

## UNA PROTEASA ALCALINA CON ACTIVIDAD DE LIPASA Y ESTERASA EN *Aspergillus nidulans* PW

Norma Ballesteros, Dense Castro, Carolina Peña y Amelia Farrés González-Saravia  
Laboratorio 312 Dpto. de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.  
just\_persa@hotmail.com

*Palabras clave:* lipasa, proteasa, esterasa, *A. nidulans*

**Introducción.** *Aspergillus nidulans* ha constituido por muchos años un modelo de estudio para enzimas y metabolitos fungales. Kawasaki (1995) había reportado una actividad lipolítica extracelular y estudios posteriores llevaron al grupo a identificar que ésta correspondía en realidad al producto del gene *prtA*, reportado por Katz (1994) y que codifica para una proteasa alcalina. La incertidumbre creada por este resultado llevó al grupo a reproducir condiciones previamente reportadas por otros autores para producción de proteasas en el género y a verificar si en las mismas se detectaba la actividad lipolítica o esterolítica detectada previamente por el grupo de trabajo.

**Metodología.** Se cultivó el microorganismo en medio basal reportado por Cohen (1973) para la producción de proteasas y en el diseñado por Peña (1998) para la producción de lipasas. Los sobrenadantes obtenidos fueron evaluados por técnicas potenciométricas y espectrofotométricas, así como cualitativas con  $\alpha$ -naftil acetato. Se emplearon triacil glicerol de cadena corta, media y larga, así como sustratos proteicos para determinar actividad. Se llevaron también a cabo zimogramas para identificar las bandas responsables de cada actividad.

**Resultados y discusión.** La mayor actividad se produjo sobre triacilglicerol de cadena corta, ya que sobre tributirina se presentó una actividad casi 50 veces mayor que sobre trioleína o tripalmitato. Este resultado corresponde a una actividad esterasa. Por otra parte, los extractos obtenidos en este medio mostraron actividad sobre azocaseína en dispersión.

Se optimizó el medio de cultivo reportado por Cohen incluyendo diversas fuentes orgánicas nitrogenadas (leche y extracto de levadura) y se obtuvo actividad sobre azocaseína. Algunas de las formulaciones mostraron actividad sobre elastina y colágeno

*aceite de olivo, A: medio con aceite de olivo y sin glucosa, concentrado 10X*

En geles SDS PAGE se llevaron a cabo zimogramas sobre geles nativos, con acrilamida 12% y tinción con fast red y alfa naftil acetato, se observan varias bandas en la zona ubicada entre los 25 y 34 kDa. Este peso molecular corresponde al producto del gene *prtA*. Se aprecia que la intensidad y número de bandas difiere de acuerdo a la formulación del medio.

**Conclusiones.** El producto del gene *prtA* se produce en niveles altos en medios diseñados para la producción de lipasas, porque contienen aceite de olivo como inductor. Tiene actividad sobre triacilglicerol, lo que haría pensar en una actividad lipolítica, pero ésta es de tipo esterasa al tener una marcada diferencia por los solubles de cadena corta. Tiene una actividad proteolítica manifestada en acción sobre azocaseína. Por tanto, la proteína identificada previamente como lipasa es en realidad una proteasa con amplio rango de actividad sobre sustratos.

**Agradecimiento.** Idalia Flores y Sandra Pérez por apoyo técnico.

### Bibliografía.

- Cohen, B. L. (1973). Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. J Gen Microbiol 79: 311-320.  
Katz, M. E; Rice, R. N. and Cheetham, B. F. (1994). Isolation and characterization of an *Aspergillus nidulans* gene encoding an alkaline protease. Gene 150:287-292  
Kawasaki, L., Farrés, A. y Aguirre, J., 1995. *Aspergillus nidulans* mutants affected in acetate metabolism isolated as lipid nonutilizers. Exp. Mycol. 19, 81-8  
Peña, C. (2001). Producción, purificación y caracterización bioquímica de una enzima con actividad lipolítica en *Aspergillus nidulans*. Tesis de Maestría. UNAM.

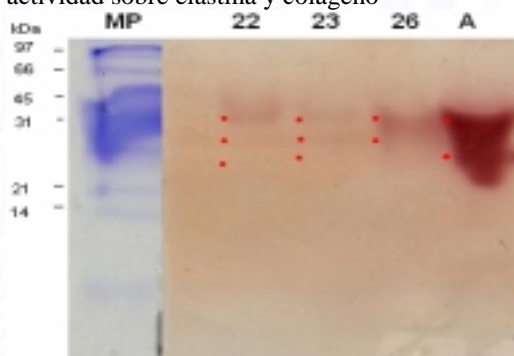


Fig. 1 carril 1, marcadores de peso molecular. Carriles 22: medio suplementado con extracto de levadura, 23 mediosuplementado con aceite de olivo, 26 medio sin