



## IDENTIFICACIÓN DE PROTEASAS Y TIROSINASAS PRODUCIDAS POR *Amylomyces rouxii*.

Ara Itzel Pérez de los Santos, Francisco J. Fernández, Alfonso Santiago, Jaime Marcial, Araceli Tomasini\*  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. de Biotecnología Apdo. Postal 55-535 C.P. 09340.  
México D.F. Tel: 58046453 y 58044711; Fax: 58044712; \*e-mail: [atc@xanum.uam.mx](mailto:atc@xanum.uam.mx)

*Palabras clave: Tirosinasas, Proteasas, inhibidores, A. rouxii*

**Introducción.** *Amylomyces rouxii*, aislado de un efluente de la industria del papel (1), se caracteriza por producir tirosinasa extracelular a diferencia de otros hongos que la producen intracelularmente. Esta enzima es empleada en la degradación de compuestos xenobióticos, en la fabricación de electrodos, en cosméticos, etc. Se demostró que *A. rouxii* también produce proteasas extracelulares (1, 2).

El objetivo de este trabajo fue determinar actividades de las enzimas extracelulares, proteasas y tirosinasas producidas por *A. rouxii*, así como el efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad de dichas enzimas.

**Metodología.** Se realizaron fermentaciones sumergidas utilizando medio Melin-Norkrans. Los extractos se obtuvieron a partir del caldo de cultivo y se midió la actividad enzimática. Para la actividad monofenolasa de la tirosinasa se empleó como sustrato L-Tirosina y para la difenolasa, 4-*tert*-butilcatecol (TBC) y Metil-dopa-hemihidratada (3). La actividad proteasa se midió sobre Azocaseína (1% p/v) y Hemoglobina (1 % p/v) (4). Los inhibidores empleados para tirosinasas y proteasa fueron ácido Koji, 5.5 mM, y Cocktail de proteasas, 100 µl, (Sigma) respectivamente,

**Resultados y discusión.** Se encontró actividad mono y difenolasa para los sustratos empleados, siendo el TBC el sustrato más reactivo con una actividad específica de 14,844 U mg proteína<sup>-1</sup>, lo cual confirma la presencia de una tirosinasa extracelular. Así mismo, se observó que al inhibir las proteasas se produce un incremento en la actividad (16,250 U mg proteína<sup>-1</sup>) de la tirosinasa. Al emplear el ac. Koji la actividad de tirosinasa disminuye en comparación del control sin inhibidor y el cocktail de proteasas, independientemente del sustrato utilizado (tabla 1).

Tabla 1. Efecto de inhibidores sobre las actividades mono y difenolasas en tirosinasas extracelular

Tratamiento	Actividad específica (U mg proteína <sup>-1</sup> )		
	DOPA (4.2mM)	TBC (3mM)	L-Tirosina (0.2mM)
Control (sin inhibidor)	12	14,844	3,516
Ácido Koji	7	10,208	1,875
Cocktail de proteasas	12	16,250	4,531

*A. rouxii* produce proteasas de tipo ácidas al presentar una mayor actividad, 2.98 x 10<sup>-3</sup> U mg proteína<sup>-1</sup>, empleando como sustrato hemoglobina a pH de 3.5, mientras que con azocaseína (para determinar proteasas básicas) la actividad fue menor, 5.18 x 10<sup>-5</sup> U mg proteína<sup>-1</sup>, a pH de 7.5 (tabla 2). Al emplear el inhibidor de proteasas comercial se observó que la actividad proteasa disminuyó 58 % y se incrementó al doble la actividad tirosinasa. De acuerdo a lo anterior se puede suponer que estas proteasas producidas por *A. rouxii* tienen un efecto sobre las tirosinasas producidas por el mismo hongo.

Tabla 2. Efecto de inhibidores sobre las actividades de proteasas básicas y ácidas extracelular

Tratamiento	Actividad específica (U mg proteína <sup>-1</sup> )	
	Azocaseína	Hemoglobina
Control (sin inhibidor)	5.18 x 10 <sup>-5</sup>	2.98 x 10 <sup>-3</sup>
Cocktail de proteasas	6.51 x 10 <sup>-6</sup>	1.74 x 10 <sup>-3</sup>

**Conclusiones.** La tirosinasa extracelular que produce *A. rouxii* se ven afectada en presencia de proteasas de tipo ácidas. Usando inhibidores inespecíficos para proteasas se consiguió disminuir este efecto, aumentando la actividad específica de la tirosinasa, sin embargo, para posteriores estudios, el uso de un inhibidor específico de proteasas ácidas podría conseguir una mayor inhibición y por tanto, un probable aumento de la actividad tirosinasa.

**Agradecimiento.** A CONACYT por la beca de maestría no. 229059 y por la beca de doctorado no. 172706.

### Bibliografía.

- (1) Montiel M, Fernández J, Marcial J, Soriano J, Barrios-González J and Tomasini A. (2004). A fugal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. *Biotech. Letters*. 26: 1353-1357.
- (2) Marcial J, Barrios-González J, Tomasini A. (2006). Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. *Process Biochem*. 41: 496-500.
- (3) Selinheimo E, et al. (2007). Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *J of Biotechnology*. 130: 471-480.
- (4) Kumar S, et al. (2004) Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochem* 40: 1701-1705.