

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**



Casa abierta al tiempo

**“Caracterización molecular de proteasas termoestables producidas por  
*Aspergillus fumigatus*”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**M. en B. RICARDO HERNÁNDEZ MARTÍNEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. LILIA ARELY PRADO BARRAGÁN**

**ASESORES:**

**DR. OCTAVIO LOERA CORRAL**

**DR. ARTURO ROJO DOMÍNGUEZ**

México, D. F., Febrero de 2011

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, y además cuenta con apoyo del mismo consejo”

Esta tesis se realizó en la Planta Piloto de Fermentación en Estado Sólido (PP4) perteneciente al Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa en México D.F. bajo la dirección de la Dra. Lilia Arely Prado Barragán. Se agradece a CONACyT por la beca otorgada para los estudios de Doctorado así como también por la beca mixta para realizar una estancia de investigación en la Universidad de Georgia en el Complex Carbohydrate Research Center (CCRC) en Athens G.A.

México D.F. a 14 de Febrero del 2011

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“Caracterización molecular de proteasas termoestables producidas por  
*Aspergillus fumigatus*”**

que presentó:

M. en B. Ricardo Hernández Martínez

Comité Tutorial:

Director: Dra. Lilia Arely Prado Barragán

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dr. Arturo Rojo Domínguez

Jurado:

Presidente: Dr. Arturo Rojo Domínguez

Universidad Autónoma Metropolitana Cuajimalpa

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Vocal: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Vocal: Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

Universidad Autónoma de Coahuila

The image shows four handwritten signatures in black ink, each positioned above a horizontal line. The signatures are: 1. A stylized signature for Arturo Rojo Domínguez. 2. A signature for Octavio Loera Corral. 3. A signature for Sergio Huerta Ochoa. 4. A signature for Cristóbal Noé Aguilar González.

*Si quieres ser sabio, aprende a interrogar razonablemente,  
a escuchar con atención, a responder serenamente  
y a callar cuando no tengas nada que decir*

*Johann Kaspar Lavater*

*A Fabiola y Axel por ser mi principal motivación gracias por el apoyo y por ser parte de mi, ustedes me dieron la fortaleza necesaria para salir adelante.*

*A mis padres Chanito y Juanita por haberme dado la vida, esos deseos de superación que siempre vi en ustedes me inspiraron para seguir adelante, gracias por el apoyo. Este logro es más suyo que mío.*

*A mis Hermanos y cuñadas: Esther, Alicia, Victor, Memo, Fatima, Elo sin ustedes no lo hubiera conseguido, este logro también es de ustedes.*

*A mis sobrinos Joyce, Yahir, Vale, Santi son una bendición en nuestras vidas.*

## **Agradecimientos**

Es muy complicado expresar mi agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de alguna manera en la realización de este trabajo, espero no olvidar a nadie.

Quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Lilia Arely Prado por haber dirigido este trabajo, por sus consejos y apoyo, y sobre todo por su amistad.

Agradezco al Dr. Octavio Loera y Dr. Arturo Rojo Domínguez el apoyo y sugerencias realizadas durante el desarrollo de este trabajo, por haber contribuido de manera muy importante en mi formación.

A los Drs. Sergio Huerta y Cristóbal Noé Aguilar por sus comentarios y contribución para la mejora de este documento.

A los Drs. Gerardo Gutiérrez y Carl W. Bergman por haber permitido trabajar en su laboratorio (CCRC), por haberme asesorado y por el apoyo tan importante que me brindaron durante mi estancia. Para ustedes un agradecimiento muy especial, sin su apoyo no hubiera sido posible.

A los Drs. Ernesto Favela y Gerardo Saucedo gracias por haberme enseñado los secretos de la fermentación en estado sólido, por haber contribuido a mi formación y sobre todo por su amistad.

A Blanquita, Neith, Gabriel, Luz, Toño, Dany, Isadora por haberme enseñado que la amistad es muy valiosa, por haberme abrigado cuando lo necesite y por haber estado siempre cerca de mí, los quiero.

A todos los compañeros de la PP4 por haber sido mi compañía y por haber hecho tan agradable y divertido mi paso por el laboratorio. Gracias por su apoyo y amistad.

A los compañeros y amigos del W-104 Erick, Armando, Robert, Misa, Cuapio, Pacos, Oscar, gracias por apoyarme y por compartir tantos momentos conmigo.

## Índice

Resumen .....	I
Abstract .....	III
1 Introducción .....	2
1.1 Proteasas .....	2
1.1.1 Proteasas bacterianas .....	4
1.1.2 Proteasas fúngicas .....	4
1.1.2.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	5
1.1.3 Clasificación de proteasas .....	7
1.2 Producción de proteasas .....	8
1.3 Enzimas termoestables .....	11
1.4 Proteasas termoestables .....	12
1.4.1 Proteasas termoestables microbianas .....	14
1.4.2 Ingeniería proteica de subtilisinas .....	15
1.5 Estabilidad de proteínas .....	17
1.5.1 Estabilidad macroscópica .....	18
1.5.1.1 Cinética de inactivación térmica.....	19
1.5.2 Estabilidad microscópica .....	21
1.6 Mejoramiento de la estabilidad térmica.....	22
1.6.1 Glicosilación .....	23
2 Justificación .....	27
3 Hipótesis.....	30
4 Objetivos.....	32
4.1 General.....	32
4.2 Particulares.....	32
5 Materiales y métodos.....	34
5.1 Microorganismos .....	34

5.1.1	Conservación de las cepas.....	34
5.2	Preselección de cepas productoras de proteasas.....	34
5.2.1	Crecimiento a 45°C en placas de agar papa dextrosa .....	34
5.2.2	Determinación de actividad proteolítica en placa de agar leche descremada...35	
5.3	Selección de cepas productoras de proteasas.....	35
5.3.1	Producción de inóculo .....	35
5.3.2	Producción de enzimas proteolíticas en cultivo en medio sólido .....	35
5.4	Ensayo enzimático.....	37
5.5	Proteína total .....	37
5.6	Purificación de proteasas.....	38
5.6.1	Isoelectroenfoque .....	38
5.6.2	Intercambio aniónico.....	39
5.6.3	Tratamiento térmico.....	39
5.6.4	Intercambio catiónico.....	40
5.6.5	Filtración en gel .....	40
5.7	Caracterización de las proteasas puras.....	41
5.7.1	Electroforesis.....	41
5.7.2	Determinación de actividad proteolítica <i>in situ</i> .....	41
5.7.3	Efecto del pH sobre la actividad.....	42
5.7.4	Energía de activación y temperatura óptima .....	42
5.7.5	Efecto del pH sobre la estabilidad.....	42
5.7.6	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad .....	43
5.7.7	Cinética de inactivación térmica.....	43
5.7.8	Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica.....	44
5.7.9	Determinación del estado de oligomerización.....	45
5.7.10	Digestión con endoglicosidasas.....	45
6	Resultados y discusión .....	47

6.1	Preselección de cepas productoras de proteasas.....	47
6.1.1	Crecimiento a 45°C en placas de agar papa dextrosa .....	47
6.1.2	Determinación de actividad proteolítica en agar leche descremada.....	47
6.2	Selección de cepas productoras de proteasas.....	50
6.3	Caracterización de los extractos proteolíticos producidos por CMS.....	54
6.3.1	Efecto del pH y temperatura en la actividad de extractos proteolíticos.....	54
6.3.2	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de extractos proteolíticos .....	57
6.3.3	Efecto de inhibidores sobre la actividad de extractos proteolíticos.....	58
6.3.4	Actividad proteolítica <i>in situ</i> .....	59
6.1	Identificación y caracterización de cepas.....	60
6.2	Purificación de proteasas termoestables .....	61
6.2.1	Isoelectroenfoque .....	61
6.2.2	Separación de proteasas.....	62
6.3	Caracterización de proteasas .....	71
6.3.1	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad .....	71
6.3.2	Digestión con endoglicosidasas.....	75
6.3.3	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad .....	78
6.3.4	Efecto de glicosilación sobre la estabilidad térmica .....	82
6.3.5	Cinética de inactivación térmica.....	84
6.3.6	Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica.....	93
7	Conclusiones .....	96
8	Perspectivas .....	99
9	<i>Bibliografía</i> .....	101
ANEXOS.....		i
ANEXO A. Análisis estadístico selección de cepas .....		i
Anexo B. Secuencia de ácidos nucleídos de las cepas 36 aIV y 2.2. aB. (servicio CBG-IPN, Reynosa, Tamaulipas, México). .....		ii

Anexo C. Cromatogramas derivados de las etapas de purificación de las proteasas A y B. ....	vii
Anexo D. Estimación de los pesos moleculares (PM) de las proteasas puras.....	x

## Índice de tablas

Tabla No.		Pag.
1.1	Características de algunas proteasas microbianas comerciales	3
1.2	Características de proteasas de acuerdo a la familia a la que pertenecen	9
1.3	Reacciones de bioconversión y aplicaciones de enzimas termoestables	13
6.1	Relación de cepas fúngicas que presentaron crecimiento a 45°C	48
6.2	Índice de potencia de las cepas productoras de proteasas en agar leche descremada	49
6.3	Producción de proteasas microbianas	53
6.4	Extractos proteolíticos producidos por diferentes microorganismos	56
6.5	Parámetros obtenidos de la purificación de la proteasa A producida por <i>A. fumigatus</i> en cultivo en medio sólido	64
6.6	Parámetros obtenidos de la purificación de la proteasa B producida por <i>A. fumigatus</i> en cultivo en medio sólido	65
6.7	Características de proteasas producidas por cepas fúngicas	68
6.8	Parámetros estimados para las proteasas A y B de la cinética de estabilidad térmica	81
6.9	Tiempo de vida media de la proteasa B nativa y deglicosilada	84
6.10	Parámetros termodinámicos reportados para distintas enzimas	91
6.11	Parámetros cinéticos y termodinámicos de la inactivación térmica de la proteasa A	92
6.12	Parámetros cinéticos y termodinámicos de la inactivación térmica de la proteasa B	92
6.13	Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica de proteasas	93

## Índice de figuras

Fig. No.		Pag.
5.1	Diagrama del sistema de columnas utilizado para la producción de proteasas	36
6.1	Halos de hidrólisis observados a las 72 horas de cultivo	50
6.2	Cinética de producción de extractos proteolíticos en cultivo en medio sólido	51
6.3	Efecto del pH sobre la actividad de los extractos producidos por las cepas 2.2 aB y 36 aIV	54
6.4	Efecto de la temperatura sobre la actividad de los extractos proteolíticos producidos por las cepas 2.2 aB y 36 aIV	55
6.5	Efecto de inhibidores en la actividad proteolítica de los extractos producidos por las cepas 2.2 aB y 36 aIV	59
6.6	Zimograma de actividad proteolítica de los extractos producidos en cultivo en medio sólido	60
6.7	Separación isoelectroforética de proteasas del extracto proteolítico producido por <i>A. fumigatus</i>	62
6.8	Perfil electroforético (SDS-PAGE) de las etapas de purificación de la proteasa A	66
6.9	Perfil electroforético (SDS-PAGE) de las etapas de purificación de la proteasa B	66
6.10	Perfil de actividad de las proteasas A y B en función del pH	72
6.11	Perfil de estabilidad de las proteasas A y B en función del pH	74
6.12	Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la proteasa A digerida con glicosidasas	77
6.13	Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la proteasa B digerida con glicosidasas	77

6.14	Gráfico de Arrhenius para la proteasa A	79
6.15	Gráfico de Arrhenius para la proteasa B	79
6.16	Perfil de termoestabilidad presentado por la proteasa A	81
6.17	Perfil de termoestabilidad presentado por la proteasa B	82
6.18	Gráfico de Arrhenius para la estimación de los parámetros termodinámicos de la proteasa A	87
6.19	Gráfico de Arrhenius para la estimación de los parámetros termodinámicos de la proteasa B	87

## Resumen

Actualmente el interés en la producción de enzimas termoestables se ha incrementado debido a la diversidad de aplicaciones y beneficios industriales que representan. El objetivo de la presente investigación fue la caracterización de los factores bioquímicos responsables de la termoestabilidad de proteasas fúngicas producidas por Cultivo en Medio Sólido (CMS).

El trabajo se inicio seleccionando los hongos y levaduras capaces de crecer a 45°C, en esta etapa se seleccionaron 29 de 72 cepas. En una segunda etapa, se seleccionaron las cepas (2.2 aB, 2.7 aB y 36 aIV) productoras de proteasas en agar leche descremada. Posteriormente se evaluó la producción de proteasas en CMS con las cepas seleccionadas, las cepas 2.2 aB y 36 aIV alcanzaron la máxima actividad a las 36 h de cultivo, mientras que la cepa 2.7 aB requirió 48 h para alcanzar la máxima producción, misma que fue 45% menor que las cepas antes mencionadas, motivo por cual fue descartada.

Los extractos enzimáticos producidos por las cepas 2.2aB y 36 aIV presentaron pH y temperatura óptimos de actividad de 9 y 7 respectivamente, a 50°C. El extracto producido por la cepa 2.2 aB presentó un tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de 2.96, 1.07, 0.74, 0.5, 0.33 y 0.16 h a 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C, respectivamente. En contraste, los valores de  $t_{1/2}$  presentados por el extracto producido por la cepa 36 aIV fueron de 1.78, 1.0, 0.8, 0.33, 0.28 y 0.20 h a las mismas condiciones de temperatura.

Debido a que la cepa 36 aIV mostró mayor estabilidad, ésta se seleccionó para continuar la presente investigación. Sin embargo, ambas cepas se identificaron molecularmente como: *Yarrowia lipolytica* (99%) y *Aspergillus fumigatus* (90%) para las cepas 2.2 aB y 36 aIV, respectivamente.

Se purificaron dos proteasas producidas por *Aspergillus fumigatus*, las cuales fueron denominadas como A y B. Las proteasas A y B fueron purificadas a homogeneidad obteniéndose un porcentaje de recuperación de 6.6 y 3.9% con factor de purificación de 8.8 y 7.1, respectivamente. El peso molecular (SDS-PAGE, tinción plata) de las enzimas monoméricas puras fue de 88 y 45 kDa para la proteasa A y B, respectivamente. La proteasa B presenta N-glicosilación y el 29% del peso molecular es representado por los carbohidratos; en contraste proteasa A no presentó N-glicosilación.

La caracterización de las enzimas puras indica que la proteasa A es activa en un rango de pH de 6 a 9, en un rango de temperatura de 50 a 64°C mostrando la máxima actividad

a pH 7 y 60°C. En tanto que, la proteasa B exhibió actividad en un rango de pH de 8 a 12, en un rango de temperatura de 50 a 66°C presentando la máxima actividad a pH 10 y 63°C. Los estudios de estabilidad térmica indican que la proteasa A conserva el 58 y 43% de actividad residual a 50 y 60°C, mientras que la proteasa B mantiene el 49 y 17% a las mismas condiciones de temperatura en una hora de ensayo. Los  $t_{1/2}$  indican que a 60 y 70°C la proteasa A presenta mayor estabilidad que la proteasa B. En contraste a 50°C la proteasa B presenta  $t_{1/2}$  12% mayores, sugiriendo que la proteasas A posee mayor termoestabilidad que la B a temperaturas mayores a 50°C. La evaluación de la termoestabilidad de la proteasa B previamente digerida con endo H (deglicosilada) se observó que los valores de  $t_{1/2}$  disminuyen a 50 y 60°C, mientras que a 70 y 80°C se inactiva completamente. Dichos resultados sugieren que la glicosilación es una característica que confiere estabilidad térmica a esta proteasa.

La cinética de inactivación térmica (ecuación Lumry-Eyrin) muestra valores absolutos de 67 kJ mol<sup>-1</sup> y -69 J mol<sup>-1</sup> de entalpía ( $\Delta H^*$ ) y entropía ( $\Delta S^*$ ) respectivamente para la proteasa A, mientras que para la proteasa B se obtuvieron valores de 130 kJ mol<sup>-1</sup> y 124 J mol<sup>-1</sup> de  $\Delta H^*$  y  $\Delta S^*$  respectivamente. Estos resultados confirman una mayor estabilidad térmica de la proteasa A con respecto a la B. Por otro lado, los parámetros calculados para las temperatura ensayadas indican que la  $\Delta H^*$  es independiente de la temperatura, indicando que no hay cambios en la capacidad calorífica en ambas enzimas. Asimismo, los valores de  $\Delta S^*$  para ambas enzimas fueron negativos, indicando estabilidad térmica en un rango de temperatura de 50 a 70 °C.

Adicionalmente, los estudios de inhibición enzimática sugieren que las proteasas A y B pueden pertenecer a la familia de las serín proteasas.

Finalmente se concluye que *A. fumigatus* produce al menos dos proteasas termoestables en CMS con diferentes características estructurales. La glicosilación es una característica estructural que podría participar en la estabilidad térmica de la proteasa B, no se observó efecto del estado de oligomerización en la termoestabilidad. La inserción de carbohidratos en la cadena proteica de la proteasa A, además de la adición de enlaces covalentes que permitan la rigidez y flexibilidad necesaria para la catálisis, permitiría obtener una enzima con características de estabilidad térmica mejoradas. Es importante mencionar que la proteasa A presentó mayor termoestabilidad que las producidas por otras cepas fúngicas previamente reportadas en la literatura.

## Abstract

The interest on thermostable enzymes has increased due to their numerous advantages and industrial applications. The objective of this work was to identify some of the biochemical factors responsible for the thermostability of fungal proteases produced in Solid State Culture (SSC).

First the fungal and yeast strains competent to grow at 45°C; there were selected 29 from 72 assayed strains. Then, the strains that showed proteases production on skim milk agar plates were selected (2.2 aB, 2.7 aB and 36 aIV) to evaluate their protease production by SSC. The strains 2.2 aB and 36 aIV showed maximum activity at 36 h of culture, while the strain 2.7 aB required 48 h to reach maximal protease production, however the enzyme production was 45% lower than the strains 2.2 aB and 36 aIV, for this reason the 2.7 aB was also discarded.

The enzymatic extracts produced by the strains 2.2 aB and 36 aIV showed optimum pH and temperature activity at 9 and 7 respectively, at 50°C. The extract produced by the strain 2.2 aB showed a half life ( $t_{1/2}$ ) of 2.96, 1.07, 0.74, 0.5, 0.33 and 0.16 h at 30, 40, 50, 60, 70 and 80°C, respectively. In contrast,  $t_{1/2}$  values presented by the extract produced by the strain 36 aIV were of 1.78, 1.0, 0.8, 0.33, 0.28 and 0.20 h at the same temperature conditions.

Because the 36 aIV strain showed major thermostability, it was selected to continue this research. However, both strains were identified as *Yarrowia lipolytica* (99%) and *Aspergillus fumigatus* (90%) for strains 2.2 aB and 36 aIV respectively.

Two proteases produced by *Aspergillus fumigatus* were purified, which were referred as A and B. Proteases A and B were purified to homogeneity with a finally yield of 6.6 and 3.9% and purification fold of 8.8 and 7.1 respectively. The molecular weight (SDS-PAGE, silver stain) of pure monomeric enzymes was 88 and 45 kDa for protease A and B respectively. The protease B presents N-glycosylation and 29% of its molecular weight is accounted by carbohydrates, in contrast protease A did not show N-glycosylation.

Enzymes characterization indicates that protease A is active in the range of pH from 6 to 9, at the temperature range from 50 to 64°C with maximal activity at pH 7 and 60°C. Whereas protease B exhibits activity in the range of pH from 8 to 12, at the temperature range from 50 to 66°C showed maximal activity at pH 10 and 63°C. Thermal stability assays indicate that protease A retained 58 and 43% of residual activity at 50 and 60°C, whereas protease B preserved 49 and 17% at the same temperature conditions in both

cases after one hour of assay. The  $t_{1/2}$  indicates that at 60 and 70°C the protease A exhibits higher thermostability than protease B. In contrast, at 50°C the protease B show  $t_{1/2}$  12% higher than protease A; suggesting that protease A presents additional thermostability than B at temperatures above 50°C. The evaluation of the thermostability of the protease B previously digested with endo H (deglicosilated), showed that  $t_{1/2}$  values decreased at 50 and 60°C, whereas at 70 and 80°C were completely inhibited. These results suggest that glycosylation is a feature that may confer thermal stability on this protease.

The thermal inactivation kinetics (Lumry-Eyring equation) shows the absolute values of 67 kJ mol<sup>-1</sup> and -69 J mol<sup>-1</sup> for enthalpy ( $\Delta H^*$ ) and entropy ( $\Delta S^*$ ) respectively for protease A, whereas for protease B, values were 130 kJ mol<sup>-1</sup> and 124 J mol<sup>-1</sup> for  $\Delta H^*$  and  $\Delta S^*$  respectively. These results corroborate the higher thermal stability for protease A. Nevertheless, parameters obtained at each temperature assayed indicated that  $\Delta H^*$  is independent of the temperature, showing no-change in heat capacity in both enzymes. Furthermore, the  $\Delta S^*$  values for both enzymes were negative, indicative of thermal stability at the temperature range from 50 to 70°C.

Additionally, enzyme inhibition studies suggest that proteases A and B may be considered in the serine protease family.

Finally, it is concluded that *A. fumigatus* produce at least two thermostable proteases in SSC with different molecular characteristics. Glycosylation is a structural feature that may contribute in thermal stabilization of the protease B, no effect on thermal stabilization was showed by the oligomerization state of the enzyme. The insertion of carbohydrates in the protein chain of protease A and the addition of covalent bonds to give the equilibrium between flexibility and rigidity during catalyses at high temperatures provides enzyme with improved thermal stability. It is important enfatice that protease A exhibits higher thermal stability that fungal proteases previously reported in the literature.

# Introducción

## 1 Introducción

### 1.1 Proteasas

Las proteasas son enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas (EC 3.4), las cuales representan el 30% de la producción mundial de enzimas, siendo las denominadas alcalinas las que comprenden el mayor porcentaje de comercialización (25%) (Rao y col., 1998; Moreira y col., 2003; Seong y col., 2004). Estas enzimas pueden ser producidas a partir de plantas, animales y microorganismos. Las de origen microbiano son más utilizadas que el resto, ya que son producidas en mayores cantidades, además de que presentan mayor homogeneidad y actividad catalítica, características que las hacen económicamente viables.

Frecuentemente las proteasas producidas por microorganismos son constitutivas o parcialmente inducibles dependiendo de las condiciones de cultivo; además su síntesis es influenciada por los componentes del medio de cultivo, la relación carbono-nitrógeno, la presencia de azúcares de fácil asimilación y en casos particulares, la presencia de determinados iones. Además la producción de proteasas también se ve afectada por condiciones de cultivo seleccionadas (Gupta y col., 2002).

Las proteasas microbianas son generalmente estables y su proceso de producción es sencillo, seguro y de menor costo que las obtenidas de origen animal o vegetal. Existe gran variedad de microorganismos que pueden sintetizar proteasas, dentro estos se destacan las de origen bacteriano y fúngico, en la

Tabla 1.1 se listan algunas proteasas comerciales y propiedades de pH y temperatura de actividad.

**Tabla 1.1** Características de algunas proteasas microbianas comerciales (Guadix y col., 2000)

Enzima	Origen	Estabilidad*	
		pH	Temperatura (°C)
Alcalasa 0.6 L	<i>Bacillus licheniformis</i>	4-11.5	50-60
Neutrasa	<i>Bacillus subtilis</i>	6-8	45-55
Alcalasa 660L	<i>Bacillus subtilis</i>	7-10	50-70
Corolasa 7107	<i>Bacillus subtilis</i>	7-9	40-50
Proteasa fúngica	<i>Aspergillus oryzae</i>	6-9	45-55
Corolasa 7093	<i>Aspergillus oryzae</i>	6-9	35-45
P.E.M. 2500 S**	Tripsina porcina	6-10	30-60
	Tripsina bovina	6-10	25-45
Corolasa PP	Tripsina bovina	6-10	25-45
Corolasa PS	Quimiotripsina bovina	7-9	45-55
Corolasa 7089	Tripsina bovina	5-7	50-60
Corolasa 7092	Quimiotripsina	6-8.5	55-60
Bromelanina Takamina	Piña	2-3	30-50

\*Estabilidad referida en rango de pH y temperatura

\*\*Mezcla de enzimas proteolíticas de origen animal

### 1.1.1 Proteasas bacterianas

La mayoría de las proteasas comerciales se producen por organismos que pertenecen al género *Bacillus*. Las proteasas alcalinas de origen bacteriano son las más comercializadas debido a su alta actividad catalítica; se caracterizan por tener preferentemente una actividad óptima a pH 10, además de una alta especificidad por sustratos y generalmente su temperatura óptima está alrededor de los 60°C. Las proteasas neutras de origen bacteriano son activas en un rango de pH de 5 a 8 con una limitada termotolerancia y se caracterizan por presentar alta afinidad por aminoácidos hidrofóbicos. Las propiedades de las proteasas alcalinas bacterianas son apropiadas para usarse en la industria de los detergentes ([Rao y col., 1998](#); [Joo y Chang 2006](#)).

### 1.1.2 Proteasas fúngicas

Las proteasas de origen fúngico son activas en un rango de pH de 4 a 11 y exhiben una amplia especificidad por diferentes sustratos. Las proteasas ácidas presentan un pH óptimo de 4 a 4.5 y son estables entre valores de pH 2.5 y 6; mientras que las neutras son activas a valores de pH ligeramente ácidos y alcalinos entre 6 y 8 ([Rao y col., 1998](#)). Las proteasas alcalinas tienen actividad en un amplio rango de pH (8-11) y se utilizan en numerosos procesos industriales dentro de los que destacan sus usos en la industria de detergentes, encurtido de piel, alimentos, industria química, formulaciones médicas, recuperación de plata en películas de rayos-X y en la modificación de proteínas, entre otros ([Agrawal y col., 2005](#)).

Además, las proteasas fúngicas presentan ciertas ventajas sobre sus homólogas bacterianas por ser generalmente extracelulares, de fácil recuperación/purificación y los procesos de producción son habitualmente más sencillos y económicos. Las cepas fúngicas tienen la capacidad de secretar una mayor variedad de enzimas que las bacterias. Por ejemplo, *Aspergillus oryzae* tiene la capacidad de producir proteasas ácidas, neutras y alcalinas dependiendo de las condiciones de pH del cultivo. Existen numerosos reportes de biosíntesis de proteasas fúngicas que indican que las cepas *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* producen concentraciones elevadas de enzimas proteolíticas (Sandhya y col., 2005). La mayoría de los estudios en la producción de enzimas proteolíticas convergen principalmente en la utilización de hongos mesófilos (temperatura óptima de 20 a 45°C); sin embargo, actualmente existe interés en la producción de enzimas de microorganismos termotolerantes y termófilos, para aplicaciones a gran escala que requieren de altas temperaturas (Vieille y Zeikus, 2001).

#### **1.1.2.1 *Aspergillus fumigatus***

*Aspergillus fumigatus* es un hongo considerado como patógeno debido a que bajo ciertas condiciones puede ocasionar aspergilosis (infección pulmonar que se puede extender a otras partes del cuerpo), desórdenes respiratorios tales como aspergiloma (reproducción de *Aspergillus* en una cavidad pulmonar), así como también infecciones invasivas severas en personas inmunodeprimidas o personas recién trasplantadas (Markaryan y col., 1994; Moser y col., 1994).

La literatura revela que esta cepa tiene la capacidad de producir diferentes proteasas extracelulares involucradas en los mecanismos de patogenicidad (Borger y col., 1999). Sin embargo los estudios que involucran la función de las proteasas sintetizadas por *A. fumigatus* con las enfermedades citadas previamente son contradictorios debido a que algunos autores han encontrado tres proteasas (serín, aspartil y metalo) directamente involucradas con los mecanismos de infección. No obstante, otros autores exponen que existen algunas proteasas extracelulares que no han sido identificadas como responsables de la patogenicidad, las cuales se producen en mayor cantidad cuando no están presentes las proteasas directamente involucradas con este mecanismo (Kunert y Kopecek, 2000).

En la actualidad se conocen diversas proteasas extracelulares producidas por *A. fumigatus*, sin embargo para señalar la responsabilidad sobre la patogenicidad es necesario conocer todas las enzimas proteolíticas que pueden ser producidas. También es necesario conocer las características moleculares de las mismas debido que tienen gran relevancia sobre la función ejercida en las infecciones causadas por esta especie fúngica. El análisis de las proteasas producidas por *A. fumigatus* ha sido continuo pero no se ha presentado ninguna prueba de que alguna proteasa en particular juegue un papel fundamental en la patogénesis de las aspergilosis invasiva (Latge, 1999). Asimismo, Markaryan y col. (1994) y Wang y col. (2005) reportaron que la metalo proteasa y serín proteasa producidas por *A. fumigatus* presentan características de estabilidad térmica inusuales, comparado con las proteasas producidas por otras especies fúngicas. Esta característica de estabilidad hace a las enzimas secretadas por *A. fumigatus*

candidatas potenciales para expresarse en algún microorganismo reconocido como seguro (GRAS) para su uso en procesos biotecnológicos que requieran temperaturas altas ( $\geq 60^{\circ}\text{C}$ ). Además, las estructuras moleculares podrían servir como modelo de estudio para entender los mecanismos mediante los cuales las enzimas adquieren termoestabilidad y al mismo tiempo entender los procesos de desnaturalización térmica para diseñar enzimas termo-activas con mayor estabilidad térmica.

### 1.1.3 Clasificación de proteasas

De acuerdo a la clasificación de la “Comisión de Enzimas” (EC, por sus sigla en inglés) regida por el Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas se clasifican en el grupo 3 (hidrolasas) subgrupo 4 (hidrólisis de enlaces peptídicos). Debido a la gran diversidad de reacciones que catalizan esta clasificación puede ser subdividida con base en la afinidad que presentan por los aminoácidos localizados en los extremos de los sustratos. De tal manera que se clasifican como exopeptidasas; dependiendo del extremo por el cual tienen afinidad éstas se subclasifican en carboxipeptidasas o aminopeptidasas. En contraste, las proteasas que presentan afinidad por los enlaces formados entre aminoácidos internos del sustrato son clasificadas como endopeptidasas.

Por otro lado, numerosos autores clasifican a las proteasas acorde a la similitud de su secuencia como ha sido clasificado en la base de datos MEROPS, que incluye a todas las proteasas (peptidasas) que se han originado de un ancestro

común. Por otra parte, de acuerdo al grupo funcional responsable de la catálisis las proteasas pueden ser clasificadas en serín, treonín, cisteín, aspartil, metalo y glutamil proteasas. Otra clasificación que puede distinguir a las proteasas es la que se basa en el pH óptimo de actividad, clasificándolas en ácidas, neutras y alcalinas (Sumantha y col., 2006; <http://merops.sanger.ac.uk>). También se puede destacar que las proteasas se clasifican de acuerdo a ciertas propiedades distintivas, las cuales pueden depender de la fuente y condiciones de producción. En Tabla 1.2 se listan algunos ejemplos de las características de proteasas producidas por microorganismos

## 1.2 Producción de proteasas

En la actualidad la producción de proteasas se ha estudiado mediante los procesos de cultivo en medio líquido (CML) y cultivo en medio sólido (CMS) (Lazim y col., 2009). El CML, es el proceso en el cual los microorganismos se desarrollan sumergidos en medio líquido donde el oxígeno y los nutrientes requeridos para el crecimiento y producción de metabolitos se encuentran disueltos en el medio. Por tal motivo el CML requiere nutrientes solubles que tengan la capacidad de dispersarse. En consecuencia, el CML tiene una cantidad neta de carbono y energía accesible, además de que se facilita el control del proceso y la recuperación de las enzimas extracelulares, o bien micelio o esporas. Sin embargo, los productos biotecnológicos excretados se obtienen a concentración diluida y los extractos enzimáticos generalmente presentan menor estabilidad que los producidos en CMS.

**Tabla 1.2** Características de proteasas de acuerdo a la familia a la que pertenecen

Tipo de proteasa	EC. No.	Masa molar (kDa)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Requerimiento de iones metálicos	Aminoácidos presentes en el sitio activo	Inhibidor	Fuente
Aspartil o carboxil proteasas	3.4.23	30–45	3–5	40–55	Ca <sup>2+</sup>	Aspartato o cisteína	Pepstantina	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Neurospora</i> , Tejido animal (estómago)
Cisteín o tiol proteasas	3.4.22	34–35	2–3	40–55	–	Aspartato o cisteína	Iodoacetamida o β-CMB	<i>Aspergillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> Piña, papaya (Carica papaya)
Metalo proteasas	3.4.24	19–37	5–7	65–85	Zn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	Fenilalanina o leucina	EDTA, EGTA	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>
Serín proteasas	3.4.21	18–35	6-11	50–70	Ca <sup>2+</sup>	Serina, histidina y aspartato	PMSF, DIFP, EDTA, Inhibidor de tripsina,	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , Intestinos de animales <i>Tritirachium album</i> (termoestable)

El CMS se define como el cultivo en soportes sólidos (con capacidad de retener agua en su estructura), en ausencia (o casi ausencia) de agua libre (agua disponible para reacciones metabólicas). El soporte debe poseer el sustrato suficiente que permita el desarrollo, multiplicación celular y metabolismo del microorganismo para la producción de enzimas. Los aspectos de importancia que deben considerarse en este tipo de cultivo son la selección del microorganismo y de un sustrato adecuado, la separación y purificación de las enzimas producidas, así como también la selección y optimización de los parámetros del proceso como temperatura, pH, aireación, tamaño de inóculo, etc. (Pandey, 2003).

La adecuada selección del sustrato es un punto clave para los CMS, debido a que el sustrato puede servir como soporte físico y fuente de nutrientes (residuos agroindustriales), aunque en otros casos se adiciona solubilizado al soporte inerte. Para la selección del sustrato se deben tener en cuenta que éste sea específico para inducir la enzima que se desea producir. También puede estar relacionado con la meta de producción. De la misma forma se seleccionan los microorganismos más apropiados para la producción del metabolito de interés.

Otros aspectos relevantes son los parámetros del proceso y su optimización, esto incluye parámetros fisicoquímicos y bioquímicos tales como tamaño de partícula, textura inicial, temperatura de incubación, agitación y aireación, edad y concentración del inóculo, complementación de nutrientes como nitrógeno, fósforo, elementos traza, fuentes de carbono e inductores (Pandey, 2003).

Diversas enzimas han sido producidas por CML debido a la facilidad para controlar el cultivo; sin embargo, el CMS ha cobrado importancia por las ventajas

atribuidas sobre el CML, algunas de las más importantes son que la cantidad de enzima producida por hongos filamentosos supera a la producida por CML, la simplicidad de equipo y técnicas utilizadas, el bajo requerimiento de energía y el bajo costo de producción debido a la posibilidad del uso de residuos agroindustriales como soporte y sustrato. Otras ventajas son las bajas cantidades de efluentes generados (Mitchell y col., 2000). El CMS representa el medio adecuado para crecimiento y síntesis de enzimas fúngicas, ya que además se minimiza la represión catabólica y se estimula la producción de moléculas reguladoras que favorecen las altas producciones de enzima con mayor estabilidad térmica que las producidas por CML (Aguilar y col., 2004; Hamidi-Eshafani y col., 2007; Oda y col., 2006; Mitchell y col., 2000).

### **1.3 Enzimas termoestables**

El estudio de nuevos microorganismos extremófilos y sus enzimas ha tenido gran impacto en el campo de la biocatálisis, ya que están adaptados para sobrevivir en nichos ecológicos en donde prevalecen valores extremos de temperatura y pH, concentraciones salinas y presiones altas, entre otras condiciones extremas (Vieille y Zeikus 2000). El hecho de que los extremófilos sean capaces de sobrevivir bajo condiciones no-convencionales podría indicar que han desarrollado propiedades enzimáticas que les permite sobrevivir en tales ambientes. Como resultado, estos microorganismos producen biocatalizadores únicos que funcionan en condiciones en las cuales sus contrapartes mesófilas no podrían operar. Asimismo las proteínas termoestables producidas entre los 45 y

100°C por los microorganismos termotolerantes, termófilos e hipertermófilos son generalmente resistentes a la desnaturalización química y proteolítica (Jaenicke, 1991).

La operación a altas temperaturas tiene influencia significativa en la disponibilidad de sustratos y productos, debido que incrementa su solubilidad, además la temperatura reduce la incidencia de contaminación ocasionada por el desarrollo de microorganismos mesófilos. Al mismo tiempo, las enzimas termoestables pueden realizar una amplia gama de bioconversiones, tal y como se observa en la Tabla 1.3. Debido a que las enzimas termoestables catalizan reacciones enzimáticas específicas, pueden ser utilizadas para realizar reacciones que no sería posible realizar por catálisis química (Becker y col., 1997; Haki y Rakshit, 2003).

#### **1.4 Proteasas termoestables**

La importancia que han adquirido las proteasas termoestables se debe a que pueden ser aplicadas en procesos que se llevan a cabo a temperaturas elevadas (> 50°C) y valores extremos de pH, tales como la industria peletera, lavado de equipo (sanitización), alimentos, farmacéutica, obtención de hidrolizados de proteína, síntesis y resolución de muestras racémicas de aminoácidos, fotografía, papel, entre otros (Johnvesly y col., 2002; Haki y Rakshit, 2003; Kazan y col., 2005; Peña-Montes y col., 2008).

**Tabla 1.3** Reacciones de bioconversión y aplicaciones de enzimas termoestables (Haki y Rakshid 2003)

Enzima	Temperatura óptima (°C)	Bioconversión	Aplicación
<b>α- Amilasa</b>	50-60	Almidón → jarabe de dextrosa	Producción de maltosa
<b>Celulasa</b>	45-55, 95	Celulosa → glucosa	Hidrólisis de celulosa, degradación de polímeros en detergentes
<b>Proteasa</b>	65-85	Proteína → aminoácidos y péptidos	Horneado, detergentes, industria de la piel y fotografía
<b>Lipasa</b>	30-70	Remoción de grasa, hidrólisis, interesterificación, alcoholólisis, aminólisis	Lácteos, detergentes, farmacéutica, cosméticos, industria de la piel
<b>DNA polimerasa</b>	90-95	Amplificación de DNA	Ingeniería genética/PCR

Las proteasas termoestables son inusualmente estables a altas temperaturas (comparadas con sus contrapartes mesófilas), lo que les concede ventajas como modelo de estudio de los mecanismos fisicoquímicos y estructurales que confieren termoestabilidad enzimática (Zhu y col., 2007). El entendimiento de los factores que confieren estabilidad catalítica a altas temperaturas permite elucidar los mecanismos de plegamiento y estabilidad estructural, y en consecuencia conlleva a efectuar diseños enzimáticos catalíticamente termorresistentes (Kumar y Nussinov, 2001). En la actualidad los esfuerzos realizados para comprender los procesos de estabilización de enzimas proteolíticas se ha rezagado debido a la

inestabilidad que han presentado las enzimas estudiadas, por lo cual los resultados reportados son generalmente ambiguos.

#### **1.4.1 Proteasas termoestables microbianas**

Los microorganismos hipertermófilos son capaces de producir un abundante número de proteasas y peptidasas, ya sea intra o extracelulares con diferente especificidad de sustrato. Una importante proporción de proteasas producidas por microorganismos hipertermófilos pertenecen a la familia de las subtilisinas y la secuencia de éstas han sido identificados a través de la comparación de secuencias de proteasas homólogas con ayuda una “Herramienta de búsqueda de alineamiento básico local” (BLAST, por sus siglas en inglés). Sin embargo, esta aproximación en función de la comparación de estructuras tiene diversas limitaciones, de hecho es prácticamente inútil en la identificación de proteínas que no presentan similitud con la estructura primaria a los genes con función conocida. A pesar de que varias proteasas termoestables son estructuralmente similares a las mesófilas previamente caracterizadas, aún se siguen identificando nuevas estructuras ([Almog y col., 2003](#)).

Las acualisinas son otro grupo de proteasas termoestables ampliamente estudiadas y son producidas por *Thermus aquanticus*. La acualisina I ha sido examinada y se ha encontrado que en su estructura posee cuatro cisteínas que forman dos puentes disulfuro responsables en parte de la estabilidad térmica elevada que exhibe. Adicionalmente, se ha encontrado que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son requeridos para estabilizar a la enzima, como sucede también para las subtilisinas

y otras proteasas. La acualisina I es una serín proteasa considerada como un tipo de subtilisina, presentó de 37 a 39 % de identidad con otras subtilisinas producidas por la misma bacteria (Lin y col., 1999).

Una característica que se ha atribuido a las subtilisinas es su considerable estabilidad; sin embargo, los mecanismos por los cuales exhibe esta propiedad no han sido entendidos con claridad. El análisis de la estructura cristalina de subtilisinas producidas por microorganismos mesófilos y termófilos ha mostrado estabilidad estructural dependiente de la presencia de uno o más iones  $\text{Ca}^{2+}$  enlazados a la molécula de la proteína. La contribución del  $\text{Ca}^{2+}$  se atribuye al enlazamiento a un sitio específico en la estructura terciaria, que contribuye a la estabilidad mediante enlazamiento energético del estado nativo, favoreciendo la energía libre del plegamiento ( $\Delta G$ ) y evitando la desnaturalización (Bryan, 2000).

#### 1.4.2 Ingeniería proteica de subtilisinas

En términos de ingeniería proteica, la estabilidad de las subtilisinas se define como la pérdida de actividad (inactivación) con respecto al tiempo. Los mecanismos de inactivación irreversible son muy complejos ya que implican desnaturalización, auto digestión, agregación y en algunos casos daño de aminoácidos específicos. En general, los métodos por los cuales se ha medido la tasa de inactivación de subtilisinas a temperaturas elevadas, son indirectamente medidos por la tasa de desnaturalización, debido a que el desplegamiento es el paso determinante en la inactivación irreversible conforme aumenta la temperatura. Por lo tanto, los cambios en la tasa de inactivación irreversible se

reflejan en cambios de energía de activación para el desplegamiento. La estabilización de las subtilisinas se clasifica de la siguiente manera: 1) estabilización por la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , 2) estabilización por la presencia de agentes quelantes y 3) estabilización por presencia de ambos (Bryan, 2000).

Entre las proteasas que se ha caracterizado más ampliamente para determinar los factores que afectan su estabilidad se encuentra la termolisina (pertenece al grupo de las subtilisinas). La estabilidad de esta enzima puede explicarse por la diferencia de las energías libres entre el estado nativo y el desnaturalizado, las cuales pueden ser cinéticamente controladas si se logra fortalecer la estructura de las asas (estructura primaria de las proteínas que une los dominios estructurales) de la proteasa debido a que son las zonas más susceptibles a la desnaturalización (Vried y Eijsink, 1993). Este tipo de enzimas requieren  $\text{Zn}^{2+}$  para ser catalíticamente activas, así como también cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$  para ser estructuralmente estables (Inouye y col., 2003).

Erróneamente la estabilidad de proteasas se ha fundamentado en la medición de actividad y en consecuencia los resultados obtenidos no presentan conclusiones referentes a los mecanismos de estabilización. Por lo tanto, en este trabajo se pretende contribuir a la generación de resultados que puedan apoyar la explicación y elucidación de los mecanismos moleculares, a través de los cuales se estabilizan las estructuras moleculares de las proteasas.

## 1.5 Estabilidad de proteínas

Entre los esfuerzos realizados para la identificación de los factores responsables de la estabilidad térmica de enzimas, se encuentra la secuenciación y comparación estructural de proteínas termoestables con sus contrapartes mesófilas. Con esto se ha deducido que son varios los factores responsables de la estabilidad térmica; sin embargo, en la actualidad no existen reglas generales para la predicción de la estabilidad de proteínas ([Almog y col., 2003](#)).

En condiciones fisiológicas normales las proteínas se encuentran en su forma más estable (nativa). Sin embargo, con los cambios drásticos de temperatura, pH y la presencia de agentes desnaturizantes en el medio, las proteínas pueden ser susceptibles a la desnaturalización. La estabilización estructural puede ser comprendida si se entienden los mecanismos moleculares que impactan directamente a esta propiedad. Diferentes investigadores sugieren que entre los factores que contribuyen a la estabilidad se encuentran puentes de hidrógeno, empacamiento hidrofóbico, exposición de estructura secundaria, reducción en el tamaño de las asas, incremento de residuos de prolina, disminución de residuos termolábiles, aumento en el área superficial polar, interacción entre proteínas, estado de oligomerización, remoción de residuos sensibles a la oxidación o desaminación, aumento de puentes salinos e interacciones electrostáticas ([Nosoh y Sekiguchi, 1990](#); [Kumar y col., 2000](#); [Pack y Yo, 2003](#)).

La estabilidad y plegamiento de proteínas puede ser entendida como el balance entre las fuerzas que estabilizan y el aumento de la entropía conformacional debida a la adquisición de la forma desplegada ([Nosoh y Sekiguchi, 1990](#)). Existen numerosos procedimientos mediante los cuales la estabilidad de

proteínas puede ser expresada; sin embargo, las definiciones más utilizadas se basan en la estabilidad en términos termodinámicos macroscópicos y microscópicos a partir de secuencias y diferencias estructurales (Kumar y Nussinov, 2001).

### 1.5.1 Estabilidad macroscópica

La estabilidad termodinámica de las proteínas puede variar con los cambios en las condiciones del medio en el que se encuentren. Por ejemplo temperatura, pH, soluciones amortiguadoras, concentraciones de sales, presencia y ausencia de desnaturalizantes químicos, concentración de proteína, presencia y ausencia de sustratos, ligandos y subunidades (Kumar y Nussinov, 2001).

La estabilidad termodinámica de proteínas puede medirse a través de los cambios de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), tanto de los estados nativo (N) como el desnaturalizado (D) en la reacción de plegamiento. Para muchas proteínas la reacción de plegamiento es reversible y a partir de  $\Delta G$  es posible que los parámetros termodinámicos  $\Delta H$  y  $\Delta S$  sean determinados experimentalmente. En 1889, Arrhenius demostró que la tasa de una reacción química está determinada por la energía de activación ( $E_a$ ) y que a su vez esta depende de la temperatura. Estudios basados en  $E_a$  son referidos principalmente a la entalpia de activación ( $\Delta H^*$ ) (Oliveberg y col., 1995). El cambio de la energía libre de Gibbs para el plegamiento de una proteína se define de la siguiente manera:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Donde  $\Delta H$  es el cambio de entalpía y  $\Delta S$  es el cambio de entropía entre el estado plegado y desplegado. Por otro lado los cambios de entalpía debidos a la desnaturalización están relacionados con los cambios en la capacidad calorífica de la proteína. A su vez, se relacionan con los cambios en la accesibilidad en el área superficial entre el estado plegado y desplegado (Kumar y Nussinov, 2001). Muchos estudios han correlacionado las diferencias entre la estabilidad macroscópica de enzimas de hipertermófilos, termófilos y mesófilos con la diferencia secuencial y estructural microscópica. La descripción microscópica de estabilidad está directamente relacionada con la estructura y propiedades secuenciales de las proteínas. Una estrategia indirecta para estudiar la estabilidad termodinámica de las proteínas es mediante el estudio de la cinética de desnaturalización térmica, la cual es generalmente expresada en términos de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) a cierta temperatura.

#### **1.5.1.1 Cinética de inactivación térmica**

Para poder definir estrategias racionales que reflejen el aumento de la estabilidad térmica de enzimas es necesario elucidar los procesos de desnaturalización térmica irreversibles. Una explicación utilizada para la inactivación enzimática es la que define la pérdida de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria debido a la desaparición de los enlaces covalentes. Algunas enzimas muestran la pérdida exponencial de actividad con respecto al tiempo, mientras que otras siguen diferentes cinéticas no exponenciales. Para ello han sido propuestos diferentes modelos, un ejemplo es el modelo general propuesto por Lumry y

Eyring (Iqbal y col., 2003) que define la desnaturalización térmica de las enzimas como:



Donde  $N$  es la enzima nativa catalíticamente activa,  $U$  es la enzima desnaturalizada y catalíticamente inactiva reversiblemente, e  $I$  es la enzima inactivada de manera irreversible. En el primer paso la inactivación de las enzimas es debida a la pérdida de interacciones no covalentes con la conservación de la conformación nativa. Este proceso es completamente reversible debido a que algunas enzimas tienen la capacidad de recobrar su actividad cuando su estructura no se perturba demasiado. Si el agente desnaturalizante es más agresivo ocurre el segundo paso, en donde las enzimas son inactivadas de manera irreversible (Violet y Meunier, 1989; Souza y col., 2009). Los experimentos de cinética de inactivación térmica permiten estimar los parámetros termodinámicos de estabilización de una manera sencilla y rápida a través de la linearización (EC 3) de la ecuación propuesta por Lumry y Eyring (2):

$$k_d = \frac{Tk_B}{h} e^{\frac{\Delta S^*}{R}} e^{\frac{\Delta H^*}{RT}} \quad (2)$$

$$\ln\left(\frac{k_d}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^*}{R} - \frac{\Delta H^*}{RT} \quad (3)$$

Donde  $k_d$ ,  $T$ ,  $k_B$ ,  $h$ ,  $\Delta S^*$ ,  $\Delta H^*$  y  $R$  son la constante de inactivación térmica, temperatura absoluta, constante de Boltzmann, constante de Plank, entropía de activación, entalpia de activación y constante de los gases respectivamente (Iqbal y col., 2003; Dogan y Tari, 2008; Volquen y col., 2008).

### 1.5.2 Estabilidad microscópica

La actividad catalítica de las enzimas depende de la integridad de su conformación proteica nativa. Si se desnaturaliza o disocia una enzima en sus sub-unidades, se pierde normalmente la actividad catalítica. Una de las hipótesis referentes a la estabilidad térmica de las enzimas refleja una restricción en la flexibilidad de la misma; la cual les permite ser funcionalmente activas a temperaturas elevadas e inusualmente rígida a temperaturas intermedias ([Scandurray col., 2000](#)). Para que las reacciones enzimáticas se lleven a cabo es necesaria la flexibilidad, pero la rigidez es esencial para los sitios de enlace ya que los residuos responsables de la catálisis deben mantener cierta orientación para conservar su función. Un alto nivel de rigidez implica el incremento de la estabilidad, no obstante la flexibilidad es esencial para su función; sin embargo, una excesiva flexibilidad de las proteínas las hace susceptibles a la proteólisis o desnaturalización ([Smith y col., 1999](#)).

Mediante estudios estructurales se han caracterizado proteínas aisladas de microorganismos termófilos, aunque en contraste sólo se han reportado algunos cuantos trabajos sobre proteínas adaptadas a bajas temperaturas o psicrófilas. Se ha mostrado que las proteínas termofílicas comparadas con sus homólogas mesofílicas, tienen un mejor empaquetamiento interno de grupos no polares, pequeñas asas superficiales; además por una parte tienen menor contenido de residuos lábiles (cisteína, asparagina y glutamina), mientras que por la otra se incrementa el número de puentes salinos, aumentan el número de interacciones hidrofóbicas, aromáticas, puentes de hidrógeno y el grado de oligomerización; también aumentan los enlaces con iones metálicos ([Yano y Poulos, 2003](#)). Se ha

encontrado que iones metálicos como el  $\text{Ca}^{2+}$  estabilizan un gran número de proteínas mediante la formación de enlaces, y su alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel muy importante en la estabilización de éstas.

## 1.6 Mejoramiento de la estabilidad térmica

En la actualidad existen hipótesis acerca de que las propiedades superficiales (por ejemplo hidrofobicidad y carga neta) de las proteínas juegan un papel importante en la estabilización molecular y biocatálisis; sin embargo, los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo dicha acción no han sido totalmente elucidados. Se han propuesto muchas técnicas para modificar las superficies de las enzimas y su microambiente, y en consecuencia sus propiedades funcionales (características fisicoquímicas). Las modificaciones a las cuales han sido atribuidas algunas variaciones en las características fisicoquímicas (estabilidad térmica) de proteínas son la metilación, fosforilación, acetilación y glicosilación (Shental y Levy 2008; [Navilaeva y Turner, 2001](#)). Son muchos los compuestos que pueden ser utilizados para la modificación de las enzimas, los azúcares (glicosilación) son los más empleados debido a que se ha comprobado que en algunos casos mejoran la estabilidad funcional de éstas ([Longo y Combes 1999](#)). Otras estrategias utilizadas para el mejoramiento de la termoestabilidad es la estabilización entrópica (rigidificación) por mutaciones de Gly→Ala, Xxx→Pro o la introducción de puentes disulfuro, introducción de residuos que interactúen con el dipolo alfa-hélice, la inserción de puentes salinos

y la generación de interacciones entre aminoácidos aromáticos (Eijisink y col., 2004).

### 1.6.1 Glicosilación

La glicosilación es una modificación que se lleva a cabo generalmente a nivel post-transcripcional, y dentro de ésta se puede encontrar a la N-glicosilación y O-glicosilación. En la O-glicosilación los carbohidratos se unen a la cadena peptídica a través de los residuos de treonina o serina; mientras que en la N-glicosilación están unidos a los residuos de asparagina específicamente en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina (Colangelo y col., 1999; Angel y col., 2007). Los monosacáridos comúnmente unidos a las proteínas son: fucosa, galactosa, manosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido sialico (ácido N-acetilneuramínico) (Sola y Griebenow 2008).

La glicosilación es generalmente reversible y no tiene ningún papel en la regulación de la actividad proteolítica o de cualquier otra enzima. Sin embargo, debido que la hidrofobicidad de las proteínas cambia en función de los carbohidratos covalentemente unidos, se mantiene la solubilidad de éstas asegurando el correcto plegamiento de los dominios extracelulares proporcionando resistencia a la degradación, lo que también puede ajustar termodinámica y cinéticamente características estructurales de las proteínas (Shental-Bechor y Levy, 2008).

En algunos casos se ha mostrado que la N-glicosilación tiene dos papeles fundamentales: la secreción de la enzima y la regulación de la actividad enzimática (Navilaeva y Turner, 2001). Por otro lado, también se ha encontrado que la glicosilación tiene gran relevancia sobre las estructuras proteicas debido a que puede propiciar el aumento de la estabilidad térmica de las enzimas (Colangelo y col., 1999). Se ha reportado un gran número de proteínas que han aumentado extensivamente su estabilidad térmica por glicosilación.

Algunos estudios por Resonancia Magnética Nuclear han revelado que la estabilización termodinámica debida a la glicosilación está relacionada con la disminución de la dinámica estructural. Algunos autores han sugerido que la estabilidad termodinámica debida a la glicosilación puede ser incrementada con el aumento en el grado de glicosilación; sin embargo, es importante señalar que existen reportes que muestran que el efecto causado por los carbohidratos sobre la termoestabilización de algunas glicoproteínas puede deberse a la disminución del punto isoeléctrico de éstas debido a la modificación de las cargas superficiales generadas por la lisina covalentemente unida a los azúcares (Longo y col., 1995; Navilaeva y Turner 2001) Longo y combes (1999) glicosilaron una lisozima y demostraron que entre las características que se modifican en las moléculas enzimáticas con la adición de azúcares se destaca la hidrofobicidad, actividad hidrolítica, especificidad por sustrato y la termoestabilidad.

La glicosilación de proteínas se realiza de manera natural dentro de la célula (modificaciones pos-trascipcionales); sin embargo, es posible efectuarla *in vitro* mediante modificaciones químicas o enzimáticas con diferentes objetivos dentro

de los que destacan, el aumento de la solubilidad y estabilidad térmica (Sola y Griebenow 2008).

# Justificación

## 2 Justificación

El incremento en la demanda de biocatalizadores que puedan tolerar las condiciones de procesos industriales ha llevado a la búsqueda de enzimas que ofrezcan mayor estabilidad. Comparado con los procesos de síntesis orgánicas, los biocatalizadores ofrecen una mayor precisión durante el proceso logrando obtener productos con mayor especificidad y menor número de reacciones colaterales. En respuesta a esta demanda, diferentes grupos de investigación básica están dedicando esfuerzos considerables en la búsqueda de enzimas que presenten mayor estabilidad operacional (Van den Burg, 2003).

El estudio de microorganismos termotolerantes y sus enzimas ha tenido gran impacto en el campo de la biocatálisis ya que estos microorganismos están adaptados para sobrevivir en nichos ecológicos en donde prevalecen altas temperaturas. El hecho de que los termotolerantes sean capaces de sobrevivir bajo condiciones no-convencionales podría indicar que éstos han desarrollado propiedades enzimáticas que les permite sobrevivir en tales ambientes (Jaenicke, 1991).

Actualmente el uso de las enzimas está limitado por su estabilidad sin embargo, la experiencia práctica de la ingeniería de proteínas ha demostrado que es posible utilizar la información obtenida de las proteínas termoestables para mejorar la estabilidad térmica de las enzimas (Yano, 2003). Para esto, es necesario realizar estudios referentes a la caracterización de los factores bioquímicos y estructurales que confieren la estabilidad térmica de las enzimas.

El entendimiento de los factores que confieren estabilidad a las enzimas termoestables es una tarea que involucra diferentes disciplinas de ciencia básica y aplicada, ya que si éstos llegan a ser bien entendidos, las enzimas podrían ser modificadas a formas más estables a través de un diseño de ingeniería de proteínas racional. En este sentido, las proteínas de los microorganismos termotolerantes han sido un punto de interés en el análisis de los factores que confieren termoestabilidad por mostrar sustancialmente mayor estabilidad térmica intrínseca

# Hipótesis

### **3 Hipótesis**

El análisis molecular de proteasas termoestables producidas por *A. fumigatus* permitirá definir algunos factores estructurales responsables de la termoestabilidad, con lo cual se podrán proponer posibles modificaciones moleculares para aumentar la estabilidad térmica.

# Objetivos

---

## 4 Objetivos

### 4.1 General

- Caracterización de los factores bioquímicos responsables de la termoestabilidad de proteasas fúngicas.

### 4.2 Particulares

- Identificar las cepas fúngicas productoras de proteasas termoestables.
- Obtención de una proteasa termoestable pura a homogeneidad.
- Evaluar la influencia del efecto del pH, temperatura e inhibidores en la actividad proteolítica de las enzimas purificadas.
- Determinar el efecto del pH y la temperatura en la estabilidad de enzimas purificadas.
- Identificar el estado de oligomerización y glicosilación de las proteasas termoestables.
- Determinar el efecto de la glicosilación en la estabilidad térmica de una proteasa glicosilada.
- Obtener la cinética de inactivación térmica de las enzimas purificadas.
- Analizar los parámetros relacionados con la termoestabilidad para definir algunos factores moleculares responsables de ésta.

# Materiales y métodos

## 5 Materiales y métodos

### 5.1 Microorganismos

Se utilizaron 72 cepas fúngicas aisladas de bagazo de caña y pasta de copra de la colección del Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad de Guadalajara.

#### 5.1.1 Conservación de las cepas

La conservación y mantenimiento de las cepas se realizó en tubos inclinados con agar papa dextrosa (APD) a 45°C por 7 días. Asimismo las cepas seleccionadas fueron conservadas por liofilización en leche descremada al 10% (p/v). Las cepas fueron resembradas periódicamente en el medio de conservación.

### 5.2 Preselección de cepas productoras de proteasas

La selección de las cepas con mayor actividad proteolítica, se realizó en dos etapas. La primera, se basó en el crecimiento del microorganismo a 45°C y la segunda en la detección macroscópica de actividad proteolítica en placas de agar leche descremada (ALD) ([Vermelho y col., 1996](#)).

#### 5.2.1 Crecimiento a 45°C en placas de agar papa dextrosa

Las 72 cepas fueron inoculadas por duplicado en placas con APD y se incubaron a 45°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo se analizó el crecimiento.

### **5.2.2 Determinación de actividad proteolítica en placa de agar leche descremada**

Las cepas fueron sembradas en placas ALD (por duplicado) por la técnica de sembrado por picadura, posteriormente fueron incubadas de manera invertida durante 72 horas a 45°C, se tomaron mediciones del diámetro de colonia y halo de hidrólisis cada 12 horas para la determinación del índice de potencia (IP) (Herrera-García 2003; García-Gómez y col., 2009).

### **5.3 Selección de cepas productoras de proteasas**

La selección de las cepas productoras de proteasas se realizó a partir de cultivos en medio sólido (CMS), utilizando espuma de poliuretano (EP) como soporte inerte y harina de pescado (HP) como sustrato.

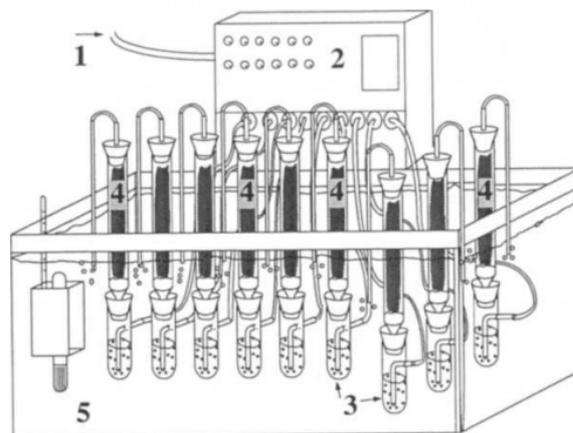
#### **5.3.1 Producción de inóculo**

Las esporas producidas en tubo inclinado con APD se resembraron en 30 mL de APD en matraces Erlenmeyer de 250 mL e incubadas a 45°C por 7 días. Las esporas producidas se cosecharon con una solución de Tween 80 al 0.01% (v/v) y se utilizaron como inóculo para la producción de proteasas por CMS.

#### **5.3.2 Producción de enzimas proteolíticas en cultivo en medio sólido**

El CMS fue realizado en columnas de vidrio empacadas (Fig. 5.1) con 13 g de mezcla de fermentación (PUF/HP) en una relación 70/30 (p/p) (Saucedo-

Castañeda y col., 1992). La mezcla de fermentación fue preparada mezclando la proporción adecuada de HP con PUF ajustando la humedad a 50% con una solución con los siguientes elementos (g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 y 0.5 de KCl en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7. La concentración de esporas fue ajustada a una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas por cada g de materia seca (Tunga y col., 2003). Las columnas empacadas se incubaron a  $45^\circ\text{C}$  por 72 h con un flujo de aire de 40 mL/min. El extracto proteolítico se obtuvo realizando una extracción con agua destilada, el líquido recuperado se centrifugó a  $10,000 \times g$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$  y el sobrenadante obtenido considerado como extracto proteolítico (EP) se congeló y liofilizó hasta su uso.



**Figura 5.1** Diagrama del sistema de columnas utilizado para la producción de proteasas.

1) alimentación de aire, 2) válvulas de regulación de aire, 3) humidificadores, 4) columnas de fermentación y 5) baño de temperatura controlada.

#### 5.4 Ensayo enzimático

La actividad proteolítica se determinó por el método Kembhavi descrito por [Johnvesly](#) y col. (2002). El ensayo se inició incubando a 50°C por 15 min 0.95 mL de una solución de caseína al 1% (p/v) en una solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7) y 0.05 ml de extracto enzimático. La reacción fue detenida con la adición de 1.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. La mezcla de reacción fue centrifugada a 10,000 x g por 15 min y filtrada a través de papel filtro Whatman No. 1. La absorbancia del filtrado se determinó a 280 nm. Una unidad enzimática se definió como los péptidos liberados equivalentes a 1 µg de tirosina en un minuto bajo las condiciones de ensayo.

#### 5.5 Proteína total

La concentración de proteína total fue determinada por el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar (PIERCE®). Se adicionaron 25 µL de muestra a una microplaca, posteriormente se adicionaron 200 µL de reactivo BCA, se agitó por 30 seg. La muestra se incubó a 37°C por 30 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 562 nm y la concentración de proteína fue estimada por interpolación a la curva patrón de BSA.

## 5.6 Purificación de proteasas

La purificación a partir de los extractos producidos por *A. fumigatus* se realizó en cuatro etapas; sin embargo, para definir las condiciones de trabajo se inició con un paso preparativo (isoelectroenfoque) con el objetivo generar la información necesaria para el buen manejo de las muestras. El protocolo de purificación incluyó cromatografía de intercambio aniónico, catiónico y filtración en gel. Del EP se purificaron 2 proteasas las cuales se designaron como proteasa A y B, respectivamente.

### 5.6.1 Isoelectroenfoque

La técnica se inició resuspendiendo y dializando el EP en agua desionizada a 4°C por 12 h, posteriormente se filtró a través de membranas de 45 µm (Millipore®), 1 mL de EP fue mezclado con 58 mL de agua desionizada y 3 mL de anfolitos Bio-Lyte de amplio rango (pH 3-10, Bio-Rad®). La mezcla se inyectó en un aparato de isoelectroenfoque Rotoford (Bio-Rad®), la separación se llevó a cabo a 15 W hasta alcanzar voltaje constante utilizando como soluciones de intercambio NaOH (1 M) y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1 M). Se colectaron 20 fracciones y se determinó el pH a cada una de éstas. Las fracciones obtenidas fueron dializadas contra una solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7) para posteriormente determinar su actividad proteolítica y proteína total.

### 5.6.2 Intercambio aniónico

Para realizar la cromatografía de intercambio aniónico 1 el EP se resuspendió y dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos (20 mM, pH 9) durante 12 h a 4°C. Posteriormente la muestra se aplicó a una columna High Q de 5 mL (Macro-Prep Bio-Rad®), previamente equilibrada con la misma solución amortiguadora. Las fracciones con actividad proteolítica fueron eluidas de la columna aplicando un gradiente de NaCl (en solución amortiguadora TRIS-HCl 20 mM, pH 9) de 0-3 M durante una hora a un flujo constante de 1 mL/min. Se colectaron fracciones de 4 mL y a todas las fracciones se les determinó actividad proteolítica y proteína total por los métodos descritos anteriormente.

El segundo y tercer paso de purificación para las proteasas A y B (ambos intercambio aniónico) se realizó bajo las mismas condiciones de pH utilizadas en el intercambio aniónico 1, variando el gradiente de elución de 0 a 2 M de NaCl en solución amortiguadora de fosfatos (20 mM, pH 9) por 2 horas a un flujo constante de 0.5 mL/min, utilizando la columna del primer intercambio aniónico.

### 5.6.3 Tratamiento térmico

Con el objetivo de eliminar las proteínas termolábiles del extracto proteolítico, las muestras provenientes del intercambio aniónico 1 y 2 (proteasa A y B respectivamente) que presentaron mayor actividad se reunieron y fueron sometidas a tratamiento térmico a 60°C por 60 min. Posterior el extracto fue centrifugado a 10,000 x *g* por 30 min determinándose actividad proteolítica y concentración de proteína a las muestras tratadas.

#### 5.6.4 Intercambio catiónico

El extracto enzimático obtenido en la etapa de purificación anterior (tratamiento térmico, proteasa A) se dializó durante 12 h a 4°C contra una solución amortiguadora de acetatos (20 mM, pH 5) y se aplicó a una columna High S de 5 mL (Macro-Prep Bio-Rad®), previamente equilibrada con la misma solución amortiguadora. Las proteasas fueron eluidas de la columna aplicando un gradiente de NaCl en solución amortiguadora de acetatos (20 mM, pH 9) de 0 a 3 M en 1 h a un flujo de 1 mL/min. Se colectaron fracciones de 4 mL para la determinación de actividad y concentración de proteína.

#### 5.6.5 Filtración en gel

Las fracciones que presentaron actividad proteolítica en la etapa de purificación previa (intercambio aniónico 2, proteasa B) se reunieron y dializaron por 12 h a 4°C contra una solución amortiguadora TRIS-HCl (20 mM, pH 8 con 200 mM de NaCl). Posteriormente la muestra fue aplicada a una columna S-200 (Pharmacia®), previamente equilibrada con la misma solución amortiguadora. La enzima fue recuperada con la solución amortiguadora de equilibrio a un flujo de 0.3 mL/min, fracciones de 8 mL fueron colectadas para la determinar actividad proteolítica y concentración de proteína.

## 5.7 Caracterización de las proteasas puras

Una vez confirmada la pureza de las enzimas se procedió a la caracterización en términos de peso molecular (PM), estado de oligomerización, estado de glicosilación, pH y temperatura de actividad y estabilidad.

### 5.7.1 Electroforesis

Las muestras obtenidas durante las diferentes etapas de purificación; así como el extracto proteolítico crudo, fueron analizadas por electroforesis en geles de acrilamida-SDS (dodecil sulfato de sodio) al 12% y nativos (determinación de estado de oligomerización) mediante el método descrito por Laemmli (1970). Las proteínas fueron separadas en un equipo Novex mini-cell (Invitrogen) a 120 V. Se utilizaron marcadores de peso molecular Invitrogen pre-teñidos (See Blue<sup>®</sup>) para la estimación del peso molecular de las proteínas. Las proteínas separadas fueron visualizadas después de realizar una tinción con plata utilizando el método descrito por Blum y Gross (1987).

### 5.7.2 Determinación de actividad proteolítica *in situ*

Para la identificación de las proteasas presentes en el EP, se realizó una electroforesis en geles de acrilamida-SDS al 10% en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Posterior a la separación electroforética (ver electroforesis 4.7.1) el SDS fue eliminado de mediante lavados con Triton X-100 al 0.1% y se impregnaron con substrato (caseína 2%) por 12 h a 4°C. Posteriormente se

incubaron a 50°C por dos horas. Los geles fueron teñidos utilizando tinción Commassie y revelados en una solución ácido acético: metanol: agua (10:40:50) (v/v) (García-Carreño y col., 1993).

### 5.7.3 Efecto del pH sobre la actividad

Con el propósito de determinar el pH óptimo de actividad para las enzimas nativas, la actividad proteolítica fue determinada en solución de caseína al 1% en un rango de pH de 6 a 10 en las siguientes soluciones amortiguadoras: pH 6 y 7 fosfatos 50 mM, pH 8 y 9 TRIS-HCl 50 Mm; y pH 10 glicina-NaOH (Azeredo y col., 2004).

### 5.7.4 Energía de activación y temperatura óptima

La temperatura óptima de actividad se determinó variando la temperatura de incubación de la mezcla enzima-sustrato (ver ensayo enzimático) en un rango de temperatura de 54 a 70°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Los datos obtenidos fueron graficados de acuerdo al modelo de Arrhenius y a partir de estos fue determinada la energía de activación ( $E_a$ ) y temperatura óptima de actividad proteolítica (Iqbal y col., 2003).

### 5.7.5 Efecto del pH sobre la estabilidad

El efecto del pH sobre la estabilidad de las proteasas puras fue determinado pre-incubando las enzimas a diferentes valores de pH (5-12) por 1 h a temperatura

ambiente. Trascurrido el tiempo de pre-incubación se midió la actividad proteolítica residual de las enzimas puras tal y como se describe en el ensayo enzimático ([Adinarayana y col., 2003](#)).

#### **5.7.6 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad**

Una vez determinadas las condiciones óptimas de reacción de las enzimas puras (temperatura y pH), así como también la estabilidad a diferentes valores de pH se procedió a determinar la estabilidad térmica. El ensayo consistió en la pre-incubación de las muestras puras en ausencia de sustrato a diferentes temperaturas (50-80°C) durante una hora y se determinó el porcentaje de actividad residual por método descrito anteriormente ([Sookkheo y col., 2000](#)). Con objetivo de determinar el efecto de la glicosilación sobre la estabilidad térmica, el ensayo se realizó también a una proteasa deglicosilada (digerida con glicosidasas, ver 4.7.10).

#### **5.7.7 Cinética de inactivación térmica**

La cinética de inactivación térmica de las enzimas puras fue realizada por incubación de la enzima a diferentes temperaturas (50-80°C) por una hora en ausencia de sustrato. Durante el ensayo se tomaron muestras en intervalos periódicos de tiempo (15 min) para posteriormente determinar la actividad por el método anteriormente descrito. La actividad residual se graficó semi-logaritmicamente contra el tiempo de incubación. Las tasas constantes de

inactivación de primer orden ( $k_d$ ) fueron determinadas mediante regresión lineal. Los tiempos de vida media aparentes se calcularon con la ecuación 4 (Iqbal y col., 2003; Dogan y Tari, 2008).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (4)$$

Los parámetros termodinámicos fueron estimados en el rango de temperatura de 50-80°C utilizando la ecuación de Lumry-Eyrin rearrreglada (Iqbal y col., 2003). Las ecuaciones utilizadas para calcular los parámetros termodinámicos de la catálisis de las proteasas fueron las ecuaciones 1 y 2 descritas en la sección 1.5.1.1.

#### 5.7.8 Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica

Con el objetivo de determinar la naturaleza catalítica de las enzimas puras la actividad enzimática fue evaluada en presencia de tres inhibidores de proteasas: fluoruro fenil metil sulfonil (PMSF), inhibidor de serín proteasas; ácido etilendiaminotetracético (EDTA), inhibidor de metalo proteasas; y  $\beta$ -mercaptoetanol, inhibidor de cisteín proteasas. El ensayo se realizó a una concentración final de inhibidor de 5 mM en una solución amortiguadora adecuada para cada proteasa (A y B). La actividad proteolítica se determinó en las condiciones óptimas de las enzimas puras (y en su caso extracto crudo), siguiendo la metodología descrita. Para determinar el efecto de los compuestos evaluados se graficó la actividad residual en función de cada compuesto (Sookkheo y col., 2000; Tunga y col., 2003; Adinayarana y col., 2003; Azeredo y col., 2004).

### 5.7.9 Determinación del estado de oligomerización

Debido a que el estado de oligomerización puede estar relacionado con la estabilidad térmica, éste fue determinado mediante electroforesis. Las muestras analizadas fueron tratadas como se indica en la sección 4.7.1, además una muestra de cada enzima fue separada en ausencia de SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol (condiciones nativas). El estado de oligomerización fue determinado por la diferencia de  $R_f$  de las muestras.

### 5.7.10 Digestión con endoglicosidasas

Las proteasas A y B previamente purificadas fueron deglicosiladas con N-glicosidasa A (Calbiochem<sup>®</sup>) y endoglicosidasa H (Gliko<sup>®</sup>, Prozyme). La reacción de deglicosilación se realizó adicionando 10 mU de N-glicosidasa a una mezcla de reacción que contenía 100  $\mu$ g de proteasa pura, 0.1 % de SDS, 50mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y PMSF 5 mM en buffer de fosfatos (pH 7.5, 100 mM). La digestión con endoglicosidasa H se realizó añadiendo 10 mU de enzima a una mezcla de reacción que contenía 100  $\mu$ g de enzima pura, 0.1% de SDS, 1% y 25 mM de EDTA en buffer de acetatos (pH 5.5, 50 mM). Ambas reacciones se llevaron a efecto a 37°C por 12 h y posteriormente se analizaron por electroforesis por la técnica descrita ([Gentzsch y col., 2003](#); [Kiser y col., 2001](#)).

# Resultados y discusión

## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Preselección de cepas productoras de proteasas

En esta sección se describe la pre-selección de cepas como etapa preliminar a la selección de cepas productoras de proteasas a 45°C.

#### 6.1.1 Crecimiento a 45°C en placas de agar papa dextrosa

Un total de 72 cepas fúngicas, fueron sometidas a pruebas de crecimiento en cajas petri con APD a 45°C durante 7 días. Bajo estas condiciones de cultivo sólo 29 cepas presentaron crecimiento (Tabla 6.1), motivo por el cual éstas fueron seleccionadas para continuar con los estudios de pre-selección.

#### 6.1.2 Determinación de actividad proteolítica en agar leche descremada

Con el propósito de seleccionar las cepas que tenían la capacidad de metabolizar sustratos proteicos como única fuente de carbono y nitrógeno, las 29 cepas fúngicas pre-seleccionadas fueron sembradas en placas de ALD. La capacidad de producción de proteasas se determinó a través del índice de potencia (IP)(Herrera-García, 2003; Vermelho y col., 1996), medido a los 7 días de cultivo aplicando la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{DHH}{DC}$$

Donde:

DHH es el diámetro del halo de hidrólisis y DC es el diámetro de la colonia. Ésta técnica indica (cualitativamente) la capacidad de producción de proteasas extracelulares en el medio de cultivo.

**Tabla 6.1** Relación de cepas fúngicas que presentaron crecimiento a 45°C

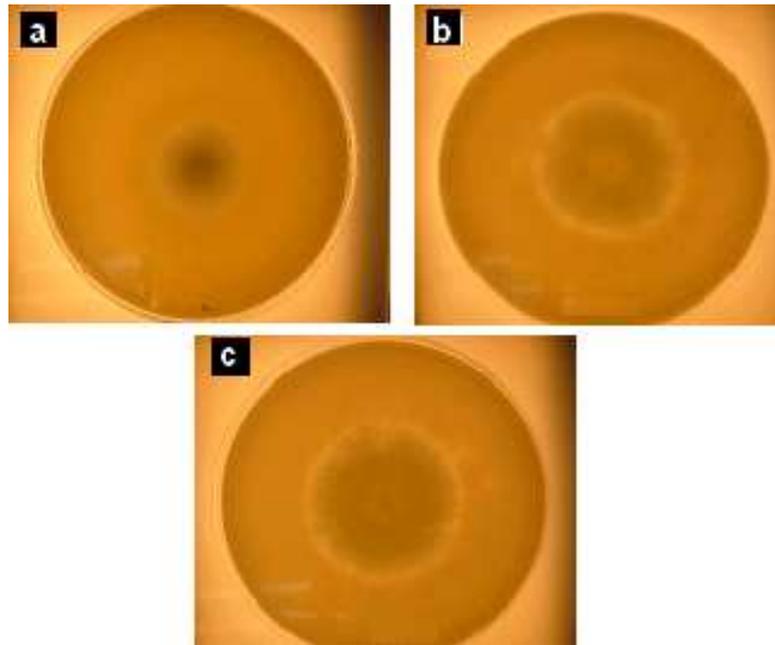
Origen de cepas	
Bagazo de caña	Pasta de copra
7 aIV	1.4 eB
19 bV	1.5 bB
22 aIV	1.5 cB
23 aIV	1.6 B
27 b	1.7 cB
31 aV	1.8 bB
31 cIV	1.8 cB
35 bIV	1.9 aB
36 aIV	2.1 dB
41 aIV	2.2 aB
46 aIV	2.7 aB
48 aIV	2.8 bB
51 aVA	
52 bIV	
66 aV	
68 aV	
68 al A	

La Tabla 6.2 muestra los resultados en base al IP. Se puede apreciar que únicamente 8 cepas utilizaron leche descremada como fuente carbono y nitrógeno. De las cuales, las cepas 36 aIV, 2.2 aB y 2.7 aB exhibieron mayor valor

de IP (1-1.03) (Fig. 6.1), indicando la producción de enzimas proteolíticas. Dicho resultado sugiere que las cepas 36 aIV, 2.2 aB y 2.7 aB tienen la capacidad de producir proteasas a partir de sustratos proteicos, siendo esta característica el criterio de pre-selección de cepas fúngicas productoras de proteasas termoestables. Es importante señalar que para calcular los valores de IP se realizaron siembras por triplicado; sin embargo, el valor reportado en la Tabla 5.2 es representativo de una unidad experimental, dado que la medición del diámetro de halo y cepa se dificultó debido a las formas irregulares presentadas por ambos, razón por la cual no se realizó un análisis estadístico para determinar diferencias entre cepas.

## 6.2 Índice de potencia de las cepas productoras de proteasas en agar leche descremada

Cepa	Parámetro		
	DHH	DC	IP
<b>36 aIV</b>	<b>2.4</b>	<b>2.4</b>	<b>1.0</b>
1.4 eB	5.0	6.3	0.79
1.5 bB	4.1	5.8	0.71
1.5 cB	5.5	6.0	0.92
1.6B	4.5	5.0	0.90
1.9 aB	5.7	6.0	0.95
<b>2.2 aB</b>	<b>3.5</b>	<b>3.4</b>	<b>1.03</b>
<b>2.7 aB</b>	<b>4.5</b>	<b>4.4</b>	<b>1.03</b>

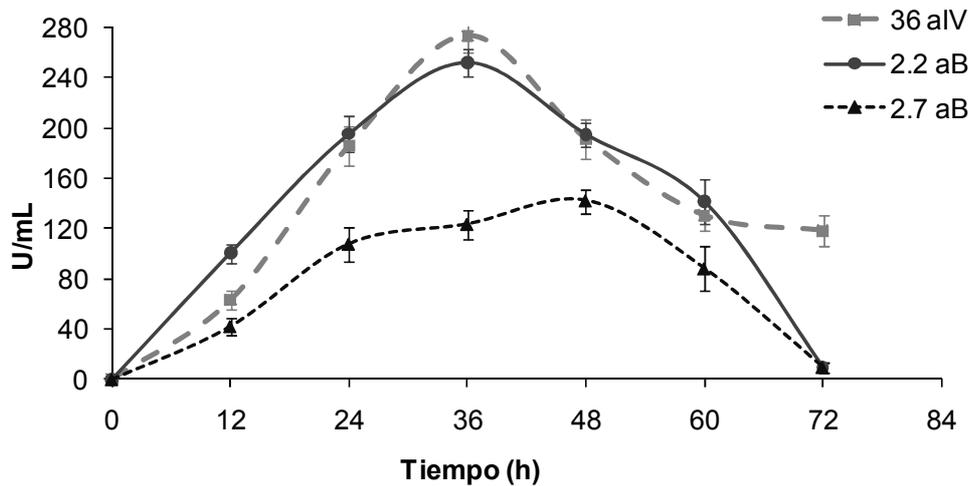


**Figura 6.1** Halos de hidrólisis observados a las 72 horas de cultivo. a) 36 aIV, b) 2.2 aB y c) 2.7 aB.

## 6.2 Selección de cepas productoras de proteasas

El objetivo de esta sección fue evaluar cuantitativamente la capacidad de producción de proteasas de las 3 cepas pre-seleccionadas. Se realizó una cinética de producción de extractos proteolíticos de las cepas 36 aIV, 2.2 aB y 2.7 aB. La Fig. 6.2 muestra la cinética de producción de proteasas, donde la máxima actividad proteolítica es presentada por las cepas 36 aIV y 2.2 aB (265 y 252 U/mL respectivamente) a las 36 h de cultivo. La 2.7 aB presentó máxima actividad proteolítica (142 U/mL) a las 48 horas. El análisis estadístico (ANOVA, anexo A) muestra que entre las actividades presentadas por los extractos de las cepas 36 aIV y 2.2 aB no existe diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) referido a la máxima actividad presentada. En contraste, la actividad del extracto producido por la cepa

2.7 aB, fue significativamente menor al presentado por la 36 aIV y 2.2 aB (con harina de pescado como inductor), motivo por el cual ya no se continuó trabajando con ésta.



**Figura 6.2** Cinética de producción de extractos proteolíticos en cultivo en medio sólido.

La actividad enzimática presentada por los extractos proteolíticos producidos por 36 aIV y 2.2 aB fueron menores a las presentadas por los extractos producidos a partir de harina de pescado por *Pseudomona auroginosa* y *Bacillus subtilis* (720 y 412 U/mL); sin embargo, es importante señalar que en los trabajos antes mencionados las condiciones de producción fueron previamente optimizadas, además de que fueron producidas por CML. Si en el futuro se estudiaran las condiciones para optimizar la producción de proteasas con las cepas estudiadas en este trabajo, podrían llegar a igualarse o incluso superar la producción reportada para *P. auroginosa* y *B. subtilis* (Triki y col., 2003; Ellouz y col., 2001).

García-Gómez y col. (2009) reportó la producción de extractos proteolíticos con la cepa *Aspergillus oryzae* en CMS (sistema idéntico al utilizado en este trabajo) utilizando harina de pescado como sustrato y obtuvo una actividad proteolítica de 0.121 U/mL, siendo menor a la reportada en este trabajo; sin embargo, es importante indicar que el ensayo proteolítico fue distinto al aquí utilizado. Además la actividad proteolítica presentada por las cepas 2.2 aB y 36 aIV son superiores a la producción de *Scytalidium thermophilum*, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Penicillium* sp., *Thermomyces lanuginosus*, *Streptomyces* sp. y *Bacillus cereus*, los cuáles fueron estudiados para la producción de enzimas proteolíticas utilizando distintos procesos de producción; así como también distintos residuos agroindustriales y fuentes de carbono y nitrógeno (Tabla 6.3).

En la Tabla 6.3 se puede observar que la mayoría de las cepas reportadas como productoras de proteasas obtienen la máxima actividad en tiempos superiores (de 12 a 132 h más) al obtenido en este trabajo. Sin embargo los rendimientos pueden ser maximizados a través de una optimización del proceso, pretendiendo reducir los tiempos y costos de producción considerablemente.

**Tabla 6.3** Producción de proteasas microbianas

Microorganismo	Cultivo	Tiempo de cultivo (d)	Sustrato	Actividad proteolítica	Referencia
<i>Beauveria felina</i>	CMS	7	Salvado de trigo con proteína de soya	20000 U/gS	<a href="#">Agrawal y col., 2005</a>
<i>Scytalidium thermophilum*</i>	CML	3	Celulosa cristalina	2.5 U/ mL	<a href="#">Ifrig y Ogel 2002</a>
<i>Aspergillus fumigatus Fresenius</i>	CML	2	Queratina de plumas de pollo	0.25 U/ mL	<a href="#">Santos y col., 1996</a>
<i>Aspergillus oryzae</i>	CMS	1.8	<b>Harina de pescado</b>	0.121 U/ mL	<a href="#">García-Gómez y col., 2009</a>
<i>Penicillium sp.</i>	CMS	3	Harina de soya desengrasada	80907 U/ gS	<a href="#">Agrawal y col., 2004</a>
<i>Penicillium sp.</i>	CMS	2	Soya desengrasada	51.6 U/ mL	<a href="#">Germano y col., 2003</a>
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	CML	12	Caseína, glucosa y extracto de levadura	16 U/mL	<a href="#">Li y col., 1997</a>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MN7	CML	1	<b>Harina de pescado</b>	720 U/ mL	<a href="#">Triki-Ellouz y col., 2003</a>
<i>Streptomyces sp.</i>	CML	5	Casitona y molasas	120 U/mL	<a href="#">Azeredo y col., 2004</a>
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21415	CML	5	Lactosa y glucosa	29 554 U/mL	<a href="#">Mabrouk y col., 1999</a>
<i>Bacillus licheniformis</i> NH1	CML	1	Caseína y extracto de levadura	1600 U/mL	<a href="#">Hadj-Ali y col., 2006</a>
<i>Bacillus subtilis*</i>	CMS	2	Maltosa y extracto de carne	1.81 U/gS	<a href="#">Mukherjee y col., 2008</a>
<i>Bacillus cereus</i>	CML	2	Extracto de carne, peptona y glucosa	134.57 U/mL	<a href="#">Esakkiraj y col., 2007</a>
<i>Bacillus sp</i>	CMS	2.5	Cáscara de frijol	9550 U/gBiomasa	<a href="#">Prakasham y col., 2006</a>
<i>Bacillus subtilis</i>	CML	-	<b>Harina de pescado</b>	412 U/mL	<a href="#">Ellouz y col., 2001</a>
2.2 aB	CMS	1.5	<b>Harina de pescado</b>	265 U/mL	Este trabajo
36 aIV	CMS	1.5	<b>Harina de pescado</b>	253 U/mL	Este trabajo

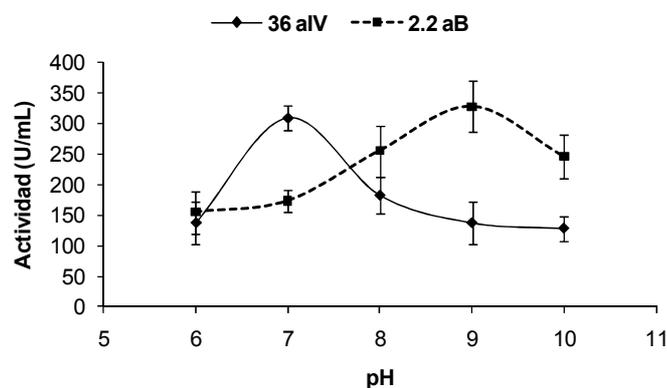
Nota: \* termófilo, CMS: Cultivo en medio sólido, CML: Cultivo en medio líquido, U/ gS: unidades por gramo de sustrato inicial.

### 6.3 Caracterización de los extractos proteolíticos producidos por CMS

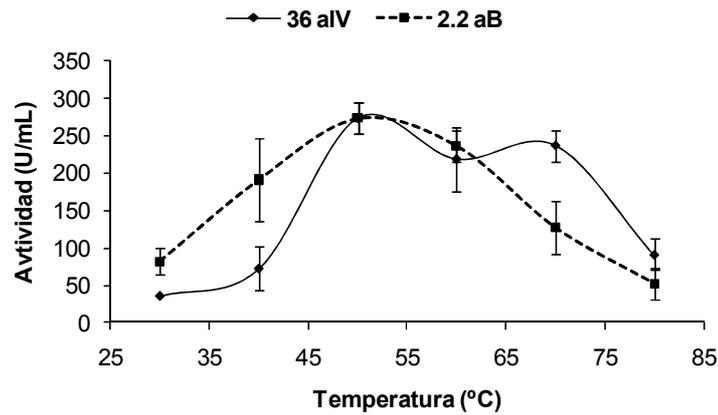
El objetivo de esta sección fue garantizar la existencia de al menos una proteasa termoestable para su purificación, así como también conocer algunas características bioquímicas para la mejor manipulación durante las etapas de purificación. Se determinó el efecto del pH y la temperatura en actividad y estabilidad enzimática; así como el efecto de iones metálicos e inhibidores.

#### 6.3.1 Efecto del pH y temperatura en la actividad de extractos proteolíticos

Al evaluar las condiciones de catálisis enzimática para los extractos producidos por la cepa 2.2 aB y 36 aIV, se observó que la mejor actividad catalítica se obtiene a pH 9 y 7 respectivamente, mientras que ambos extractos presentaron mejor actividad catalítica a 50°C. Sin embargo, es importante indicar que el extracto producido por la cepa 36 aIV exhibió un segundo máximo de actividad a 70°C, debido a la probable existencia de más de una proteasa en el extracto (Fig. 6.3 y 6.4).



**Figura 6.3.** Efecto del pH sobre la actividad de los extractos producidos por las cepas 2.2 aB y 36 aIV.



**Figura 6.4.** Efecto de la temperatura sobre la actividad de los extractos proteolíticos producidos por las cepas 2.2 aB y 36 aIV.

Con respecto al pH óptimo de actividad, en la Tabla 6.4 se puede observar que el pH óptimo de actividad (pH 7) presentado por extracto producido por la cepa 36 aIV es menor al presentado por el extracto producido por *Aspergillus oryzae* (pH 8) (García-Gómez y col., 2009) producido también con harina de pescado. Sin embargo, ambos valores de pH de actividad solo permiten clasificar a los extractos proteolíticos como neutros. Mientras que el extracto producido por la cepa 2.2 aB puede ser clasificado como un extracto alcalino (actividad óptima a pH 9).

Comparando con los extractos producidos por cepas cultivadas en diferentes sustratos (Tabla 6.4), se puede observar que la mayoría de los extractos presentan su catálisis óptima en condiciones alcalinas, seguida por extractos neutros y los extractos con actividad óptima a pH ácido son reducidos.

**Tabla 6.4** Extractos proteolíticos producidos por diferentes microorganismos

Microorganismo	pH de actividad	Temperatura de actividad (°C)	Estabilidad térmica	Referencia
<i>Scytalidium thermophilum</i> *	6.5 a 8	37 a 45	45 °C por 8 h	Ifrig y Ogel 2002
<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Fresenius</i> *	9	45	Conserva 90 % de actividad a 70°C por 1.5 h	Santos y col., 1996
<i>Aspergillus oryzae</i> **	8	50	$t_{1/2(50^{\circ}\text{C})} = 0.41$ h	García-Gómez y col., 2009
<i>Penicillium</i> sp.**	6.5	45	-	Germano y col., 2003
<i>Thermomyces lanuginosus</i> *	5.0 y 9	70	$t_{1/2(60^{\circ}\text{C})} = 2.6$ h $t_{1/2(70^{\circ}\text{C})} = 1$ h	Li y col., 1997
<i>Streptomyces</i> sp.*	-	-	$t_{1/2(55^{\circ}\text{C})} = 0.45$ h	Azeredo y col., 2004
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21415*	-	-	Conserva el 52 % de actividad a 50°C por 1 h	Mabrouk y col., 1999
<i>Bacillus licheniformis</i> NH1*	10 a 11	65-70	Conserva el 62 % de actividad a 60°C por 1 h	Hadj-Ali y col., 2006
<i>Bacillus subtilis</i> **	8 a 9	37-45	Conserva el 67 % de actividad a 60°C por 0.25 h	Mukherjee y col., 2008
<i>Bacillus cereus</i> *	7	60	-	Esakkiraj y col., 2007
2.2 aB**	9	50	$t_{1/2(50^{\circ}\text{C})} = 0.74$ h; $t_{1/2(60^{\circ}\text{C})} = 0.5$ h	Este trabajo
36 aIV**	7	50	$t_{1/2(50^{\circ}\text{C})} = 0.8$ h; $t_{1/2(60^{\circ}\text{C})} = 0.33$ h	Este trabajo

\*Producidas por CML, \*\* producidas por CMS

Con respecto a la temperatura óptima de actividad obtenida (50°C), es importante señalar que ambos extractos (cepa 2.2 aB y 36 aIV) presentaron temperatura óptima similar a la obtenida por el extracto proteolítico reportado por García-Gómez (2009) el cual fue producido utilizando harina de pescado como sustrato. Por otro lado el segundo pico de máxima actividad presentado a 70°C por el extracto de la cepa 36 aIV muestra la que existe la posibilidad de la presencia de una proteasa termo-activa.

En la Tabla 6.3 se puede observar que los extractos proteolíticos caracterizados en este trabajo exhiben temperatura óptima de actividad mayor a la reportada para extractos producidos por cepas fúngicas, los cuales típicamente presentan mayor actividad a temperaturas menores de 50°C, con excepción del hongo termófilo *Thermomyces lanuginosus* (Li y col., 1997). Para caracterizar apropiadamente las enzimas es necesario tenerlas puras debido a que las proteínas presentes en el extracto (proteínas contaminantes o diferentes tipos de enzimas) pueden interferir en los ensayos; motivo por el cual en este trabajo la caracterización de las enzimas se realizó utilizando las enzimas purificadas.

### **6.3.2 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de extractos proteolíticos**

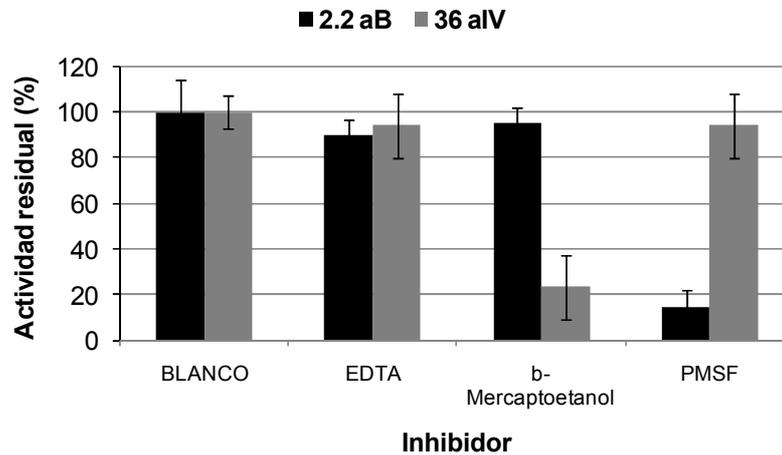
Una vez identificadas las condiciones óptimas de catálisis (pH y temperatura) de los extractos, se evaluó la estabilidad térmica a diferentes temperaturas (30-80°C). El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de los extractos proteolíticos se determinó mediante una cinética de primer orden. El extracto producido por la cepa 2.2 aB

presentó  $t_{1/2}$  de 2.96, 1.07, 0.74, 0.5, 0.33 y 0.16 horas a 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C respectivamente. Por otro lado, el extracto producido por la cepa 36 aIV exhibió  $t_{1/2}$  de 1.78, 1.0, 0.8, 0.33, 0.28 y 0.20 horas a las mismas condiciones de temperatura. Los extractos obtenidos en este estudio presentan mayor  $t_{1/2}$  a 50°C que los obtenidos por García-Gómez y col. (2009) (Tabla 6.4). Por otro lado Wang y col. (2005), caracterizaron una proteasa producida por *A. fumigatus* en harina de pescado, dicha enzima conservó el 47% de actividad a 60°C después de 30 min, siendo similar a la estabilidad presentada por el extracto producido la cepa 2.2 aB (50% de actividad a 60°C por 30 min) y superior al producido por la cepa 36 aIV (50% de actividad por 20 min a la misma temperatura). Sin embargo, es importante aclarar que en el trabajo citado la caracterización se realizó con la enzima pura. Algunos autores (Tabla 6.4) han reportado la caracterización de extractos proteolíticos producidas por cepas fúngicas utilizando diferentes sustratos como soporte/sustrato. Se puede observar que los extractos producidos en éste trabajo, presentan una mayor estabilidad térmica que los producidos por *A. oryzae*, *Streptomyces* sp. y menor estabilidad que los producidos por las cepas termofilas *Scytalidium thermophilum*, *Thermomyces lanuginosus* y *Aspergillus fumigatus* Fresenius (García-Gómez y col., 2008; Azeredo y col., 2004; Ifrig y Ogel 2002; Li y col., 1997; Santos y col., 1996).

### 6.3.3 Efecto de inhibidores sobre la actividad de extractos proteolíticos

Se evaluaron tres inhibidores de proteasas EDTA,  $\beta$ -mercaptoetanol y PMSF. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad del extracto producido por la cepa

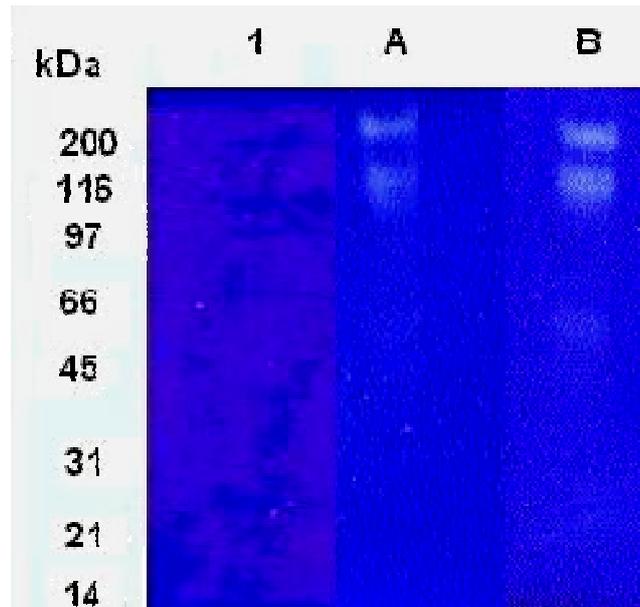
36 aIV puede deberse a la presencia de una cisteín proteasa mientras que para el extracto producido por la cepa 2.2 aB puede deberse a una serín proteasa (Fig. 6.5).



**Figura. 6.5.** Efecto de inhibidores en la actividad proteolítica de los extractos producidos por las cepas 2.2 aB y 36 aIV.

#### 6.3.4 Actividad proteolítica *in situ*

Por último se confirmó actividad proteolítica *in situ* de los extractos enzimáticos por la técnica de zimografía. Los resultados obtenidos revelan que la actividad enzimática de los extractos producidos por las cepas 2.2 aB y 36 aIV es debida a la presencia de al menos tres proteasas con diferente masa molecular (88, 140 y 200 kDa aproximadamente), tal y como puede ser apreciado en la Fig. 6.6.



**Figura 6.6.** Zimograma de actividad proteolítica de los extractos producidos en cultivo en medio sólido por las cepas A) 2.2 aB y B) 36 aIV.1) marcador de peso molecular.

### 6.1 Identificación y caracterización de cepas

Debido a que en la selección de cepas productoras de proteasas, los extractos proteolíticos los producidos por las cepas 2.2 aB y 36 aIV no presentaron diferencias significativas en cuanto a la estabilidad térmica (objetivo principal de este trabajo), se decidió continuar trabajando con ambas, considerando su caracterización e identificación molecular. La comparación de las secuencias del DNAr 18s (anexo E) que resultaron de la amplificación (PCR) mostraron que las cepas 36 aIV y 2.2 aB presentan identidad con *Aspergillus fumigatus* (90%) y *Yarrowia lipolytica* (99%) respectivamente.

Es de gran relevancia mencionar que este es el primer trabajo donde se reporta la producción de proteasas en CMS con *Yarrowia lipolytica* a 45°C. Ya que los reportes indican que esta levadura tiene su metabolismo óptimo a 37°C.

Por otro lado, en la Figura 6.2 se puede observar que el extracto proteolítico producido por *A. fumigatus* (36 aIV) conserva 118 U/mL a las 72 horas de cultivo, mientras que el producido por *Y. lipolytica* (2.2 aB) conserva únicamente 10 U/mL; además los resultados de termoestabilidad a 80°C muestran que el  $t_{1/2}$  del extracto producido por *A. fumigatus* es mayor que el producido por *Y. lipolytica*. De la misma manera en la Fig. 6.4 se puede observar que el extracto producido por *A. fumigatus* presenta dos puntos máximos de actividad el primero a 50°C y el segundo a 70°C sugiriendo en los tres casos mayor termoestabilidad intrínseca; razón por la cual se seleccionó esta cepa para continuar con el trabajo.

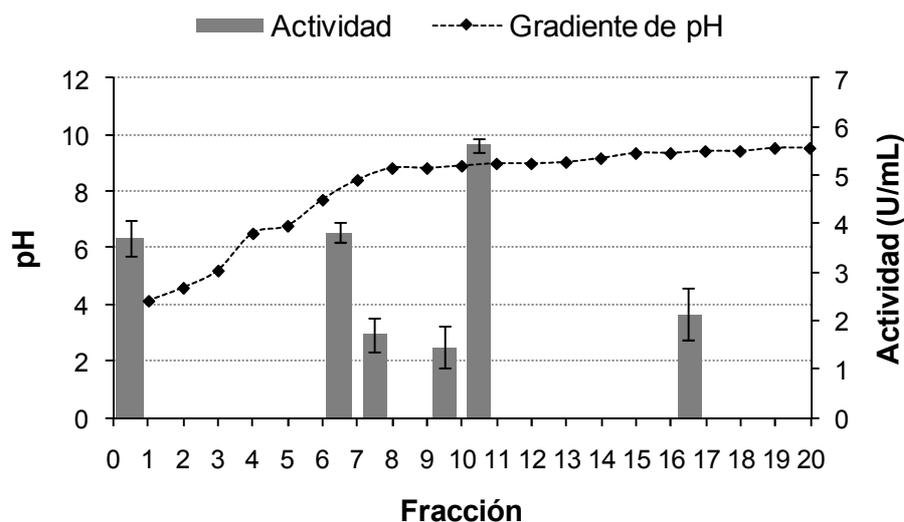
## 6.2 Purificación de proteasas termoestables

Una vez confirmada la presencia de proteasas termoestables en los extractos enzimáticos se decidió purificar al menos una de éstas para su posterior caracterización.

### 6.2.1 Isoelectroenfoque

El extracto enzimático fue sometido a isoelectroenfoque con el objetivo conocer el rango de punto isoeléctrico (PI) de las diferentes proteasas contenidas en el

extracto enzimático y determinar las condiciones iniciales del protocolo de purificación. En la Figura 6.7 se observa que la mayor actividad proteolítica se presentó en las fracciones que exhibieron un valor de PI entre 4.1 y 8.9, estos resultados son similares a los reportado por Kunert y Kopecek (2000) quienes encontraron que un extracto proteolítico producido por *Aspergillus fumigatus* separado por isoelectroenfoque contenía al menos 6 serín proteasas con PI entre 5.2 a 8.1. Los resultados obtenidos permitieron establecer las condiciones de pH para iniciar la separación por cromatografía de intercambio aniónico y catiónico.

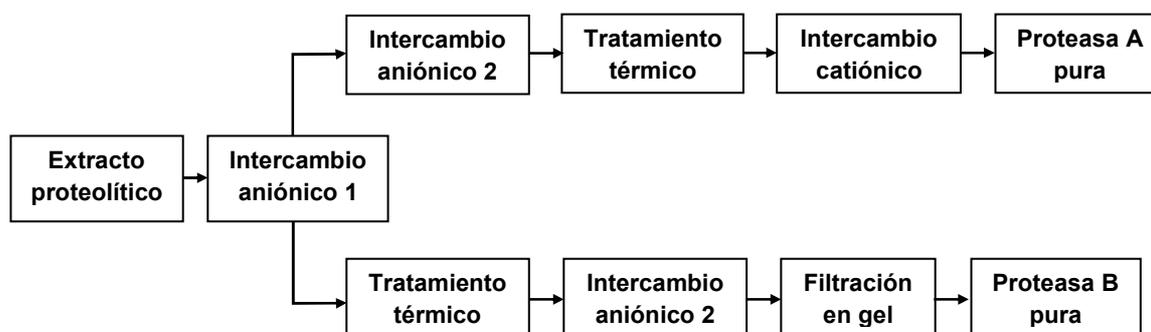


**Figura 6.7** Separación isoelectroforética de proteasas del extracto proteolítico producido por *A. fumigatus*.

### 6.2.2 Separación de proteasas

Del EP producido por *A. fumigatus* fueron purificadas dos proteasas las cuales fueron designadas A y B, los parámetros obtenidos de la purificación se resumen

en las Tablas 6.5 y 6.6. La purificación de las enzimas se realizó mediante el siguiente protocolo de purificación:



Las proteasas A y B fueron purificadas a homogeneidad con un porcentaje de recuperación de 6.6 y 3.9% con un factor de purificación de 8.8 y 7.1 respectivamente. Es de gran importancia indicar que antes de la purificación, el extracto proteolítico se sometió a tratamiento térmico a 60°C por 30 min, para garantizar la presencia de al menos una proteasa termoestable; ya que cuando se midió termoestabilidad al extracto producido por *A. fumigatus* se conservó al menos el 50% de actividad después de 20 min de tratamiento a esta temperatura (sección 6.3.3). El tratamiento térmico previo a etapas cromatográficas ha sido probado como una estrategia de purificación de enzimas termoestables (Bougadef y col., 2007).

La pureza de las proteasas fue verificada por electroforesis (SDS-PAGE) (Fig. 6.8 y 6.9). El peso molecular de las proteasas A y B puras fue estimado de 88 y 45 kDa respectivamente (Anexo D). Como se puede apreciar en la Tabla 6.7 el peso molecular reportado previamente para proteasas producidas por *Aspergillus* oscila

entre 32 y 124 kDa. Así mismo, para otras especies fúngicas fluctúan entre 25 a 42 kDa. La proteasa A (88 kDa) purificada en este trabajo presenta diferencias considerables de PM con respecto a la mayoría de proteasas reportadas para *A. fumigatus* (30-45 kDa). Sin embargo, presenta un PM similar a las dipeptidil peptidasas (DPP) IV y V reportadas por Beuvais y col. (1997) (Tabla 6.7).

**Tabla 6.5** Parámetros obtenidos de la purificación de la proteasa A producida por *A. fumigatus* en cultivo en medio sólido

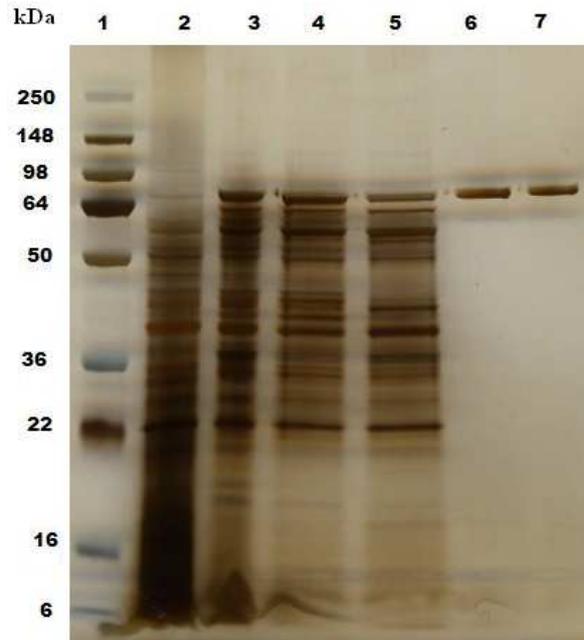
Paso de purificación	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor de purificación
Extracto proteolítico	1697	23.9	70.7	100	1
Intercambio aniónico (1)	1036	13.5	76	61	1.1
Intercambio aniónico (2)	627	4	156	37	2.2
Tratamiento térmico (60°C 30 min)	248	1.7	162	15	2.3
Intercambio catiónico	112	0.18	622	6.6	8.8

Nota: los cromatogramas obtenidos en cada etapa de purificación pueden ser observados en el anexo C fig C<sup>1</sup> a C<sup>3</sup>.

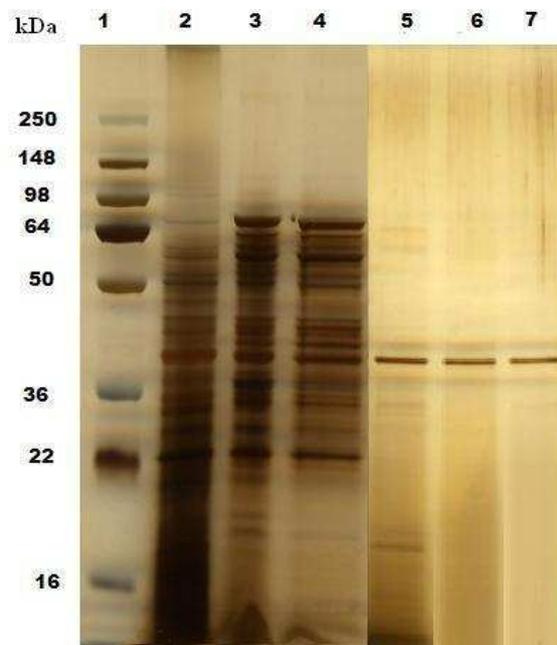
**Tabla 6.6** Parámetros obtenidos de la purificación de la proteasa B producida por *A. fumigatus* en cultivo en medio sólido

Paso De Purificación	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor De Purificación
Extracto proteolítico	1503	21.7	69	100	1
Intercambio aniónico (1)	995	6.1	164	66	2.4
Tratamiento térmico (60°C 30 min)	435	1.7	256	29	3.7
Intercambio aniónico (2)	64	0.21	300	4.3	4.3
Filtración en gel	59	0.12	489	3.9	7.1

Nota: los cromatogramas obtenidos en cada etapa de purificación pueden ser observados en el anexo C fig C<sup>4</sup> a C<sup>6</sup>.



**Figura 6.8** Perfil electroforético (SDS-PAGE) de las etapas de purificación de la proteasa A. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: extracto proteolítico; carril 3: intercambio aniónico 1; carril 4: intercambio aniónico 2; carril 5: tratamiento térmico; carril 6: intercambio catiónico; carril 7: proteasa pura en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol.



**Figura 6.9** Perfil electroforético (SDS-PAGE) de las etapas de purificación de la proteasa B. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: extracto proteolítico; carril 3: intercambio aniónico 1; carril 4: tratamiento térmico; carril 5: intercambio aniónico 2; carril 6: Filtración en gel; carril 7: proteasa pura en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol.

En contraste, la proteasa B presentó un PM de 45 kDa similar a la mayoría de las proteasas reportadas para *A. fumigatus* y otras especies fúngicas (Tabla 6.7). Así mismo es importante señalar que de las enzimas reportadas, sólo la proteasa producida por *A. fumigatus* (124 kDa) reportada por Wang y col. (2005) presentó termoestabilidad, caso similar al de las proteasas aquí estudiadas.

Para determinar el estado de oligomerización de las dos proteasas puras, se realizó en paralelo un estudio electroforético en el que se comparó la separación proteica en condiciones nativas y desnaturalizantes. Los resultados obtenidos (Fig. 6.8 y 6.9) muestran bandas únicas para ambas proteasas, lo que indica que ambas enzimas son monoméricas. Kumar y col. (2000<sup>a</sup>), sugirieron que la oligomerización es un factor que puede incrementar la estabilidad de las proteínas. Sin embargo, en este trabajo se descartó que el grado de oligomerización fuera contribuyente a la termoestabilidad de la estructura de las proteasas: ambas enzimas son monoméricas y presentan termoestabilidad comparable con trabajos previamente reportados (Yano y Poulos, 2003; Markaryan y col., 1994).

**Tabla 6.7** Características de proteasas producidas por cepas fúngicas

Cepa	Tipo de proteasa	pH óptimo de actividad	Temperatura óptima de actividad (°C)	Estabilidad a temperatura	Estabilidad a pH	Peso molecular (kDa), PI	Autor
<i>Penicillium sp.</i>	Serín proteasa	6.5	45	-	6.0-9	-	Germano y col., 2003
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	-	5.0 y 9	70	$t_{1/2(60^{\circ}\text{C})}$ = 2.6 h $t_{1/2(70^{\circ}\text{C})}$ = 1 h	4.0-11	-	Li y col., 1997
<i>Nocardopsis sp.</i>	Serín proteasa	-	50	-	8-10.5	-	Moreira y col., 2003
<i>Streptomyces tendae</i>	Serín proteasa	6	70	-	-	21	Seong y col., 2004
<i>Monascus purpureus</i> CCRC31499	-	7 a 9	40	40 °C	5 a 9	40, PI 7.9	Liang y col., 2006
<i>Penicillium duponti</i> K1014	Ácida	-	-	50 Y 60 °C por 1 h	-	-	Hashimoto y col., 1972
<i>Beauveria felina</i>	-	-	-	-	-	-	Agrawal y col., 2005
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Serín proteasa	6.5 a 8	37 a 45	45 °C por 8 h	-	-	Ifrig y Ogel 2002
<i>Beauveria bassiana</i>	Serín proteasa	9.5 y 7.5	-	-	-	31.5	Urtz y Rice 2000
<i>A. oryzae</i>	-	8	50	0.41 h a 50 °C	-	-	García-Gómez y col., 2009
<i>A. clavatus</i> ES1	Serín proteasa	8.5	50	50 y 10 % de actividad residual a 50 y 60 °C por 0.5 h	7 a 9	32	Hajji y col., 2007

Continúa...

**Tabla 6.7** Características de proteasas producidas por cepas fúngicas (continuación).

Cepa	Tipo de proteasa	pH óptimo de actividad	Temperatura óptima de actividad (°C)	Estabilidad a temperatura	Estabilidad a pH	Peso molecular (kDa), PI	Autor
<i>A. clavatus</i>	Serín proteasa	9.5	40	-	-	35	Tremacoldi y col., 2007
<i>A. tamarii</i>	-	-	45	$t_{1/2(50^{\circ}\text{C})} = 1.5 \text{ h}$ $t_{1/2(55^{\circ}\text{C})} = 0.2 \text{ h}$	6-9.5	48 kDa	Boer y Peralta 2000
<i>A. tamarii</i>	Serín proteasa	8.5	45	-	7.5-11	45	Anandan y col., 2007
<i>A. sp. FC-10</i>	Metálica	7 a 9	65	-	5 a 9	28 kDa	Su y Lee 2001
<i>A. terreus</i> (IJIRA 6.2)	Serín proteasa	8.5	37	-	5.5-9.5	37 kDa	Chakrabarti y col., 2000
<i>A. nidulans</i> HA-10	Serín proteasa	8	35	estable de 20 a 50 °C por 1 h	6.0-10	42 kDa	Charles y col., 2008
<i>A. nidulans</i>	Carboxil esterasa	8.5	40	50% de actividad residual por 0.25 h a 80 °C	6 a 8	37 kDa, PI 4.5	Peña-Montes y col., 2008
<i>A. fumigatus</i>	Serín proteasa	8	40	47 % a 60 °C por 0.5 h a 70 °C se inactiva por completo	6 a 10	124, 8.3	Wang y col., 2005
<i>A. fumigatus</i>	Serín proteasa	-	-	-	-	32-33	Davies y col., 2005
<i>A. fumigatus</i>	Metálica	7.5 a 8	60	50 % de actividad residual a 60 °C por 1 h	-	43	Markaryan y col., 1994
<i>A. fumigatus</i>	Metálica	-	-	a 50 °C pierde 100 % de actividad en 0.16 h	-	40, 5.5	Monod y col., 1993

Continúa...

**Tabla 6.7** Características de proteasas producidas por cepas fúngicas (continuación).

Cepa	Tipo de proteasa	pH óptimo de actividad	Temperatura óptima de actividad (°C)	Estabilidad a temperatura	Estabilidad a pH	Peso molecular (kDa), PI	Autor
<i>A. fumigatus</i>	Aspartil	-	-	-	-	48, 4.2	Reichard y col., 1994
<i>A. fumigatus</i> <i>Fresenius</i>	-	9	45	90 % de actividad residual a 70 °C por 1.5 h	-	-	Santos y col., 1996
<i>A. fumigatus</i>	Serín proteasa	9	37-42	-	-	33, 8.75	Larcher y col., 1992
<i>A. fumigatus</i>	Keratinasa	-	-	-	-	31	Noronha y col., 2002
<i>A. fumigatus</i>	DPP V	7	-	-	-	88	Beuvais y col., 1997 <sup>a</sup>
<i>A. fumigatus</i>	DPP IV	7	-	-	-	95	Beuvais y col., 1997 <sup>b</sup>
<i>A. fumigatus</i>	Serín proteasa	7.4 y 8.8	45	-	-	32	Frosco y col., 1992
<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	32 ,5.2 a 8.6	Kunert y Kopecek 2000
<i>A. fumigatus</i>	Serín proteasa A	7	60	t <sub>1/2</sub> (50°C)=1.08 h t <sub>1/2</sub> (60°C)=0.56 h t <sub>1/2</sub> (70°C)=0.23 h	7 a 9	88	Este trabajo
<i>A. fumigatus</i>	Serín proteasa B	10	63	t <sub>1/2</sub> (50°C)=1.21 h t <sub>1/2</sub> (60°C)=0.4 h t <sub>1/2</sub> (70°C)=0.18 h	5 a 12	45	Este trabajo

(-) datos no mencionados por los autores

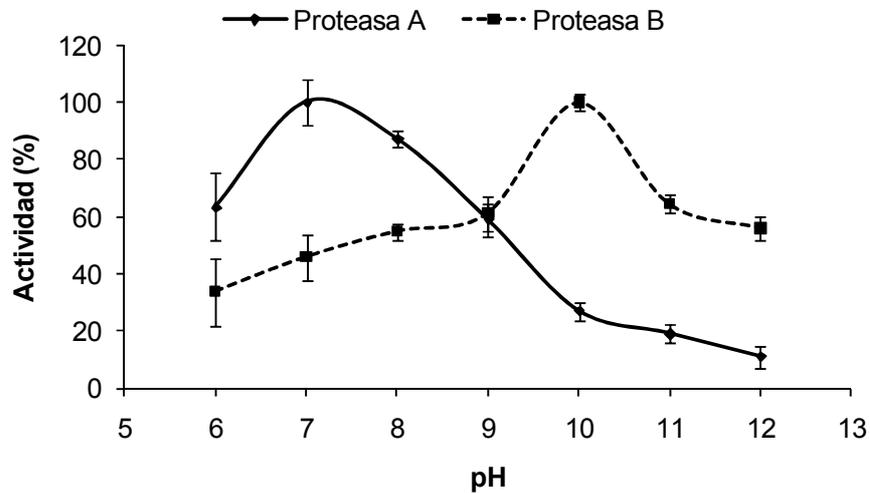
### 6.3 Caracterización de proteasas

En este apartado se describen las características fisicoquímicas de las proteasas puras, con el objetivo de determinar las características moleculares más trascendentales para modificar la actividad y la estabilidad térmica en las dos proteasas producidas por *A. fumigatus* en CMS.

#### 6.3.1 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad

La actividad y estabilidad de las proteasas A y B fue medida en función del pH utilizando caseína como sustrato. La proteasa A (Fig. 6.10) es activa en un rango de pH de 6 a 9 (actividad residual  $\geq 50\%$ ). La máxima actividad fue observada a pH 7 (13 U/mL), resultados similares fueron reportados por Beuvais y col. (1997<sup>a</sup>) para las DPP IV y V (Tabla 6.7). Sin embargo, los autores no reportan las unidades de actividad obtenidas. No obstante, el PM reportado (88 y 95 kDa) sugiere que la proteasa A de este trabajo (88 kDa) podría tener homología con la DPP IV y V producidas por *A. fumigatus*. El pH óptimo de actividad de la proteasa A difiere con el pH óptimo de actividad exhibido por la mayoría de proteasas que han sido reportadas para el género *Aspergillus* y otras cepas fúngicas (Tabla 6.7). Sin embargo, el resultado es consistente debido a que el pH de actividad de las proteasas es característico de tipo de las serín, aspartil, cisteín y metaloproteasas. Es importante enfatizar que al no tener información de la naturaleza de la triada catalítica (serín, aspartil, cisteín o metaloproteasa) el resultado obtenido proporciona únicamente la información para clasificar a las

enzimas en función del pH de actividad, lo que permite clasificar a la proteasa A como neutrasa.



**Figura 6.10** Perfil de actividad de las proteasas A y B en función del pH.

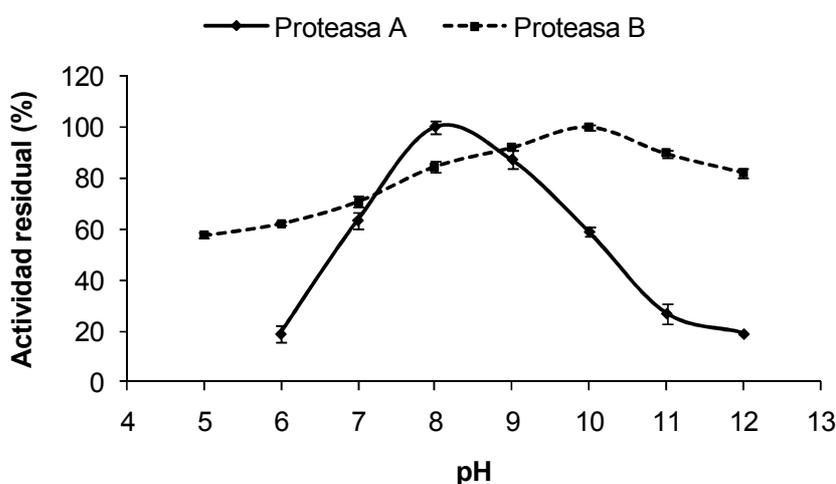
Con lo que respecta a la proteasa B, ésta presentó actividad en un rango de pH de 8 a 12 (actividad residual  $\geq 50\%$ ), observándose máxima actividad a pH 10 (21 U/mL). El pH óptimo de actividad mostrado por la proteasa B es similar a la mayoría de proteasas reportadas para el género *Aspergillus* y otras especies fúngicas; sin embargo el resultado es útil únicamente para clasificarla como una proteasa alcalina.

El valor de pH óptimo de actividad para las proteasa A es igual al presentado por el extracto de procedencia (pH 7). Mientras que el pH óptimo de actividad para la proteasa B (pH 10) difiere del obtenido para el extracto. Es importante considerar que el pH óptimo de actividad del extracto corresponde a la suma de la actividad de todas las proteasas presentes en el cultivo (sección 6.3.1). Los resultados de

pH de actividad obtenidos para las proteasas A y B producidas por *A. fumigatus* muestran que el pH óptimo de actividad (pH 7), reportado para el extracto proteolítico del cual fueron purificadas las enzimas, puede ser resultado de la suma de la actividad de las diferentes proteasas presentes en el cultivo y puede deberse mayoritariamente a la proteasa A (pH óptimo de 7). Los resultados muestran que el pH de actividad del extracto enzimático no manifiesta la actividad de todas las proteasas presentes, debido a que cuando se trabaja con extractos crudos pueden existir interacciones proteína-proteína. También puede presentarse hidrólisis entre proteasas, impidiendo la expresión de la actividad de las diferentes enzimas mediante la alteración de las propiedades cinéticas de las enzimas, reflejándose en interacciones inadecuadas con los sustratos e incluso otros factores pueden interferir en la determinación de actividad (Phizicky y Fields, 1995).

La estabilidad a pH de las proteasas A y B puras se observa en la Fig. 6.11. La proteasa A presentó estabilidad (actividad residual  $\geq 50\%$ ) en un rango de pH de 7 a 9, mientras que la proteasa B mostró estabilidad (actividad residual  $\geq 50\%$ ) en un rango de pH de 5 a 12. Los resultados indican que la proteasa B es estable a mayor rango de pH que la proteasa A; a pesar que ambas enzimas fueron producidas en el mismo cultivo, dicho resultado puede deberse a diferencias estructurales entre moléculas. Una diferencia estructural observada hasta este momento entre las proteasas estudiadas es el PM. Dicha variación puede deberse a modificaciones post-transcripcionales que estabilizan/desestabilizan a las proteínas (Kumar y col., 2000). El perfil de estabilidad presentado por la proteasa A es similar al presentado por la proteasa producida por *Aspergillus clavatus* ES1

(pH 7-9) el cual es considerablemente restringido (Hajji y col., 2007) En contraste el perfil presentado por la proteasa B (5 a 12) es similar al de la mayoría de las proteasas producidas por el género *Aspergillus* (Tabla 6.7). No obstante, el resultado mostrado por la proteasa A muestra un rango de pH de estabilidad de 7 a 9 que no tiene ninguna otra enzima producida por el género *Aspergillus* (Tabla 6.7).



**Figura 6.11.** Perfil de estabilidad de las proteasas A y B en función del pH.

Los resultados obtenidos en esta sección permiten establecer las condiciones de ensayo de estabilidad térmica, debido a que la estabilidad estructural de las enzimas es función del pH. Yang y Honing (1993) utilizando lisozima como modelo de estudio, evidenciaron que el estado de transición de una proteína (de estado nativo a desnaturalizado) es dependiente del pH del medio en el cual se encuentre suspendidas. Considerando que la energía libre del sistema (carga neta) se expresa como una función del pH y en consecuencia, a la existencia de

grupos ionizables en las proteínas, prevalecen interacciones intermoleculares de estabilización o en su caso de desestabilización. Se puede aseverar que las proteasas A y B presentan una carga neta que favorece la estabilización de la estructura mediante la generación de interacciones intermoleculares a valores de pH de 7 a 9 y de 5 a 12, respectivamente. Por lo anterior, podemos decir que la estabilidad de las enzimas es función del pH.

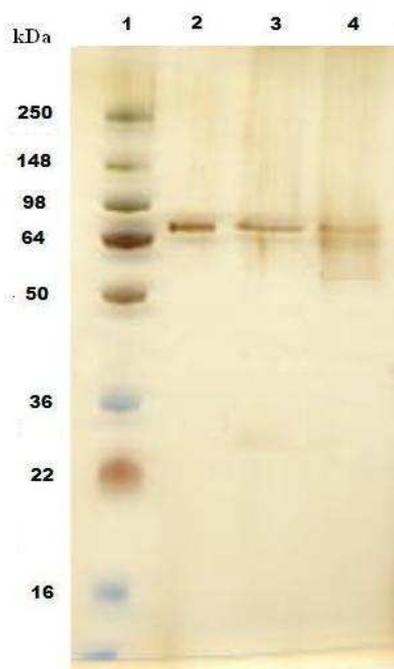
### 6.3.2 Digestión con endoglicosidasas

La glicosilación de las proteasas A y B fue analizada por electroforesis en geles de acrilamida. En la Fig. 6.12 se puede observar el perfil de la proteasa A digerida con endo H y NPGasa (determinación de N-glicosilación). La proteasa digerida con glicosidasas presentó la misma movilidad que la enzima sin digerir indicando que no existe alguna N-glicosilación en la estructura de la proteasa. Sin embargo, no se puede garantizar que no ésta glicosilada debido a que no fue analizada la O-glicosilación; otro tipo de glicosilación que puede tener influencia sobre la estabilidad de la estructura de la enzima ([Gerken y col., 1997](#)).

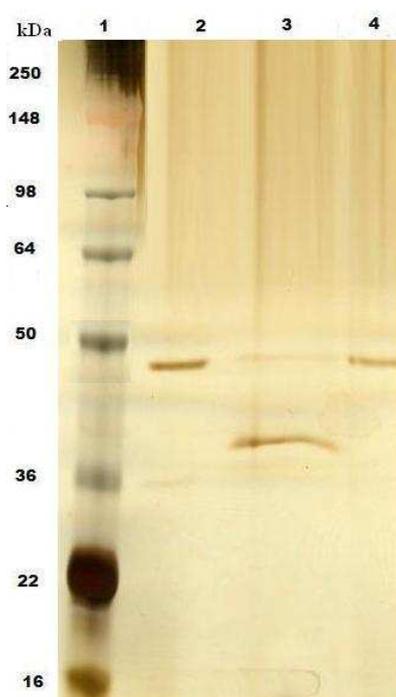
En contraste para la proteasa B (Fig. 6.13), se observó que el PM de la proteasa disminuyó de 45 a 32 kDa como resultado de la digestión con endo H, sugiriendo que la proteasa B esta N-glicosilada. El peso molecular aproximado de la proteasa B desglicosilada (Anexo B) fue de 32 kDa, lo cual indica que los oligosacaridos presentes en la proteasa representan al menos 29% del peso total de la proteasa. No existen estudios estructurales detallados de proteasas fúngicas en donde se determine si existe algún tipo de glicosilación. No obstante en 1992,

Peek y col. reportaron que la proteasa producida por *Thermus* sp Rt41A es una glicoproteína que contiene 0.7% de carbohidratos en la molécula; representando un porcentaje muy pequeño en comparación con el resultado obtenido en este trabajo. Además Gou y col. (2008) reportaron una fitasa glicosilada producida por *A. fumigatus*, revelando que dicha enzima tiene 10 sitios probables de N-glicosilación. El PM de la fitasa nativa fue de 83 kDa reduciéndose hasta 63 kDa después de ser digerida con PNGasa, los carbohidratos representaron el 24.1% del peso y fueron un factor de estabilización; lo cual coincide con los resultados encontrados para la proteasa B (29%). Es importante mencionar que sería importante comprobar la existencia o ausencia de O-glicosilación en ambas proteasas.

Algunos autores han referido que la glicosilación puede tener efecto sobre la solubilidad, proteólisis y estabilidad conformacional (Takekawa y col., 2006; Yadav y col., 2006; Wu y col., 2007). Por lo cual, se puede considerar que los carbohidratos presentes en la proteasa B pueden tener efecto sobre la estabilidad térmica, así como también pueden tener influencia sobre la estabilidad presentada en el rango de pH observado; sin embargo, este supuesto no fue comprobado (sección 6.6.1). Es importante resaltar que la proteasa B presentó características de estabilidad térmica importantes que serán discutidas en la sección 6.6.4.



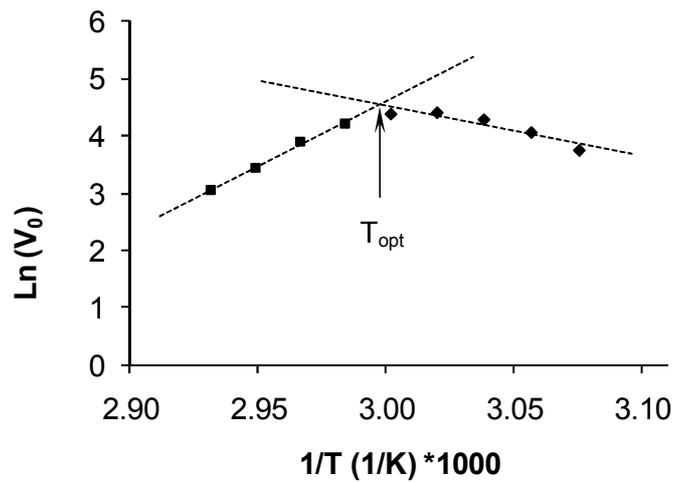
**Figura 6.12** Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la proteasa A digerida con glicosidasas. Carril 1: marcador de PM; carril 2: proteasa A; carril 3: proteasa A digerida con endo H; carril 4: proteasa A digerida con NPGasa.



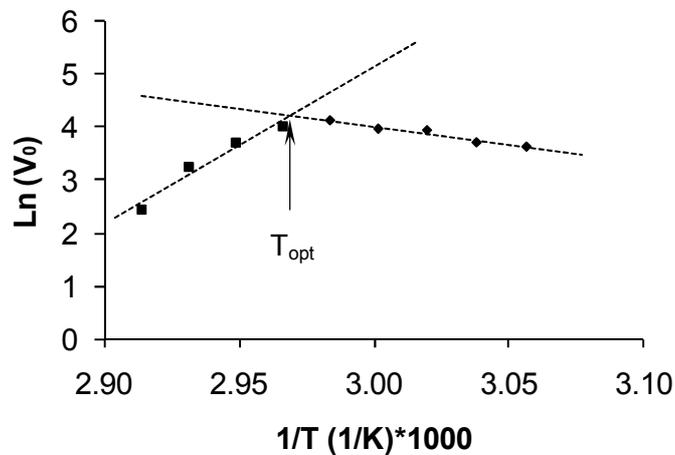
**Figura 6.13** Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la proteasa B digerida con glicosidasas. Carril 1: marcador de PM; carril 2: proteasa B; carril 3: proteasa B digerida con endo H; carril 4: proteasa B digerida con NPGasa.

### 6.3.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad

En la Fig. 6.14 se puede observar el perfil de actividad proteolítica en función de la temperatura presentado por la proteasa A (gráfico de Arrhenius). Los resultados muestran que la proteasa A es activa en el rango de temperaturas de 50 a 64°C ( $\geq 50\%$ ), con una temperatura óptima a 60°C (Fig. 6.14). Con respecto a la proteasa B (Fig. 6.12), se observó en el gráfico de Arrhenius que la temperatura óptima fue 63°C, además se observó actividad en el rango de temperatura de 50 a 66°C ( $\geq 50\%$ ). La temperatura óptima presentada por las proteasas A y B estudiadas en este trabajo son de 17 a 42% mayores a las mostradas por la mayoría de las proteasas producidas por especies fúngicas, incluyendo al género *Aspergillus*; que típicamente muestran actividad en un rango de temperatura que va de 35 a 50°C (Tabla 6.7). Resultados similares fueron obtenidos para metalo proteasas producidas por *A. fumigatus*, *Aspergillus* sp. FC-10 y por las serín proteasas producidas por *Thermoactinomyces candidus*, *Thermomyces lanuginosus* y *Streptomyces tendae* que presentaron actividad óptima a 60, 65, y 70°C las tres últimas. Es importante señalar que la metalo proteasa producida en CML a 37°C, reportada por Markaryan y col. (1994) es la única proteasa producida por *A. fumigatus* que ha mostrado catálisis óptima a temperaturas mayores a 50°C, al igual que las proteasas A y B caracterizadas en este trabajo.



**Figura 6.14** Gráfico de Arrhenius para calcular la temperatura óptima y  $E_a$  para la hidrólisis de caseína de la proteasa A. Correlación utilizada  $\text{Ln}(V_0) = -E_a/RT$ , donde  $R$  es la constante de los gases ( $8.314 \text{ kJ mol}^{-1}$ ).



**Figura 6.15** Gráfico de Arrhenius para calcular la temperatura óptima y  $E_a$  para la hidrólisis de caseína de la proteasa B. Correlación utilizada  $\text{Ln}(V_0) = -E_a/RT$ , donde  $R$  es la constante de los gases ( $8.314 \text{ kJ mol}^{-1}$ ).

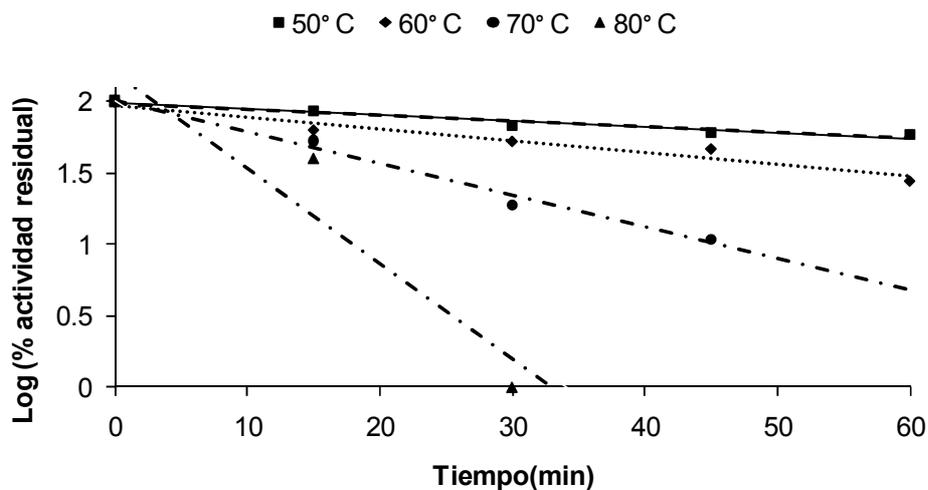
Los perfiles de estabilidad térmica de las proteasas A y B son presentados en las Fig. 6.16 y 6.17; los datos experimentales obtenidos de los ensayos de termoestabilidad fueron utilizados para calcular los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) mediante un análisis de regresión (Azeredo y col., 2004). Los resultados se muestran en la Tabla 6.8. La proteasa A conserva el 58 y 43% de actividad residual a 50 y 60°C, mientras que la proteasa B mantiene el 49 y 17% a las mismas temperaturas, después de una hora de ensayo. La disminución de los  $t_{1/2}$  (Tabla 6.8) indican que a 60 y 70°C la proteasa A presenta mayor estabilidad ( $>t_{1/2}$ ) que la proteasa B. Mientras que a 50°C la proteasa B presenta  $t_{1/2}$  12% mayores, por lo que dicha consideración sugiere que la proteasas A es más termoestable que la B. No obstante, con el análisis realizado no se tiene evidencia suficiente para establecer si alguna de las enzimas presenta mayor termoestabilidad. Por otro lado es importante señalar que los ensayos realizados en este trabajo, pueden no reflejar adecuadamente la estabilidad de las proteasas, medida como la disminución de la actividad residual a altas temperaturas; en una interacción con la temperatura de catálisis presentada por ambas enzimas (60 y 63°C respectivamente) se puede estar reflejando la hidrólisis de las cadenas de proteína de las mismas proteasas, en consecuencia estar impactando directamente el resultado de termoestabilidad presentado en este trabajo (hipótesis no comprobada). Aunque los resultados no muestran diferencia entre las proteasas A y B, al comparar con la literatura es posible puntualizar que la estabilidad presentada por ambas enzimas es superior al presentado por la mayoría de proteasas producidas por géneros de *Aspergillus* (Tabla 6.7). Por ejemplo: la metalo y serín proteasas producidas por *A. fumigatus*

son estables a temperaturas inferiores a 50°C (Monod y col, 1993; Wang y col., 2005). Como se menciona previamente, la única proteasa producida por *A. fumigatus* que hasta el momento ha presentado estabilidad térmica similar a las proteasas A y B es la reportada por Markaryan y col. (1994), quienes reportaron una metalo proteasa que conserva el 50% de actividad a 60°C después de una hora de ensayo.

**Tabla 6.8** Parámetros estimados para las proteasas A y B de la cinética de estabilidad térmica

TEMPERATURA (°C)	PROTEASA A			PROTEASA B		
	$K_d$	$t_{1/2}$ (min)	$R^2$	$K_d$	$t_{1/2}$ (min)	$R^2$
50	0.026	65	0.94	0.023	73	0.93
60	0.050	34	0.95	0.071	24	0.97
70	0.121	14	0.99	0.152	11	0.98

$K_d$ : constante cinética de inactivación de primer orden,  $R^2$ : coeficiente de correlación.



**Figura 6.16** Perfil de termoestabilidad de la proteasa A.

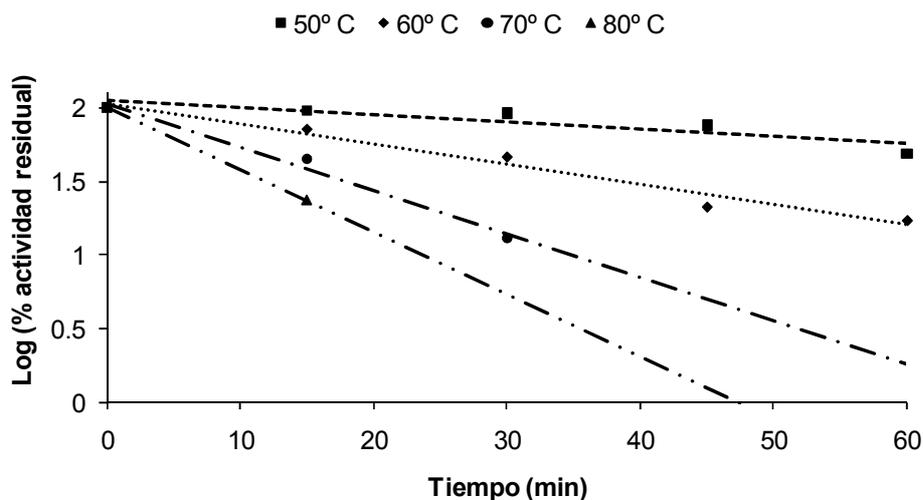


Figura 6.17 Perfil de termoestabilidad de la proteasa B.

#### 6.3.4 Efecto de glicosilación sobre la estabilidad térmica

Como se mencionó en la sección 6.5.2, la proteasa B digerida con Endo H presentó características para ser considerada como una glico-proteasa, por tal motivo se evaluó el efecto de la glicosilación sobre la estabilidad térmica. En la Tabla 6.9, se muestran los resultados de termoestabilidad obtenidos de la proteasa B en estado nativo (glicosilada) y digerida con endo H (deglicosilada). Los estudios de termoestabilidad mostraron que la glicosilación es una característica que puede conferir estabilidad térmica a la proteasa, debido a que los valores de  $t_{1/2}$  disminuyeron a todas las temperaturas probadas en la enzima deglicosilada (Tabla 5.9). Se puede observar que la enzima digerida disminuyó el  $t_{1/2}$  a 50 y 60°C, mientras que a 70 y 80°C se inactivó completamente. Dichos resultados son similares a los reportados para la fitasa producida por *A. fumigatus* en la cual se determinó que después de digerir la enzima con PNGasa la termoestabilidad disminuyó a 40°C, mientras que a 55°C se inactivó a los 10 min

de ensayo. Sin embargo, es importante señalar que la enzima antes mencionada fue expresada en *Pichia pastoris* (Guo y col., 2008).

Es interesante observar que conforme aumenta la temperatura, disminuye la estabilidad de la proteasa B digerida con respecto a la glicosilada. Los tiempos de vida media disminuyeron el 9 y 46% a 50 y 60°C, mientras que 70 y 80°C se perdió la actividad completamente. Los resultados mostrados indican que la glicosilación contribuye a la termoestabilidad, en mayor medida a temperaturas altas (mayores a 60°C), debido a que puede proteger a la enzima de la desnaturalización térmica. Chu y col., (1978), mostraron que en enzimas tratadas con endo H los carbohidratos no tienen influencia conformacional en la cadena principal de las enzimas, pero su presencia es de gran relevancia para promover la estabilidad térmica a través de la resistencia a la proteólisis. Conjuntamente Anbarasan y col. (2009) al estudiar el efecto de la glicosilación sobre la termoestabilidad de 10 xilanasas producidas por *Thermopolyspora flexuosa*, encontraron que los carbohidratos unidos a las cadenas peptídicas, pueden tener influencia positiva o nula sobre la estabilidad térmica, de acuerdo a su localización sobre la cadena. Es decir, si la glicosilación se encuentra en una posición estratégica por ejemplo, sobre las asas permitirá protegerla de la desnaturalización o proteólisis. Dicha información se corrobora con los resultados obtenidos por Longo y col. (1999) que encontraron que después de realizar glicosilaciones quimo-enzimáticas sobre lisozima (80 °C),  $\alpha$ -quimotripsina (50 °C) y una lipasa (50°C) los tiempos de vida media disminuyeron en todos los casos, indicando el efecto negativo de la modificación sobre la estabilidad térmica.

En apariencia, la glicosilación juega un papel de vital importancia en la tolerancia

a la temperatura de la proteasa B. Los resultados de este trabajo son consistentes con lo reportado por Guoy col. (2008), quienes refieren que las glico-proteínas son proteínas monoméricas (la proteasa B es monomérica) que afectan sus propiedades físicas y bioquímicas, respaldando también con esto la disminución de estabilidad presentada a las temperaturas ensayadas por la proteasa B.

**Tabla 6.9** Tiempo de vida media de la proteasa B nativa y deglicosilada

Temperatura (°C)	t <sub>1/2</sub> (min)			
	Nativa	R <sup>2</sup>	Deglicosilada	R <sup>2</sup>
50	72	0.93	66	0.96
60	24	0.97	13	0.94
70	11	0.98	0	0
80	0.8	ND*	0	0

R<sup>2</sup> Coeficiente de correlación, \*dato no determinado

### 6.3.5 Cinética de inactivación térmica

La inactivación enzimática es una de las mayores limitantes en los procesos biotecnológicos. Por esta razón es de suma importancia entender los mecanismos de inactivación o desnaturalización. La inactivación térmica es asociada a la pérdida de enlaces no-covalentes, incluyendo interacciones hidrofóbicas y en consecuencia el aumento de la entalpía de activación (Dogan y Tari 2008; Iqbal y col., 2003). Para poder conocer los mecanismos de inactivación fue necesario realizar ensayos de estabilidad térmica en donde las proteasas A y

B fueran expuestas a tratamientos térmicos. Por otro lado, las características de inactivación térmica de las proteasas se determinaron realizando un análisis termodinámico de la cinética de inactivación térmica de ambas enzimas.

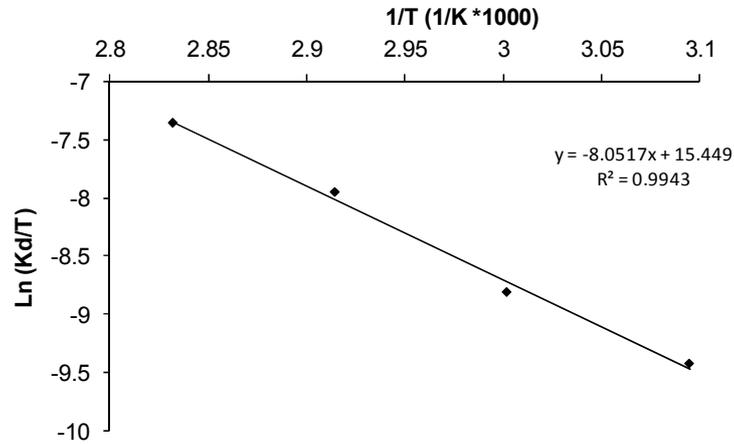
Las proteasas A y B presentaron una  $E_a$  para hidrólisis de caseína de 72 y 56  $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  y una  $E_d$  de 176 y 247  $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  respectivamente. Los valores de la energía de activación de Arrhenius son un poco mayores a la presentada por la serín proteasa producida por *Bacillus clausii* GMBAE 42 (44.3  $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ), la cual presentó una temperatura óptima similar (60°C) a las proteasas A y B sobre el mismo sustrato (Kazan y col., 2005). Adicionalmente se puede observar en la Tabla 6.10 que las  $E_a$  reportadas para otras enzimas son variables y van desde 33 hasta 57  $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ .

Con lo que respecta a las energías de desactivación ( $E_d$ ) de las proteasas A y B son superiores a las presentadas por las enzimas mostradas en la tabla 5.10; no obstante, Peña-Montes y col. (2008) reportaron que los rangos de  $E_d$  para varias enzimas va de 150 a 400  $\text{kJ mol}^{-1}$  rango en el que se encuentra la  $E_d$  de las proteasas A y B. Debido a que la  $E_d$  es un parámetro que está relacionado con la sensibilidad de un proceso a los cambios de temperatura, y depende de los cambios de energía libre  $\Delta G^\circ$ , para un proceso de inactivación con un  $\Delta G^\circ$  muy negativo, la  $E_d$  debe ser alta para poder mantener la estabilidad de la forma activa (Cornish-Bowden 1995). Para las enzimas presentadas en este trabajo debe ser demostrado que el  $\Delta G^\circ$  requerido para el proceso de inactivación de las proteasas A y B es muy negativo, según los valores de  $E_d$  (176 y 247  $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ , respectivamente). Esto permitiría la estabilidad de la forma activa a temperaturas

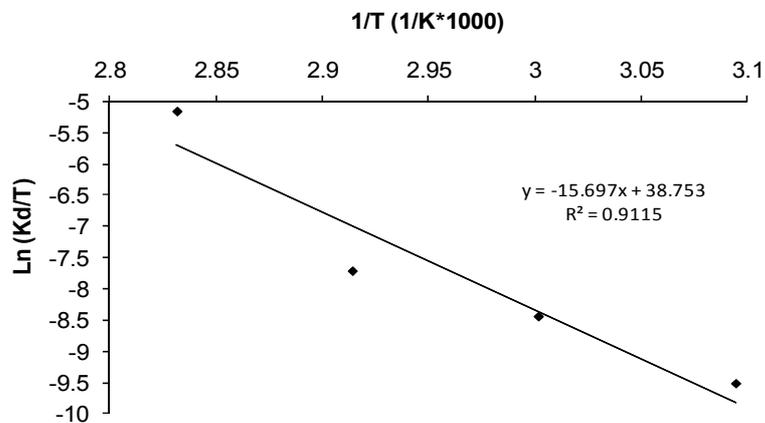
altas (Peña-Montes y col., 2008). Sin embargo, para poder tener conclusiones más precisas a cerca de la estabilidad estructural, fue necesario realizar ensayos complementarios para adquirir información adicional sobre la inactivación térmica de estas enzimas (parámetros termodinámicos) que permitirán entender de manera integral los procesos de estabilización molecular.

Los parámetros termodinámicos fueron calculados utilizando las ecuaciones 2 y 3 descritas en la sección 1.5.1.1. Los parámetros termodinámicos de la inactivación proporcionan información sobre la estabilidad térmica de la enzima en cada paso del proceso de desnaturalización inducido por el calentamiento. Esto ayudaría a encontrar efectos secundarios de los procesos de estabilización o desestabilización, que podrían pasar inadvertidos si sólo se consideraran los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ). Los parámetros termodinámicos  $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$  y  $\Delta S^*$  para la inactivación térmica de las proteasas A y B fueron calculados en un rango de temperatura de 50 a 80°C. Por otro lado, los perfiles que describen el comportamiento de acuerdo la ecuación de Lumry-Eyring (Ecuación 1 sección 1.5.1.1), pueden ser observados en las Figuras 6.18 y 6.19. El análisis proporcionó valores absolutos de 67 kJ mol<sup>-1</sup> y -69 J mol<sup>-1</sup> de entalpía y entropía respectivamente para la proteasa A, mientras que para la proteasa B se obtuvieron valores de 130 kJ mol<sup>-1</sup> y 124 J mol<sup>-1</sup> de entalpía y entropía respectivamente. Estos resultados podrían reflejar la menor estabilidad térmica de la proteasa B con respecto a la A, lo cual concuerda con los datos de la Fig. 5.16 y 5.17. Debido a que la entropía negativa presentada por la proteasa A refleja un mayor orden estructural que el presentado por la proteasa B. Sin embargo, para poder concluir con más argumentos a continuación se discutirán los valores de los

parámetros termodinámicos calculados para cada enzima a cada temperatura ensayada.



**Figura 6.18.** Gráfico de Arrhenius entre el Ln ( $K_d/T$ ) contra  $1/T$  para calcular  $\Delta H^*$  (entalpía de desactivación) y  $\Delta S^*$  (entropía de desactivación) para la proteasa A nativa utilizando la ecuación 3 descrita en materiales y métodos.



**Figura 6.19.** Gráfico de Arrhenius entre el Ln ( $K_d/T$ ) contra  $1/T$  para calcular  $\Delta H^*$  (entalpía de desactivación) y  $\Delta S^*$  (entropía de desactivación) para la proteasa B nativa utilizando la ecuación 3 descrita en materiales y métodos.

Los resultados de  $\Delta H^*$  mostrados en las Tablas 6.11 y 6.12 muestran que la entalpía es prácticamente independiente de la temperatura en ambos casos, es decir no hay cambios en la capacidad calorífica de estas (Souza y col., 2009). De acuerdo a Ortega y col. (2004), los valores de  $\Delta H^*$  pueden correlacionarse con el número de enlaces no-covalentes rotos durante el proceso de desnaturalización de las proteínas. Por lo tanto, valores grandes de  $\Delta H^*$  pueden ser debidos a enlaces no-covalentes presentes en la estructura de la proteína con lo cual podría ser más termoestable; sin embargo, los  $\Delta H^*$  obtenidos para las proteasas A y B son pequeños comparados con otras enzimas (Tabla 6.11), mostrando que en ambas enzimas la contribución de los enlaces no covalentes a la estabilidad es limitada y posiblemente su estabilidad sea debida a enlaces covalentes e incluso otros factores estructurales. La estabilidad de las proteínas es el resultado de un delicado equilibrio entre las fuerzas de estabilización y desestabilización, que pueden estar influenciados por varios factores como por ejemplo puentes de hidrógeno, enlaces disulfuro, grado de plegamiento, hidrofobicidad de la molécula, cantidad de interacciones iónicas y otras interacciones (Souza y col., 2009). Asimismo los valores de entropía calculados para ambas enzimas a diferentes temperaturas (Tablas 6.11 y 6.12) fueron negativos sugiriendo orden estructural o termoestabilidad (Iqbal y col., 2003). En la Tabla 6.10 se puede observar que el valor de entropía para la proteasa A fue negativo, mientras que para la proteasa B fue positivo indicando mayor orden estructural en la proteasa A. Por otro lado los valores de entropía (Tabla 6.10) indican que la proteasa A presenta termoestabilidad similar al presentado por otras enzimas, mientras que la proteasa B presenta menor estabilidad. Los resultados obtenidos respaldan los

datos presentados previamente en la sección 6.6.3, en donde se observó que las proteasas A y B son más estables que otras proteasas fúngicas reportadas (Tabla 6.7). Además, debido a que los resultados termodinámicos de entropía muestran la posible existencia de estructuras moleculares ordenadas, se podría aseverar que parte de la pérdida de actividad residual (termoestabilidad) es debida a la autoproteólisis, dicha aseveración podría ser corroborada conociendo la estructura primaria de ambas proteasas, así como también realizando ensayos de especificidad utilizando sustratos de secuencia conocida, lo cual podría demostrarse mediante electroforesis.

La energía libre está directamente relacionada con la estabilidad térmica de la siguiente manera, la disminución progresiva de los valores de  $\Delta G^*$  muestran desestabilizaciones progresivas. Valores de  $1 \text{ kJ mol}^{-1}$  pueden considerarse como no significativos; en otras palabras se puede sugerir que valores elevados de  $\Delta G^*$  pueden manifestar estabilidades altas (Longo y Combes 1999; Souza y col., 2009). En la Tabla 6.11 se puede observar que los valores de  $\Delta G^*$  para la proteasa A se mantienen prácticamente constantes al aumentar la temperatura de 50 a 80°C; incluso se puede observar un aumento en los valores (no significativo), dichos resultados pueden indicar que la proteasa A tiene una estabilidad termodinámica elevada, reforzando con esto la suposición de que la disminución de  $t_{1/2}$  al aumentar la temperatura de 50 a 80°C, puede deberse en gran medida a la autoproteólisis y no a la existencia de una estructura molecular inestable. En contraste, en la Tabla 6.12 se puede observar que los valores de  $\Delta G^*$  para la proteasa B se mantienen prácticamente constantes al aumentar la temperatura de 50 a 70°C; sin embargo, a 80°C se observa una disminución considerable del

valor de  $\Delta G^*$ , indicando que a esa temperatura la estructura molecular de la proteasa B sufre desestabilizaciones. Con esto, se sustentan los ensayos presentados en la sección 6.5.3, en donde se observó que a 80°C el  $t_{1/2}$  medio fue prácticamente cero. Los valores de  $\Delta G^*$  obtenidos para las proteasas A y B son similares a los obtenidos para una glucoamilasa producida por *A. sojae* y una endoglucanasa producida por *Gymnoascus citrina* las cuales fueron consideradas como termoestables (Iqbal y col., 2003; Jabbar y col., 2008). Sin embargo, la proteasa termoestable producida por *Candida Buinensis* presenta un valor de  $\Delta G^*$  (103 kJ mol<sup>-1</sup> a 50°C) superior al presentado por las proteasas A y B (89.4 y 89.2 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente) indicando una estabilidad térmica superior a la presentada por las proteasas caracterizadas en este trabajo; no obstante, es importante señalar que dicha superioridad puede deberse a que la caracterización de la proteasa antes mencionada fue realizada a un extracto (De Araujo y col., 2010). De esta manera, se puede concluir que la proteasa A es termodinámicamente estable en un rango de temperatura de 50 a 80°C mientras que, la glico-proteasa B lo es de 50 a 70°C. Tomando en cuenta la consideración realizada al inicio de esta sección, en donde los valores de  $E_d$  para ambas enzimas predicen valores de  $\Delta G^*$  negativos, se puede observar que los valores de  $\Delta G^*$  estimados contrastan con la aseveración. No obstante, permiten llegar a la misma conclusión de que ambas enzimas son termodinámicamente estables.

**Tabla 6.10** Parámetros termodinámicos reportados para distintas enzimas

Enzima	Origen	$E_a$ (kJ/mol K)	$E_d$ (kJ/mol K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol K)	$\Delta G$ (kJ/mol K)	Autor
<b><math>\beta</math>-D-Glucosidasa</b>	<i>Aspergillus wentii</i>	33.2	111.3	-	-	-	Srivastava y col., 1984
		43.6	66.7	-	-	-	
<b>Xilanasa</b>	<i>Scopulariopsis</i> sp.	-	-	306 264	-232 490	-	Afzal y col., 2005
<b>Poligalactouronasa</b>	<i>Aspergillus sojae</i>	-	68.41 kcal/mol	-	-	-	Dogan y Tari 2008
<b>Glucoamilasa</b>	<i>Arachniotus</i> sp.	57	89	73	60	98	Iqbal y col., 2003
<b>Endoglucanasa</b>	<i>Gymnoascus citrina</i>	36.2	-	33.5	- 114.4	70.4	Jabbar y col., 2008
<b>Aqualisina I</b>	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	-	-		-	-	Lin y col., 1999
<b>Transglutaminasa</b>	<i>Bacillus circulans</i> BL32	-	-	347.8	744	-	Souza y col., 2009
<b>Proteasa</b>	<i>Candida buinensis</i>	40	-	37.3	-197.5	101	
<b>Proteasa A</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	72	176	67	-69	-	Este trabajo
<b>Proteasa B</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	56	247	130	124	-	Este trabajo

**Tabla 6.11** Parámetros cinéticos y termodinámicos de la inactivación térmica de la proteasa A \*\*

T (°C)	T(K)	$K_d$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol K)
50	323	0.026	65	67.06	89.2	-68.4
60	333	0.050	34	66.98	90.2	-69.5
70	343	0.121	14	66.90	90.5	-68.2
80	353	0.225	8	66.81	91.4	-68.8

\*\* $K_d$  es tasa constante de primer orden para la inactivación térmica, los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) debidos a la inactivación fueron determinados mediante los gráficos del logaritmo del % de actividad residual contra el tiempo de incubación y  $K_d=1.6989t_{1/2}$ ,  $\Delta H^*$  (kJ mol<sup>-1</sup>)= $E_a$  (72.6 kJ mol<sup>-1</sup>)-RT donde  $E_a$  es la energía de activación para la desnaturalización,  $\Delta G$ (kJmol<sup>-1</sup>)= $-RT \ln\{(kd.h)/k_B.T\}$ ,  $\Delta S^*$  es la entropía de la inactivación irreversible y fue calculada de  $\Delta S= (\Delta H^*-\Delta G^*)/T$ .

**Tabla 6.12** Parámetros cinéticos y termodinámicos de la inactivación térmica de la proteasa B<sup>a</sup>

T (°C)	T(K)	$K_d$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol K)
50	323	0.023	72	53.3	89.4	-111.7
60	333	0.071	24	53.3	89.2	-108.0
70	343	0.152	11	53.2	89.8	-106.8
80	353	1.996	1	53.1	85	-90.2

<sup>a</sup> $K_d$  es tasa constante de primer orden para la inactivación térmica, los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) debidos a la inactivación fueron determinados mediante los gráficos del logaritmo del % de actividad residual contra el tiempo de incubación y  $K_d=1.6989t_{1/2}$ ,  $\Delta H^*$  (kJ mol<sup>-1</sup>)= $E_a$ (72.6 kJ mol<sup>-1</sup>)-RT donde  $E_a$  es la energía de activación para la desnaturalización,  $\Delta G$ (kJ mol<sup>-1</sup>)= $-RT \ln\{(kd.h)/k_B.T\}$ ,  $\Delta S^*$  es la entropía de la inactivación irreversible y fue calculada de  $\Delta S= (\Delta H^*-\Delta G^*)/T$ .

Teniendo en cuenta los valores de  $t_{1/2}$  y los parámetros termodinámicos se puede concluir que la proteasa A es molecular y termodinámicamente más estable que glico-proteasa B (Longo y combes, 1999).

### 6.3.6 Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica

Con el objetivo clasificar las proteasas de acuerdo a la naturaleza del sitio activo se realizaron estudios de inhibición con las proteasas puras, los resultados mostraron que las proteasas A y B no fueron inhibidas en presencia de EDTA ni  $\beta$ -mercaptoetanol (Tabla 6.13), presentando una inhibición del 88 y 85% en presencia de PMSF. Estos resultados sugieren que ambas proteasas pueden pertenecer a la familia de las serín proteasas (Rao y col., 1998).

**Tabla 6.13** Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica de proteasas

Inhibición (%)				
Inhibidor	Proteasa A	D E*	Proteasa B	D E*
EDTA	5	0.16	0	0.26
$\beta$ -mercaptoetanol	17	0.12	0	0.58
PMSF	88	0.04	85	0.48

\*D E: desviación estándar.

Por otro lado, es importante señalar que las serín proteasas A y B presentaron un pH óptimo de actividad diferente (7 y 10 respectivamente), teóricamente presentan la misma triada catalítica His-Asp-Ser; sin embargo, pueden

encontrarse en cuatro contextos estructurales distintos. Recientemente se han encontrado serín proteasas con triada y diada catalítica novedosas incluyendo, Ser-His-Glu, Ser-Lys/His, His-Ser-His y con N terminal Ser, lo cual puede explicar la diferencia en el pH óptimo de actividad para las proteasas A y B (Henstrom 2002). La diferencia de pH óptimo de actividad además puede deberse a que el anillo imidazol de la histidina aumenta la reactividad de la serina conforme aumenta el pH (a partir de 6); y posiblemente el entorno de la histidina permita mejores condiciones de reacción a pH 7 para la proteasa A y a pH 10 para la proteasa B; también es importante mencionar que dichas enzimas son estructuralmente diferentes (Banchovchin y col., 1978; Banchovchin y col., 1981).

# Conclusiones

## 7 Conclusiones

Los resultados obtenidos proporcionan los elementos necesarios para formular las siguientes conclusiones:

- Las cepas *Aspergillus fumigatus* y *Yarrowia lypolytica* producen extractos proteolíticos termoestables, en cultivo en medio sólido con de harina de pescado como fuente de carbono-nitrógeno y espuma de poliuretano como soporte de cultivo.
- *A. fumigatus* produce al menos dos proteasas termo-activas (proteasa A y B) estructuralmente distintas y ambas presentan termoestabilidad (50 y 60°C).
- La proteasa A tiene un peso molecular aproximado de 88 kDa, pertenece a la familia de las serín proteasas con catálisis óptima a pH 7 y 60°C. La proteasa B tiene un peso molecular aproximado de 45 kDa, pertenece a la familia de las serín proteasas con catálisis óptima a pH 10 y 63°C.
- Ambas proteasas son monoméricas; sin embargo, la serín proteasa A no está glicosilada, mientras que la B está N-glicosilada. Los carbohidratos presentes en la serín proteasa B son la base de la estabilidad estructural, la cual fue reflejada en la estabilidad térmica y probablemente en estabilidad en el amplio rango de pH (5 a 12).
- La proteasa A producida por *A. fumigatus* presenta termoestabilidad superior a la presentada por la mayoría de proteasas producidas por cepas fúngicas.

- La contribución de los enlaces no covalentes a la estabilidad de las estructuras moleculares de ambas proteasas es limitada. Por lo tanto, la estabilidad de las mismas, puede deberse principalmente a enlaces covalentes (S-S) u otro tipo de interacciones.
- La proteasa A es molecularmente termoestable.

# Perspectivas

## 8 Perspectivas

- Comprobación de la existencia de auto-proteólisis.
- Caracterización de los azúcares presentes en la glico-proteasa B y determinación de su responsabilidad sobre la estabilidad térmica.
- Exploración de existencia de O-glicosilación en ambas proteasas y el efecto sobre la estabilidad de estructuras moleculares.
- Obtención de la estructura primaria de las proteasas A y B producidas por *A. fumigatus*, para el modelado de estructura tridimensionales; con el objetivo de realizar un diseño teórico de estabilidad, y con ello proponer modificaciones para diseñar enzimas con mayor termoestabilidad intrínseca.
- Determinación de sitios potenciales de glicosilación mediante secuencias consenso y localización de cisteínas que puedan formar puentes disulfuro (S-S), para proponer diseños de enzimas con estabilidad térmica mejorada.
- Expresión de los genes que codifica para las proteasas termoestables producidas por *A. fumigatus* en un microorganismo GRAS.
- La inserción de carbohidratos en la cadena proteica de la proteasa A, además de la adición de enlaces covalentes que permitan la rigidez y flexibilidad necesaria para la catálisis, permitirá obtener una enzima con características de estabilidad térmica mejoradas.

# Bibliografía

## 9 Bibliografía

**Adinarayana K., Ellaiah P. and Prasad D.** 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech.* **4 (4)**:1-9.

**Afzal A., Ali D., Latif F., Rajoka M. AND Siddiqui K.** 2005. Innovative Kinetic Thermodynamic Analysis Purified Superactive Xylanase From *Scopulariopsis* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **120**:52-70.

**Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil Sh.** 2005. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry.* **40**:1131-1136.

**Agrawal D., Patidar P., Banerjee T., Patil Sh.** 2004. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry.* **39**: 977-981.

**Aguilar C. N., Contreras J. C., Rodríguez R., Prado L. A. and Loera O.** 2004. Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. *Food Science Biotechnology.* **13**: 109-113.

**Almong O., González A., Klein D., Greenblatt H., Braun S. and Shoham G.** 2003. The 0.93 Å Crystal Structure of Sphericase: A Calcium-loaded Serine Protease from *Bacillus sphaericus*. *Journal of Molecular Biology*. **332**:1071-1082.

**Anandan D., Marmer W., Dudley R.** 2007. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamarii*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. **34**: 339–347.

**Angel P., Lim J., Wells L., Bergmann C. and Orlando R.** 2007. A potencial pitfall in <sup>18</sup>O-based N-linked glycosylation site mapping. *Rapid Communication in Mass Espectrometry*. **21**: 674-682.

**Azeredo L. A. I., D. M. G. Freire, R. M. A. Soares, S. G. F. Leite and R. R. R. Coelho.** 2004. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces sp.* Isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*. **34**: 354-358.

**Anbarasan S., Janis J., Poloheimo M., Laitaoja M., Vuolanto M., Vainiotalo P., Leisola M. and Turunen O.** 1999. The effect of glycosylation and additional domains on the thermostability of a family 10 xylanase of *Thermopolyspora flexuosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.00357-09.

**Bachovchin W., Kaiser and John Roberts.** 1978. Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. The State of Histidine in the Catalytic Triad of  $\alpha$ -Lytic Protease. Implications for the Charge-Relay Mechanism of Peptide-Bond Cleavage by Serine Proteases. *Journal of the American Chemical Society.* **26:** 8041-8047.

**Bachovchin W., Kaiser R., Richards J. and John Roberts.** 1981. Catalytic mechanism of serine proteases: Reexamination of the pH dependence of the histidyl  $J_{13C-2H}$  coupling constant in the catalytic triad of  $\alpha$ -lytic protease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 78(12): 7323-7326.

**Bascarán V., Hardisson C. and Braña A.** 1990. Regulation of extracellular protease production in *Streptomyces clavuliyerus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **34:** 208-213.

**Becker P., Abu-Resh I., Markossian S., Antraniquian G., Maki H.** 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus sp. IHI-91* in olive oil. Application in Microbiol and Biotechnology. **48:** 184-190.

**Benito M., Rodríguez M., Núñez F., Asencio M., Bermúdez M. and Córdoba J.** 2002. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 Active against Meat Proteins. *Applied and Enviromental Microbiology.* **68** (7): 3532–3536.

**Beuvas A., Monod M., Debeapuis J., Diaquin M., Kobayashi H. and Latge J.** 1997<sup>a</sup>. Biochemical and Antigenic Characterization of a New Dipeptidyl-Peptidase Isolated from *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (10): 6238-6244.

**Beuvas A., Monod M., Wynuger J., Debeapuis J., Grouzmmann E., Brakch N., Svab J., Hovanessian A. and Latge J.** 1997<sup>b</sup>. Dipeptidyl-Peptidase IV Secreted by *Aspergillus fumigatus*, a Fungus Pathogenic to Humans. *Infection and Immunity*. **65** (8): 3042–3047.

**Blum H. and Gross HJ.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. **8**:93-99.

**Boer C. and Peralta R.** 2000. Production of extracellular protease by *Aspergillus tamarii*. *J. Basic Microbiol.* **40** (2): 75–81.

**Bougadef A., Souissi N., Fakhfakh N., Ellouz-Triki Y., Nasri M.** 2007. Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*. **102**: 343-350.

**Bryan P.** 2000. Protein engineering of subtilisin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1543: 203-222.

**Chakrabarti S., Matsumura M. and Ranu R.** 2000. Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). *Current Microbiology an International Journal*. **40**: 239-244.

**Charles P., Devanathan V., Anbu P., Ponnuswami M., Kalaichelvan P. and Hur B.** 2008. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10 *Journal of Basic Microbiology*. **48**: 347-352.

**Chu F., Trimble R. and Maley F.** 1978. The Effect of Carbohydrate Depletion on the Properties of Yeast External Invertase. *Journal of Biological Chemistry*. **253** (24): 8691-8693.

**Colangelo J., Licon V., Benen J., Visser J., Bergmann C. and Orlando R.** 1999. Characterization of the Glycosylation of Recombinant Endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**:1448–1453.

**Cornish-Bowden A.** 1995. Fundamentals of enzyme kinetics. Portland, London.

**Davies D., Kalinina N., Samokhvalova L., Malakhova G., Scott G., Venning G., Volynskaya A. and Nemeyanov V.** 2005. Isolation and Characterization of the ALP1 Protease from *Aspergillus fumigatus* and Its Protein Inhibitor from *Physarium polycephalum*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. **31** (3): 229–237.

**De araujo D., De albuquerque C., Pereira R., Souza C., Aparecida K., De Lima J., Taciana M., Converti A., Figueredo A.** 2010. Production and stability of protease from *Candida buinensis*. *Appl. Biochem Biotechnol*. **162**:830-842.

**Dienes D., Borjesson J., Hagglund P., Tjerneld F., Liden G., Reczey K. and Stalbroad H.** 2007. Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**: 1087–1094.

**Dogan N., Tari C.** 2008. Characterization of three-phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. *Biochemical Engineering Journal*. **39**: 43-50.

**Eijsink V., Kjork A., Gaseidnes S., Sirevag R., Synstad B., Burg B., Vried G.** 2007. Rational engineering of enzyme stability. 2004. *Journal of Biotechnology*. **113**:105–120.

**Ellouz Y., Bayoudh A., Kammoun S., Gharsallah N., Nasri M.** 2001. Production of proteases from *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and vicera flour. *Bioresource Technology*. **80**: 49-51.

**Essakiraj P., Immanuel G., Sownya S., Iyapparaj P., Palavesam A.** Evaluation of Protease-producing Ability of Fish Gut Isolate *Bacillus cereus* for Aqua Feed. *Food Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-007-0046-6.

**Frosco M., Chase T. and Macmillan J.** 1992. Purification and Properties of the Elastase from *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*. **60** (3): 728-734.

**García-Carreño F., Dimes M. and Haard N.** 1993. Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases of proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*. **214**:65-69.

**García-Gómez M. J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L. A.** 2009. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry*. **112**: 604-608.

**Gentsch M., Cui L., Mengos A., Chang XB., Chen JH., Riordan JR.** 2003. The PDZbindingchloride channel CIC-3B localizes to the Golgi and associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-interacting PDZ proteins.*J. Biol.Chem.* **278**: 6440-6449.

**Gerken T., Owens C. and Pasumarthy M.** 1997. Determination of the Site-specific O-Glycosylation Pattern of the Porcine Submaxillary Mucin Tandem Repeat Glycopeptide. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**(15): 9709-9719.

**Germano S., Pandey A., Osaku Cl., Rocha S., Soccol C.** 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. **32**: 246-251.

**Guadix A., Guadix D., Paéz-Dueñas M., González-Tello P. and Camacho F.** 2000. Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*. **41**(1): 79-89.

**Guo M., Hang H., Zhu T., Zhuang Y., Chu J., Zhang S.** 2008. Effect of glycosylation on biochemical characterization of recombinant phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*. **42**:340-345.

**Hadj-Ali N., Agrebi R., Ghorbel-Fikha B., Sellami-Kamoun A., Kanoun S., Nasri F.** 2006. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**: 515-523.

**Haki G. D. y S. K. Rakshit.** 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes. *Biorresource Technology*. **89**: 17-34.

**Hajji M., Kanoun S., Nasri M., Gharsalla N.** 2007. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*. **42**: 791-797.

**Hamidi-Eshafani F., Hejazi P., Shojaosadati S., Hoogschagen M., Vasheghani E., Rinzema A.** 2007. A two-phase kinetic model for fungal growth in solid-state cultivation. *Biochemical Engineering Journal*. **36**:100–107.

**Hashimoto H., Iwaasa T. and Yokotsuka T.** 1972. Thermostable Acid Protease Produced by *Penicillium duponti* K1014, a True Thermophilic Fungus Newly Isolated from Compost. *Applied Microbiology*. **24** (6): 986-992.

**Hedstrom L.** 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Review*. **102**: 4501-4523.

**Herrera O.** 2003. Obtención y selección de cepas de *Aspergillus niger* sobre-productoras de Fitasa. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.

**Ifrig I. and Ogel Z.** 2002. Production of neutral and alkaline extracellular proteases by the thermophilic fungus, *Scytalidium thermophilum*, grown on microcrystalline cellulose. *Biotechnology Letters*. **24**:1107-1110.

**Ignatova Z., Gousterova A., Spassov G. and Nedkov P.** 1999. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Can. J. Microbiol.* **45**: 217–222.

**Iqbal Z., Rashid M. H., Jabbar A., Malana M. A., Khalid and Rajoka M. I.** 2003. Kinetics of enhanced thermostability of an extracellular glucoamylase from *Arachniotus* sp. *Biotechnology Letters.* **25**: 1667-1670.

**Inouye K., Kusano M., Hashida Y., Minoda M. and Yasukawa K.** 2007. Engineering, expression, purification, and production of recombinant thermolysin. *Biotechnology Annual Review.* **13**:43-64.

**Jaenicke R.** 1991. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *European Journal of Biochemistry.* **202**:715-728.

**Johnvesly B., Manjunath B. R., Naik G. R.** 2002. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline from a thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Bioresource Technology.* **82**:61-64.

**Joo H.-S. and Chang Sh.-S.** 2006. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkalophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme and Microbial Technology.* **38**:176-183.

**Kazan D., Denizci A., Oner M., Errarslan A.** 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **32**: 335–344.

**Kiser GL., Gentsch M., Kloser AK., Balzi E., Wolf DH., Goffeau A., Riordan JR.** 2001. Expression and degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **390**: 195-205.

**Kumar S., Tsai Ch., Ma B. and Nussnov R.** 2000. Factor enhancing protein thermostability. *Protein engineering.* **13(3)**:179-191.

**Kumar S., Tsai Ch., Ma B. and Nussnov R.** 2000. Contribution of Salt Bridges Toward Protein Thermostability. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics.* **11(1)**:79-85.

**Kumar S. and Nussinov R.** 2001. How do thermophilic proteins deal with heat?. CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences. **58**: 1216–1233.

**Kunert J. and Kopecek P.** 2000. Multiple forms of the serine protease *Alp* of *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses.* **43**: 339-347.

**Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.

**Larcher G., Bouchara J., Annaix V., Symoens F., Chabasse D. and Tronchin G.** 1992. Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *Federation of European Biochemical Societies*. **308** (1): 65-69.

**Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., Limam F.** 2009. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J Ind Microbiol Biotechnol*. **36**:531–537.

**Li D., Yang y., Shen Ch.** 1997. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycol. Res*. **101** (1), 18–22.

**Liang T., Lin J., Yen Y., Wang C., Wang S.** 2006. Purification and characterization of a protease extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*. **38**: 74–80.

**Lin Sh., Yoshimura E., Sakai H., Wakagi T., Matsuzawa H.** 1999. Weakly bound calcium ions involved in the thermostability of aqualysin I, a heat-stable subtilisin-type protease of *Thermus aquaticus* YT-1. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1433**: 132-138.

**Longo M. and Combes D.** 1995. A novel chemoenzymatic glycosylation strategy: application to lysozyme modification. *FEBS Letters*. **375**: 63-66.

**Longo M. and Combes D.** 1999. Thermostability of modified enzymes: a detailed study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **74**:25-32.

**Mabrouk S., Hashem A., El-Shayeb N., Ismail A., Abdel-Fattah A.** 1999. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*. **69**: 155-159.

**Markaryan A., Morozoba I., Yu H. and Kolattukudi P.** 1994. Purification and Characterization of an Elastinolytic Metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and Immunoelectron Microscopic Evidence of Secretion of This Enzyme by the Fungus Invading the Murine Lung. *Infection and Immunity*. **62** (6): 2149-2157.

**Mitchell D. A., M. Berobic y N. Krieger.** 2000. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*. **68**:65-69.

**Monod M., Paris S., Sanglard D., Jatton-Ogay K., Bille J. and Latge J.** 1993. Isolation and Characterization of a Secreted Metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*. **61** (10): 4099-4104.

**Moreira K., Porto T., Teixeira M., Porto A., and Filho J.** 2003. New alkaline protease from *Nocardopsis* sp.: partial purification and characterization. *Process Biochemistry*. **39**: 67-72.

**Mukherjee A., Adhikari H., Rai S.** 2008. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*. **39**: 353-361.

**Nalivaeva N. and Turner A.** 2001. Post-translational modifications of proteins: Acetylcholinesterase as a model system. *Proteomics*. **1**:735–747.

**Noronha E., Lima B., Sa C. and Felix C.** 2002. Heterologous production of *Aspergillus fumigatus* keratinase in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **18**: 563–568.

**Nosoh Y. and Sekiguchi T.** 1990. Protein engineering for thermostability. *TIBTECH*. **8**:16-20.

**Oda K., Kakizono D., Yamada O., Iefiji H., Akita O., And Iwashita K.** 2006. Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **72(5)**: 3448-3457.

**Oliveberg M., Tan Y. and Fersht A.** 1995. Negative activation enthalpies in the kinetics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 8926-8929.

**Ortega N., Diego S., Rodríguez-Nogales J., Pérez-Mateos M., Busto M.** 2004. Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. *International Journal of Food Science and Technology.* **39**: 631–639.

**Pack S. and and Yoo Y.** 2003. Protein thermostability: structure-based difference of residual properties between thermophilic and mesophilic proteins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **26**:257–264.

**Pandey A.** 2003. Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* **13**: 82-84.

**Peek K., Daniel R., Monk C., Parker L. and Coolbear T.** 1992. Purification and characterization of a thermostable proteinase isolated from *Thermus* sp. strain Rt41A. *European Journal of Biochemistry.* **207**:1035-1044.

**Peña-Montes C., González A., Castro-Ochoa D., Farrés A.** 2008. Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **78** :603–612.

**Phizicky E. and Fields S.** 1995. Protein-protein interactions: Methods for Detection and Analysis. *Microbiology Reviews*. **59(1)**: 94-123.

**Prakasham R., Rao Ch., Sarma P.** 2006. Green gram husk—an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. **97**: 1449-1454.

**Reichard U., Eiffert H. and Ruchel R.** 1994. Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical and Veterinary Micrology*. **32**: 427-436.

**Santos R., Firminio A., Sá C., Felix C.** 1996. Keratinolytic Activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Current Microbiology*. **33**: 364-370.

**Saucedo C. G., B. K. Lonsane, J. M. Navarro, S. Rusos and L. Raimbault** 1992. Potential of using fermenter for biomass build-up, starch hydrolysis and ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **36**: 47-61.

**Scandurra R., Consalvi V., Chiaraluce R., Politi L. AND Engel P.** 2000. Protein Stability in Extremophilic Archae. *Frontiers in Bioscience*. **5**: 787-795.

**Seong C., Jo J., Choi S., Kim S., Kim S., Lee O., Han J. and Yoo J.** 2004. Production, purification, and characterization of a novel thermostable serine

protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*. *Biotechnology Letters*. **26**: 907–909.

**Shental-Bechor D. and Levy Y.** 2008. Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *PNAS*. **105(24)**: 8256-8261.

**Smith C., Toogood H., Baker H., Daniel R. and Baker E.** 1999. Calcium-mediated Thermostability in the Subtilisin Superfamily: The Crystal Structure of *Bacillus* Ak.1 Protease at 1.8 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*. **294**:1027-1040.

**Sola R. and Griebenow K.** 2008. Effect of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Science*. **98**: 1223-245.

**Sookkheo B., S. Sinchaikul y S. Phutrakul.** 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification*. **20**: 142-151.

**Souza C., Faccin D., Mertins O., Heck J., Silveira N., Secchi A., Ayub N.** 2009. Kinetics of thermal inactivation of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32. *J. ChemTechnol Biotechnol*. **84**: 1567–1575.

**Srivastava S., Golpakrishnan K. and Ramachandran K.** 1984. Kinetic characterization of a crude  $\beta$ -D-glucosidase from *Aspergillus wentii* Pt 2804. *Enzyme and Microbial Technology*. **6**:508-512.

**Su N-W and Lee M-H.** 2001. Purification and characterization of a novel salt-tolerant protease from *Aspergillus* sp. FC-10, a soy sauce koji mold. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **26**: 253-258.

**Takekawa H., Ina C., Sato R., Toma K., Ogawa H.** 2006. Novel Carbohydrate-binding Activity of Pancreatic Trypsins to N-Linked Glycans of Glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**(13): 8528–8538.

**Triki-Ellouz Y., Ghorbel B., Souissi N., Kammoun S., Nasri M.** 2003. Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on fish substrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **19**: 41–45.

**Tremacoldi C., Monti R., Selistre-De-Araujo H., Carmona E.** 2007. Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus*. *World J Microbiol Biotechnol*. **23**: 295–299.

**Tunga R., B. Shrivastava and R. Banerjee.** 2003. Purification and characterization of a proteases from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*. **38**: 1553-1558.

**Urtz B. and Rice W.** 2000. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* **104** (2): 180–186.

**Van Den Burg B.** 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*. **6**: 213-218.

**Vermelho A., Leal m., Lopes A., Dias S., Chaia A., Branquinha M.** 1996. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro*. **91** (6): 755-760.

**Vieille C. and Zeikus G.** 2000. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Reviews*. **65**(1):1–43

**Violet M. and Meunier J.** 1989. Kinetic study of the irreversible thermal denaturation of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase. *Biochemistry Journal*. **263**: 665-670.

**Volquen C. F., Luvizetto D. J., Mertins O., Heck J. X., Pesce N., Resende A., Záchia M. A.** 2009. Kinetics of thermal inactivation of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32. *J. Chem. Technol Biotechnol.* **84**: 1567-1575.

**Vried G., and Eijsink V.** 1993. Prediction and analysis of structure, stability and unfolding of thermolysin-like proteases. *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* **7**:367-396.

**Wang S., Chen Y., Wang Ch., Yen Y. and Chern M.** 2005. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology.* **36** :660–665.

**Wu J., Zhao X., Pan R., He R.** 2007. Glycosylated trypsin like proteases from earthworm *Eisenia fetida*. *International Journal of Biological Macromolecules:* **40**: 399-406.

**Yadav S., Pande M., Jagannadha M.** 2006. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochemistry.* **67**:1414-1426.

**Yang A. and Honing B.** 1993. On the pH dependence of protein stability. *Journal and Molecular Biology.* **231**: 459-474.

**Yano J. K. y T. L. Poulos.** 2003. New Understandings of Thermostable and Peozostable enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*. **14**: 360-365.

# Anexos

## ANEXOS

### ANEXO A. Análisis estadístico selección de cepas

Con el objetivo de comparar el efecto de la cepa en la producción de proteasas se analizó la producción de éstas a las 36 h de cultivo. Las cepas estudiadas fueron la 2.2 aB, 2.7 aB y 36 aIV Se realizó un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés). En la Tabla A1 se puede observar el ANOVA y en la tabla A2 la comparación múltiple de Tukey para la comparación de las cepas. En la tabla A2 se puede observar que las entre las cepas 2.2 aB y 36 aIV no existe diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ).

**Tabla A1.** ANOVA

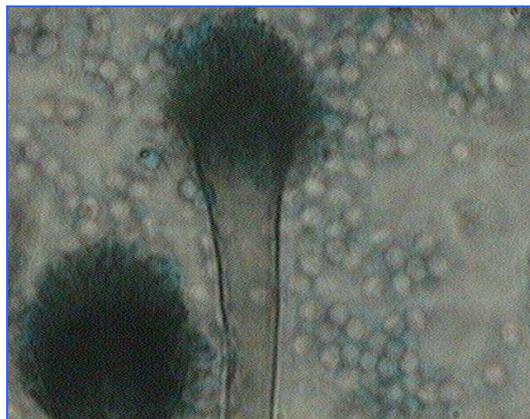
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Significancia
Entre grupos	19856.343	2	9928.172	73.475	0.003
Dentro de los grupos	405.370	3	135.123		
Total	20261.713	5			

**Tabla A2.** Comparación múltiple de Tukey

Cepa	$\alpha= 0.05$		
	Comparación	Media	Diferencia entre grupos
2.7aB	2	142	2.2aB,36aIV
2.2aB	2	252	2.7aB
36aIV	2	273.5	2.7aB

**Anexo B.** Secuencia de ácidos nucleídos de las cepas 36 aIV y 2.2. aB. (servicio CBG-IPN, Reynosa, Tamaulipas, México).

Los métodos moleculares de identificación de microorganismos, se basan en el estudio de las moléculas de DNA y RNA. La identificación de las cepas 2.2 aB y 36 aIV se realizó aislando el DNA genómico. El DNA extraído fue usado como molde en las subsecuentes reacciones de amplificación por Polymerase Chain Reaction (PCR). Se utilizaron iniciadores de secuencias conservadas (ITS). Se realizó un alineamiento múltiple para la obtención de las secuencias. En las Fig. B1 y B2 puede observar la morfología colonial de las cepas así como en las secciones B1 y B2 las secuencias de ácidos nucleídos obtenidas.



**Figura B1.** Morfología presentada por la cepa 36 aIV.

**Sección B1.** Secuencia de ácidos nucleídos cepa 36 aIV. Resultados de la secuenciación región ITS1-5.8S-ITS2.

**Aspergillus fumigatus** strain Ppf10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=606

Score = 675 bits (365), Expect = 0.0

Identities = 466/515 (90%), Gaps = 6/515 (1%)

Query 119 TTCCGT-GGGTGAAACCTGCGGAAGGATCATTTCCGAGTGAGGGTCCCTCTGGGTCCCAC  
177

||||| ||||| ||||||||||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||

Sbjct 3 TTCCGTAGGGTG-AACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGG-CCCTCTGGGTCCAAC  
60

Query 178 CTcccccccGTGTCTTTCGTACCTTGTTGCTTcggcgggcccgcggtttcggcggcgcgc  
237

||||| ||||||||||| ||||||||||||||||||| ||||||||||| |||||||||||

Sbjct 61 CTCCCACCCGTGTCTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCGCC  
120

Query 238 gggggggccttgcgccccgggcccgcgcccgcgAAGACCCCCACATGATCGCTGTTCT  
297

||||| ||||||||||||||||||| ||||||||||| ||||||| |||||||||

Sbjct 121 GGGGAGGCCTTGCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCT  
180

Query 298 GAGTGTGTTGCTGTCTGAGTTGATTTTCGTTATCTGTTAAGTCTTCAACAACGGATCTCT  
357

|| || ||| ||||||||||||||| ||||| ||| ||||| |||||||||||||||

Sbjct 181 GAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAACTTCAACAACGGATCTCT  
240

Query 358 TGGTTCGGCTTCGATGAAGATCGCAGCGAAATGCGTTTTGTTTTGTGAATTGCTGAATT  
417

||||||||| ||||||||||| ||||||||||| | || ||||||||| |||||

Sbjct 241 TGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT  
300

Query 418 CTGTGAATCTTCGTGTCTTTGATCGCTCATTCGCCCCCTGGTTTTCCGGGGGGC-TGCC  
476

| ||||||| ||| ||||||||| ||| ||||||||||||||| ||||||||| |||||



***Yarrowia lipolytica*** strain LN-13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequenceLength=396

Score = 625 bits (338), Expect = 9e-176

Identities = 343/345 (99%), Gaps = 1/345 (0%)

Query 401 AGGATCATTATTGATTTTATCTATTTCTGTGGATTTCTATTATATTACAGCGTCATTTTA  
460

|||||

Sbjct 50 AGGATCATTATTGATTTTATCTATTTCTGTGGATTTCTATTCTATTACAGCGTCATTTTA  
109

Query 461 TCTCAATTATAACTATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGCG  
520

|||||

Sbjct 110 TCTCAATTATAACTATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGCG  
169

Query 521 AACCGCGATATTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCG  
580

|||||

Sbjct 170 AACCGCGATATTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCG  
229

Query 581 CGGTATGGCATTCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTCCCTCTGGGATCGCATTGCT  
640

|||||

Sbjct 230 CGGTATGGCATTCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTCCCTCTGGGATCGCATTGCT  
289

Query 641 TTCTTGAAATGGAtttttttAAACTCTCAATTATTACGTCATTTACCTCCTTCATCCGA  
700

|||||

Sbjct 290 TTCTTGAAATGGATTTTTTAAACTCTCAATTATTACGTCATTTACCTCCTTCATCCGA  
349

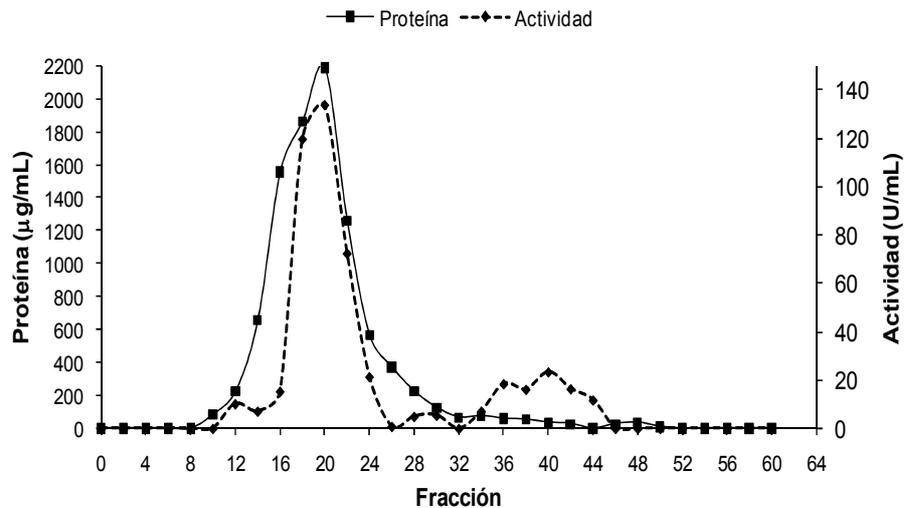
Query 701 GATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGG-AGGAAAAA 744

|||||

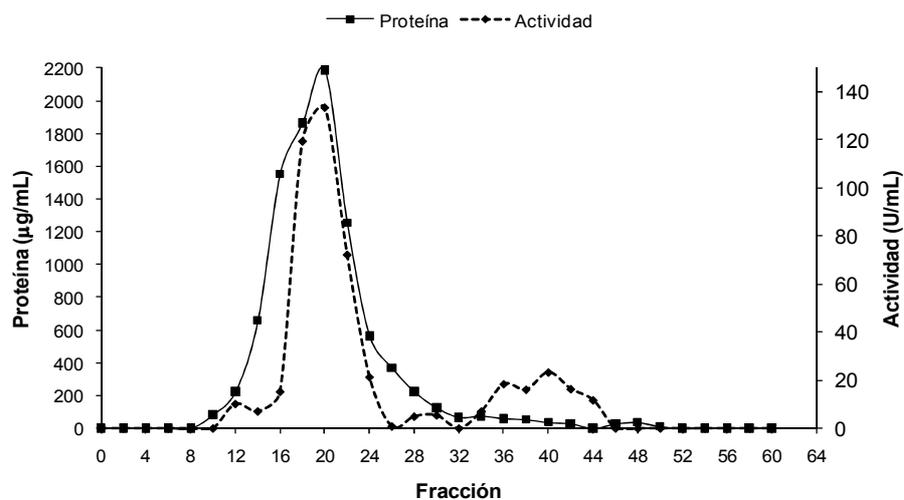
Sbjct 350 GATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGGAGGAAAAA 394

**Anexo C.** Cromatogramas derivados de las etapas de purificación de las proteasas A y B.

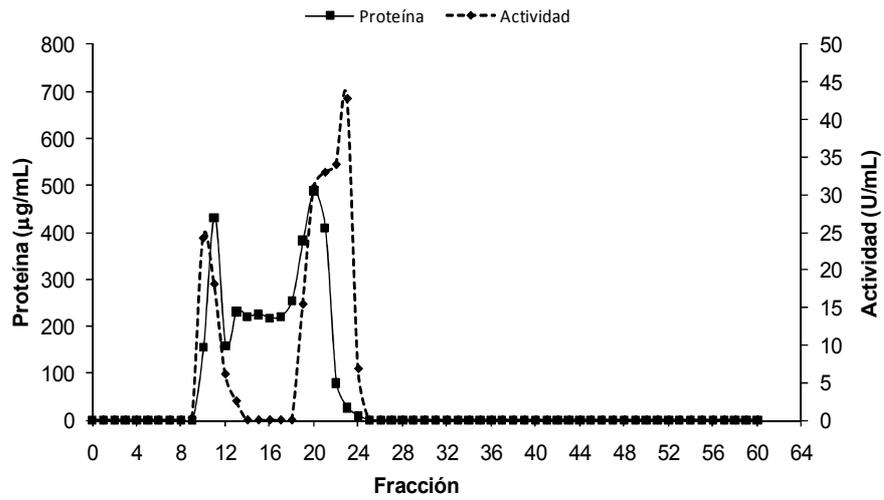
En los gráficos C1 A C3 se muestran los resultados obtenidos de la separación de la proteasa A y en los gráficos C4 a C6 se muestran los resultados para la proteasa B. En cada etapa de purificación se juntaron las fracciones que presentaron actividad proteolítica para ser sometidas al siguiente paso de purificación.



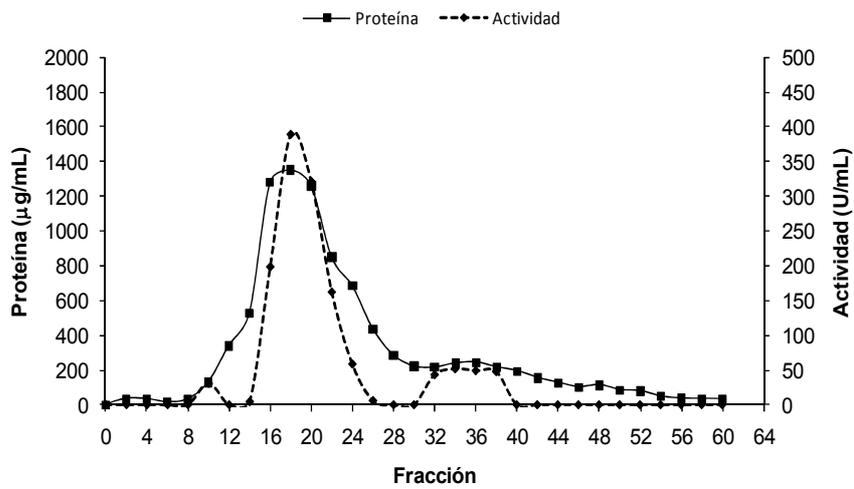
**Figura C1.** Perfil de elución presentado por la proteasa A durante la cromatografía de intercambio aniónico 1.



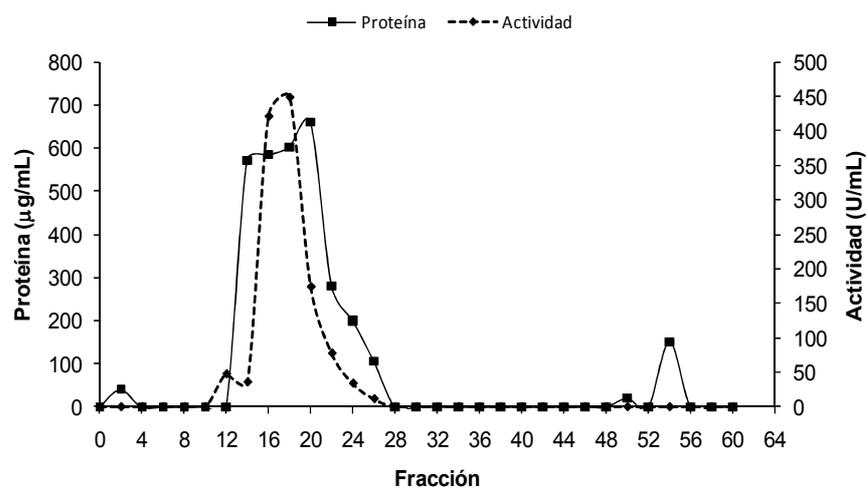
**Figura C2.** Perfil de elución presentado por la proteasa A durante la cromatografía de intercambio aniónico 2.



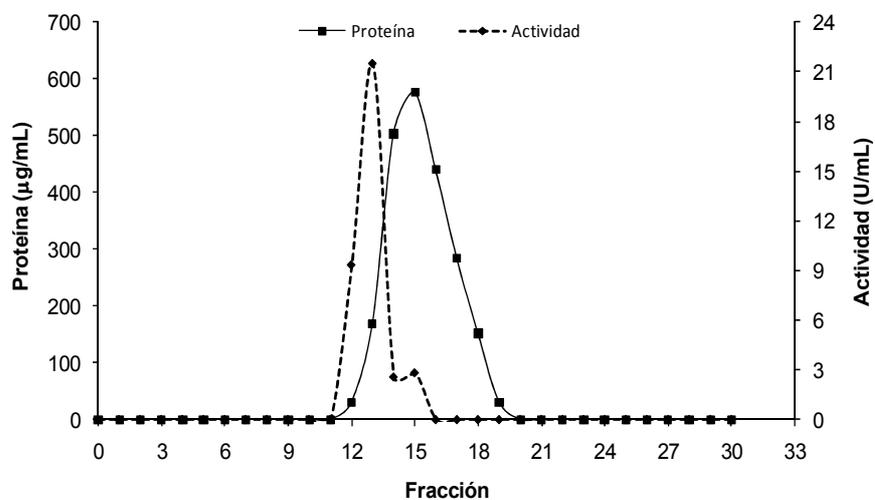
**Figura C3.** Perfil de elución presentado por la proteasa A durante la cromatografía de intercambio catiónico. Nota: la proteasa pura obtenida de la fracción 9 a la fracción 14.



**Figura C4.** Perfil de elución presentado por la proteasa B durante la cromatografía de intercambio aniónico 1.



**Figura C5.** Perfil de elución presentado por la proteasa B durante la cromatografía de intercambio aniónico 2.



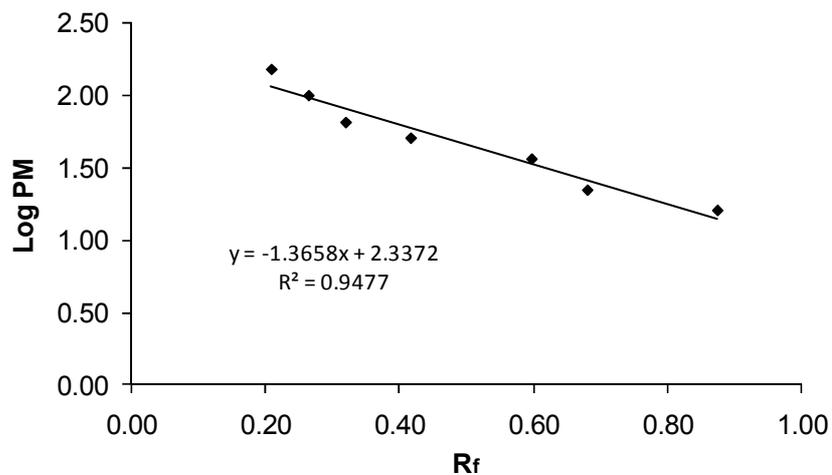
**Figura C6.** Perfil de elución presentado por la proteasa B durante la cromatografía de Filtración en gel. Nota: la proteasa pura fue obtenida de la fracción 12 a 14.

**Anexo D.** Estimación de los pesos moleculares (PM) de las proteasas puras.

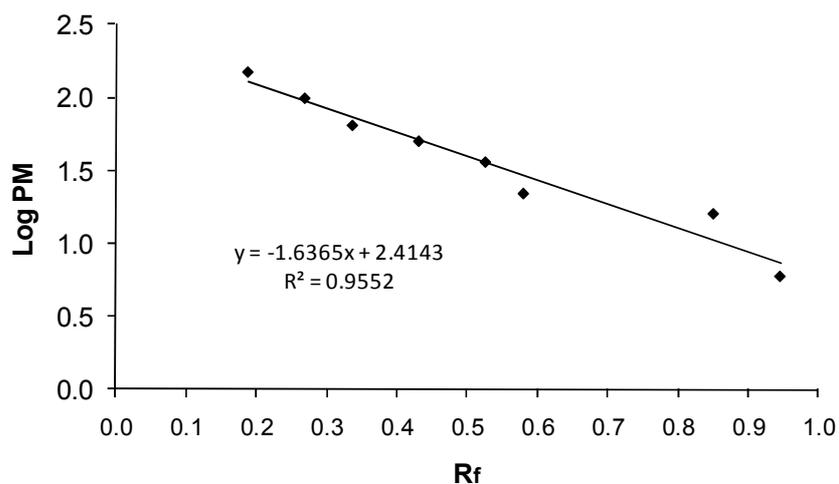
El perfil obtenido en SDS-PAGE puede ser utilizado para estimar el peso molecular de proteínas. Para ello se compara el  $R_f$  de la proteína problema con el de proteínas de referencia cuyo peso molecular se conoce (marcador de peso molecular). El  $R_f$  es el parámetro experimental asociado a esta técnica, y se define como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia que migra una proteína determinada}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

El frente del gel se determina por la posición de un compuesto de referencia de movilidad máxima, como puede ser el azul de bromofenol.



**Figura D1.** Curva estándar utilizada para la estimación del PM de la proteasa A (88 kDa).



**Figura D2.** Curva estándar utilizada para la estimación del PM de la proteasa B (45 kDa).

**Tabla D1.** Características presentadas por las proteínas presentes en el marcador de PM en la electroforesis (estimación PM proteasa A)

Proteína	PM (kDa)	Log PM	R <sub>f</sub>
<b>Forforilasa</b>	148	2.17	0.21
<b>BSA</b>	98	1.99	0.26
<b>Deshidrogenasa glutámica</b>	64	1.81	0.32
<b>Alcohol deshidrogenasa</b>	50	1.70	0.42
<b>Anhidrasa carbónica</b>	36	1.56	0.60
<b>Mioglobina roja</b>	22	1.34	0.68
<b>Lisozima</b>	16	1.20	0.88

**Tabla D2.** Características presentadas por las proteínas presentes en el marcador de PM en la electroforesis (estimación PM proteasa B)

Proteína	PM (kDa)	Log PM	R <sub>f</sub>
<b>Forforilasa</b>	148	2.17	0.19
<b>BSA</b>	98	1.99	0.27
<b>Deshidrogenasa glutámica</b>	64	1.81	0.34
<b>Alcohol deshidrogenasa</b>	50	1.70	0.43
<b>Anhidrasa carbónica</b>	36	1.56	0.53
<b>Mioglobina roja</b>	22	1.34	0.58
<b>Lisozima</b>	16	1.20	0.85
<b>Aprotinina</b>	6	0.78	0.95

**Tabla D3.** Parámetros estimados en electroforesis.

Muestra	Distancia recorrida (cm)	R <sub>f</sub>	Peso molecular estimado (kDa)
<b>Frente de corrida gel proteasa A</b>	7.2	-	-
<b>Frente de corrida gel proteasa B</b>	7.4	-	-
<b>Proteasa A</b>	2.08	0.29	87.6
<b>Proteasa B</b>	3.45	0.47	44.8
<b>Proteasa B desglicosilada</b>	4.1	0.55	32.18