



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



Cinética de estabilidad térmica de una proteasa fúngica

Ricardo Hernández-Martínez, Octavio Loera-Corral, Arturo Rojo-Domínguez, Lilia Arely Prado-Barragán*.

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Tel. 58046555, fax 58044712, lapb@xanum.uam.mx

Palabras clave: proteasas, termoestabilidad, termodinámica.

Introducción. La inactivación térmica de enzimas en procesos biotecnológicos es una de las principales limitantes para su uso en procesos industriales. El entendimiento de los mecanismos de inactivación y desnaturalización es indispensable para el diseño de enzimas termoestables. Algunas enzimas muestran la pérdida exponencial de actividad con respecto al tiempo, mientras que otras siguen cinéticas no exponenciales, el entendimiento de estos procesos ayudaría a elucidar los mecanismos de inactivación (1,2). El objetivo de este trabajo fue la caracterización de la cinética de inactivación térmica de una proteasa fúngica.

Metodología A partir del extracto proteolítico producido en medio sólido (36 h) se purificó una proteasa en 4 etapas: intercambio aniónico (IA) (X2), tratamiento a 60°C por 30 min (TT) e intercambio catiónico (IC). La actividad proteolítica fue medida utilizando el método descrito por Johnvesly y Naik (3). La proteína fue determinada por el método de BCA (PIERCE®). Se caracterizó la estabilidad a diferentes temperaturas por 1 h, y fue expresada en términos de $t_{1/2}$ y K_d (3). Utilizando las K_d a diferentes temperaturas se determinaron los parámetros termodinámicos de desnaturalización térmica irreversible (1).

Resultados.

La proteasa se purificó con un porcentaje de recuperación de 6.6 y un factor de purificación de 8.8, presenta un peso molecular (PM) aproximado de 88 kDa (Fig. 1), similar al reportado para la Dipeptidil-Peptidasa IV y V producida por *A. fumigatus* (4).

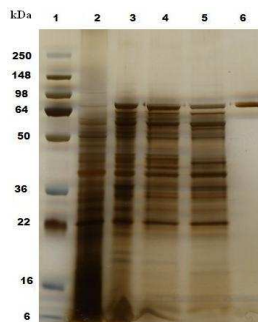


Fig. 1. Perfil electroforético de las etapas de purificación. 1) marcador de PM, 2) extracto, 3)IA 1, 4)IA 2,5)TT, 6)IC.

El perfil de estabilidad térmica de la proteasa (Tabla 1) muestra que el $t_{1/2}$ disminuyó 48, 60 y 43% a 60, 70 y 80°C respectivamente. Sin embargo, los tiempos exhibidos a 70 y 80°C son superiores a los reportados para cepas fúngicas (4). Los resultados referentes a los parámetros termodinámicos indicaron que la entalpía (ΔH^*) (Tabla 1) es independiente de la temperatura, revelando que no hay cambios en la capacidad calorífica de la enzima, y en consecuencia que la estabilidad es debida en gran medida a la presencia de enlaces no covalentes (5). Asimismo, la energía libre (ΔG^*) está directamente relacionada con la estabilidad y como se observa en la Tabla 1 los valores de ΔG^* aumentan al aumentar la temperatura indicando que la enzima es termoestable y además que el equilibrio se encuentra desplazado hacia el estado nativo de la enzima (1, 2, 5). Con lo que respecta los valores de entropía (ΔS^*) en todos los casos fue negativo indicando un aporte positivo al ΔG^* lo cual favorece la estabilidad térmica (1,5).

Tabla 1. Parámetros cinéticos y termodinámicos de inactivación térmica.

T (°C)	$t_{1/2}$ (min)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔG^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol K)
50	65	67.06	89.02	-68.4
60	34	66.98	90.02	-69.5
70	14	66.90	90.5	-68.2
80	8	66.81	91.4	-68.8

Conclusiones. La proteasa fúngica caracterizada es termoestable y presenta mayor estabilidad que la mayoría de proteasas producidas por cepas fúngicas. Podría ser utilizada en procesos donde las temperaturas sean \geq a 50°C como por ejemplo la industria láctea, encurtido de piel y síntesis de aminoácidos.

Agradecimiento. Hernández-Martínez R. agradece a CONACYT la beca No.(188273).

Bibliografía.

1. Iqbal Z., Rashid M. H., Jabbar A., Malana M. A., Khalid and Rajoka M. I. (2003). *Biotech Lett.* 25: 1667-1670.
2. Dogan N. and Tari C. (2008). *Biochem Eng J.* 39: 43-50.
3. Johnvesly B., Manjunath B. R. and Naik G. R. (2002). *Bioresource Technol.* 82:61-64.
4. Beauvais A., Monod M., Debeaupuis J., Diaquin M., Kobayashi H. and Latge J. (1997). *J Biol. Chem.* 272 (10): 6238-6244.
5. Souza C., Faccin D., Mertins O., Heck J., Silveira N., Secchi A. and Ayub N. (2009). *J. Chem Technol Biotechnol.* 84: 1567-1575.