



Purificación y caracterización de una proteasa producida por *Aspergillus fumigatus* HQ en fermentación en medio sólido

Ricardo Hernández-Martínez, Gerardo Gutiérrez-Sánchez, Carl W. Bergman, Octavio Loera-Corral, Arturo Rojo-Domínguez, *Lilia Arely Prado-Barragán. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Tel. 58046555, fax 58044712, lapb@xanum.uam.mx

Palabras clave: *Aspergillus*, proteasa, termoestable

Introducción. *Aspergillus fumigatus* ha sido ampliamente estudiado debido a que es el principal causante de aspergilosis, sin embargo también se ha reportado como productor de serín-proteasas, aspartil-proteasas y metalo-proteasas en medios que contiene proteína como única fuente de carbono y nitrógeno. En la actualidad el uso de enzimas ha sido limitado por su estabilidad térmica, sin embargo las especies fúngicas termotolerantes representan una fuente potencial de enzimas con altos niveles de estabilidad térmica y actividad (1,2). El objetivo de este trabajo fue caracterizar parcialmente una proteasa termoestable producida por *A. fumigatus* en fermentación en medio sólido (FMS).

Metodología. La producción de proteasas se realizó por FMS en columnas empacadas utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte y harina de pescado como sustrato. Después de 36 h de cultivo, se obtuvo el extracto crudo para la posterior purificación de la enzima. La purificación de la proteasa se realizó en 4 etapas: intercambio aniónico (X2), tratamiento a 60°C por 30 min e intercambio catiónico. La actividad proteolítica fue cuantificada utilizando el método descrito por Kembahavi modificado por Johnvesly y Naik (3). La proteína fue determinada por el método de BCA (PIERCE®). Se determinó pH y temperatura óptima de actividad de la proteasa pura. De igual manera se caracterizó la estabilidad a pH y temperatura pre-incubando la enzima y a diferentes pHs y temperaturas por 1 h (3). Una unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar el equivalente a 1 µg tirosina por minuto bajo las condiciones de ensayo.

Resultados y discusión.

La proteasa fue purificada en cuatro etapas obteniendo un factor de purificación de 6.7. La enzima presentó un peso molecular (P.M.) aproximado de 88 kDa (SDS-PAGE), dicho valor es similar (88 kDa) al reportado para la Dipeptidil-Peptidasa (DPP) también producida por *A. fumigatus* (1). El pH y la temperatura óptimos observados fueron de 7 y 60°C respectivamente. El pH óptimo es similar al reportado para la DPP (6.5). Tanto la DPP como la proteasa purificada en este trabajo presentan actividad proteolítica en un rango de pH de 6 a 8. En cuanto a la temperatura óptima de actividad, es importante señalar que solo la metalo proteasa producida por *A. fumigatus* reportada por Markaryan (1994) a presentado máxima actividad a 60°C, ya que típicamente

se a reportado máxima actividad de 37 a 42°C (4,5) para las proteasas producidas por *A. fumigatus*. Los resultados de la estabilidad a pH mostraron que la proteasa conservo el 95, 100 y 83% de actividad a pH 7, 8 y 9 respectivamente. En la Figura 1 se puede observar que la proteasa conserva el 58 y 42% de actividad después de una hora de incubación a 50 y 60°C, respectivamente; mostrando características de estabilidad similares a otras proteasas producidas por este microorganismo. Wang y col. en 2005 reportaron que la metalo proteasa producida por *A. fumigatus*, pierde por completo su actividad a 70°C después de 10 min; sin embargo, como se puede observar en la Fig. 1 la proteasa producida en este trabajo conserva el 53 y 20 % de actividad después de 15 y 45 min de incubación (70 °C), respectivamente (5).

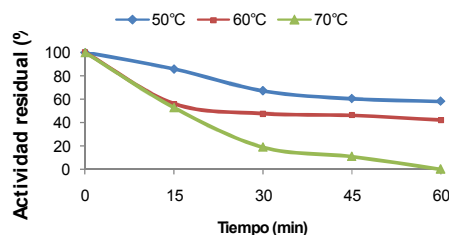


Fig. 1. Efecto de la temperatura en la estabilidad

Conclusiones. La proteasa producida por *A. fumigatus*. HQ tiene un P.M. aproximado de 88 kDa, presenta un pH óptimo de 7 y una temperatura óptima de 60°C, a demás presento características de **termoestabilidad** que no han sido reportadas para la cepa estudiada. Actualmente se trabaja en la elucidación de la estructura primaria de la proteasa para explicar los mecanismos estructurales responsables de la estabilidad además, se realizaran pruebas de especificidad e inhibición para clasificar a la proteasa de acuerdo a la naturaleza del sitio catalítico.

Bibliografía

1. Beauvais A., Monod M., Debeauvais J., Diaquin M., Kobayashi H. and Latge J. (1997). *J Biol. Chem.* 272 (10): 6238-6244.
2. Reichard U., Léchenne B., Asif A., Streit F., Grouzman E., Jousson, Monod M. (2006). *Applied Env. Microbiol.* 72(3):1739-1748.
3. Johnvesly B. and Naik. (2001). *Proc. Biochem.* 37:139-144.
4. Markaryan A., Morozoba I., Yu H. and Kolattucudi P. (1994). *Infect Imm.* 62(6): 2149-2157.
5. Wang S., Chen Y., Wang Ch., Yen Y., Chern M. (2005). *Enz. Microb. Technol.* 36:660-665.