555 lapb@xanum.uam.mx

Palabras clave: inmovilización, soporte, estabilidad

Introducción. Las proteasas representan el 60% de ventas a nivel mundial, pero su utilización industrial es limitada por su inestabilidad en condiciones de temperatura y pH extremos así como en solventes orgánicos. Por lo tanto, se necesita desarrollar técnicas que permita aumentar la estabilidad de las enzimas en los procesos industriales (1). Para ello se han desarrollado distintas técnicas como la inmovilización de enzimas (2). La inmovilización de enzimas es una técnica atractiva porque mantiene la actividad catalítica, especificidad y selectividad; proporcionando gran estabilidad al mismo tiempo permite su reutilización (2). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la inmovilización de un extracto proteolítico en diferentes soportes sobre la estabilidad térmica.

Metodología. El extracto proteolítico producido por *A. fumigatus* (PAF) en fermentación en medio sólido. Para inmovilizar el extracto en los soportes Glioxil (PAF-Glioxil) y Monoaminoethyl-N-aminoethyl-Agarosa (PAF-MANAE) (2). Durante la inmovilización se monitoreo la actividad proteolítica del extracto libre e inmovilizado por el método de Kembahavi (3). La estabilidad térmica se midió preincubando los extractos a 30, 50 y 70°C (pH7) y se determinó actividad proteolítica cada 15 minutos.

Resultados y discusión. El mayor porcentaje de la actividad proteolítica inmovilizada se obtuvo a las 5 horas (5°C±1) en Glioxil 63% y MANAE 55%. Estabilidad térmica. En la Figura 1 se observa que el PAF conserva 74, 63 y 25% de actividad después de 1h de incubación a 30, 50 y 70°C respectivamente.

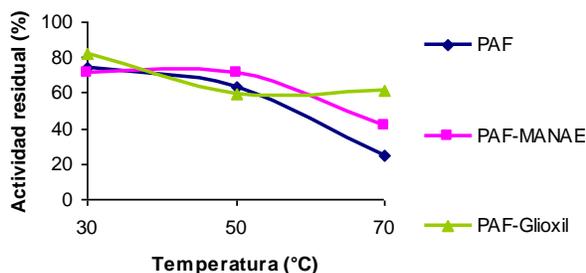


Figura 1. Efecto de la temperatura en la estabilidad del PAF libre e inmovilizado incubado durante 1 h.

Al analizar la actividad residual de las proteasas inmovilizadas presentes en el extracto se observó un mayor porcentaje de actividad residual al inmovilizar en Glioxil a 30°C (11%) y 70°C (19%). Resultados similares se reportan para: tripsina, quimotripsina y alcalasa inmovilizadas en glioxil donde se retuvo el 75, 70 y 54% de actividad respectivamente (2). Por otro lado, la actividad residual de PAF-MANAE (71%) es similar al reportado para una endoproteasa y aminopeptidasa de Flavorzyme® a 50°C (80%). Los resultados anteriores van acorde con el tiempo de vida media de los PAF mostrados en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tiempo de vida media

Temperatura (°C)	PAF $t_{1/2}$ (h)	PAF-MANAE $t_{1/2}$ (h)	PAF-Glioxil $t_{1/2}$ (h)
30	2.7	2.3	4.1
50	1.6	1.9	1.4
70	0.8	0.9	1.6

El tiempo de vida media de PAF-Glioxil muestra un aumento de estabilidad a las tres temperaturas, debida a que con este soporte se tiene una mayor cantidad de puntos de unión enzima-soporte. Por otro lado; la baja estabilidad presentada por PAF-MANAE a 30 y 70°C se debe a que los puntos de unión de las proteínas del PAF no están los suficientemente expuestos para unirse con los sitios activos del soporte. Para lograr una mayor estabilidad con MANAE, los grupos amino pueden modificarse y activarse con el uso de algunos reactivos específicos (2).

Conclusiones. PAF-MANAE aumenta el $t_{1/2}$ a 50°C. El soporte glioxil aumenta la estabilidad térmica del PAF a las tres temperaturas estudiadas.

Bibliografía.

1. Basma, G., Alya, S-K. y Morce, f N. (2003) Stability studies of proteases from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme. and Microb. Techn.* 32: 513-518.
2. Yust, M., Pedroche J. y Alaiz, M. (2007) Partial purification and immobilization/stabilization of highly activated glyoxyl-agarose supports of different proteases from Flavourzyme. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6503-6508.
3. Johnvesly B. y Naik G. (2001). Studies on production of thermostable alkaline potease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in chemical defined medium. *Process Biochem.* 37: 139-144.