

# PRODUCCION, PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD LIPOLITICA EN *Aspergillus nidulans*

Carolina Peña, Augusto González y Amelia Farrés  
Depto. de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.  
Fax: (52) (5) 6 22 53 09, e-mail: [farres@servidor.unam.mx](mailto:farres@servidor.unam.mx)

Palabras clave: lipasa, purificación, caracterización, *Aspergillus nidulans*.

**Introducción.** En adición a su significado biológico, la bioconversión de lípidos, las lipasas tienen muchas aplicaciones en el área de tecnología de alimentos, ciencias biomédicas y en la industria química. El uso de estas enzimas como catalizadores ha aumentado debido a su alta eficiencia en sistemas de solventes orgánicos. *A. nidulans* es un hongo muy importante debido al grado de conocimiento que se tiene de su estructura genética y a la facilidad para obtener mutantes.

Dentro del grupo de trabajo se encontró actividad lipolítica en *A. nidulans* PW1. Se trabajó en la obtención de mutantes que no produjeran lipasa y se encontró que dicha enzima se reprime por carbono por un mecanismo independiente del represor creA (1). Posterior a estos trabajos, otros grupos han observado la presencia de actividad lipolítica en este microorganismo (2) y recientemente se reportó la purificación y caracterización de una lipasa activa a bajas temperaturas (0-20°C) para la cepa de *A. nidulans* WG312 (3). Aun así, se conoce poco sobre las lipasas producidas por *A. nidulans* y no se sabe cómo ocurre la regulación de estas enzimas, por lo que es interesante profundizar estudios en esta área. El presente trabajo se centró en la purificación de la lipasa de *A. nidulans* y en la caracterización bioquímica de la misma.

**Metodología.** Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL (volumen de trabajo de 50 mL). La enzima se purificó siguiendo la siguiente estrategia: a) filtración del extracto crudo (Millipore), b) liofilización, c) tratamiento de la muestra con éter (1:5), d) centrifugación durante 15 min a 14,000 rpm, e) cromatografía de filtración en gel (Ultragel ACA-54) usando Tris 0.2 M, pH 7.5 como amortiguador, f) ultrafiltración (Amicon, membrana de YM 30) y g) cromatografía de intercambio iónico (Econo-Pack) con gradiente lineal de 0.1 M NaCl con acetatos 0.5 M, pH 5.2 como amortiguador. La actividad enzimática se cuantificó por el método espectrofotométrico con *o*-nitrofenil laurato (4).

**Resultados y Discusión.** Se estableció una estrategia de purificación para la enzima con la que se obtuvo un factor de purificación de 59.84 y un porcentaje de rendimiento de actividad de 56.25. Los resultados de la caracterización bioquímica mostraron como condiciones de reacción óptimas del ensayo de actividad de la enzima un pH de 8.5 y una temperatura de 40°C. Se observó que la enzima es resistente a un rango de pH de 8-11 durante 12 h a 37°C y de 68 durante 24 h a 37°C. En cuanto a la temperatura, se determinó que la enzima conserva el 80% de su actividad en un rango de 30 a 70°C durante 15 y 30 min. A 80°C se observó que la enzima pierde el 50% de su actividad después de 15 min y el 80% después de 30 min.

Se presentó una marcada activación de la enzima al adicionar  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  a concentración 1 mM y se obtuvo un efecto negativo con los iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  a concentraciones 1 y 10 mM. Se determinó que la enzima tiene un peso molecular de 37 KDa y un punto isoeléctrico de 4.5. Al determinar la especificidad de sustrato se vio que la enzima hidrolizó preferencialmente sustratos de cadena corta y mostró su actividad máxima con tributirina.

**Conclusiones.** La lipasa de *A. nidulans* PW1 caracterizada es termoalcalofílica y tiene un peso molecular de 37 KDa y un pI de 4.5. Los resultados mostraron que la enzima tiene un peso molecular de 37 KDa y conserva el 80% de su actividad en un rango de temperatura de 30 a 70°C durante 15 y 30 min y en un rango de pH de 8 a 11 durante 12 horas a 37°C.

Esta enzima es diferente de la ya reportada para la cepa de *A. nidulans* WG312.

**Agradecimientos.** Se agradece el apoyo financiero de la IFS 1478/3. La cepa de *A. nidulans* fue donada por el Dr. Jesús Aguirre, Instituto de Fisiología, UNAM. C. Peña fue becaria CONACYT

## Bibliografía

1. Kawasaki, L. (1995). Obtención y caracterización de mutantes de *A. nidulans* incapaces de utilizar lípidos como fuente de carbono. Tesis de Maestría. UNAM.
2. García-Lepe, R., Nuero, O. (1997). Lipases in autolysed cultures of filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 125-130.
3. Mayordomo, I., Rande-Gil, F. (2000). Isolation, purification and characterization of a cold active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 105-109.
4. Isobe, K., Akiba, T. y Yamaguchi, S. (1998). Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agric. Biol. Chem.* 52 (1): 41-47.