



## CARACTERIZACIÓN DE UN EXTRACTO PROTEOLÍTICO FÚNGICO TERMOESTABLE

Ricardo Hernández, Sergio Huerta, Carlos Regalado, Octavio Loera y Lilia Arely Prado\*,

\*Departamento de Biotecnología UAM-Iztapalapa México D.F., 09340 Tel. 5804 6555 ó 5804 4999, Fax 58046554,  
[lapb@xanum.uam.mx](mailto:lapb@xanum.uam.mx)

*Palabras clave: Proteasas, termoestable, inhibidor.*

**Introducción.** Actualmente, el uso de las enzimas está limitado por su estabilidad, sin embargo la experiencia en ingeniería de proteínas ha demostrado que es posible producir enzimas termoestables a partir de microorganismos termotolerantes<sup>1</sup>. Las proteasas termoestables son inusualmente estables a temperaturas elevadas debido a que los organismos que las producen se adaptan a las altas temperaturas del medio. Entre las ventajas que ofrecen las proteasas termoestables se tiene que pueden utilizarse en procesos que requieren temperaturas elevadas ya que éstas ofrecen altas tasas de reacción, reduciendo la incidencia de contaminación microbiana por organismos mesofílicos<sup>2</sup>.

El objetivo de este trabajo fue la caracterización de extractos proteolíticos producidos por dos cepas fúngicas termotolerantes.

**Metodología.** Las cepas estudiadas en este trabajo fueron aisladas de pasta de copra y bagazo de caña. La producción de los extractos proteolíticos se realizó por fermentación en medio sólido (FMS) en columna empacada a 45°C utilizando harina de pescado como sustrato y espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte. La concentración de inóculo se ajustó a  $2 \times 10^7$  esporas/g de materia seca. Se determinó la termoestabilidad preincubando el extracto proteolítico a diferentes temperaturas (30-80°C) y posteriormente se determinó actividad proteolítica a las condiciones de pH y temperatura determinados previamente. Se evaluó el efecto inhibidores de proteasas (PMSF, EDTA y  $\beta$ -mercaptoetanol) e iones ( $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) a una concentración final de 1 y 5 mM, respectivamente. La actividad proteolítica se determinó por el método de Kembhavi modificado<sup>4</sup>. Una unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que liberan 1  $\mu\text{g}$  de tirosina por minuto.

**Resultados y discusión.** Al evaluar el efecto de la temperatura y pH en la actividad enzimática se encontró que los extractos proteolíticos tienen una temperatura óptima de 50°C, mientras que el pH de reacción óptimo es de 7 y 9 para los extractos producidos por las cepas 36 aIV y 2.2 aB respectivamente. Una vez optimizadas las condiciones de reacción enzimática se evaluó la estabilidad térmica a diferentes temperaturas (Tabla 1) y se determinaron los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) de los extractos proteolíticos. Estudios de termoestabilidad de proteasas reportan los siguientes tiempos de vida media: la proteasa alcalina producida por *Bacillus* sp. GX6638 presenta un tiempo de vida media de 0.38 h a 60°C, la producida por *Bacillus subtilis* ATCC 14416 de 0.16 h a 60°C, la producida por *Bacillus brevis* de 7 h a 60°C y la proteasa producida por

*Streptomyces* sp. presenta un tiempo de vida media de 0.45 h a 55°C. Realizando una comparación, basada en tiempos de vida media a 60°C, se puede observar que el extracto producido por la cepa 2.2 aB es superior en todos los casos excepto cuando se compara con el extracto producido por *Bacillus brevis*, mientras que el extracto producido por la cepa 36 aIV tiene un tiempo de vida media sólo superior al del producido por *Bacillus* sp. GX6638. Por otro lado el extracto producido por la cepa 36 aIV conservó el 23% de actividad en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol y aumentó en un 39 y 22% su actividad en presencia de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Na}^+$ , respectivamente. En contraste el extracto de la cepa 2.2 aB conservó un 15% de actividad en presencia de PMSF y aumentó un 21% la actividad en presencia de  $\text{Ba}^{++}$ .

**Tabla 1.** Constantes de desactivación y tiempos de vida media para los extractos producidos por las cepas 2.2 aB y 36 aIV.

Cepa	36 aIV		2.2 aB	
	$k_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
30	0.0065	1.78	0.0039	2.96
40	0.0116	1	0.0108	1.07
50	0.0145	0.8	0.0157	0.74
60	0.0347	0.33	0.0231	0.5
70	0.0408	0.28	0.0348	0.33
80	0.0578	0.20	0.0597	0.16

**Conclusión.** La actividad del extracto producido por la cepa 2.2 aB puede deberse a la presencia de una serin proteasa y el ion  $\text{Ba}^{++}$  puede estar estabilizando a la enzima. Con lo que respecta a el extracto producido por la cepa 36 aIV, la actividad puede deberse en su mayoría a la presencia de una cistein proteasa, mientras que los iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Na}^+$  pueden estabilizar a la enzima ya que en presencia de éstos la actividad aumenta. Las comparaciones con otras proteasas demuestra la existencia de una fracción termoestable en los extractos proteolíticos producidos en este trabajo.

### Bibliografía.

- 1.- Yano J. y Poulos T. (2003). New Understandings of Thermostable and Peostable enzymes. *Curr. Op. in Biotechnol.* (14): 360-365.
- 2.- Sookkheo B., Sinchaikul S. y Phutrakul S. (2000) Purification and characterization of the highly Thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification.* (20): 142-151.
- 3.- Haki G. y Rakshit S. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes. *A Review Biorresource Technology.* (89): 17-34.
- 4.- Johnvesly B., Manjunath B. y Naik G. (2002). Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from Thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Biorresource Technology.* (82):61-64.