

Purificación de una proteasa extracelular de 29 kDa de *Aspergillus nidulans* y efecto del aceite de oliva sobre su producción.

Denise Castro¹, Carolina Peña¹, Augusto González², Amelia Farrés¹, ¹Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, Circuito de la Investigación s/n.Conj. "E", Lab. 312, Cd. Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F. Fax: 55 56 22 53 09, ²Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Hospital General de México, México, D.F. farres@servidor.unam.mx.

Palabras clave: *Aspergillus nidulans* proteasa, purificación,

Introducción. Las proteasas extracelulares en *Aspergillus nidulans* son producidas en respuesta a condiciones limitantes de carbono, nitrógeno o sulfuro (1). En el grupo de trabajo se ha observado que cuando se cultiva a *Aspergillus nidulans* PW1 en medio optimizado empleando aceite de olivo como inductor, se producen tres actividades esterasa extracelular con pesos moleculares de 37, 29 y 24 kDa. Una de estas actividades (37kDa) ha sido purificada y caracterizada en términos de su actividad como esterasa (2). La posterior secuenciación del amino terminal de las proteínas de 37 y 29 kDa mostró que ambas enzimas son proteasas alcalinas de *A. nidulans* producto del gen *prtA* (2, 3). No obstante, se desconoce si la proteasa de 29 kDa es producto de degradación de la proteína de 37 kDa, si son isoenzimas o proteínas con diferentes modificaciones postraduccionales.

Los objetivos de este trabajo fueron la purificación de la proteasa de 29 kDa para su posterior caracterización y el estudio del efecto del aceite de olivo sobre la producción de la proteína.

Metodología. Para estudiar el efecto del aceite de olivo sobre la producción de la enzima se creció *A. nidulans* en medio optimizado con aceite de olivo y sin éste (2). Mediante SDS-PAGE se observó el perfil de proteínas secretadas por el hongo en ambas condiciones de fermentación y por RT-PCR se analizó la expresión del gen *prtA* a partir de RNA extraído del micelio empleando cebadores específicos para la amplificación del gen. La purificación de la proteína de 29 kDa se realizó mediante electroforesis preparativa (SDS-PAGE) con el sistema Prep-Cell (Bio-Rad). Se preparó un gel al 12% de acrilamida y se cargó con muestra del extracto crudo previamente concentrado por precipitación con TCA (10%). Se colectaron 80 fracciones de 5 mL en las que se determinó la presencia de la proteína por ensayo de actividad enzimática. La pureza e identificación de la proteína se analizó por SDS-PAGE y zimogramas.

Resultados y discusión. En las dos condiciones en las que se analizó la expresión del gen *prtA* por RT-PCR, se observó la amplificación de una banda mayoritaria de aproximadamente 1200pb que corresponde con el tamaño esperado (Fig. 1a), sin embargo se encontró una

mayor producción extracelular de la proteína en el medio con el aceite de olivo (Fig. 1b). El aceite podría ser sustrato si se trata de una esterasa, pero los resultados muestran que el efecto es probablemente sobre la secreción de la enzima.

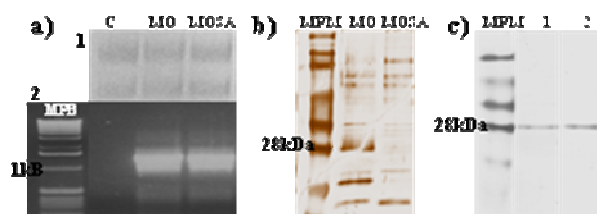


Fig. 1. a) Análisis expresión del gen *prtA.1* RNA, 2, RT-PCR, MO, medio optimizado, MOSA, medio optimizado sin aceite y C, control. b) Efecto del aceite en la producción de la proteína extracelular. c) Purificación. 1, Proteína pura, 2, Zimograma.

La purificación de la enzima se hizo a partir del extracto crudo obtenido del medio optimizado con aceite de olivo. Del total de fracciones colectadas solo en doce se detectó la actividad enzimática de la proteína de interés, y en 10 de éstas se obtuvo a la enzima pura, identificada por tinción de la proteína con nitrato de plata y ensayo de actividad mediante zimograma. La purificación de esta proteína ha sido repetida demostrando la reproducibilidad del método.

Conclusiones. La adición del aceite de olivo en el medio de cultivo optimizado aumenta la producción extracelular de la proteasa de 29 kDa (PrTA) en *A. nidulans*. La proteína se purificó por electroforesis preparativa en condiciones desnaturizantes manteniendo la actividad enzimática.

Agradecimiento. Al proyecto PAPIIT No. IN2148092 por el financiamiento para la realización del trabajo.

Bibliografía.

1. Cohen, B. L. (1972). Ammonium repression of extracellular protease in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen Microbiol.* 79: 311-320.
2. 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):603-12.
3. Castro, D. y Farrés A. (2005). Actividad de esterasa de la proteasa alcalina de *Aspergillus nidulans* PW1. SMBB, Mérida, Yucatán.