



PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA PROTEASA ÁCIDA EXTRACELULAR DE *Sporisorium reilianum*.

Virginia Mandujano, Ainhoa Arana, Yuridia Mercado. Universidad Politécnica de Pachuca (Laboratorio de microbiología molecular), Carr. Pachuca-Cd. Sahagun km 20, Zempoala, Hidalgo. 43830. vmg_061186@hotmail.com

Palabras clave: *Sporisorium reilianum*, purificación y proteasa.

Introducción. El carbón de la espiga ocasionado por el hongo basidiomiceto *Sporisorium reilianum* es una enfermedad de distribución mundial que afecta principalmente al maíz y al sorgo, siendo su principal característica la presencia de masas carbonosas de color negro en mazorcas y en espigas, estas últimas presentan un desarrollo excesivo y deformaciones (1). Hasta el momento no se conoce acerca de las enzimas hidrolíticas extracelulares de este hongo.

En el presente trabajo se realizó la purificación y caracterización bioquímica de la proteasa ácida extracelular producida por este fitopatógeno, con la finalidad de evaluar el potencial biotecnológico que tiene esta enzima.

Metodología. La actividad enzimática fue medida utilizando albúmina sérica bovina a pH 3.2. Para la purificación de la proteasa se partió de un extracto extracelular obtenido de un cultivo de 96 horas en medio mínimo con glucosa y sulfato de amonio como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente; el cual fue sometido a un proceso de cromatografía en una columna de intercambio iónico con un gradiente de NaCl al 0.1M de 0-100% utilizando el sistema FPLC. La purificación se siguió por SDS-PAGE y tinción de plata. Una vez purificada la enzima se determinó su pH y temperatura óptima y la estabilidad a estos mismos parámetros (2). La proteína se determinó por el método de Bradford (3).

Resultados. La proteasa fue purificada a homogeneidad molecular en un solo paso cromatográfico, utilizando una columna de intercambio iónico. La fracción 35 presentó solo una banda de proteína con actividad, la cual fue eluida a una concentración de NaCl del 25% (Figura 1). El pH y temperatura óptima fueron de 3 y 35°C respectivamente.

La enzima fue estable en un intervalo de pH de 2-11 y de 4°C a 50°C.

La proteína fue purificada 22.63 veces con un rendimiento de 43.58 (Tabla 1).

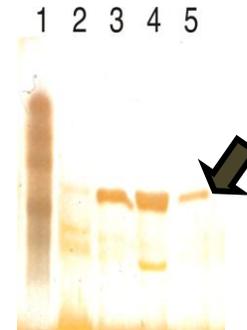


Fig. 1. Gel de electroforesis, teñido con plata. 1. Marcador de peso molecular. 2. Extracto crudo. 3. Fracción 37. 4. Fracción 36. 5. Fracción 35.

Tabla 1. Tabla de purificación.

PASO DE PURIFICACIÓN	PROT. TOT. (mg)	ACT. (U)	ACT. ESP (U/mg)	REND %	PURIF (VECES)
EXTRACTO CRUDO	2.7	205.3	76.03	100	1
INTERCAMBIO IÓNICO.	.052	89.48	1720.7	43.58	22.63

Conclusiones.

Se purificó la proteasa ácida extracelular de *S. reilianum*. La enzima fue estable en un amplio intervalo de pH y temperatura, con óptimos de 3 y 35°C respectivamente.

Bibliografía.

- Fredericksen, R. A. 1977. Head smut of corn and sorghum. *Proc. Corn Sorghum Res. Conf.* 32: 89-104
- Mercado, Y., Guerra, G., Villa, L y, Hernandez, C. (2003). Purification and characterization of an extracellular non-aspartyl acid protease (pumAe) from *Ustilago maydis*. *Current Microbiol.*
- Bradford, M. (1975). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254