



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y APLICACIÓN DE LA
PROTEASA PrtA DE *Aspergillus nidulans* EN DETERGENTES**

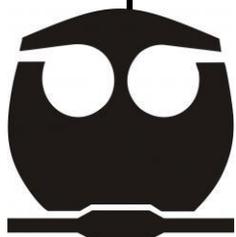
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

ADRIANA LÓPEZ CALDERÓN



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Arturo Navarro Ocaña

Vocal: Laura Carmona Salazar

Secretario: Carolina Peña Montes

1er Suplente: Carmina Montiel Pacheco

2do Suplente: Francisca Morayna Gutierrez Luna

Este trabajo se realizó en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutorial de la Dra. Carolina Peña Montes.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del proyecto CONACyT 153500

ASESORA
Dra. Carolina Peña Montes

SUSTENTANTE
Adriana López Calderón

RECONOCIMIENTOS

Un reconocimiento especial para el Dr. Augusto González Canto de la unidad de Investigación en Medicina Experimental, facultad de medicina, UNAM. Ubicada en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

Por su valiosa cooperación en la purificación de la enzima, por todos los conocimientos que ha compartido conmigo durante todo este tiempo y por ser paciente conmigo en más de una ocasión.

Sin olvidar agradecer también a Marco Ginez quien hizo muy amenas mis visitas y trabajo en el hospital.

GRACIAS

ÍNDICE GENERAL

Índice de Tablas

Índice de Figuras

1. - RESUMEN

2. - MARCO TEÓRICO	1
2.1.0. Enzimas.....	1
2.1.1 Estructura de las enzimas.....	2
2.1.2 Catálisis enzimática	2
2.1.3 Agentes desnaturalizantes.....	3
2.1.4 Clasificación de las enzimas.....	4
2.2.0 Proteasas y su clasificación.....	4
2.2.1 Serín-proteasas.....	5
2.2.2 Subtilisinas.....	7
2.2.3 Estructura y Mecanismo de las serín-proteasa.....	8
2.3.0 Promiscuidad catalítica	10
2.4.0 Uso de enzimas en la industria.....	12
2.5.0 Aplicaciones de las proteasas.....	13
2.6.0 Proteasas en hongos.....	14
2.6.1 Proteasas del género <i>Aspergillus</i>	15
2.7.0 <i>Aspergillus nidulans</i>	16
2.7.1 Proteasas en <i>Aspergillus nidulans</i>	17
2.8.0 Detergentes.....	18
2.8.1 Enzimas en detergentes	20
3. - ANTECEDENTES.....	22
4. - JUSTIFICACIÓN.....	25
5. - HIPÓTESIS	25
6. - OBJETIVOS.....	25
7.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
7.0.0 Diagrama de la metodología	26
7.1.1 Reactivación de <i>A. nidulans</i>	27

7.1.2	Preparación de medio mínimo.....	27
7.1.3	Cosecha y conteo de esporas.....	29
7.2.0	Producción de la proteasa PrtA.....	30
7.2.1	Medio optimizado para la proteasa PrtA de <i>A. nidulans</i>	30
7.2.2	Ultrafiltración.....	31
7.3.0	Determinación de la actividad enzimática y cantidad de proteína.....	31
7.3.1	Cuantificación de proteína.....	31
7.3.2	Determinación de la actividad esterasa.....	32
7.3.2.1	Evaluación cualitativa de la actividad esterasa en microplaca.....	32
7.3.2.2	Evaluación cuantitativa de la actividad esterasa en microplaca.....	33
7.3.3.0	Determinación de la actividad proteasa.....	34
7.3.3.1	Evaluación de la actividad proteasa con caseína	34
7.3.3.2	Evaluación de la actividad proteasa con colágeno y elastina	34
7.3.3.3	Evaluación de la actividad proteasa con azocaseína	35
7.3.3.4	Evaluación de la actividad proteasa con gelatina succinilada	35
7.4.0	Evaluación del perfil de proteínas y determinación de actividad enzimática “In situ”	36
7.4.1	Perfil de proteínas en geles SDS-PAGE.....	36
7.4.2	Zimogramas para actividad de esterasa.....	37
7.4.3	Zimogramas para Actividad de proteasa.....	37
7.5.0	Identificación de enzimas que presenta actividad proteolítica.....	38
7.6.0	Purificación de la enzima PrtA.....	38
7.7.0	Caracterización de la enzima PrtA como proteasa	39
7.7.1	Efecto de pH en la actividad proteasa	39
7.7.2	Efecto de la temperatura en la actividad proteasa	39
7.7.3	Determinación de especificidad de sustrato.....	39
7.7.4	Efecto de los iones en la actividad proteasa	39
7.8.0	Caracterización de la enzima PrtA como esterasa.....	40
7.8.1	Efecto del pH en la actividad esterasa.....	40
7.8.2	Efecto de la temperatura en la actividad esterasa.....	40
7.8.3	Determinación de especificidad de sustrato.....	40

7.8.4 Efecto de los iones en la actividad esterasa.....	40
7.9.0 Aplicación de las enzimas presentes en el extracto crudo de <i>A. nidulans</i> en detergentes comerciales	41
7.9.1 Efecto de los aditivos de detergentes en la actividad	41
7.9.2 Efecto de diferentes detergentes para ropa en la actividad	41
8. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
8.1 Proteasa en el genoma de <i>A. nidulans</i>	42
8.2 Extracto crudo.....	43
8.2.1 Actividad esterasa.....	44
8.2.2 Actividad proteasa.....	46
8.3 Identificación de bandas con actividad proteolítica.....	48
8.4 Purificación de la variante de 14 kDa y de 30 kDa de la proteasa PrtA de <i>A.</i> <i>nidulans</i>	53
8.4.1 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima.....	56
8.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima.....	58
8.4.3 Determinación de la especificidad de sustrato.....	60
8.4.4 Efecto de diferentes iones en la actividad de la enzima.....	62
8.5 Efecto de aditivos de detergentes en la actividad de la PrtA.....	66
8.6 Actividad en presencia de detergentes comerciales	68
9. CONCLUSIONES.....	70
10.PERSPECTIVAS.....	72
11. BIBLIOGRAFIA.....	73
12. ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Serín-proteasas conocidas hasta el momento y aminoácidos de sitio catalítico	6
Tabla 2. Diferentes clasificaciones de la promiscuidad enzimática en la literatura.....	11
Tabla 3. Diferentes usos de proteasas en la industria.....	13
Tabla 4. Proteasas del género <i>Aspergillus</i> que han sido caracterizadas	15
Tabla 5. Composición de un detergente y función de cada componente	19
Tabla 6. Enzimas usadas en detergentes que se encuentran en el mercado	21
Tabla 7. Características de la enzima PrtA de <i>A. nidulans</i> PW1 como esterasa...23	
Tabla 8. Composición del medio mínimo para <i>Aspergillus nidulans</i>	27
Tabla 9. Composición de las sales 20x	28
Tabla 10. Composición de los elementos traza 100x	28
Tabla 11. Requerimientos nutricionales para <i>A. nidulans</i> PW1.....	29
Tabla 12. Medio mínimo con 0.5% de extracto de carne y sin glucosa.....	30
Tabla 13. Orden de reactivos para la determinación de la actividad proteasa usando azocaseína.....	35
Tabla 14. Composición de SDS-PAGE para 2 geles.....	36
Tabla 15. Actividad esterasa cuantitativa del extracto crudo.....	44
Tabla 16. Actividad proteasa cuantitativa del extracto crudo con diferentes sustratos.....	46
Tabla 17. Efecto de diferentes aditivos para detergentes en la actividad proteasa y esterasa del extracto crudo de <i>A. nidulans</i>	66
Tabla 18. Efecto de diferentes detergentes en la actividad proteasa y esterasa del extracto crudo de <i>A. nidulan</i>	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de coordenada de reacción.....	1
Figura 2. Estructura de la Subtilisina de Carlsberg de clan SB	7
Figura 3. Representación esquemática de la estructura secundaria de una subtilisina.....	8
Figura 4. Mecanismo catalítico de las serin-proteasas.....	9
Figura 5. Reaccion de perhidrolisis.....	12
Figura 6. Micrografía de <i>Aspergillus nidulans</i>	17
Figura 7. Mecanismo de funcionamiento de los detergentes biológicos de ropa ...	20
Figura 8. Perfil de proteínas en geles SDS-PAGE y Zimograma de actividad esterasa del extracto crudo de <i>A. nidulans</i> conteniendo la proteína PrtA.....	22
Figura 9. Perfil de proteínas en geles SDS-PAGE del extracto crudo de las diferentes clonas recombinantes de <i>P.pastoris</i>	24
Figura 10. Cámara de Neubauer.....	30
Figura 11. Reacción de hidrólisis de acetato de <i>p</i> -nitrofenilo.....	33
Figura 12. Distribución de las proteasas putativas de <i>A. nidulans</i>	42
Figura 13. Perfil de Proteínas en SDS-PAGE del extracto crudo concentrado....	43
Figura 14. Actividad esterasa cualitativa con FR y α -NA del extracto crudo.....	44
Figura 15. Zimogramas semi-desnaturalizante y SDS-PAGE del extracto crudo..	45
Figura 16. Zimograma y Perfil del extracto crudo en geles con gelatina 1%.....	47
Figura 17 Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima de 37 kDa.....	48
Figura 18. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima de 14 kDa.....	49
Figura 19. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima de 30 kDa.....	50
Figura 20. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima de 97 kDa.....	50
Figura 21. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima de 42 kDa.....	51
Figura 22. SDS-PAGE de las variantes de 37 kDa y 14 kDa después de la purificación.....	53

Figura 23. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima con un peso de 37kDa de la fracción pura.....	54
Figura 24. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima con un peso de 27kDa de la fracción pura.....	55
Figura 25. Efecto del pH en la actividad proteasa de ambas variantes de la PrtA.	56
Figura 26. Efecto del pH en la actividad esterasa las variantes de la enzima PrtA.....	57
Figura 27. Efecto de la temperatura en la actividad proteasa de ambas variantes de la PrtA.....	58
Figura 28. Efecto de la temperatura en la actividad esterasa de ambas variantes de la PrtA.	59
Figura 29. Especificidad de sustrato de la actividad proteasa de ambas variantes.....	60
Figura 30. Especificidad de sustrato de la actividad esterasa de ambas variantes.	61
Figura 31. Efecto de iones en la actividad proteasa de la variante de 14 kDa.....	62
Figura 32. Efecto de iones en la actividad esterasa de la variante de 14 kDa.....	63
Figura 33. Efecto de iones en la actividad proteasa de la variante de 37 kDa.....	64
Figura 34. Efecto de iones en la actividad esterasa de la variante de 37 kDa.....	65

1.- RESUMEN

Aspergillus nidulans es un hongo que comúnmente es utilizado como organismo modelo y en cuyo genoma se ha encontrado que codifica para al menos 27 proteasas extracelulares diferentes. Se han observado hasta el momento sólo 4 diferentes, siendo la enzima codificada por el gen *prtA*, la que presenta mayor actividad. Sin embargo, pese al potencial de este organismo aún no se utiliza industrialmente.

Dentro del grupo de trabajo se caracterizó la actividad promiscua de esterasa de la enzima PrtA y se encontró que es termoalcalina, trabajando a un pH y temperatura óptimas de 8.5 y 40°C respectivamente. Se ha intentado clonar en *Pichia pastoris* y *E. coli*, y resultó citotóxica para ambas. Sin embargo, se encontró que, al cambiar la composición del medio, la producción de la enzima PrtA se incrementa. En vista de las características que presenta, esta enzima se puede utilizar en la industria de detergentes, la cual demanda enzimas que puedan trabajar a pH alcalinos (pH de detergentes) y a temperaturas altas. En el presente trabajo se realizó la caracterización de la actividad proteolítica de la enzima PrtA y se evaluó su aplicación en la industria de detergentes.

Se encontraron 2 variantes de diferentes pesos de la enzima PrtA y se caracterizaron ambas. Tras lo cual se observó que ambas variantes son termoalcalinas, la variante de 14 kDa trabaja a pH óptimo de 9 para su actividad proteasa y esterasa, su temperatura óptima es de 40°C para su actividad proteasa y de 80°C para su actividad esterasa. La variante de 37 kDa tiene un pH óptimo de 8 para la actividad proteasa y de 10 para la actividad esterasa. La temperatura óptima para la actividad proteasa es de 40°C y para la actividad esterasa es de 60°C.

Al evaluar la actividad de las enzimas presentes en el extracto crudo en presencia de diferentes ingredientes presentes de detergentes, se observó que aumenta la actividad en presencia del CTAB, zeolita y peróxido de hidrógeno, mientras que la urea, perborato de sodio y SDS tuvieron un efecto negativo en la actividad.

2. - MARCO TEÓRICO

2.1.0 Enzimas

Son proteínas altamente especializadas, que juegan un papel importante para la vida, dado que son capaces de catalizar reacciones necesarias para la célula, de manera eficiente y selectiva (Nelson & Cox, 2013). Estos biocatalizadores o enzimas presentan velocidades de reacción en magnitudes de $10^6 - 10^{12}$, mayores a las correspondientes a reacciones no catalizadas y varios ordenes mayores a los presentados por las reacciones catalizadas por catalizadores químicos (Voet, 2011).

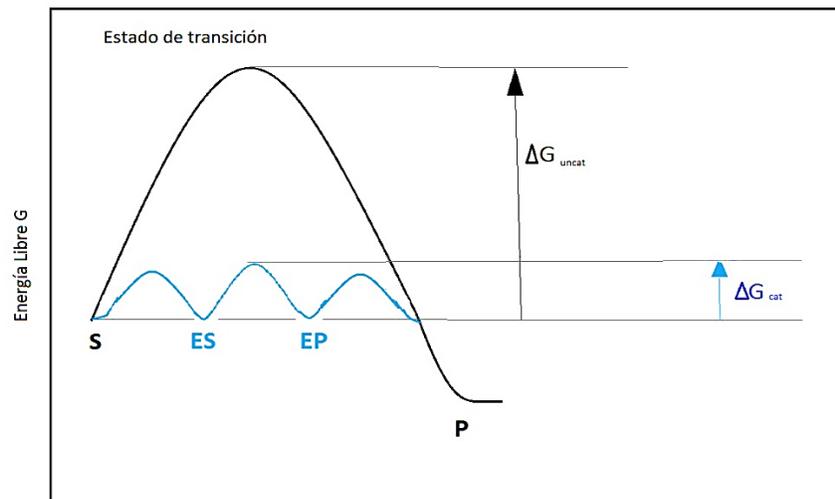


Figura 1. Diagrama de coordenada de reacción (Nelson & Cox, 2013). Línea negra. Cambio de energía durante una reacción no catalizada. Línea azul cambio de energía en una reacción catalizada por una enzima

Para que se lleve a cabo una reacción es necesario aplicar una cantidad de energía que permita que las moléculas interactúen. Esta suele representarse en diagramas de reacción como se observa en la figura 1, en donde podemos observar el cambio de energía en la reacción, expresada en términos de energía libre (G).

Cuando la reacción es llevada a cabo sin el uso de ningún catalizador es muy grande la barrera energética a superar para pasar de sustrato a producto. En la figura 1

este tipo de reacción está representada por la línea negra y podemos observar que la energía requerida para esta reacción es mayor a la necesaria cuando se usan enzimas como catalizadores (línea azul). Esto es debido a que cuando se usan enzimas se forman intermediarios (ES y EP) que reducen la barrera energética a superar, permitiendo que la reacción se lleve a cabo más fácilmente. Los dos picos que se observan en la línea azul indican las formaciones de intermediarios en la reacción.

Cabe recordar que las reacciones en la célula por si solas tendrían que superar una barrera energética muy grande, sin embargo, esto se evita al usar enzimas. Otras ventajas que presentan las enzimas consisten en el uso de condiciones de reacción más suaves a las requeridas por una catálisis química y en que presentan mayor grado de especificidad hacia el sustrato (Voet, 2011).

2.1.1 Estructuras de las enzimas

Son proteínas las cuales llegan a estar compuestas por uno o más péptidos que a su vez están formadas hasta por 2000 residuos de aminoácidos. Estas cadenas polipeptídicas forman una estructura tridimensional específica, con una parte conocida como sitio activo el cual se encarga de la catálisis enzimática y llega a estar formado hasta por menos de 10 residuos de aminoácidos (Robison, 2015).

Si bien el resto de los residuos de aminoácidos no actúa directamente en la catálisis si funcionan estabilizando al sitio activo e induciendo las condiciones propias para la reacción (Robison, 2015). De ahí que la actividad catalítica de la enzima dependa de la integridad de la conformación nativa de la misma, ya que cuando la enzima es desnaturalizada es común que la actividad también se pierda (Lenhinger, 2013).

2.1.2 Catálisis enzimática

Como se ha mencionado anteriormente la formación de los complejos enzima-sustrato (ES) y enzima-producto (EP) en el sitio activo reducen la barrera energética de la reacción permitiendo así que esta se lleve a cabo más fácilmente. Para que se formen estos complejos existen una serie de mecanismos los cuales ayudan a la

ruptura y formación de enlaces que estabilizan estos complejos y que finalmente resultan en la catálisis del sustrato (Harper,2010; Lenhinger, 2013) . Se conocen 3 mecanismos que son los siguientes:

1. Catálisis Acido-Base:

En este caso los grupos ionizables de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos o de las coenzimas (si es el caso) contribuyen a la catálisis actuando como un ácido o una base. De esa manera estabilizan la formación de los intermediarios que finalmente resultaran en la formación de productos.

2. Catálisis covalente.

Consiste en la formación transitoria de un enlace covalente entre la enzima y el sustrato. En este caso algunos residuos de aminoácidos o cofactores actúan como nucleófilos en la formación del enlace entre la enzima y el sustrato.

3. Catálisis ion metal

4. En este caso los iones unidos a las enzimas (Cofactores) actúan ayudando a orientar al sustrato o estabilizando los estados transitorios. Los metales pueden también mediar reacciones de oxido reducción.

2.1.3 Agentes desnaturizantes

Algunos agentes desnaturizantes para las enzimas son los tratamientos con calor, el pH del medio, algunos solventes como el alcohol y la acetona; también la urea y algunos detergentes pueden afectar la estabilidad de la enzima. Esta desnaturización es resultado de que se afectan las interacciones hidrófobas, se rompen puentes de hidrogeno o en el caso del pH se altera la carga neta de la proteína causando una repulsión hidrostática (Lenhinger, 2013).

2.1.4 Clasificación de las enzimas

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (“International Union Of Biochemistry and Molecular Biology”) clasifica a las enzimas en función del tipo de reacción que catalizan, encontrándose en 6 grupos diferentes.

- Oxido-reductasas: Catalizan reacciones de óxido-reducción
- Transferasas: Catalizan la transferencia de grupos glicosílico, metílico o fosfórico
- Hidrolasas: Catalizan la división hidrolítica de enlaces C-C, C-O, C-N
- Liasas: Dan como resultado la formación de dobles enlaces
- Isomerasas: Realizan cambios estructurales dentro de una molécula
- Ligasas: Catalizan la unión de dos moléculas mediante el hidrolisis de ATP

A su vez, cada grupo posee diferentes subgrupos en los cuales se encuentran clasificadas las diferentes enzimas (Harper, 2010).

2.2.0 Proteasas y su clasificación

Pertencen al grupo de las hidrolasas y realizan la hidrólisis del enlace peptídico encontrado en las proteínas (EC 3.4). Son indispensables para la vida debido a que intervienen en el metabolismo, por ejemplo, durante la germinación de semillas, llevan a cabo la hidrólisis de las reservas de origen proteínico en la misma (Khan, 2013). También son el grupo más ampliamente estudiado entre las enzimas conocidas (Gupta, 2002).

Hay 2 maneras de clasificar a las proteasas: una es en base a las características de sitio catalítico y la otra es dependiendo del pH óptimo de trabajo.

Sitio Catalítico: Se clasifican en 8 grupos tomando como base el residuo amino que interviene en el mecanismo catalítico (Mótyán et al., 2013)

- Aspartil-proteasas
- Cisteín-proteasas
- Glutamil-proteasas
- Metaloproteasas
- Serín-proteasas
- Treonin-proteasas
- *De mecanismo desconocido.* Un ejemplo es la colagenasa de *Porphyromonas gingivalis*, la cual hidroliza el colágeno tipo I. Aun no se conoce el mecanismo catalítico, pero se sabe que tiene como secuencia consenso 2 cisteínas que de alguna manera sirven como firma del grupo de proteínas al que pertenece.

pH óptimo: Se clasifican en 3 grupos: ácidas, proteasas que trabajan a pH ácido (2.0 a 6.0); neutras, proteasas que trabajan a pH neutro (6.0 a 8.0) y alcalinas, proteasas que trabajan a pH alcalino (8.0 a 13.0) (Souza, 2014).

2.2.1 Serín-proteasas

Casi un tercio de las proteasas conocidas son catalogadas como serin-proteasa, esta clasificación se debe a la presencia de un residuo de serina en la tríada catalítica, que actúa como nucleófilo. Los otros dos residuos de la tríada son histidina y aspartato (Hedstrom, 2002).

De acuerdo con la base de datos de peptidasas MEROPS, que clasifica a las proteasas en clanes por su mecanismo catalítico y en familias por un ancestro en común, las serin-proteasas pertenecen a la familia S. Estas a su vez se han dividido en diferentes clanes debido a que se han encontrado diferentes estructuras y modificaciones de la tríada catalítica (Page, 2008).

La tabla 1 muestra los diferentes clanes de la familia S según la clasificación de Barret y Rawlings en 2007, la cual se basa en la similitud de secuencia y estructuras de las proteasas conocidas. Hasta el momento se han encontrado 4 diferentes

estructuras en las cuales está la tríada completa y nueve en las que hay variaciones del mecanismo catalítico en las cuales pueden intervenir 1 o 2 aminoácidos, pero en todos los casos encontramos al residuo de serina (Hedstrom, 2002).

Tabla 1. Serin-proteasas conocidas hasta el momento y los aminoácidos del sitio catalítico (Page, 2008).

	Clan	Ejemplo	Aminoácidos que intervienen en la catálisis
Clásicas	PA	Quimiotripsina	His-Asp-Ser
	SB	Subtilisina	Asp-His-Ser
	SC	Carboxilpeptidasa Y	Ser-Asp-His
	SK	Proteasa Clp	Ser-His-Asp
Nuevas	SE	D-Ala-D-Ala carboxilpeptidasa	Ser, Lys
	SF	Lex A Peptidasa	Ser,Lys/His
	SH	Citomegalovirus	His, Ser, His
	SJ	Lon peptidasa	Ser, Lys
	SP	Nucleoporina	His, Ser
	SQ	Amonipeptidasa DmpA	Ser
	SR	Lactoferrina	Lys, Ser
	SS	L, D-Caboxilpeptidasa	Ser, Glu, His
	ST	Rombiode	His, Ser

2.2.2 Subtilisinas

Son un tipo de serin-proteasas caracterizadas por tener una tríada en orden de Asp/His/Ser en la secuencia primaria, del amino al carboxilo terminal (Dogan, 2008). La mayoría de los miembros son proteasas activas en pH neutros y alcalinos, termoestables y sintetizados con péptido señal y propéptido (Rawlings, et al., 2016). Finalmente, la enzima es activada por la eliminación del propéptido, aunque hay numerosos casos en los cuales el propéptido aparece completo o en partes (Siezen, 1997).

La estructura general de este grupo se caracteriza por tener 3 capas de hojas beta intercaladas con alfa hélices en dos dominios (Perona, 1995). El miembro más representativo de este grupo es la subtilisina Carlsberg, la cual ha sido ampliamente estudiada junto con la quimiotripsina. La figura 2 muestra la estructura terciaria de la subtilisina.



Figura 2. Estructura de la Subtilisina de Carlsberg de clan SB (Page, 2008).

En ella podemos observar la presencia de alfa hélices y beta plegadas. En la figura 3 se presenta un esquema de la estructura de una subtilisina, en donde se puede observar una estructura tipo sándwich con 2 capas de alfa hélices representadas por cilindro y 3 capas de betas plegadas representadas por flechas.

Las enzimas pertenecientes a este clan se caracterizan por tener preferencia por hidrolizar las proteínas del lado del carbono terminal junto a la cadena de péptidos. (Page,2008)

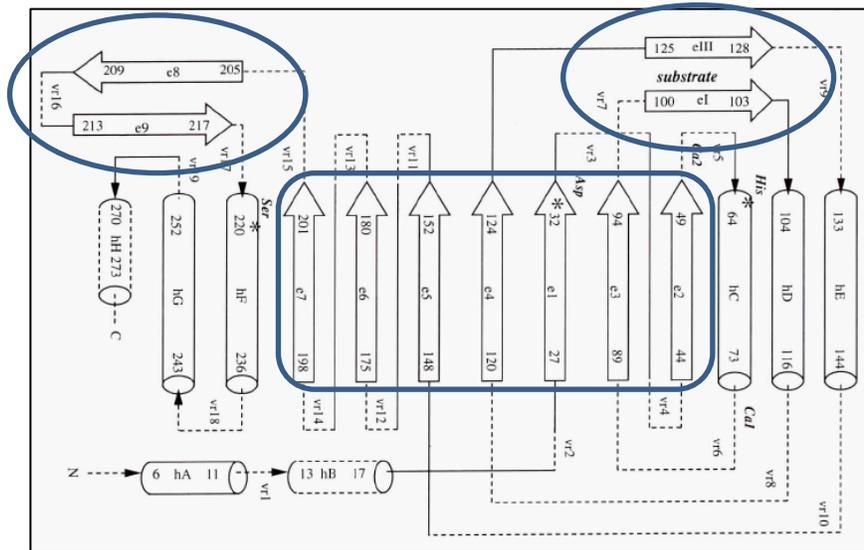


Figura 3. Representación esquemática de la estructura secundaria de una subtilisina. Se muestran las α -hélices representadas por cilindros y hojas beta representadas por flechas (Siezen, 1997).

2.2.3 Estructura y mecanismo de las serin-proteasas

Desde el conocimiento de las proteasas muchos estudios se han dedicado a la elucidación del mecanismo de acción de las mismas. En el caso de las serin-proteasas debido a las similitudes que presentan en los sitios activos, se considera que presentan el mismo mecanismo (Voet, 2011).

La figura 4 indica el mecanismo en términos de la estructura de la quimiotripsina. En ella se muestra los 4 pasos en que consiste el mecanismo. El primero es el ataque nucleofílico del residuo de serina al grupo carbonilo de la proteína, formando así un intermediario tetraédrico, al cual se ve estabilizado por el anillo imidazol del residuo de histidina. El siguiente paso es la descomposición del intermediario tetraédrico y la formación de un intermediario acil-enzima y los últimos pasos consisten en descomposición de intermediario acil-enzima con la liberación de un

grupo amina y la formación de nuevo del intermediario tetraédrico que finalmente se descompone dando como resultado a la enzima activa y por otra parte a la cadena peptídica unida al carbonilo terminal (Voet, 2011)

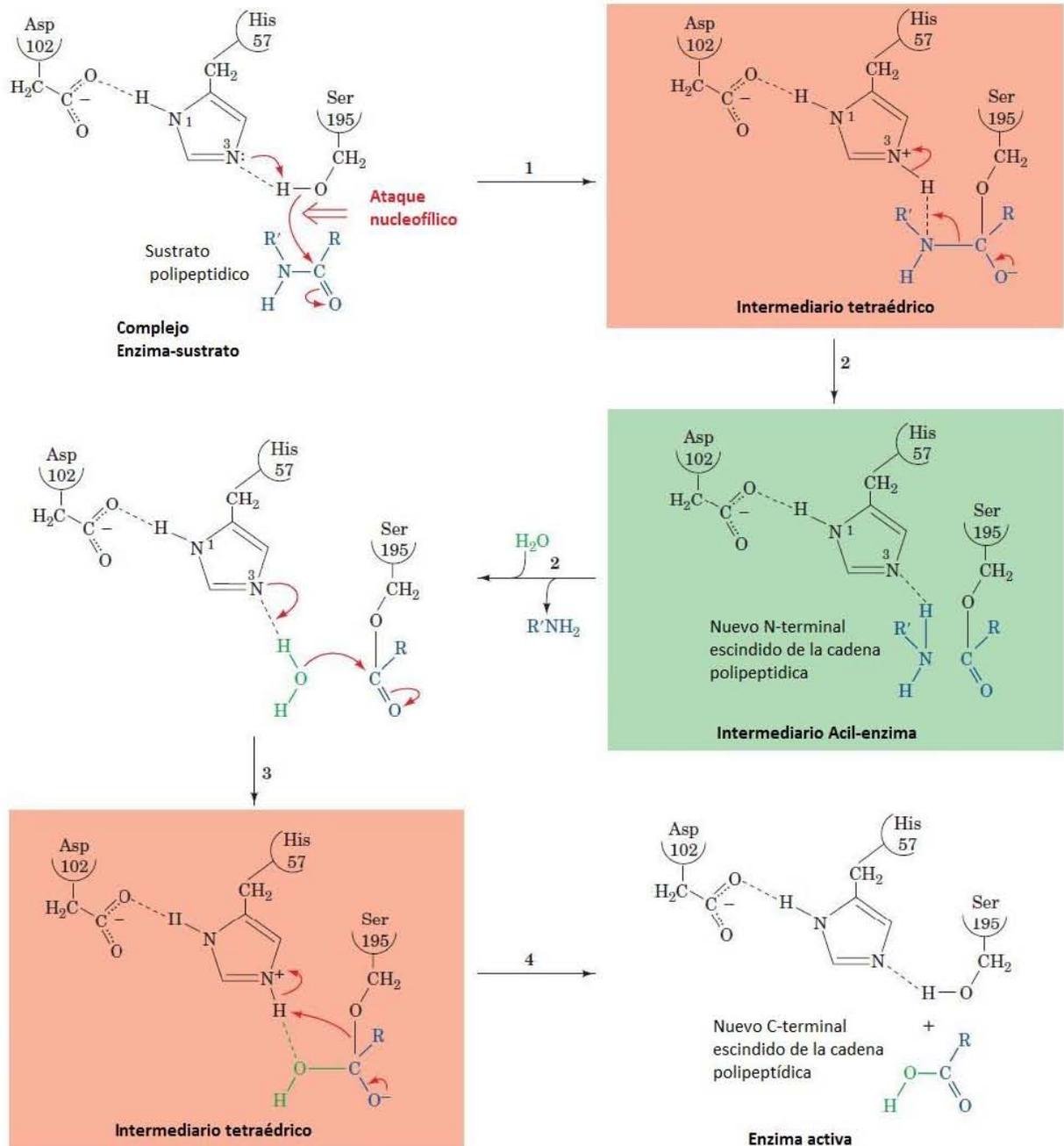


Figura 4. Mecanismo catalítico de las serin-proteasas. 1) Ataque nucleofílico al carbonilo 2) Descomposición de intermediario tetraédrico 3) Formación de un segundo intermediario tetraédrico 4) Liberación de grupo carbonilo (Voet et al., 2011)

2.3.0 Promiscuidad catalítica

El término promiscuidad enzimática, implica que la enzima tiene la capacidad de catalizar dos reacciones en las que están envueltas sustancias químicas diferentes. Y por lo que se sabe hasta el momento la segunda reacción está relacionada con el mismo sitio catalítico de la actividad primaria, en esta pueden actuar algunos o todos los aminoácidos catalíticos de la actividad primaria. Además, se considera que la actividad promiscua es por lo general menos eficiente que la primaria (Taglieber, 2007; Arora, 2014).

Normalmente esta función secundaria puede llamarse función promiscua, o ambigüedad de sustrato, sin embargo, esto no debe confundirse con la amplitud de especificidad de sustrato que algunas enzimas presentan (Gupta, 2016; Olga, 2010). Por ejemplo, las lipasas catalizan la hidrólisis de una amplia gama de ácidos carboxílicos y alcoholes, pero no por ello se le considera que tienen actividad promiscua (Gupta, 2016).

Se ha observado que algunas enzimas dentro de la misma superfamilia llegan a presentar actividad promiscua de otras de la misma familia. Por ejemplo, la familia de las serin hidrolasas se caracteriza por tener una serina catalítica que realiza un ataque nucleofílico como se muestra en la figura 4 (Simon, 2010). Y dentro de esta se encuentran una gran variedad de actividades hidrolíticas como lipasas, proteasas esterases, tioesterasas y perhidrolasas entre otras. Se sabe de perhidrolasas que presentan también la actividad de esterasa y de lipasas que también catalizan la formación de enlaces C-C (Svedendahl, 2011; Lin 2008; Lescic, 2010, Aora, 2014).

Se ha propuesto que la actividad promiscua es el resultado de cambio en algún aminoácido que este envuelto en el sitio catalítico y de interacciones hidrofobas (Aora, 2014). En diversos trabajos se muestra como por medio de ingeniería de proteínas se obtienen enzimas con cambios que les permiten ya sea presentar más la actividad promiscua o sino presentan actividad promiscua llegar a presentarla (Gupta, 2016).

Si bien diferentes autores están de acuerdo que se pueden presentar varios tipos de promiscuidad, no parece haberse llegado a un consenso en cuanto a una clasificación de la promiscuidad (Copley, 2003; Hult y Berglund, 2007; Bornscheuer, 2004; Nobeli,2009; Gupta, 2016).

Tabla 2. Diferentes clasificaciones de la promiscuidad enzimática en la literatura.

Referencia	Clasificación
Copley, 2003	<ol style="list-style-type: none"> 1. Utilizando sustratos similares para llevar una reacción 2. Obtención de múltiples productos usando diferentes sitios activos 3. Usando el mismo sitio activo pero diferentes reacciones 4. Catalizan diferentes reacciones que envuelven diferentes mecanismos de acción
Bornscheuer, 2004	<ol style="list-style-type: none"> 1. Que grupos funcionales están involucrados en las reacciones. 2. Mecanismo diferentes o iguales
Hult y Berglund, 2007	<ol style="list-style-type: none"> 1. Condiciones que propician la promiscuidad 2. Promiscuidad enzimática hacia el sustrato 3. Promiscuidad enzimática del mecanismo catalítico
Nobeli,2009	<ol style="list-style-type: none"> 1. Niveles de promiscuidad 2. Condiciones 3. Mecanismos 4. Efectos
Gupta, 2016	<ol style="list-style-type: none"> 1. Plasticidad del sitio activo 2. Ambigüedad de sustrato 3. Ambigüedad del cofactor

Hoy en día se investigando sobre las enzimas que presentan promiscuidad, debido a que se percibe como un fenómeno útil que puede mejorar el uso de biocatalizadores (Aora,2014). Por ejemplo, se han encontrado esterasas,lipasas y proteasas que también generan ácidos peroxicarboxílicos, los cuales son usados en desinfectantes, detergentes y son reconocidos por su capacidad de blanqueamiento más eficiente que el peróxido de hidrogeno(Carboni-Oerlemans,

2006). Sin embargo, estos ácidos son poco estables, por lo que la generación “*in situ*” de estos es obligada para su aplicación en detergente y al respecto las enzimas tendrían un papel importante en su producción (Yin, 2010; Bernhardt, 2005; Björkling, 1992; Carboni-Oerlemans, 2006; Vojcic, 2015). La figura 5 muestra la reacción

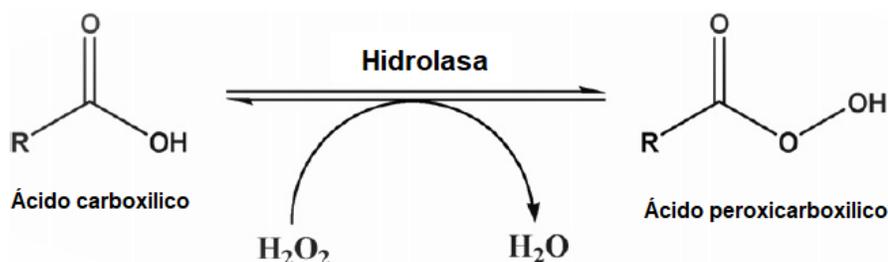


Figura 5. Reacción de perhidrolisis. En este caso el peróxido de hidrogeno actúa como un nucleófilo en la formación del peracido

Al respecto hay una patente de una lipasa de *Pseudomonas putida* en la cual la enzima mostro ser resistente a la presencia de peróxido de hidrogeno y usando un triacilglicérido como sustrato se generó el correspondiente ácidos peroxicarboxílico (Carboni-Oerlemans, 2006).

2.4.0 Uso de enzimas en la industria

El uso de enzimas en los procesos industriales está ganando interés por parte de la industria, debido a los múltiples beneficios que presenta, entre ellos se encuentran: la reducción en el tiempo del proceso, en el consumo de energía y en los costos de producción. Además, las enzimas permiten que los procesos resulten menos tóxicos y más amigables con el medio ambiente (Sigh, 2016).

Actualmente el comercio de enzimas es un mercado que constantemente está creciendo, muestra de ello es lo que la empresa Novozyme que reportó en sus ventas en 2015, ya que observaron un incremento del 10% en sus (Novozyme, 2015). El 75% del mercado está manejado por grandes empresas como Novozyme,

Dupont y Roche, mientras que el 25% restante es aportado por empresas medianas (Lin, 2012).

La empresa Novozyme reportó en 2015 que el 33% de sus ventas de enzimas es para aplicaciones de detergentes y para el cuidado del hogar, 27% es debido a las ventas de enzimas para alimento, el 18% para enzimas aplicadas a la generación de bioenergía, 15% para la agricultura y alimentación animal y por último el 7% fue destinado a la industria farmacéutica (Novozyme, 2015).

Si bien el mercado de las enzimas es amplio, gran parte de este se debe a las ventas de proteasas, un tipo de enzimas ampliamente utilizado es diversos procesos. De hecho, sus ventas llegan a ser 60%- 70% de las ventas de enzimas a nivel mundial (Srilksmi, 2015; Souza, 2014; Nilesh,2014; Charles, 2008).

2.5.0 Aplicaciones de las proteasas

Las proteasas han generado gran interés en los últimos años debido a que se pueden aplicar en diferentes procesos, haciéndolos más amigables con el medio ambiente, más eficientes y ayudando a reducir costos. Por lo general las proteasas más usadas son termoestables y alcalinas (Khan, 2013; Nigan, 2013).

Las aplicaciones son bastantes, por ejemplo, en detergentes, en la industria farmacéutica, cosméticos, la industria del cuero, en productos de limpieza, industria láctea, síntesis de péptidos, industria textil, alimentación animal y en estudios de biología molecular entre otras (Khan, 2013; Lin,2013; Lin, 2012; Souza, 2014; Nigam,2013). La tabla 3 muestra algunas aplicaciones de proteasas en la industria.

Tabla 3. Diferentes usos de proteasas en la industria (Nigh, 2016; Lin, 2012).

Industria	Enzima	Uso
Láctea	Proteasa ácida	Coagulación de leche
	Proteasa neutra	Maduración de quesos
Bebidas	Proteasa	Evitar la turbidez
Papel	Proteasa	Remover biopelículas
Detergentes	Proteasa alcalina	Remover proteínas

Cuero	Proteasa alcalina	Deshidratación
	Proteasa neutra	Remojo
Cosméticos	Proteasa	Removiendo células muertas
Desecho de residuos	Proteasa	En bioremediación
Industria panadera	Proteasa	Reduce tiempo de mezclado e incrementa el volumen
Industria cervecera	Proteasa	Incrementa la cantidad de proteína soluble y aminoácidos libres, mejoramiento de la malta, mejora el crecimiento de la levadura
Alimentación animal	Proteasas alcalinas	Degrada proteínas en péptidos y aminoácidos para su mejor asimilación

2.6.0 Proteasas en hongos

En los últimos años se han estudiado distintas fuentes de proteasas una de ellas, son los hongos. Las proteasas fúngicas presentan ventajas sobre otros tipos de fuentes, debido a que trabajan con sustratos de bajo costo y secretan una gran cantidad de enzimas al medio lo que facilitando su posterior tratamiento. El micelio puede ser fácilmente removido por algún método físico y el uso de estas enzimas es más seguro cuando el hongo es considerado como GRAS (“Generally Recognized as Safe”) (Souza et al., 2014).

En los últimos años, los hongos son cada vez más utilizados como fuentes de enzimas (Nilesh et. al, 2014). De hecho, de las 207 enzimas de la lista de la AMFEP (“Manufactures of Fermentation Enzyme Products”) para mayo 2015, más de la mitad (133), son enzimas producidas por hongos (AMFEP, 2016). En el caso de las proteasas, de 29 que encontramos en la lista, 12 son producidas por hongos. Los géneros más empleados para producción de enzimas son *Aspergillus*, *Penecillum*, y *Trichoderma*.

2.6.1 Proteasas del género *Aspergillus*

De los géneros de hongos que producen más enzimas, *Aspergillus* es el principal con un total de 68 enzimas de las 133 que producen los hongos, esto a causa de su capacidad para producir una cantidad considerable de enzimas en las condiciones apropiadas y con alta actividad biológica (Maccabe, 2002). Otro punto importante es que el género *Aspergillus* es considerado GRAS por la FDA (Kern, 2015; Kumar, 2011). Las especies más usadas de *Aspergillus* para la producción de enzimas son *A. niger*, *A. oryzae*, y *A. flavus* (Souza, 2014). La siguiente tabla muestra algunas proteasas que han sido obtenidas y caracterizadas del género *Aspergillus*.

Tabla 4. Proteasas del género *Aspergillus* que han sido caracterizadas (Souza, 2014 con Modificaciones).

Hongo	pH y temperatura óptima	Actividad enzimática (U/ mg)	Tipo de proteasa	Referencia
<i>Aspergillus sp. 13.33</i>	- /45°C	844	-	Macchione et al, 2008
<i>Aspergillus sp. 13.34</i>	- /45°C	469.6	-	Macchione et al, 2008
<i>Aspergillus sp.13.35</i>	- /45°C	640.5	-	Macchione et al, 2008
<i>Aspergillus sp.</i>	- /30°C	107.6	-	Rajmalwar, 2009
<i>Aspergillus awamori</i>	5.0 /55°C	-	Proteasa ácida	Negi, 2009
<i>Aspergillus clavatus</i> ES1	8.5 / 50°C	4970	Proteasa alcalina	Hajji et al, 2007
<i>Aspergillus flavus</i> 1.2	- /45°C	117.6	-	Macchione, 2008
<i>Aspergillus flavus.</i>	7.5 /32 °C	6.8	Proteasa alcalina	Malathi, 1991
<i>Aspergillus flavus.</i>	7.5 /45°C	640	Serin-proteasa	Kranthi , 2012
<i>Aspergillus flavus</i>	7.0 / 36°C	1894	Proteasa alcalina	Agrawal, 2005
<i>Aspergillus fumigates</i>	8.0 /50 °C	-	Serin-proteasa	Silva, 2010
<i>Aspergillus niger</i>	4.0 /30 °C	200	Proteasa ácida	Yang and Lin, 1998
<i>Aspergillus niger</i>	3.0 /27°C	3600	-	O'Donnell, 2001
<i>Aspergillus oryzae</i> IAM2704	7.0 / 30°C	1550	Neutral proteasa	Ogawa, 1995
<i>Aspergillus oryzae</i> MTCC 5341	3.0 / 55°C	43.6	Aspartil proteasa	Vishwanatha, 2009

<i>Aspergillus oryzae</i> MTCC 5341	6.3 / 55°C	3500	Aspartil proteasa	Vishwanatha, 2010
<i>Aspergillus oryzae</i> NCIM 649	7.0 / 36°C	6301	Proteasa alcalina	Agrawal, 2005
<i>Aspergillus oryzae</i> NCIM 1212	7.0 / 36°C	631	Proteasa alcalina	Agrawal, 2005
<i>Aspergillus oryzae</i> NCIM 1032	7.0 / 36°C	4744	Proteasa alcalina	Agrawal, 2005
<i>Aspergillus parasiticus</i>	8.0 / 40°C	17.65	Serin-proteasa	Tunga, 2003
<i>Aspergillus parasiticus</i>	7.0 / 36°C	9545	Proteasa alcalina	Agrawal, 2005
<i>Aspergillus ustus</i>	9.0 / 45°C	1639	Serin-proteasa	Damare, 2006
<i>Aspergillus nidulans</i> MK191	8.5 / 65°C	31.2	metalloproteasa	Emri, 2009
<i>Aspergillus flavus</i>	11.0 / 40°C	120	Serin-proteasa	Kumar, 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	8.0 / 70°C	-	Dipeptidil peptidasa	Maeda, 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	7.0 / 70°C	-	Dipeptidil peptidasa	Maeda, 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	7.0 / 50°C	-	Dipeptidil peptidasa	Maeda, 2016
<i>Aspergillus oryzae</i> CH93	8.0 / 50°C	952.0	Proteasa alcalina	Salihi, 2016

2.7.0 *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans es un ascomiceto saprófito que crece de forma rápida y se puede desarrollar tanto en medio líquido como sólido, con una gran variedad de sustratos desde simple hasta complejos (Maccabe, 2002). Normalmente es haploide y produce esporas tanto sexuales como asexuales. Contiene 8 cromosomas y del total de sus genes el 29% tienen función conocida, el 23% son de función putativa y el 46% restante son genes desconocidos (Broad Institute).

A. nidulans es un hongo bien conocido por ser un organismo modelo, debido a que su ciclo sexual ha sido bien caracterizado al igual que su genoma (Galagan, 2005). A diferencia de los otros *Aspergillus*, gracias a que se conoce su genoma se ha logrado estudiar la regulación de sus genes, como la represión por fuente de carbono y nitrógeno (Cohen 1973; Cohen, 1972) y la regulación en respuesta al pH ambiental (Caddick et al., 1986; Arst et al., 1994).

Su estudio es importante debido a la relación tan estrecha que tiene con otros *Aspergillus* de importancia industrial como *A. oryzae* (Galagan, 2005).

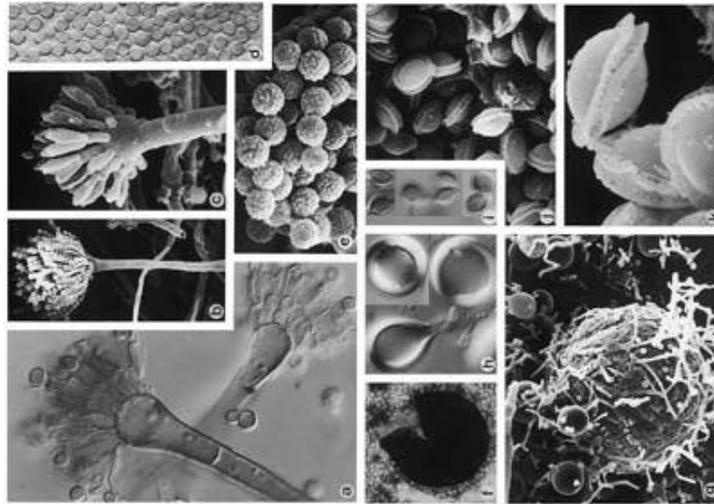


Figura 6. Micrografía de *Aspergillus nidulans* (Hoog, 2000).

2.7.1 Proteasas en *Aspergillus nidulans*

La capacidad de *A. nidulans* para utilizar una gran variedad de sustratos para su desarrollo, lo convierten en un microorganismo que podría ser usado en la producción de enzimas de importancia industrial como las proteasas (Maccabe, 2002). Se usa como modelo para estudios genéticos y como hospedero para la producción de proteasas a escala industrial (Charles,2008).

Sin embargo, por si solo *A. nidulans* produce proteasas con potencial para usarse en la industria. Esto es importante debido al aumento de la demanda de enzimas con propiedades que les permitan ser usadas en diferentes procesos de manufactura.

Se han observado en el extracto crudo de *A. nidulans* al menos 6 bandas que presentan actividad proteolítica por diferentes grupos de investigación. Una de muy alto peso molecular que se ve afectada por la presencia de EDTA, por lo que se ha

propuesto que es una metaloproteasa. Tres bandas de comportamientos parecidos ante inhibidores de serin-proteasa, por lo que se ha propuesto que sean varias formas de la misma (Cohen, 1973, Katz, 2009). Una proteasa con mayor actividad que las demás y que se ha comprobado que corresponde al producto del gen *prtA* (vanKuyk,2000, Peña-Montes 2007). Y por último una banda de bajo peso molecular con un comportamiento ante inhibidores de serin-proteasa, parecido al de la PrtA, se ha sugerido que tal vez que es un producto del mismo gen (Katz, 2009). En un estudio posterior se encontró una metaloproteasa tipo deuterolisina en el extracto crudo de *A. nidulans* HA, conocida como PepJ de 19 kDa. Se caracterizó y se encontró que tiene un pH óptimo de 8.5 y una temperatura optima de 65°C (Emri, 2009).

Al ser *A. nidulans* un modelo de estudio, se han encontrado información útil sobre los factores que afectan la producción de proteasas, como la fuente de carbono, nitrógeno y la limitación de sulfuro del medio, además del pH del medio (Cohen, 1973; Castro-Ochoa 2013).

2.8.0 Detergentes

Tienen como objetivo ayudar a eliminar las impurezas o “mugre”, la cual es una matriz compleja de diversos componentes como, proteínas, grasas y polisacáridos entre otros. La complejidad de dicha matriz hace necesario el empleo de surfactantes, que junto con otros ingredientes ayudan en el proceso de limpieza. La siguiente tabla muestra la composición de un detergente (Aaslyng,1991).

Tabla 5. Composición de un detergente y función de cada componente (Sejr, 1998 con modificaciones)

Componente	Contenido (%)	Función
Agentes mejoradores "Builders"	30-60	Amortiguadores del pH en el detergente, secuestradores de cationes, aumentan la eficiencia del surfactante, evitan la redeposición de los sólidos en la ropa
Surfactantes	10-30	Emulsifican, solubilizan o suspenden las partículas de la "mugre" y ayudan a eliminarlas.
Ayudantes de procesos e inhibidores de corrosión	0.5-5	Aunque no son necesarios para el proceso de lavado, ayudan a que el producto tenga las propiedades físicas adecuadas para su uso
Colorantes y fragancia	0.1-0.5	Dan color y aroma al producto
Agentes blanqueadores	0-25	Oxidar compuestos fenólicos, ayudar en la eliminación de la "mugre" además de ayudar a dejar más "blanca" la ropa
Enzimas	0.4 -3	Ayudan a la eliminación de compuestos proteínicos y grasos, entre otros, de la ropa. Normalmente se pueden usar proteasas, celulasas, lipasas, cutinasas, amilasas etc.

Todos estos componentes en conjunto ayudan a la remoción de la suciedad. Aunque si bien las enzimas en detergentes se empezaron a usar mucho después, el uso de estas hizo el proceso más eficiente y amigable con el medio ambiente, además de ayudar a reducir el tiempo de lavado y el consumo de agua (Sejr, 1998). Razón por la cual el 50% de los detergentes líquidos y 25% de los detergentes en polvo contienen enzimas, llegando incluso a ser un componente clave (Sejr, 1998; Khan, 2013).

El mecanismo de remoción de suciedad también conocido como "Rolling up" consiste en 3 etapas. Los mecanismos comienzan con la disminución de la tensión superficial entre el agua y la suciedad presente en la ropa. Debido a la interacción del surfactante con la suciedad se forma una monocapa alrededor de esta. Subsecuentemente se termina formando una micela, que debido a fuerzas de repulsión por los componentes del detergente comienza a separarse y finalmente debido a la aplicación de una fuerza mecánica se separa de la fibra textil (Bajpai, 2007)

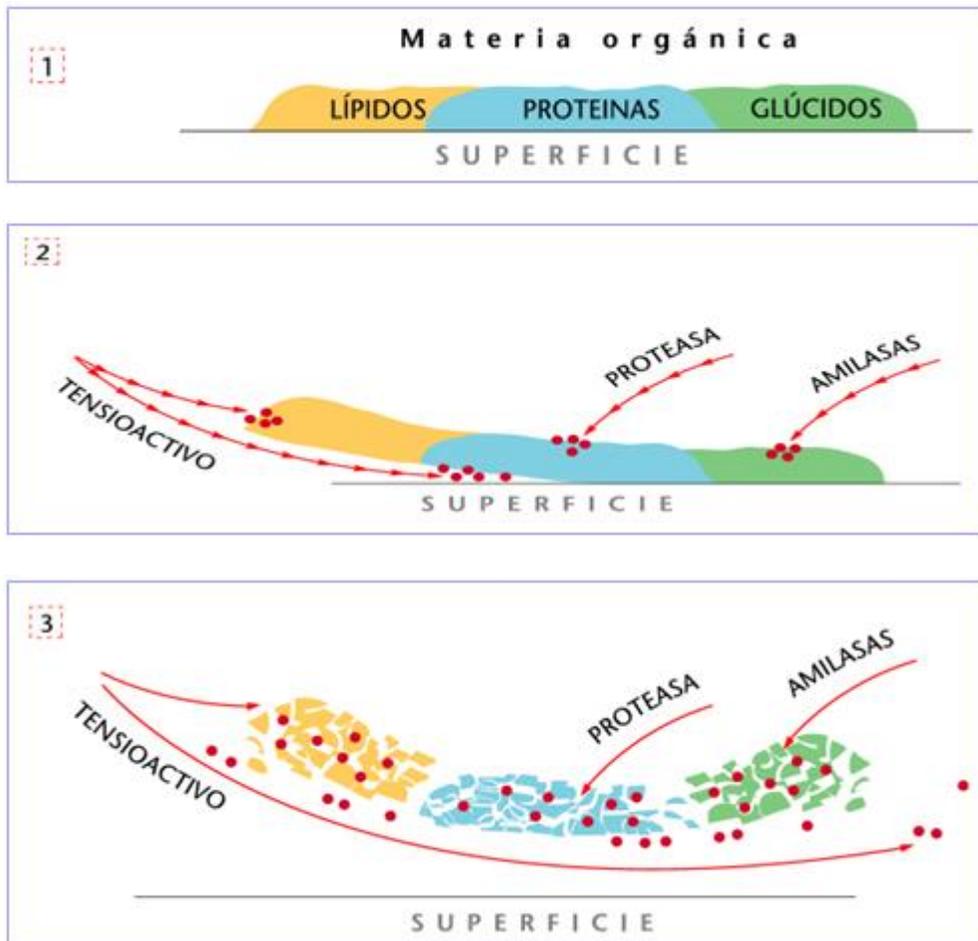


Figura 7. Mecanismo de funcionamiento de los detergentes biológicos de ropa

Cuando se usan enzimas en el detergente se sigue llevando a cabo el mismo proceso, pero las enzimas facilitan el proceso, ayudando a hidrolizar los componentes de la “suciedad” y a solubilizarlos en el medio, permitiendo así la remoción de los mismos de la fibra.

2.8.1 Enzimas en detergentes

La idea de utilizar enzimas en detergentes surge en 1913 por el alemán Otto Röhm, sin embargo, no es hasta 1959 cuando sale a la venta el primer detergente comercial con enzimas. Debido a ello en esta época se comienzan a producir enzimas en grandes cantidades industriales y rápidamente se convirtieron en el componente clave de los detergentes (Vojviv, 2015; Heinz, 2004).

La subtilisina de Carlsberg proveniente de *B. licheniformis* fue de las primeras proteasas usadas en detergentes y aun hoy día es la más usada en formulaciones de detergentes (Lin, 2013). Sin embargo, pese a su popularidad, día con día se siguen buscando nuevas enzimas con propiedades que puedan ser útiles en el proceso de lavado. Actualmente en el mercado hay varias proteasas disponibles, la tabla 6 muestra algunas.

Tabla 6. Enzimas usadas en detergentes que se encuentran en el mercado (Serj,1998).

Nombre comercial	Microorganismo	pH
Alcalase [®]	<i>Bacillus spp.</i>	6-10
Esperase [®]	<i>Bacillus spp.</i>	7-12
Everlase [™]	<i>Bacillus GMO</i>	8-11
Savinase [®]	<i>Bacillus GMO</i>	8-11
Durazym [®]	<i>Bacillus GMO</i>	8-11
Neutrase [®]	<i>Bacillus spp.</i>	6-8
Protamex [™]	<i>Bacillus spp.</i>	6-8
FLavouryme [™]	<i>Aspergillus spp.</i>	4-8
Trypsin	páncreas	7-9

Las enzimas que son usadas en detergentes deben contar con al menos 3 características que les permitan ser activas durante el lavado, 1) deben ser activas en pH alcalinos, dado que es el pH que tienen los detergentes, 2) deben trabajar en un rango de temperaturas de 20-50°C y 3) ser compatibles con los componentes del detergente, como ser estable en presencia de agentes oxidantes (Vojviv, 2015).

La demanda de enzima con estas características ha llevado en años recientes a la investigación de obtención de enzimas mediante la mutagénesis sitio-dirigida, gracias a la cual se pueden generar enzimas que sean más estables a las condiciones en que van a ser usadas (Lin, 2013). También se ha estudiado la generación de peroxiácidos por proteasa tipo subtilisina (Vojviv, 2015; Despotovic,2013; Kirk, 1994).

3. ANTECEDENTES

En el grupo de trabajo se inició una investigación sobre las carboxilesterasas, específicamente del microorganismo *Aspergillus nidulans* PW1 (Kawasaki et al., 1995) debido a las múltiples aplicaciones de estas enzimas en la industria. Las carboxilesterasas de *A. nidulans* no habían sido estudiadas en ese momento. Y se encontró en el grupo de trabajo, que enzimas extracelulares en *A. nidulans* que presentaban actividad de carboxilesterasa, se producen cuando en el medio hay como fuente de carbono lípidos. Posteriormente en 2007, Peña-Montes purificó, identificó y caracterizó una de las tres enzimas observadas en ese medio inducido con lípidos de *Aspergillus nidulans* PW1. Esta presentaba actividad de carboxilesterasa, con un peso de 37 kDa como se muestra en la figura 8, sin embargo, los resultados de identificación de la proteína mostraron que esa enzima era la proteasa PrtA que presenta actividad promiscua de esterasa.

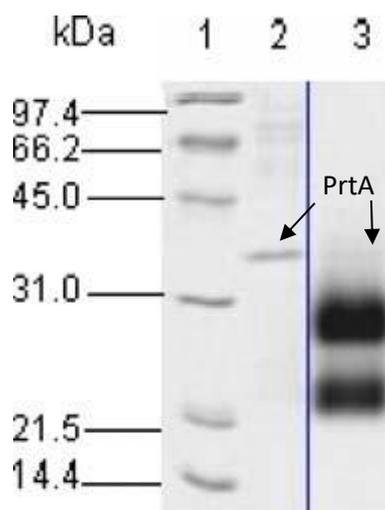


Figura 8. Perfil de proteínas en geles SDS-PAGE y Zimograma de actividad esterasa del extracto crudo de *A. nidulans* conteniendo la proteína PrtA. Carril 1: MPM Low Range (Biorad), Carril 2: Enzima PrtA Pura, Carril 3: Zimograma de actividad esterasa del extracto crudo a 24 h. (Peña-Montes, 2007).

Esta enzima se caracterizó utilizando sustratos de esterasa y lo encontrado se resume en la tabla 7 (Peña-Montes, 2007).

Tabla 7. Características de la enzima PrtA de *A. nidulans* PW1 como esterasa

CARACTERISTICAS de la PrtA (Actividad de Esterasa)	
pH	7- 11 Max. pH=8 /12h
Temperatura	30 °C – 60°C Hasta 70°C/ 30 min
Efecto de metales	Cu ²⁺ y Fe ²⁺ aumentan actividad EDTA no afecta la actividad esterasa
Soporte	Celite 545

Cuando se identificó la enzima pura, resultó ser el producto del gen *prtA* que codifica para una proteasa alcalina y que resulta además ser la proteasa con mayor actividad extracelular de *A. nidulans* (Katz, 1994; vanKuyk,2000). Anteriormente esta proteasa había sido estudiada por Cohen en 1973.

Estos resultados dejaron ver que la enzima es promiscua al presentar ambas actividades; lo cual no es de extrañar, dado que para 1976 Holmquist había demostrado como un neutral zinc-proteasa presentaba además actividad esterasa, atribuyéndolo a la similitud de los mecanismos catalíticos (Holmquist,1976).

Posteriormente Castro-Ochoa intentó clonar esta proteasa en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, encontrando que la proteína resulta citotóxica para ambos hospederos. En la Figura 9 se observa un aumento en la cantidad y variedad de proteínas en el extracto extracelular de *P. pastoris* a las 48 h debido a la proteólisis de las células (Castro-Ochoa, 2013).

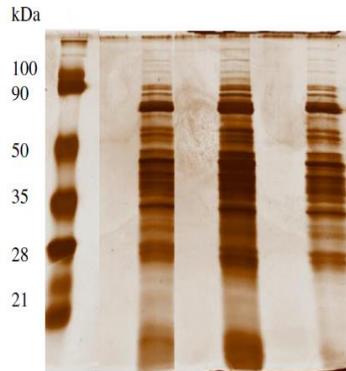


Figura 9. Perfil de proteínas en geles SDS-PAGE del extracto crudo de las diferentes clonas recombinantes de *P.pastoris* (Castro-Ochoa, 2013). Carril 1: MPM. Carril 2 y 3: Extracto de la clona PM-H1 a 24 h 48h respectivamente. Carril 4 y5: Extracto de la clona PM-H3 a 24 h 48h respectivamente. Carril 6 y 7: Extracto de la clona PM-H4 a 24 h 48h respectivamente

Una vez que se encontró que la proteasa PrtA es citotóxica para los sistemas de expresión evaluados, se optó por optimizar el medio de producción de la enzima con el fin de aumentar la cantidad de la proteasa PrtA. Se logró incrementar hasta 6.5 veces la actividad proteolítica, con un medio mínimo suplementado con extracto de carne (Castro-Ochoa, 2013).

4. JUSTIFICACIÓN

Las proteasas son el principal grupo de enzimas utilizado en la industria (Aissaoui et al., 2014; Singhal et al., 2012). Debido a que se les han encontrado diversos usos tanto en la industria del cuero, textil, de detergentes y alimentaria.

De acuerdo con las características que presenta la enzima PrtA de *A. nidulans*, (*En actividad esterasa trabaja a pH alcalinos y altas temperaturas*) puede ser de gran interés para la industria. Por lo que en este trabajo se estudiarán las características de esta enzima, utilizando sustratos para proteasas y se evaluará su posible aplicación en detergentes. Al ser una enzima que presenta actividad proteasa y esterasa, (actividades necesarias en detergentes) su uso en detergentes supondría una ventaja para la industria.

5. HIPÓTESIS

Dado que la PrtA es una proteasa que presenta actividad esterasa, encontrándose de esta última que trabaja a altas temperaturas y pH alcalinos, se podrá aplicar en la industria de detergentes.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

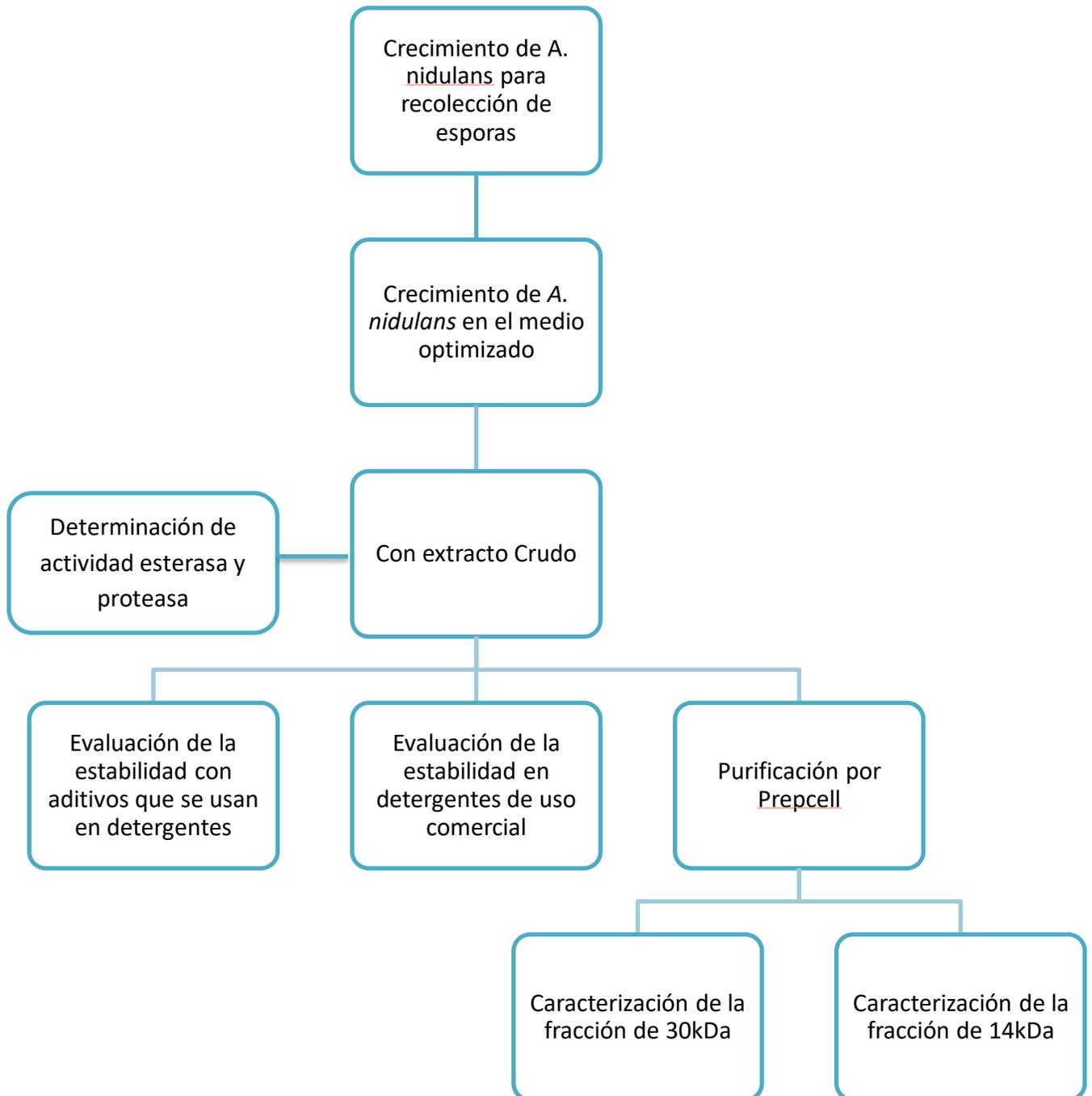
- ✓ Caracterizar la enzima PrtA con sustratos proteolíticos y evaluar la aplicación de la proteasa en detergentes biológicos.

6.2 Objetivos Particulares

- ✓ Producción de la proteasa PrtA de *A. nidulans*
- ✓ Purificación y caracterización de la proteasa PrtA
- ✓ Evaluar su estabilidad en presencia de los componentes de detergentes.
- ✓ Evaluar estabilidad en detergentes comerciales

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.0.0. Diagrama de la metodología



7.1.1 Material biológico.

Reactivación de *A. nidulans*

La cepa de *Aspergillus nidulans* PW1 auxotrofa a arginina fue proporcionada por el Dr. Jesús Aguirre del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las esporas de *A. nidulans* se conservaban en sílice gel a 4 °C, para reactivar al microorganismo se prepararon 10 cajas de Petri con medio mínimo (Kafer, 1977).

En una caja con medio mínimo se adicionaron 5 granos de sílice gel con las esporas de *A. nidulans* PW1 y se incubó durante cinco días a 37 °C. Posteriormente se tomó micelio de esta caja y se inocularon por picadura las 9 cajas restantes y se incubaron a 37 °C por cinco días.

7.1.2 Preparación de medio mínimo

Se elaboró el medio mínimo de acuerdo a lo descrito por Kafer (1977), en la siguiente tabla se muestra la composición.

Tabla 8. Composición del medio mínimo para *Aspergillus nidulans*

Compuesto	Concentración
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza 100x	1 mL/L
Glucosa	10g /L
Agar	12.5 g/L
Arginina	5.0 mL /L
Biotina	0.5 mL/L
Metionina	0.11 g/L

Se adicionaron los 4 primeros compuestos y se ajustó el pH a 6.5 con una solución de NaOH 1.0 N , se esterilizó a 121 °C por 15 minutos en una autoclave (SM300,

Yamamoto). Se dejó enfriar y posteriormente se adicionaron al medio mínimo los requerimientos nutricionales (arginina, biotina y metionina) en condiciones estériles.

En las tablas siguientes se describe la composición de las sales 20x y los elementos traza 100x.

Tabla 9. Composición de las sales 20x

Compuesto	Concentración
NaNO₃	120 g/L
KCl	10.4 g/L
MgSO₄·7H₂O	10.4 g/L
KH₂PO₄	30.4 g/L

Las sales se preparan adicionando cada compuesto en el orden descrito en la tabla y posteriormente se esterilizan a 121°C y se guardan a 4°C.

Tabla 10. Composición de los elementos traza 100x

Compuesto	Cantidad
ZnSO₄ ·7H₂O	2.20 g
H₃BO₃	1.10 g
MnCl₂· 4 H₂O	0.50 g
FeSO₄ ·7 H₂O	0.50g
CoCl₂ ·6 H₂O	0.16 g
CuSO₄ · 5 H₂O	0.16 g
(NH₄)₆Mo₇O₂₄· 4 H₂O	0.11 g
NH₄EDTA	5.00 g

Para la preparación de los elementos traza 100x, los compuestos descritos en la tabla 10 se adicionaron en el orden descrito a un volumen de solución de 80 mL de agua destilada, disolviendo perfectamente cada uno antes de agregar el siguiente. Se calentó la solución a ebullición y se dejó enfriar a temperatura ambiente para posteriormente aforar a 100 mL. Se almacenaron en un frasco ámbar a 4°C.

En la siguiente tabla se muestra la concentración de los requerimientos nutricionales.

Tabla 11. Requerimientos nutricionales para *A. nidulans* PW1

Compuesto	Concentración	Solución Stock
Arginina	5.0 mL /L	16.8 %
Biotina	0.5 mL/L	0.05 %
Metionina	0.11 g/L	---

La solución stock de arginina se prepara disolviendo la arginina en agua destilada, mientras que la solución stock de biotina se disolvió en etanol al 70 %. Se esterilizó cada disolución utilizando una membrana de 0.22 μ m, debido a que estos requerimientos nutricionales son termosensibles.

7.1.3 Cosecha y conteo de esporas

Para cosechar las esporas se agregaron 10 mL de tween 80 al 0.1% estéril a cada una de las 10 cajas de Petri, tras los 5 días de ser incubadas a 37 °C. Con mucho cuidado se rasparon las esporas con un asa micológica y posteriormente se recuperaron en un tubo falcón de 50 mL estéril. El contenido se centrifugó durante 15 minutos a 10,000 rpm y se desechó el sobrenadante, se adicionaron 5 mL de agua destilada estéril y nuevamente se centrifugó con las mismas condiciones, este procedimiento se repitió 2 veces más y finalmente se resuspendieron las esporas en 5 mL de agua estéril y se conservaron a 4 °C.

Para el conteo de esporas se utilizó la cámara de Neubauer, se colocó un cubre objetos en la cámara y 10 μ L de las esporas en cada extremo de la cámara, así por medio de capilaridad se llena la cámara. Luego se coloca la cámara de Neubauer en el microscopio y se cuentan las esporas de 5 de los 25 cuadros de los cuales está compuesta, así con el promedio de estos valores se obtuvo la cantidad de esporas necesarias para tener una concentración de 1×10^6 esporas/mL.

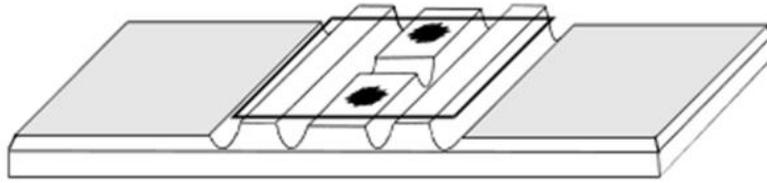


Figura 10. Cámara de Neubauer. Esquema tomado de www.marienfeld-superior.com

7.2.0 Producción de la proteasa PrtA

7.2.1 Medio optimizado para la proteasa PrtA de *A. nidulans*

El medio mínimo utilizado se modificó según lo encontrado por Castro-Ochoa et al, 2013, para una mayor obtención de la PrtA de *A. nidulans*. La composición se encuentra en la tabla 12.

Tabla 12. Medio mínimo con 0.5% de extracto de carne y sin glucosa

Componentes	Concentración
Sales 20x	50 mL /L
Elementos traza	1 mL /L
Extracto de carne	5 g / L
Arginina	5 mL/L*
Biotina	0.5 mL/L*
Metionina	0.11g /L

* Cantidad de las soluciones stock

Para la preparación del medio de cultivo se adicionaron primero las sales 20x, los elementos trazas 100x y el extracto de carne en agua destilada y se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 0.1N. Posteriormente se esterilizó a 121 °C por 15 min y 15 lb de presión en autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente, una vez que se

enfrió, en condiciones de esterilidad se añadieron los requerimientos nutricionales (Arginina, metionina y Biotina) ya estériles.

Se repartió el medio de cultivo en 10 matraces Erlenmeyer de 250 mL estériles con 50 mL de medio y se añadió la cantidad de esporas suficientes para tener una concentración de 1×10^6 esporas/mL de *A. nidulans*.

Todos los matraces se incubaron a 37 °C y 300 rpm durante 24 h. Transcurrido este tiempo se filtra el contenido y se elimina el micelio. El extracto crudo obtenido se coloca todo junto en un matraz estéril de 1L. Se determina la cantidad de proteína por Bradford y actividad enzimática y finalmente se concentra por ultrafiltración.

7.2.2 Ultrafiltración

Se ultrafiltró el extracto crudo para concentrar la cantidad de proteína obtenida 10 veces, para ello se utilizó el sistema Amicon (Millipore™) con una membrana con límite de exclusión de 10 KDa. Se concentró 10 veces el extracto crudo y se cambió el medio por un amortiguador de pH de 8 de Tris/HCl 0.1M. Se alicuotó en tubos eppendorf de 2 mL, los cuales se mantuvieron en congelación hasta su utilización. Se analizó el extracto crudo concentrado en términos de contenido de proteína y de actividad enzimática.

7.3.0 Determinación de la actividad enzimática y cantidad de proteína

7.3.1 Cuantificación de proteína

Se determinó la cantidad de proteína utilizando el método de Bradford (1976). Se colocó en un pozo de microplaca 160 µL de la muestra (en el caso del blanco se utilizó el buffer de trabajo) y se añadieron 40 µL del reactivo de Bradford (Biorad™), se homogenizó perfectamente la muestra sin formar burbujas en la microplaca y se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Tras lo cual se leyó la absorbancia en el Epoch (Biotek) utilizando el programa Gen5.1.10 a una longitud de onda de 595 nm. Dependiendo de la cantidad de proteínas se realizaron diluciones de la muestra, para que los valores obtenidos se encontraran en el rango de la curva

patrón (Anexo A). En la realización de la curva patrón se utilizó albúmina como estándar.

7.3.2 Determinación de la actividad esterasa

7.3.2.1 Evaluación cualitativa de la actividad esterasa en microplaca

Se determinó la actividad esterasa utilizando acetato de α -naftilo (α -NA) y Fast Red (FR) como reactivos, esta reacción se basa en que las enzimas con actividad esterasa hidrolizan el α -NA, liberando α -naftol el cual reacciona con el Fast Red (sal de diazolio) dando como resultado la formación de un cromóforo de color rojo muy intenso hasta marrón indicando así que la prueba es positiva (Karpushova, 2005).

En un pozo de microplaca se adicionaron 75 μ L del buffer de trabajo (Tris/HCl 0.1M pH 8), el cual se usó como blanco y en los otros pozos se adicionó la misma cantidad, pero de la muestra. Tanto al blanco como a las muestras se adicionaron 75 μ L de la solución de α -NA y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 75 μ L de la solución de Fast Red a cada pozo y se deja incubar algunos segundos, la formación de un compuesto colorido indica que la prueba es positiva y que la muestra presenta actividad esterasa.

Preparación de las soluciones

- ☞ Solución de α -NA: Se pesaron 4 mg de acetato de α -naftilo, se disolvieron en 1 mL de acetona y se llevó a un volumen final de 10 mL con en buffer Tris/HCl 0.1M pH 8.
- ☞ Solución de Fast Red: Se pesaron 5 mg de FR, se adicionaron 500 μ L de una solución de triton X-100 al 10% y se llevó a un volumen final de 2 mL con el buffer de trabajo

7.3.2.2 Evaluación cuantitativa de la actividad esterasa en microplaca

Para medir la actividad esterasa se usó como sustrato acetato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPA) 1mM. Para el blanco se adicionaron en un pozo de la microplaca 180 μ L de buffer de trabajo (pH 8), mientras que para las muestras se adicionaron 170 μ L del buffer. A cada pozo incluido el blanco, se le añadió 20 μ L de *p*-NPA 1mM mezclando perfectamente sin formar burbujas. Justo antes de medir se añadió a cada pozo, con excepción del blanco, 10 μ L de muestra del extracto crudo concentrado e inmediatamente se monitoreo la cinética durante 10 minutos tomando la lectura de absorbancia cada minuto a 420 nm en un espectrofotómetro Epoch (Biotek), usando el programa Gen5 1.10.

Preparación del stock de *p*-NPA

- ☞ Se preparó un stock de *p*-NPA 10 mM en etanol de la cual se tomaron 100 μ L y se añadieron 900 μ L de etanol para tener el sustrato en una concentración 1mM

Para determinar la cantidad de *p*-nitrofenol (*p*-NP) que se formó, se usó una curva patrón de *p*-nitrofenol la cual se encuentra en el anexo B. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto. En la figura 11 se muestra la reacción que lleva acabo la enzima.

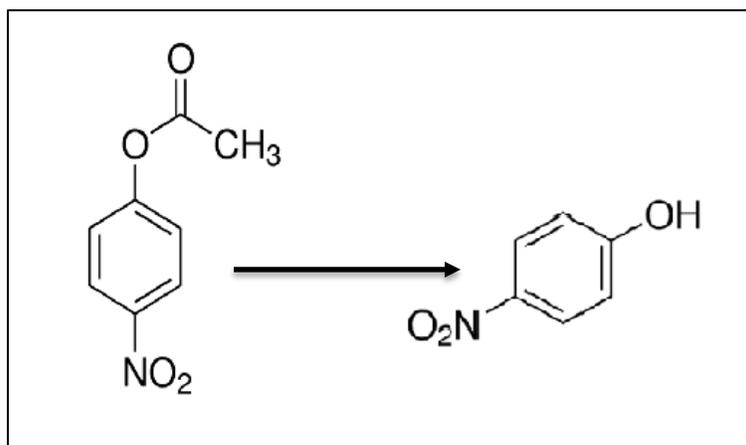


Figura 11. Reacción de hidrólisis de acetato de *p*-nitrofenilo.

7.3.3.0 Determinación de la actividad proteasa

7.3.3.1 Evaluación de la actividad proteasa con caseína

La actividad proteasa se determinó por el método descrito por Kunitz en 1946, con algunas modificaciones, usando caseína de Hammerstein como sustrato.

☞ Se preparó una solución de caseína 1% en buffer Tris/HCl pH=8

Se mezclaron en un tubo eppendorf 100 μ L de enzima con 300 μ L de la solución de caseína al 1% y 400 μ L de buffer, en el caso del blanco en lugar de enzima se adicionaron 800 μ L de buffer Tris/HCl pH 8. Se incubó la mezcla 30 minutos a 40 °C, transcurrido este tiempo se adicionó a cada mezcla 800 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se centrifugó la mezcla a 10000 rpm por 15 min a 4°C en la centrifuga Biofuga (Heraeus), para eliminar el precipitado. Del sobrenadante se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm.

Una unidad de actividad proteasa (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ g de tirosina por minuto. Para determinar la cantidad de tirosina liberada se usó una curva estándar de tirosina (Anexo C)

7.3.3.2 Evaluación de la actividad proteasa con colágeno y elastina

Para determinar la actividad con colágeno fue usado como sustrato Hide Power Azure (HPA) (Rinderknecht, et al., 1968) y para la actividad con elastina se usó Elastin congo red (ECR) (Kessler, et al., 1993). En ambas determinaciones se pesaron 5 mg del sustrato, se añadieron 950 μ L de buffer Tris/HCl pH 8 y 50 μ L de la muestra. Todo esto se hace reaccionar por 60 min a 37°C y 600 rpm, una vez terminado el tiempo se detiene la reacción a 4°C por 10 minutos y se centrifuga a 10,000 rpm durante 10 min.

En el caso de la prueba con HPA esta se lee a 595 nm y la prueba con ECR se lee a 495 nm, en cada prueba se realizó por triplicado y con su respectivo blanco. Una

unidad de actividad (U) se definió como $U = \frac{0.01 \text{ abs}}{h * mg \text{ de sustrato}}$ en ambos casos.

7.3.3.3 Evaluación de la actividad proteasa con azocaseína

Esta actividad fue determinada de acuerdo a lo descrito por Hazen en 1965. Para determinar la actividad con este sustrato se preparó en el instante una solución al 1.5% de azocaseína, y se preparó un control del extracto, un blanco y las muestras a analizar de acuerdo a lo mostrado en la siguiente tabla.

Tabla 13. Reactivos para la determinación de la actividad proteasa usando azocaseína

Reactivo	Muestra (mL)	Control de Extracto (mL)	Blanco (mL)
Azocaseína	0.5	-----	0.5
Buffer pH 8	-----	-----	0.1
Extracto con enzima	0.1	0.1	-----
TCA 20%	-----	0.5	-----
Incubar 60 min 40°C/ 800rpm			
TCA 20%	0.5	-----	0.5
Azocaseína	-----	0.5	-----
Incubar a temperatura ambiente por 30 min sin agitación			

Se centrifugó a 8500 rpm durante 20 min y se separó el sobrenadante el cual se lee a 440 nm, una unidad de actividad (U) se definió como $U = \frac{0.01 \text{ Abs } 440 \text{ nm}}{\text{mg de proteína} \cdot \text{h}}$

7.3.3.4 Evaluación de la actividad de proteasa con gelatina succinilada

Se usó gelatina succinilada como sustrato la cual se obtuvo según lo descrito por Baragi, 2000. Para realizar la prueba, primero se determina la cantidad de proteína en el sustrato.

La prueba se realiza en microplaca. Se añaden 150 µL de gelatina succinilada a cada pozo menos en donde será el blanco, ahí se añaden 150 µL de buffer de trabajo. Posteriormente a cada pozo, incluido el del blanco, se adicionan 50 µL de enzima y se deja incubar por 20 min a 37°C.

Para detener la reacción se añade TNBS 0.03% y se deja por 20 minutos a temperatura ambiente. Lo último es leer la absorbancia a 450 nm. Una unidad enzimática se definió como la $U = Abs_{450\text{ nm}} / \text{min} * \text{mg de proteína}$

7.4.0 Evaluación del perfil de proteínas y determinación de actividad enzimática “*in situ*”

7.4.1 Perfil de proteínas en geles SDS-PAGE

Para determinar el perfil de proteínas en el extracto crudo se realizó en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) usando como agente desnaturalizante dodecil sulfato de sodio (SDS) y como agente reductor el β -mercaptoetanol el cual junto con la muestra es calentado por 5 min a 95°C (Laemmil, 1970). Se realizó un gel discontinuo en el cual se usó el gel concentrador al 4% y el gel separador al 14%, como se muestra en la tabla 14. Se utilizó marcador de bajo peso molecular de Biorad.

Tabla 14. Composición de SDS-PAGE para 2 geles.

Reactivos	Gel separador 14%	Gel concentrador 4 %
Buffer (mL)	3.75*	1.6**
Acrilamida/bis-acrilamida 30 % (mL)	7.05	0.9
H ₂ O desionizada (mL)	4.05	4.06
SDS 10% (μL)	150	66.6
APS 10% (μL)	75	33.5
TEMED (μL)	7.5	6.6

* Buffer usado es Tris/HCl pH 8.8

** Buffer del gel concentrador es Tris/HCl pH 6.8

Las muestras se corrieron durante 20 minutos a 80 mVolts hasta que el frente de corrida llegó hasta el gel separador, después de lo cual se cambió el voltaje a 120

mVolt en una cámara de electroforesis Miniprotean II, BioRad. Los geles se revelaron con una solución teñidora de azul de coomassie.

7.4.2 Zimograma para actividad Esterasa

Se realizó un gel SDS-PAGE de la misma manera anteriormente descrita, solo que la muestra en este caso no se calentó antes de cargarse en el gel.

Después de que se llevó a cabo la electroforesis el gel se enjuago con un poco de buffer de trabajo y se incubó por 30 minutos en una solución de buffer Tris/HCl pH 8 con Tritón X-100 al 5% para renaturalizar la enzima, luego se enjuagó de nuevo con el buffer de trabajo y se dejó a incubar toda la noche en una solución de buffer 0.5% de tritón X-100. Transcurrido el tiempo de incubación se dejó en una solución de α -NA durante 15 minutos con agitación constante a temperatura ambiente.

- ☞ **Solución de α -NA:** se pesan 20 mg de acetato de α -naftilo, se disuelven en 5 mL de acetona y se llevó a un volumen final de 50 mL con el buffer de trabajo
- ☞ **Solución de Fast Red:** Se pesan 50 mg de FR, se añade 150 μ L de una solución de Tritón X-100 al 10% y se lleva a un volumen de 50 mL con el buffer de trabajo

Finalmente se adiciona la solución de FR hasta que se observó la tinción de las bandas color marrón que indican que la muestra si presenta actividad esterasa.

7.4.3 Zimograma para Actividad Proteasa

Se preparó un gel SDS-PAGE como se menciona en la sección 7.4.1, solo que en este caso al gel separador se añadió gelatina al 0.1% y la muestra no se calentó al momento de cargarla (Jaouadi et al. 2008). Una vez que se llevó a cabo la electroforesis, el gel se dejó incubando en buffer pH 8 con Tritón X-100 al 0.5% durante 48 h a 37 °C con agitación constate. Finalmente, el gel se tiñó con Azul de coomassie

7.5.0 Identificación de enzimas que presenta actividad proteolítica

Las proteínas que presentaron actividad proteasa se identificaron mediante el sistema LC MS/MS (“Liquid chromatography-tandem mass spectrometry”) o Cromatografía líquida acoplada a espectros de masa en tándem, en la unidad de Proteómica de la USAI, UNAM.

Esta técnica consiste en la obtención de péptidos pequeños de la proteína mediante la digestión enzimática con tripsina y su posterior análisis por espectroscopía de masas. Una vez obtenida la secuencia de los péptidos, estos se comparan con un banco de datos como UniProt (“Universal Protein Resource”) para identificar la proteína de forma muy segura.

7.6.0 Purificación de la enzima PrtA

La purificación de la PrtA fue realizada por electroforesis en gel usando el equipo PrepCell de Biorad, Esta consiste en una electroforesis de elución continua en un gel de poli(acrilamida) con SDS (Gel separador del 12% y concentrador de 4%).

Para cargar la muestra ésta se concentró mediante ultrafiltración hasta tener 5-7 mg de proteína en un volumen de 5 mL. Sin calentarse la muestra se mezcló con SDS y β -mercaptoI, y se cargó al equipo. Se dejó correr primero a 10 Watts hasta la salida del frente de corrida y luego a 12 Watts durante 24 h, todo esto en la cámara fría a 4°C

Se colectaron 80 fracciones de 6 mL (Asesorado por el Dr. Augusto Gonzalez Canto). Cada fracción se corría en zimograma de actividad proteasa con gelatina para determinar las fracciones donde se encontraba presente la enzima de interés.

7.7.0 Caracterización de la enzima PrtA como proteasa

7.7.1 Efecto del pH en la actividad proteasa

Para determinar el pH óptimo de la enzima como proteasa se realizó la prueba por el método mencionado en el punto 7.3.3.1, solo que en lugar de usar buffer Tris/HCl pH 8 se usó cada uno del buffer con diferentes pH. Los buffers usados fueron para pH 4 y 5 buffer de acetato 0.1M; para pH 6 y 7 buffer de Fosfatos 0.1M, para pH 8 y 9 buffer Tris/HCl 0.1M y finalmente para pH 10 y 11 buffer CHES 0.1 M. La prueba se realizó por triplicado y con su respectivo blanco para cada condición.

7.7.2 Efecto de la temperatura en la actividad Proteasa

Para determinar la temperatura óptima de la enzima como proteasa se determinó por el mismo método la actividad, pero esta vez usando diferentes temperaturas y como buffer el que es óptimo para la enzima. Las temperaturas usadas fueron 30, 40, 50, 60, 70, y 80 °C. La prueba se realizó por triplicado y con su respectivo blanco para cada condición.

7.7.3 Determinación de especificidad de sustrato

Se determinó la actividad de la enzima frente a diferentes sustratos, los sustratos usados fueron caseína, azocaseína, elastina, colágeno y gelatina succinilada. Cada sustrato fue determinado acorde a lo descrito anteriormente para cada sustrato.

7.7.4 Efecto de los iones en la actividad proteasa

Para determinar el efecto de diferentes iones en la actividad proteasa de la enzima, se midió la actividad por el método descrito en el punto 7.3.3.1 solo que en el buffer se encontraba disuelto con anterioridad la cantidad necesaria de cada ion, para que en el volumen final estos estuvieran a concentración 1 y 10 mM. Los iones probados fueron Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , y EDTA. Antes de la prueba la enzima fue tratada con EDTA 10 mM por 3 h para eliminar cualquier ion que estuviera presente en la muestra y que afectara los resultados

7.8.0 Caracterización de la enzima PrtA como esterasa

7.8.1 Efecto del pH en la actividad esterasa

Para determinar el pH óptimo de la enzima como esterasa se realizó la prueba usando *p*-NPA por el método mencionado en el punto 7.3.3, solo que en lugar de usar buffer Tris/HCl pH 8 se usó cada uno del buffer con diferentes pH. Los buffers usados fueron para pH 4 y 5 buffer de acetato 0.1M; para pH 6 y 7 buffer de Fosfatos 0.1M, para pH 8 y 9 buffer Tris/HCl 0.1M y finalmente para pH 10 y 11 buffer CHES 0.1 M. La prueba se realizó por triplicado y con su respectivo blanco para cada condición.

7.8.2 Efecto de la temperatura en la actividad esterasa

Para determinar la temperatura óptima de la enzima se determinó la actividad por el mismo método, pero esta vez a diferentes temperaturas y usando como buffer el que es óptimo para la enzima. Las temperaturas usadas fueron 30, 40, 50, 60, 70, y 80 °C. La prueba se realizó por triplicado y con su respectivo blanco para cada condición.

7.8.3 Determinación de especificidad de sustrato

Se determinó la actividad de la enzima frente a diferentes *p*-NP esteres a una concentración 1mM en etanol. Los *p*-NP esteres usados fueron: *p*-NPA (*p*-nitrofenilacetato) C2:0, *p*-NPB (*p*-nitrofenilbutirato) C4:0, *p*-NPO (*p*-nitrofenil Octanoato) C8:0, *p*-NPD (*p*-nitrofenil decanoato) C10:0, *p*-NPL (*p*-nitrofenil Laurato) C12:0, *p*-NPM (*p*-nitrofenil Miristato) C14:0, *p*-NPP (*p*-nitrofenil Palmitato) C16:0 y *p*-NPE (*p*-nitrofenil estearato) C18:0.

7.8.4 Efecto de los iones en la actividad esterasa

Para determinar el efecto de diferentes iones en la actividad esterasa de la enzima, se midió la actividad por el método descrito en el punto 7.3.2.2 solo que en el buffer se encontraba disuelto con anterioridad la cantidad necesaria de cada ion para que en el volumen final estos estuvieran a concentración 1 y 10 mM. Los iones probados

fueron Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , y EDTA. Antes de la prueba la enzima fue tratada con EDTA 10 mM por 3 h para eliminar cualquier ion que estuviera presente en la muestra y que afectara los resultados. La prueba se realizó por triplicado y con su respectivo blanco

7.9.0 Aplicación de las enzimas presentes en el extracto crudo de *A. nidulans* en detergentes comerciales

7.9.1 Efecto de los aditivos de detergentes en la actividad

El extracto crudo con cada aditivo en las diferentes concentraciones se incubó por 1 hora a 40°C tras lo cual se midió la actividad esterasa por el método 7.3.2.2 y la actividad proteasa usando gelatina succinilada y que esta descrita en la sección 7.3.3.4. Se tomó como control la actividad de la enzima sin ningún aditivo y para cada aditivo se realizó el correspondiente blanco. Los aditivos probados fueron: CTAB(Bromuro de cetiltrimetilamonio) 30 mM y 20mM, Zeolita 5%, 2%, y 1%, Triton-100X 10%, y 5%, Tween 80 10% y 5%, Tween 20 10% y 5%, urea 5% y 1%, Peróxido de hidrogeno 5% y 2%, Perborato de sodio 5% y 1%, SDS 2% y 1% y por último Span 80 5%

7.9.2 Efecto de diferentes detergentes para ropa en la actividad

Se probaron diferentes detergentes, tanto biológicos como no biológicos, con una concentración final junto con la solución de la enzima de 7mg/mL (Benkiar et al., 2013). Se incubaron por 1 hora a 40°C tras lo cual se midió la actividad esterasa por y la actividad proteasa usando gelatina succinilada. Se tomó como control el extracto crudo sin ningún detergente, y para cada detergente se realizó un blanco correspondiente. En el caso de los detergentes biológicos para desnaturalizar las enzimas presentes en estos, se calentaron las soluciones a 95°C por 1 hora, antes de adicionar la solución de la enzima. Los detergentes biológicos probados fueron: Carisma, Persil en polvo, Roma, Foca, Tilde líquido, Mas color líquido, Persil liquido; y los detergentes no biológicos fueron Ariel y 1,2,3.

8. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Proteasa en el genoma de *A. nidulans*.

En la base de datos “Aspergillus Genome Database”, se encuentran todas las proteasas putativas del genoma de *Aspergillus nidulans*. Con el programa “SignalP 4.1 Server” se determino cuantas de estas proteasas putativas pueden ser extracelulares y cuantas intracelulares. Los resultados se muestran en la figura 12.

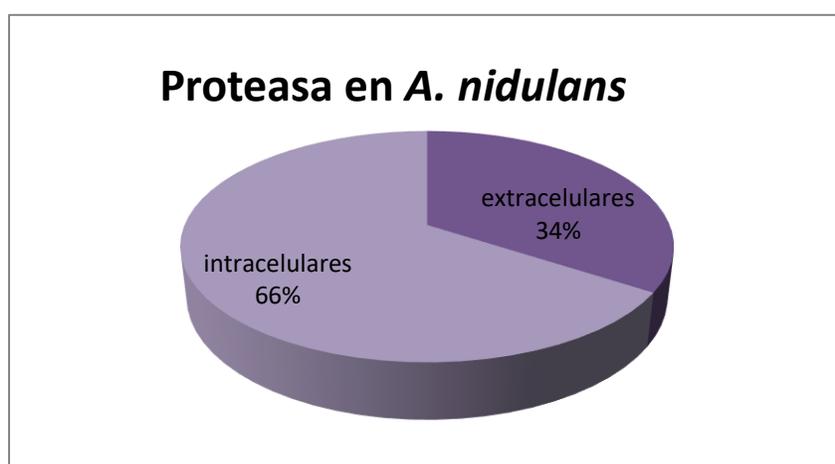


Figura 12. Distribución de las proteasas putativas de *A. nidulans*.

Como se puede observar en la figura 12 el 34% de las enzimas putativas con actividad proteolítica en *A. nidulans* son extracelulares, mientras que el 66% restante son intracelulares. Se encontraron en el genoma un total de 79 proteasas putativas, pero de estas solo 2 han sido caracterizadas. Una es la PepJ (Emri, 2009) y la otra es la PrtA (Peña-Montes, 2008), cabe recordar que esta última fue caracterizada como esterasa por el grupo de trabajo.

8.2 Extracto Crudo

La Producción de la proteasa PrtA de *A. nidulans* se llevó a cabo según lo descrito por Castro-Ochoa en 2013. Se concentró 10 veces el extracto crudo y se determinó la cantidad de proteína presente en el mismo. La concentración promedio en este medio fue **55.2±0.9 µg/mL** (±SD), 2.7 veces más que lo reportado por Castro-Ochoa en el 2013 (20.3±0.5 µg/mL). Sin embargo, cabe mencionar que este medio se diseñó para tener la mayor actividad de proteasa, y no la mayor concentración de proteínas.

El perfil de proteínas del extracto crudo se muestra en la figura 13 y se observa que hay al menos 4 bandas de proteínas intensas y 3 bandas con baja intensidad presentes en el extracto crudo, esto concuerda con el perfil encontrado por Castro Ochoa en 2013 para el medio que hemos utilizado. La banda con peso de 37 kDa había sido observada en 2007 por Peña-Montes y luego en 2013 por Castro-Ochoa, en ambas ocasiones la banda fue identificada como la PrtA y en la primera ocasión fue caracterizada como esterasa ya que en ese trabajo se buscaban enzimas CEH (carboxil esterases) y al realizar la identificación resultó ser la proteasa.

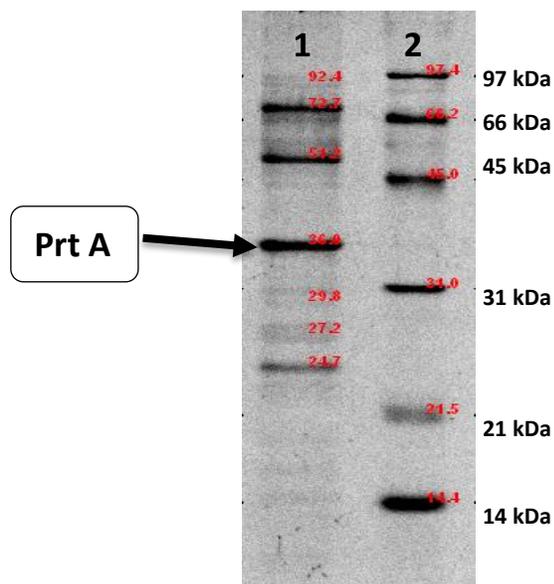


Figura 13. Perfil de Proteínas en SDS-PAGE del extracto crudo concentrado. Tinción con coomassie. Gel representativo de 3 repeticiones. Carril 1 Extracto enzimático. Carril 2 MPM Low Rang Biorad

8.2.1 Actividad esterasa

Se determinó la actividad esterasa en el extracto crudo. La prueba cualitativa se observa en la figura 14 en la cual se muestra que si hay actividad esterasa en el medio proveniente de alguna enzima con actividad de CEH.

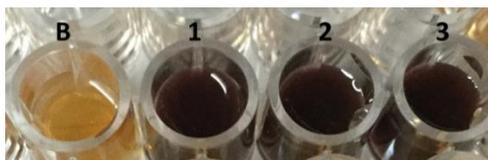


Figura 14. Actividad esterasa cualitativa con FR y α -NA del extracto crudo. En donde B es el blanco. Los números son las diferentes repeticiones

Para la medición cuantitativa se utilizó como sustrato *p*-NPA 1 mM, los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla

Tabla 15. Actividad esterasa cuantitativa del extracto.

Repetición	Actividad (U)	Actividad específica(U/mg)
1	34.29	621.31
2	33.79	625.06
3	34.50	612.13
Promedio	34.20±0.36	619.50±6.65

Si bien en la prueba anterior se observa que hay actividad esterasa en extracto de *A. nidulans*, con esta prueba se determinó el valor de dicha actividad obteniéndose una actividad específica promedio de **619.5±6.6** (U/mg). Para determinar de qué enzima o enzimas provenía dicha actividad, se realizó un zimograma para actividad esterasa del mismo extracto crudo el cual se muestra en la figura 15.

El zimograma se realizó en dos condiciones. La primera consistía en calentar la muestra antes de correr el gel y en la segunda no se calentaba la muestra, para

ambas condiciones se realizó un perfil de proteínas. Se observa que al calentar la muestra (carril 3) solo hay una banda que recupera la actividad esterasa y su peso coincide con la enzima observada por Peña-Montes en 2007, que como se había mencionado antes, es la PrtA. Sin embargo, cuando el extracto crudo no es calentado (carril 6) la actividad se detecta en un peso mucho mayor. Al comparar los carriles 5 y 6, que corresponden a las mismas condiciones, se observa que la actividad proviene de enzimas que se encuentran en un peso de 97 y 66 kDa. En esta segunda condición no se observa la banda de 37 kDa. Para determinar qué clase de qué enzimas se trataba se enviaron al proceso de identificación.

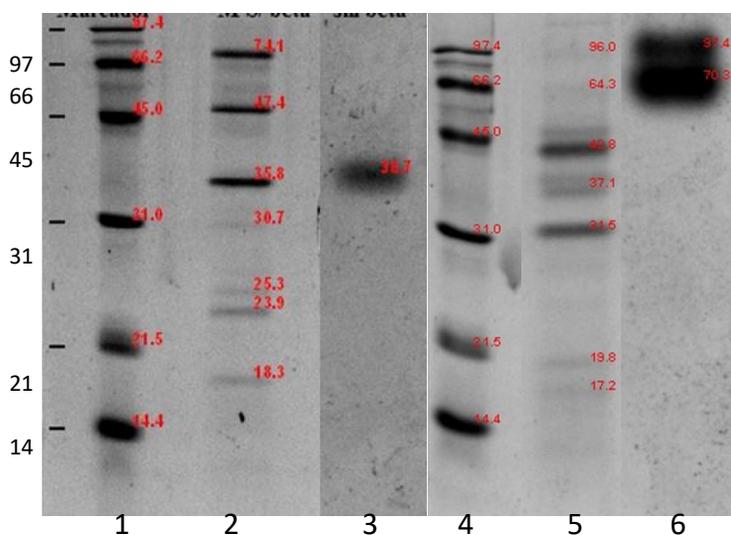


Figura 15. Zimogramas semi-desnaturalizante y SDS-PAGE del extracto crudo. Carril 1 y 4 MPM Low Rang Biorad. Carril 2 y 3 Extracto crudo y zimograma (calentado 95°C/ 5min) Carril 5 y 6 Perfil de Proteínas del extracto crudo y zimograma (Sin calentamiento)

8.2.2 Actividad proteasa

Para determinar la actividad proteasa se usó como sustrato Caseína de Hammmmerstein, colágeno, elastina, azocaseína y gelatina succinilada. Los resultados con estos diferentes sustratos se registran en la tabla 16.

Tabla 16. Actividad proteasa cuantitativa del extracto crudo con diferentes sustratos

Sustrato	U esp (U/mg prot)
Caseína U= μ g Tyr/min	1436 \pm 19
Colágeno U=0.01 Abs/h	695 \pm 6
Elastina U=0.01 Abs /h	185 \pm 8
Azocaseína U=0.01 abs /h*mg prot	308 \pm 9
Gelatina Succinilada U=abs/min*mg proteina	1305 \pm

Los resultados de la tabla 16 muestran que las proteasas presentes en el medio hidrolizan mejor tanto la caseína como la gelatina succinilada. Para determinar de qué enzimas presentes en el medio provenía dicha actividad se realizó el zimograma de gelatina al 1% el cual se muestra en la figura 16. Nuevamente se realizaron en dos condiciones, calentando la muestra (Carril 3) y sin calentarla (Carril 6). Para cada condición se corrió un perfil de proteínas en el mismo gel.

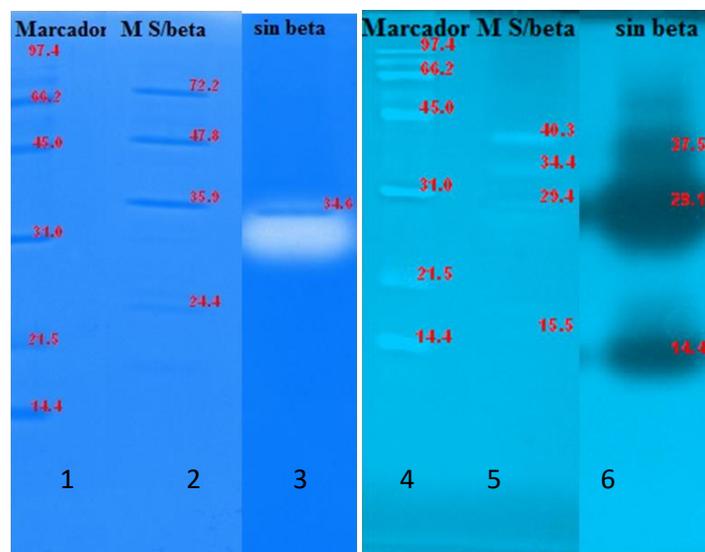


Figura 16. Zimograma y Perfil del extracto crudo en geles con gelatina 1%. Tinción con coomassie. Carril 1 y 4 MPM Low Rang Biorad. Carril 2 y 3 Perfil de Proteínas del extracto crudo y zimograma (Calentando 95°C/ 5 min) Carril 5 y 6 Perfil de Proteínas del extracto crudo y zimograma (Sin calentar)

Cuando la muestra fue calentada (Carril 3) solo se observa que una proteasa recupera su actividad, y se trata de la PrtA. Cuando la muestra no es calentada (carril 6) se observan al menos 4 enzimas con actividad proteasa, sin embargo, de estas resalta la actividad que se encuentra aproximadamente 30 kDa y a 14 kDa. Al comparar los resultados con lo encontrado por Castro-Ochoa en 2013 se obtiene que de igual manera encontró varias bandas que presentaron actividad proteolítica, lo cual concuerda con lo ya antes observado por Cohen en 1973 y por Katz en 2008 y 2009. Vankuy en 2000 encontró que la actividad de la banda de mayor intensidad proviene de la enzima PrtA y en 2013 Castro-Ochoa también observó lo mismo. Sin embargo, para asegurarnos de la identidad de la banda, se procedió a identificar la banda de 37 kDa junto con las de 42 kDa y 14 kDa.

8.3 Identificación de las bandas con actividad proteolítica

La identificación de las bandas se realizó usando la técnica LC/MS/MS por la USAI. El análisis mostró lo siguiente:

Para la proteína con peso de 37 kDa, que se observa en la figura 13 carril 1, se encontraron 6 péptidos diferentes y un total de 20 péptidos que corresponden con la secuencia de la enzima PrtA de *A. nidulans*. La siguiente figura muestra la secuencia de la enzima PrtA y en diferentes colores los péptidos encontrados.

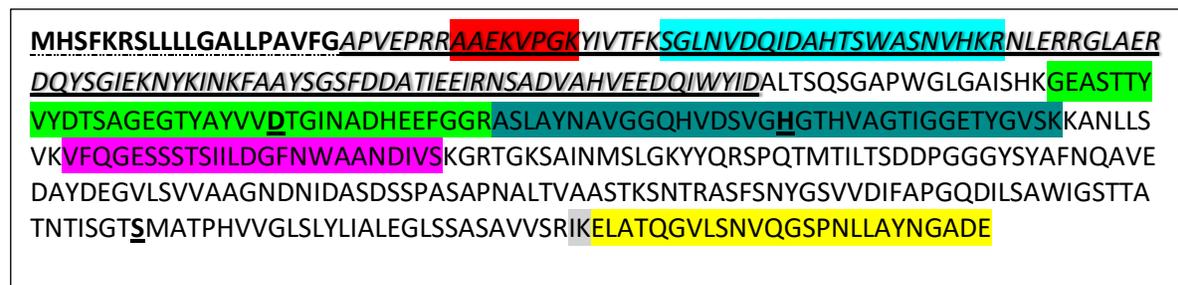


Figura 17. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima de 37 kDa. Las partes en color son los diferentes péptidos encontrados, la parte subrayada (.....) corresponde al péptido señal (SignalIP) y lo subrayado (_____) corresponde al propeptido (Peña, 2007) Tratamiento: la muestra fue calentada y se identificó la banda

Por lo mostrado en la figura anterior observamos que parte del propéptido sigue junto a la proteína madura, lo cual no es de extrañar pues en numerosos casos se ha encontrado la enzima con el propéptido completo o en partes (Siezen, 1997). Esto podría explicar por qué la enzima presenta un peso mayor al esperado sin el propéptido. El peso teórico de los péptidos encontrados es de 41 kDa (Compute pI/MW) un poco menor al peso teórico de toda la proteína, que es de 42kDa.

Se observó en la figura 16 carril 6, que había una enzima de menor peso que mostraba también actividad proteasa de manera intensa. En 2009 Emri et al, encontró una proteasa de *A. nidulans* en un peso de 19 kDa que resultó ser una metalo proteasa, pero al hacer las pruebas con EDTA, la actividad seguía presente, así que se optó por identificar la enzima. El peso de la enzima es de 14 kDa y se encontró que también era la proteasa PrtA de *A. nidulans*. Se encontraron 4 péptidos en total. Resulta interesante que, aunque la enzima se hidroliza, mantiene

su actividad proteasa y que además este cambio resulte en menor estabilidad a la temperatura, debido a que cuando la muestra es calentada (figura 16 carril 3) esta variante de la enzima no se renaturaliza.

MHSFKRSLLLGALLPAVFGAPVEPRRAAEKVPVKYIVTFKSGLNVDQIDAHTSWASNVHKRNLERGLAER
DQYSGIEKNYKINKFAAYSQSFDDATIEEIRNSADVAHVEEDQIWIYIDALTSQSGAPWGLGAISHKGEASTTY
VYDTSAGEGTYAYVVDTGINADHEEFGGRASLAYNAVGGQHVDSVGHGTHVAGTIGGETYGVSKKANLLS
 VKVFQGESSTSIILDGFNWAANDIVSKGRTGKSAINMSLGKYYQRSPQTMILTSDDPGGYSYAFNQAVE
 DAYDEGVLSVVAAGNDNIDASDSSPASAPNALTVAASTKSNTRASFSNYGSVVDIFAPQQDILSAWIGSTTA
 TNTISGTSMATPHVVGLSLYLIALEGLSSASAVVSRIKELATQGVLNVQGSPNLLAYNGADE

Figura 18. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima de 14 kDa. Las partes en color son los diferentes péptidos encontrados, la parte subrayada (.....) corresponde al péptido señal (SignalIP) y lo subrayado (____) corresponde al propeptido (Peña, 2007) Tratamiento la muestra fue calentada y se identificó la banda.

En la figura 16 carril 6 observamos que en aproximadamente 30 kDa hay una banda de actividad proteasa intensa, se cortó y del mismo modo se identificó, el resultado se muestra en la figura 17. Esta proteasa de 30 kDa también resultó ser la proteasa PrtA de *A. nidulans*.

Por lo observado en la figura 16 carril 3 y figura 15 carril 3 sabemos que la enzima PrtA presenta tanto la actividad esterasa como proteasa, algo ya reportado antes por Peña-Montes en 2008. Sin embargo, cuando se comparan estas mismas figuras, pero en los carriles 6, se observa un comportamiento muy diferente en la figura 16. La actividad proteasa de la PrtA está en aproximadamente 30 kDa (figura 16), sin embargo, la actividad esterasa no se presenta en el mismo peso sino en pesos muy altos, de aproximadamente 97 kDa.

MHSFKRSLLLGALLPAVFGAPVEPRRAAEKVPVKYIVTFKSLNVDQIDAHTSWASNVHKNLERRGLAER
DQYSGIEKNYKINKFAAYSGSFDDATIEEIRNSADVAHVEEDQIWYIDALTSQSGAPWGLGAISHKGEASTTY
 VYDTSAGEGTYAYVVD^TGINADHEEFGG^RASLAYNAVGGQHVD^SVGH^HGTHVAGTIGGETYGVSK^KKANLLS
 VK^VFQGESSTSIILDGFNWAANDIV^SKGRTGKSAINMSLGGGYSYAFNQAVEDAYDEGVLSVVAAGNDNI
 DASDSSPASAPNALTVAASTKSNTRASFSNYGSVVDIFAPGQDILSAWIGSTTATNTISGT^SMATPHVVGLSL
 YLIALEGLSSASAVVSR^IKELATQGVLSNVQGSPNLLAYNGADE

Figura 19. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima de 30 kDa. Las partes en color son los diferentes péptidos encontrados, la parte subrayada (.....) corresponde al péptido señal (SignalIP) y lo subrayado (____) corresponde al propeptido (Peña, 2007) Tratamiento la muestra no fue calentada y se identificó la banda.

La figura 15 permite saber que cuando la muestra no es calentada la actividad esterasa se observa en un peso muy elevado. Se realizó un gel en las mismas condiciones (desnaturalizantes) y se cortó la banda correspondiente a la actividad observada, con el propósito de determinar si esta actividad corresponde a la PrtA o a otras carboxilesterasa presentes en el medio. Se encontró la actividad provenía igualmente de la PrtA, tal como se indica en la figura 20 que ilustra los péptidos encontrados.

MHSFKRSLLLGALLPAVFGAPVEPRRAAEKVPVKYIVTFK^SGLNVDQIDAHTSWASNVH^KRNLERRGLAER
DQYSGIEKNYKINKFAAYSGSFDDATIEEIRNSADVAHVEEDQIWYIDALTSQSGAPWGLGAISHK^GGEASTTY
 VYDTSAGEGTYAYVVD^TGINADHEEFGG^RASLAYNAVGGQHVD^SVGH^HGTHVAGTIGGETYGVSK^KKANLLS
 VK^VFQGESSTSIILDGFNWAANDIV^SKGRTGK^SAINMSLGGGYSYAFNQAVEDAYDEGVLSVVAAGNDNI
 DASDSSPASAPNALTVAAST^KSNTRASFSNYGSVVDIFAPGQDILSAWIGSTTATNTISGT^SMATPHVVGLSL
 YLIALEGLSSASAVVSR^IKELATQGVLSNVQGSPNLLAYNGADEE

Figura 20. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima de 97 kDa. Las partes en color son los diferentes péptidos encontrados, la parte subrayada (.....) corresponde al péptido señal (SignalIP) y lo subrayado (____) corresponde al propeptido (Peña, 2007) Tratamiento la muestra no fue calentada y se identificó la banda

Estos resultados nos muestran que de alguna manera la PrtA interactúan con ella misma formando agregados de mayor peso que presentan actividad esterasa, pero no proteasa. Estos resultados muestran que la única enzima con actividad esterasa en el extracto crudo de *A. nidulans* es la PrtA.

Resulta interesante el hecho de que en condiciones nativas la actividad esterasa sólo se observe en los agregados y no en la enzima a 30 kDa que es donde se sabe que también se encuentra la PrtA (figura 19) y que además no se observe la actividad proteasa a 97 kDa, donde se encuentran los agregados de la , pero si se observe a 30 kDa y en 14kDa. Parecería que de alguna manera estos agregados impiden que se lleve a cabo la actividad proteasa, pero permiten la actividad esterasa. Sería interesante estudiar el mecanismo de acción de la enzima y saber a qué se deben estas diferencias.

MHSFKRLLLLGALLPAVFGAPVEPRRAAEKVPKYIVTFK**SGLNVDQIDAHTSWASNVHK**RNLERRGLAER
DQYSGIEKNYKINKFAAYS**GSFDDATIEEIRNSADVAHVEEDQIWIYIDALTSQSGAPWGLGAISHK**GEASTTY
VYDTSAGEGTYAYVVD**TGINADHEEFGGRASLAYNAVGGQHVDSVG**HGTHVAGTIGGETYGVSKKANLLS
VKVFQGESSTSIILDGFNWAANDIVSKGRTGK**SAINMSLGGGYSYAFNQAVEDAYDEGVLSVVAAGNDNI**
DASDSSPASAPNALTVAASTKSNTRASFSNYGSVVDIFAPGQDILSAWIGSTTATNTISGTSMATPHVVGLSL
YLIALEGLSSASAVVSR**IKELATQGVLSNVQGS**PNNLLAYNGADE

Figura 21. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima de 42 kDa. Las partes en color son los diferentes péptidos encontrados, la parte subrayada (.....) corresponde al péptido señal (SignalIP) y lo subrayado (_____) corresponde al propéptido (Peña, 2007). La muestra no fue calentada y se identificó la banda

La proteasa observada en la figura 16 carril 6, con un peso aproximado de 42 kDa, resultó ser identificada como la misma PrtA. Esto resulta interesante dado que 42 kDa es el peso teórico de enzima con todo el propéptido y péptido señal unido a ella. El resultado se muestra en la figura 21 y de nuevo parte de propéptido está junto con la proteína madura, si bien en los péptidos no se encuentran todos los aminoácidos del propéptido y del péptido señal. El que posea ese peso molecular podría deberse a que contiene todas estas partes o a que ocurran modificaciones postraduccionales de la proteína. Sin embargo, en los datos obtenidos de los análisis de las diferentes muestras no se encontró ninguna modificación en la proteína.

Otros autores habían detectado una proteasa en esta masa molecular, pero se desconocía su identidad. Se sabía que era una serín proteasa por mostrar

susceptibilidad a inhibidores de las mismas, pero el comportamiento era diferente al presentado por la PrtA, por lo que no se asociaba con ella (Katz,2009). Esto se puede deber a que, junto con esta forma de la PrtA, también se identificó un peptidasa, lo que podría explicar las diferencias en las pruebas. La peptidasa identificada fue la Q5ATD5_ EMENI (AN8445.2) de la cual hasta el momento solo se sabe que es una aminopeptidasa putativa con peso molecular teórico de 52 kDa, que anteriormente había sido observada por Sayhedkar en 2012.

Todos estos resultados muestran diferentes formas de la enzima PrtA. Anteriormente en el año 2000 Vankuy observó que con la eliminación del gen de la *prtA* desaparecía no sólo la banda de mayor actividad, sino también una banda de menor peso y su hipótesis fue que ambas eran productos del mismo gen. Con los resultados se observa que se obtienen diferentes variantes de la enzima PrtA en el extracto crudo utilizado en el presente estudio.

En 2014 Selvam encontró en el exoproteoma de *A. flavus*, 24 formas de diferentes pesos moleculares y puntos isoeléctricos, de la misma serin proteasa alcalina Alp1. Esta proteasa alcalina de *A. flavus* tiene alta identidad con la proteasa PrtA de *A. nidulans*, con un parecido del 75% en la secuencia de aminoácidos, y con un peso teórico de 42 kDa (Katz, 1994). Los resultados encontrados en el presente estudio muestran que la PrtA de *A. nidulans* se está comportando de manera parecida a la proteasa Alp1 de *A. flavus*, encontrándose diferentes formas de la misma proteína. Tal vez un estudio con geles de 2D aporte más información sobre todas las diferentes formas de la proteasa PrtA, debido a que en estos estudios las proteínas presentes en las muestras se separan tanto por peso como por punto isoeléctrico.

8.4 Purificación de las variantes de 14 kDa y de 37 kDa de la proteasa PrtA de *A. nidulans*

La purificación se realizó mediante Prepcell y, para determinar las fracciones en las que se encontraba las proteínas de interés, se realizaron múltiples zimogramas para detectar actividad proteasa. Los tubos en donde se encontraron las proteínas de interés se concentraron y los concentrados permitieron hacer la caracterización de ambas fracciones. La figura 22 muestra el gel SDS-PAGE de las fracciones puras obtenidas por prepcell.

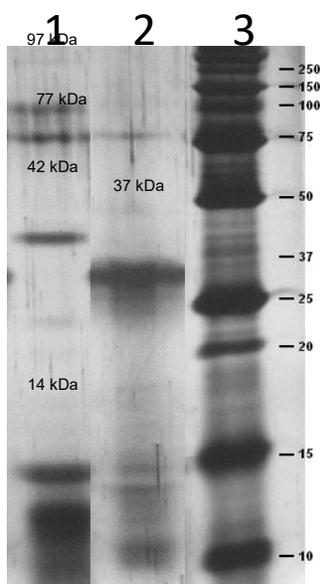


Figura 22. SDS-PAGE de variantes de 35 kDa y de 14 kDa después de la purificación. Tinción con plata. Carril 1 Fracción de 14 kDa PrtA. Carril 2 Proteasa PrtA de 37 kDa . Carril 3 Marcador de peso molecular standard Precision plus

La enzima observada en el carril 2 con un peso de 37 kDa aproximadamente es la PrtA, esto fue corroborado tras ser identificada la fracción (Fig. 23). Las bandas que se observan más abajo en el mismo carril se resultaron ser la proteína conocida como Q5AWZ9 (**AN7181.2**) de *A. nidulans* de la cual solo se sabe que es una proteína extracelular sin actividad ni función conocida dentro de la célula. En los zimogramas esta banda no muestra actividad ni de esterasa ni de proteasa. Al parecer la PrtA está hidrolizando esta proteína, cuyo peso es parecido al de la PrtA,

de ahí que se observe bandas de peso menor en el mismo carril. Cabe recordar que al no tener ni actividad esterasa ni proteasa esta enzima no interfiere en las pruebas.

MHSFKRSLLLGALLPAVFGAPVEPRRAAEKVPKGYIVTFKSGLNVDQIDAHTSWASNVHKRNLERGLAER
DQYSGIEKKNYKINKFAAYSGSFDDATIEEIRNSADVAHVEEDQIWIYIDALTSQSGAPWGLGAISHKGEASTTY
 VYDTSAGEGTYAYVVD^TGINADHEEFGGRASLAYNAVGGQHVD^SVGHGTHVAGTIGGETYGVSKKANLLS
 VKV^FQGESSTSIILDGFNWAANDIVSKGRTGKSAINMSLGGGYSYAFNQAVEDAYDEGVLSVVAAGNDNI
 DASDSSPASAPNALTVAASTKSNTASFSNYGSVVDIFAPGQDILSAWIGSTTATNTISGTSMATPHVVGLSL
 YLIALEGLSSASAVVSRIKELATQGVLSNVQGSPNLLAYNGADE

Figura 23. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima con un peso de 37kDa de la fracción pura. Las partes en color son los diferentes péptidos encontrados, la parte subrayada () corresponde al péptido señal (SignallP) y lo subrayado (____) corresponde al propeptido (Peña, 2007)

En el carril 1 se cargó el concentrado de las fracciones en donde se encontró a la variante con peso de 14 kDa. Aunque en el zimograma de actividad proteasa solo se observaba la actividad proteasa de esta banda, en el carril 1 hay otras bandas en peso de 77 kDa y 97 kDa. Estos pesos coinciden con los pesos en los cuales se observa la actividad esterasa en figura 14, carril 6. Anteriormente en la figura 20 se muestra que la banda con peso de 97 kDa también es la PrtA. Una hipótesis de porque se observan esta banda junto con esta fracción, es que puede que la variante de la PrtA de 14 kDa sea la que este formando estos conglomerados que permiten las condiciones para que se lleve a cabo la actividad esterasa.

Se observa también en el mismo carril una banda con peso de 42 kDa que podría ser un agregado de la variante de 14 kDa, que en los zimogramas de actividad proteasa no permite detectar actividad, a excepción de la banda de 14 kDa.

Durante la purificación se aislaron otras bandas que también mostraron actividad proteasa. Una banda con peso de 62 kDa ,fue identificada como la proteína Q5ATD5_EMENI (**AN8445.2**) con actividad de aminopeptidasa. Hasta el momento solo era una enzima putativa de 503 aminoácidos y con meso molecular de 52 kDa, aunque en realidad en este estudio fue encontrada de un peso de 62 kDa, mayor al esperado, pero no es de extrañar debido a que incluso la PrtA también presenta un

peso diferente al teórico esperado. Pertenece al clan MH de metalo peptidasa. Esta enzima es la misma que se observó que en presencia de EDTA 10 mM durante 1h perdía su actividad (datos no mostrados en el trabajo), que anteriormente había sido observada por Katz en 2008.

MHSFKRSLLLLGALLPAVFGAPVEPRRAAEKVP PKYIVTFKSGLNVDQIDAHTSWASNVH KRNLER GLAER
DQYSGIEK NYKINKFAAYS GSFDDATIEEIRNSADVAHVEEDQI WYIDALTSQSGAPWGLGAISHK GEASTTY
VYDTSAGEGTYAYVVD TGINADHEEFGGR ASLAYNAVGGQHVD SVGHGTHVAGTIGGETYGVSK KANLLS
VKVFQGES SSTSIILDGFNWAANDIVSK GRTGKSAINMSLGGGYSYAFNQAVEDAYDEGLSVVAAGNDNI
DASDSSPASAPNALVAASTKSNTRASF SNYGSVVDIFAPGQDILSAWIGSTTATNTISGT SMATPHVVGLSL
YLIALEGLSSASAVVSR KELATQGVL SNVQGS PNLLAYNGADE

Figura 24. Péptidos obtenidos de la identificación de la enzima con un peso de 30 kDa de la fracción pura. Las partes en color son los diferentes péptidos encontrados, la parte subrayada () corresponde al péptido señal (SignallP) y lo subrayado () corresponde al propeptido (Peña, 2007). Se encontraron 5 péptidos

También se encontró una banda con actividad proteasa, pero en un peso de 30 kDa , y el resultado de la identificación mostró que también es la PrtA. La figura 24 muestra los péptidos encontrados en la identificación de la enzima.

Al comparar todas los péptidos encontrados en las diferentes muestras se observa en general que el primer péptido es el que comienza con GEASTTYVYDTSAGEGTYAYVVDTGINADHEEFGGR. Sin embargo, esto no nos explica a que se deben las diferencia en los pesos presentados y las diferencias encontradas por las dos variantes caracterizadas. Como ya se ha mencionado antes en los resultados no se observaron modificaciones postraduccionales.

8.4.1 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima

La figura 25 muestra las gráficas de pH óptimo para la variante de 14 kDa y la de 37 kDa. Se observa que ambas variantes trabajan a pH alcalinos, para la variante de 14 kDa el pH óptimo es de 9 y para la de 37 kDa el pH es 8. Sin embargo, también observamos que la variante de 14 kDa presenta mayor actividad proteasa que la variante de 37 kDa a pH alcalinos. Mientras que la variante de 37 kDa trabaja bien en un pH de entre 7 y 8, la variante de 14 kDa es más activa en pH alcalinos como 9, 10 y 11.

37

Figura 25. Efecto del pH en la actividad proteasa de ambas variantes de la PrtA. La línea morada corresponde a la variante de 14 kDa, mientras que la línea roja corresponde a la variante de 37 kDa. Cada medición se realizó por triplicado

Figura 26. Efecto del pH en la actividad esterasa las variantes de la enzima PrtA. La línea morada corresponde a la variante de 14 kDa, mientras que la línea roja corresponde a la variante de 37 kDa. Cada medición se realizó por triplicado

La figura 26 muestra el pH óptimo para la actividad esterasa de ambas variantes, para la variante de 14 kDa el pH óptimo es de 9, mientras que para la variante 37kDa el pH óptimo es de 10. Para esta actividad notamos un cambio en el comportamiento de las variantes, si bien ambas variantes tienen la actividad esterasa, se observa que para esta actividad es la variante de 37 kDa la que tiene mayor actividad en pH más alcalinos, caso contrario a lo observado para la actividad proteasa donde la variante con mayor actividad era la de 14 kDa.

Estas diferencias observadas pueden deberse a cambios en las estructuras de ambas variantes que de algún modo les permiten mostrar más una actividad que otra.

En 2008 Peña caracterizó y encontró que el pH óptimo para la variante de 37 kDa era 8.5, mientras que en este estudio se encontró que el pH óptimo es de 10. Estas

diferencias podrían deberse a que el medio de producción es diferente y que el método de purificación también y pudieran presentarse modificaciones postraduccionales que incidan en la estructura y propiedades de la enzima . En el caso de las muestras utilizadas en este estudio se purificaron con prepcell y si bien se hicieron lavados para eliminar el SDS que se encontraba en la muestra no se logró eliminar del todo, el cual es un factor que afecta el comportamiento de la enzima. Se ha observado que los surfactantes interactúan con las proteasas resultando en una activación o inhibición de la enzima, aunque el mecanismo de esta interacción aun no es claro (Zhang, 2015)

8.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima

37

Figura 27. Efecto de la temperatura en la actividad proteasa de ambas variantes de la PrtA. La línea morada corresponde a la variante de 14 kDa, mientras que la línea roja corresponde a la variante de 37 kDa. Cada medición se realizó por triplicado

La figura 27 muestra las gráficas de temperatura óptima para ambas variantes en la actividad proteasa. Se encontró que ambas variantes trabajan a una temperatura

óptima de 40°C, y que mantienen parte de su actividad en temperaturas altas. En el caso de la variante de 14 kDa se observa que mantiene más del 70% de su actividad en 70°C y la variante de 37 kDa mantiene más del 60% de su actividad a 60°C. Esto nos muestra que para la actividad proteasa ambas variantes resistentes a temperaturas altas, esta es una característica importante para poder aplicarla en procesos industriales además de trabajar a pH alcalinos (Khan, 2013; Nigan, 2013) como ya se mostró en las figuras 25 y 26.

37

Figura 28. Efecto de la temperatura en la actividad esterasa de ambas variantes de la PrtA. La línea morada corresponde a la variante de 14 kDa, mientras que la línea roja corresponde a la variante de 37 kDa. Cada medición se realizó por triplicado

La temperatura óptima para la actividad esterasa de la variante de 14 kDa es de 80°C y para la variante de 37 kDa es de 60°C, como se observa en la figura 28. Se observa que de igual manera que para la actividad proteasa. Cuando se analiza la actividad esterasa ambas variantes trabajan a temperaturas altas, de 60°C y 80°C, en comparación de la temperatura de 40°C de la actividad proteasa.

Por lo que se observa en la figura 87 la variante de 14 kDa es más estable que la variante de 37 kDa y pierde casi por completo su actividad a los 90°C pero retiene su actividad a temperaturas altas.

8.4.3 Determinación de la especificidad de sustrato

Figura 29. Especificidad de sustrato de la actividad proteasa de ambas variantes. La barra en color vino corresponden a la variante de 14 kDa, mientras que las barras grises corresponden a la variante de 37 kDa. Cada medición se realizó por triplicado

En el caso del sustrato específico para la actividad proteasa se probaron 5 sustratos diferentes, caseína, azocaseína, colágeno, elastina y gelatina succinilada. La figura 29 muestra que ambas variantes prefieren la caseína, a los otros sustratos, el segundo sustrato preferido es la gelatina succinilada, y para los otros sustratos la actividad es mínima. No se observan diferencias muy notorias en las variantes para los diferentes sustratos, excepto para el caso de la gelatina succinilada, sobre la que la variante de 37 mostró mayor actividad.

Figura 30. Especificidad de sustrato de la actividad esterasa de ambas variantes. La barra en color morado corresponde a la variante de 14 kDa, mientras que la barra gris corresponde a la variante de 37 kDa. Cada medición se realizó por triplicado

Para la actividad esterasa de la enzima se encontró que en general ambas variantes tienen preferencia por los ácidos grasos de cadena corta como el butírico y acético, sin embargo, se observan diferencias entre ambas variantes sobre todo con el *p*-NPB. La variante de 37 kDa tiene preferencia por este sustrato, mientras que la variante de 14 kDa prefiere el *p*-NPA. Esto concuerda por lo encontrado por Peña en 2008 para la variante de 37 kDa la cual mostró preferencia por el *p*-NPB, como se encontró en este estudio.

Los resultados mostrados en las figuras 29 y 30 muestran en resumen que, la variante de 14 kDa prefiere caseína y *p*-NPA y la variante de 37 kDa hidroliza mejor el *p*-NPB a diferencia de la variante de 14 kDa y también prefiere la caseína. Además, mostro más afinidad por la gelatina succinilada que la variante de 14 kDa.

8.3.4 Efecto de diferentes iones en la actividad de la enzima

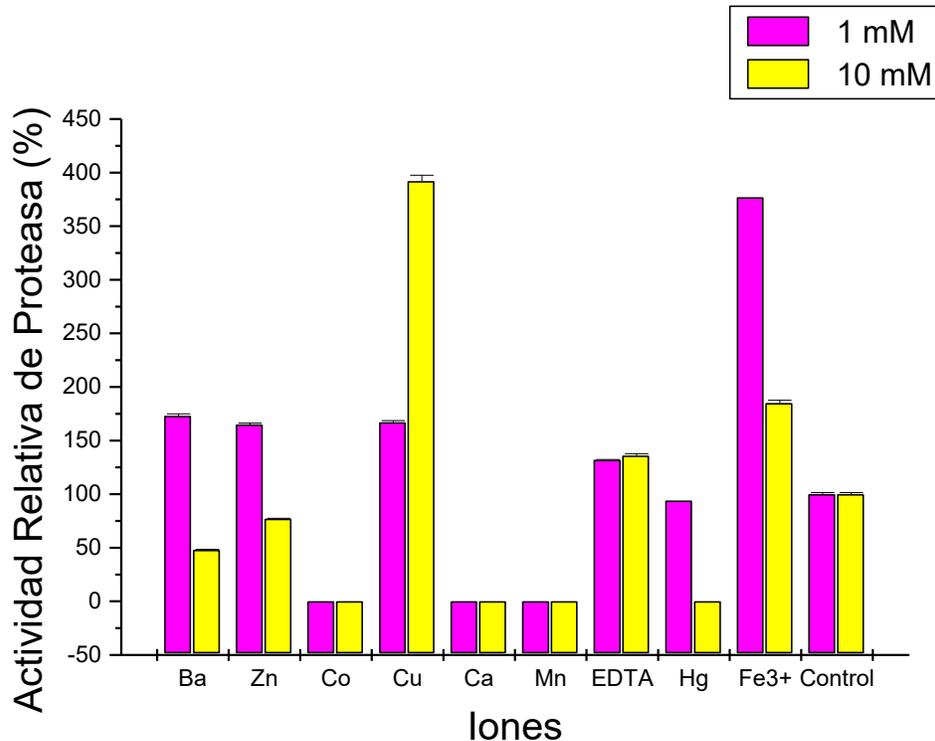


Figura 31. Efecto de iones en la actividad proteasa de la variante de 14 kDa. Las barras en color rosa corresponden al ensayo con concentración 1mM del ion, mientras que las barras amarillas corresponden al ensayo con concentración 10mM del ion. Cada medición se realizó por triplicado

En cuanto al efecto de los iones en la actividad de ambas variantes se probaron 2 diferentes concentraciones, 1mM y 10 mM. La figura 31 muestra el efecto de los iones en la actividad proteasa para la variante de 14 kDa. Tomando como 100% el control, es decir la prueba sin ningún ion, se observó que el Co^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} , disminuyen la actividad de la enzima, junto con el Zn^{2+} , Hg^{2+} y Ba^{2+} en concentración 10 mM. Devi, encontró al caracterizar una proteasa de *A. parasiticus* que de igual manera el Zn disminuía la actividad de la enzima y Kumar en 2011 observo que el Hg disminuía la actividad de la proteasa de *A. flavus* (Devi,2008; Kumar,2011). Esto es algo que de igual manera se observa en esta variante.

A diferencia de ello los iones Cu^{2+} , Fe^{3+} y el EDTA aumenta la actividad de la enzima. Con el cobre y el hierro se eleva hasta en 300% y con el EDTA, 125%. Este es un efecto ya antes observado en la caracterización de otras proteasas (Salihi et al, 2016; Kumar,2016; Dadshahi et al., 2016). Sin embargo, el que la actividad de la enzima no se vea afectada por el EDTA le permitir ser usada en formulaciones de detergentes, debido a que es un ingrediente muy usado en éstos.

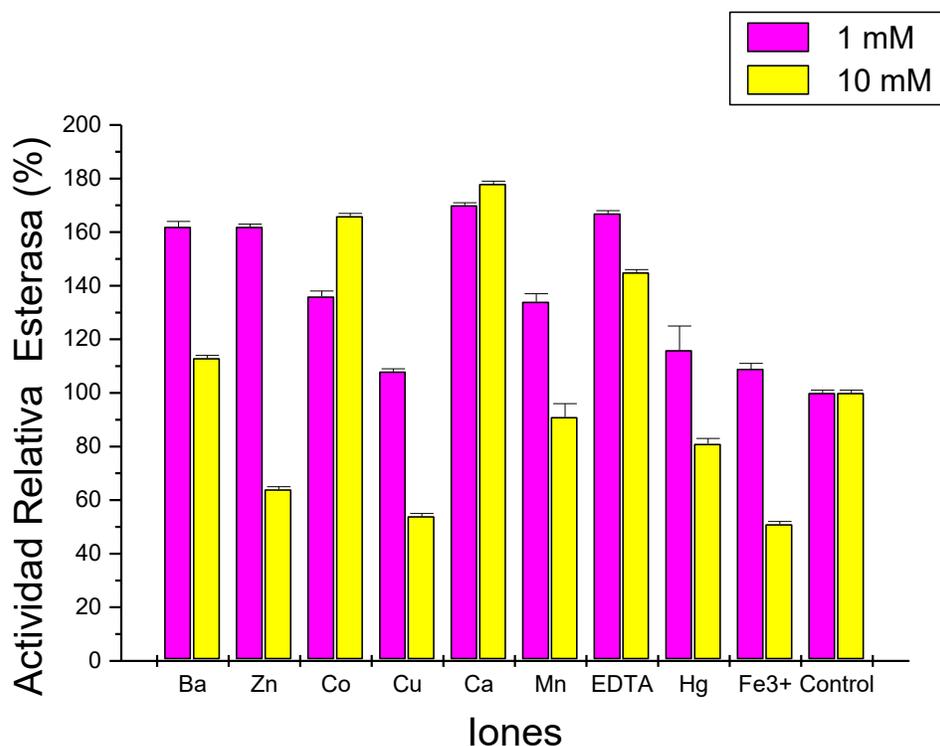


Figura 32. Efecto de iones en la actividad esterasa de la variante de 14 kDa. Las barras en color rosa corresponden al ensayo con concentración 1mM del ion, mientras que las barras amarillas corresponden al ensayo con concentración 10mM del ion. Cada medición se realizó por triplicado

Cabe resaltar el efecto tan positivo que tienen el hierro y el cobre en la actividad proteasa de esta variante. En otras proteasas alcalinas de genero *Aspergillus* se había observado el efecto positivo del hierro (Kumar, 2005; Salihi, 2015), pero no un aumento tan significativo como el encontrado en el presente estudio.

Para el caso de la actividad esterasa de esta misma variante de 14 kDa, la figura 32 muestra que los iones Ba^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , así como el quelante EDTA, aumentan la

actividad de la enzima hasta un 160%. También los iones Zn^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} y Fe^{3+} en concentración 1 mM tienen un efecto positivo en la actividad de esta variante. De estos iones llaman la atención que el cobalto y el calcio afecten positivamente esta actividad mientras que para la actividad proteasa mostrada en la figura 31 el efecto es completamente contrario.

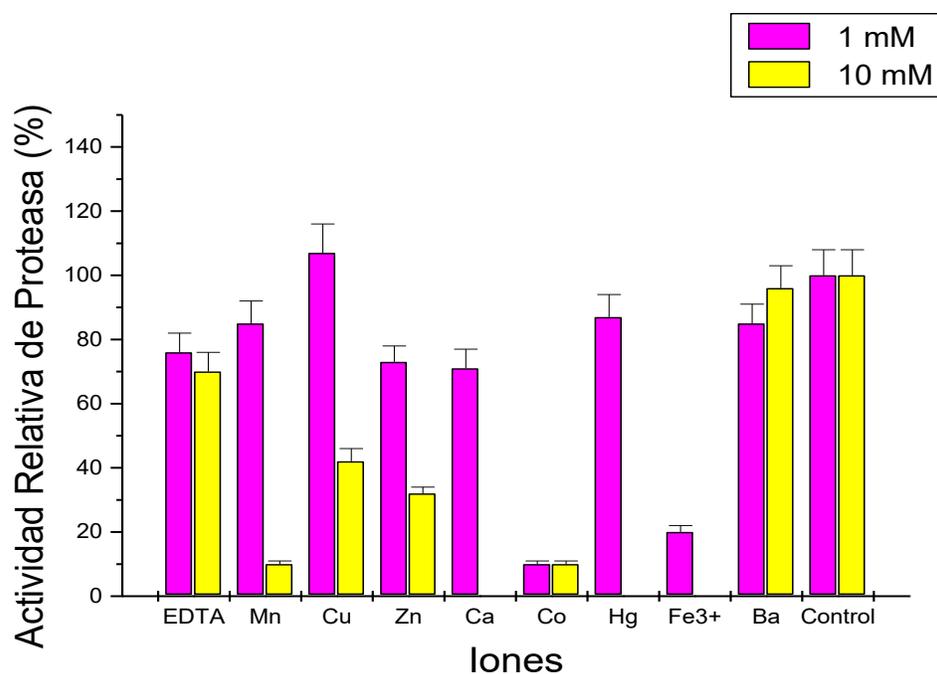


Figura 33. Efecto de iones en la actividad proteasa de la variante de 37 kDa. Las barras en color rosa corresponden al ensayo con concentración 1mM del ion, mientras que las barras amarillas corresponden al ensayo con concentración 10mM del ion. Cada medición se realizó por triplicado

Los iones que afectan negativamente la actividad esterasa de esta variante son Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} y Fe^{3+} pero en concentración 10 mM, ya que la concentración 1mM de estos mismo iones mostró un efecto positivo en algunos casos o casi no afecto la actividad en otros.

La figura 33 muestra el efecto de los iones en la actividad proteasa, pero en este caso de la variante de 37 kDa, y se observa que esta variante es más sensible al afecto de los iones presentes, debido a que la mayoría de ellos afectaron negativamente la actividad. El único ion que mostró un efecto positivo, aunque muy

poco fue el Cu^{2+} . Se observa que aunque el EDTA afecta la actividad proteasa el efecto es pequeño, por lo que se puede pensar que esta variante también puede ser aplicada en formulaciones de detergentes.

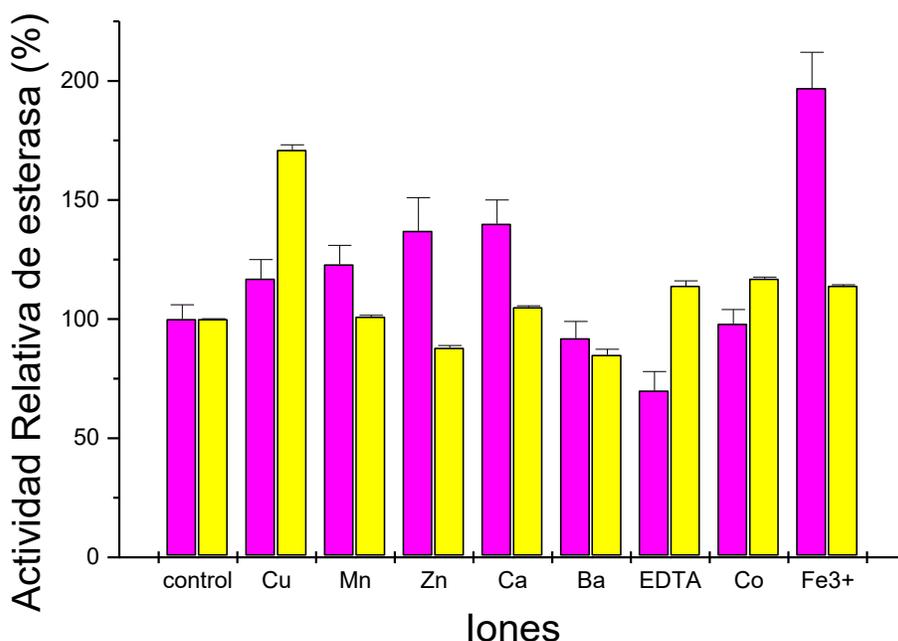


Figura 34. Efecto de iones en la actividad esterasa de la variante de 37 kDa. Las barras en color rosa corresponden al ensayo con concentración 1mM del ion, mientras que las barras amarillas corresponden al ensayo con concentración 10mM del ion. Cada medición se realizó por triplicado

Para el caso de la actividad esterasa de la variante de 37 kDa, la figura 34 muestra que Cu^{2+} , Co^{2+} y el Fe^{3+} tienen un efecto positivo en la actividad esterasa de la variante. En 2008 Peña también observó que el Fe^{3+} tenía un efecto positivo en la actividad esterasa de esta variante, y nuevamente se ve que el hierro tiene un gran efecto en la actividad de la enzima que aumenta más del 150%.

Los iones que mostraron un efecto negativo en la actividad esterasa son Zn y Ba en concentración 10Mm, así como el quelante EDTA en concentración 1 mM. Sin embargo, en concentración de 10 mM del EDTA no afecta la actividad de la enzima.

En ambas variantes la tendencia es que la actividad proteasa se ve más afectada por los iones presentes en el medio que la actividad esterasa.

En el caso de la variante de 37 kDa la presencia de algunos iones como calcio y hierro pueden determinar cuál de las dos actividades se presenta, aunque aún faltaría hacer más estudios al respecto.

8.5 Efecto de aditivos de detergentes en la actividad de la PrtA

Debido a las características encontradas por estas dos variantes caracterizadas entre ellas que trabajan a pH alcalino y a altas temperaturas, el extracto crudo

Tabla 17. Efecto de diferentes aditivos para detergentes en la actividad proteasa y esterasa del extracto crudo de *A. nidulans*. Cada medición se realizó por triplicado

Aditivo	Act. Proteasa	Act. Esterasa
Blanco	100±5	100±3
CTAB 30 mM	98±4	39±5
CTAB 20 mM	114±11	29±2
Zeolita 5%	114±6	101±4
Zeolita 2%	103±0	----
Zeolita 1%	71±2	109±0
Triton X-100 10%	98±3	91±1
Triton X-100 5%	71±1	52±3
Tween 80 10%	101±4	103±3
Tween 80 5%	107±5	31±2
Tween 20 10%	85±0	46±4
Tween 20 5%	102±5	106±6
Urea 5%	89±8	102±6
urea 1%	67±7	110±9
Peróxido de hidrogeno 5%	110±7	----

Peróxido de hidrogeno 2%	98±6	----
Span 80 5%	75±3	28±3
Perborato de sodio 5%	78±4	----
Perborato de sodio 1%	88±3	----
SDS 2%	63±2	104±12
SDS 1%	84±7	----

de *A. nidulans* con todas las proteasas presentes, puede ser aplicada para la industria de detergentes. Se realizó primero una prueba con diferentes aditivos que se usan en detergentes y en diferentes concentraciones. La tabla 17 muestra lo encontrado.

Se observa que para la actividad proteasa esta aumenta con los siguientes aditivos CTAB 20 mM, Zeolita 5% y 2%, y el Peróxido de hidrogeno 5%. El Tween 80 en las 2 concentraciones probadas no afecta de manera alguna la actividad de las enzimas presentes en el extracto crudo. Los aditivos que más impacto negativo tuvieron en la actividad proteasa son la Zeolita al 1% el triton 100X al 5%, la urea al 1%, el span 80 al 5%, el perborato de sodio y el SDS.

Para la actividad esterasa, los aditivos que no afectaron la actividad o tuvieron con los cuales aumento la actividad fueron, Zeolita 1% y 5%, Tween 80 10%, Tween 20 5%, urea 1% y 5% y el SDS 2%. Los aditivos con los que se observó un efecto negativo fueron: CTAB, Triton-100X, Tween 80 al 5%, tween 20 al 10% y span 80 al 5%.

Se sabe que los surfactantes aniónicos interactúan fuertemente con las proteasas (Zhang et al, 2015). De los surfactantes probados los únicos iónicos son el CTAB, el cual es catiónico, y el SDS, que es aniónico. En la tabla 17 se observa que el CTAB afecto fuertemente la actividad esterasa, pero no se observa lo mismo para la actividad proteasa, que no se afecta. El SDS si disminuyó la actividad proteasa hasta el 63%, algo que se había observado en otros estudios (Salihi et al, 2016; Tunga et al, 2013; Kumar et al, 2011; Anitha et al, 2013). Debido a que el SDS es

un surfactante aniónico, se esperaba este tipo de comportamiento. Resulta interesante como el CTAB disminuye la actividad esterasa contrario a lo que se observa con la actividad proteasa y que su comportamiento es contrario al SDS del cual se diferencia solo en la carga de este.

Se observa que la zeolita en concentración 1% disminuye la actividad proteasa. Esto podría deberse a que es un material poroso, que de hecho se utiliza para inmovilización de enzimas, y es posible que algunas de las proteasas presentes en el extracto crudo fueran inmovilizadas en ésta, por lo que disminuyó la actividad.

8.6 Actividad en presencia de detergentes comerciales

Tabla 18. Efecto de diferentes detergentes en la actividad proteasa y esterasa del extracto crudo de *A. nidulans*. Cada medición se realizó por triplicado.

Detergentes	Biológico	Esterasa	Proteasa
Blanco	--	100±12	100±7
Ariel	No	135±3	123±9
Carisma	Si	76±1	110±2
1,2,3	No	113±6	128±2
Persil p	Si	119±9	107±10
Roma	Si	14±1	100±2
Foca	Si	5±0	82±3
Tilde L	Si	34±1	81±3
Mas Color L	Si	32±1	82±3
Persil L	Si	56±7	90±4

En la tabla 18 se muestra el efecto que tienen diferentes detergentes comerciales en la actividad del extracto crudo. A diferencia de lo esperado la actividad es mayor con detergentes en los que no se reporta contenido de enzimas, que son el detergente Ariel y 123. La actividad aumentó también con el detergente Persil, el cual si contiene en su fórmula enzimas. En 2016 Omrane et al., observaron que el detergente Ariel no afectaba la actividad de una proteasa de origen fúngico. En 2017

Bermudez et al., observo también que el detergente Ariel aumentaba la actividad de una cutinasa de *A. nidulans*.

Los detergentes Carisma, Roma, y Foca afectaron negativamente la actividad esterasa del extracto crudo, pero no se observa un efecto tan significativo en la actividad proteasa la cual se mantuvo, a excepción del detergente Foca, con el cual disminuyó 82%. En los detergentes líquidos ambas actividades disminuyen.

9. – CONCLUSIONES

- *A nidulans* produce al menos 4 variantes de la proteasa PrtA, con diferentes pesos (37 kDa, 30 kDa, 14 kDa y 42 kDa).
- La única variante de la cual se observa en Zimogramas que tiene la actividad esterasa es la variante de 37 kDa, debido a que es la única que se renaturaliza. Pero en general se observó que la variante de 14 kDa no resiste el tratamiento térmico para ser corrida en un gel SDS-PAGE
- La variante de 14 kDa trabaja a pH óptimo de 9 para su actividad proteasa y esterasa, su temperatura optima es de 40°C para su actividad proteasa y de 80 °C para su actividad esterasa, y trabajar mejor en temperaturas altas para la actividad esterasa. El sustrato proteínico que mejor hidroliza es la caseína y luego la gelatina succinilada, en la actividad esterasa prefiere ácidos grasos de cadena corta hidrolizando mejor el *p*-NPA. La actividad proteasa se vio afectada por cobalto, calcio, manganeso y mercurio, la actividad esterasa es afectada por zinc, cobre y hierro, pero en concentración 10 mM
- La variante de 37 kDa tiene un pH óptimo de 8 para la actividad proteasa y de 10 para la actividad esterasa. La temperatura óptima para la actividad proteasa es de 40°C y para la actividad esterasa es de 60°C. El sustrato proteínico que mejor hidroliza es la caseína y luego la gelatina succinilada, la cual hidroliza mejor en comparación que la variante de 14 kDa. En la actividad esterasa prefiere ácidos grasos de cadena corta hidrolizando mejor el *p*-BPB. La actividad proteasa disminuye por los iones manganeso, zinc, cobalto y mercurio en concentración 10 mM y por el hierro en cualquier concentración. La actividad esterasa se afectada levemente por el zinc, manganeso y bario
- Ambas variantes de la enzima PrtA en la actividad proteasa son sensibles a la presencia de iones, pero mostraron mayor actividad con la presencia del cobre
- Se observó que mientras la actividad esterasa aumenta en presencia de hierro, la actividad proteasa disminuye hasta no observarse.

- El surfactante CTAB disminuye la actividad esterasa del extracto crudo, pero no afecta la actividad proteasa, mientras que el SDS afecta la actividad proteasa, pero no la actividad esterasa. Esto debido el efecto que los surfactantes aniónicos tienen sobre las proteasas.
- Las enzimas encontradas en el extracto crudo de *A. nidulans* pueden ser usadas en detergentes. Ya que se encontró, que la actividad tanto proteasa como esterasa se mantienen aún en presencia de aditivos para detergentes y detergentes comerciales

10. PERSPECTIVAS.

- Realizar un gel 2D para recabar más información sobre todas las variantes que presenta de la enzima PrtA y estudiar las posibles diferencias presentadas entre estas, si es que presentan diferencias.
- Estudiar el efecto del hierro en la actividad esterasa y en la actividad proteasa de la enzima. Debido a que en los resultados obtenidos se observó que el ion hierro tienen un efecto positivo en la actividad esterasa, pero un efecto negativo en la actividad proteasa.
- Intentar la clonación de la enzima en un hongo o insertar múltiples copias del gen en el mismo genoma de *A. nidulans* para aumentar la expresión de la enzima.
- Estudiar la estabilidad de la enzima inmovilizada en condiciones de lavado
- Realizar prueba de lavado con la enzima tanto en el extracto como inmovilizada

11. BIBLIOGRAFIA

Aaslyng, D., Gormsen, E., & Malmos, H. (1991). Mechanistic Studies of Proteases and Lipases for the Detergent Industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 50(3), 321–330.

Arnaud MB, Cerquiera GC, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley J, Shah P, Wymore F, Binkley G, Miyasato SR, Simison M, Wortman JR, Sherlock G."Aspergillus Genome Database" <http://www.aspergillusgenome.org/> (22 de febrero 2017).

Aissaoui, N., Abidi, F., Mahat, S., & Marzouki, M. N. (2014). Purification and biochemical characterization of a novel protease from *Penicillium digitatum* - Use in bioactive peptides production. *Journal of Basic Microbiology*, 54(SUPPL.1), 178–189.

Anitha, T. S., & Palanivelu, P. (2013). Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expression and Purification*, 88(2), 214–220.

Augenstine, L. (1959). Structural Correlation between Esterase and Protease Activities of Trypsin. *Science*, 129(3350), 718–719.

Bajpai, D., & Tyagi, V. K. (2007). Laundry Detergents : An Overview. *Journal of Oleo Sciencie*, 340(7), 327–340.

Baragi, V. M., Shaw, B. J., Renkiewicz, R. R., Kuipers, P. J., Welgus, H. G., Mathrubutham, M., ... Rao, S. K. (2000). A versatile assay for gelatinases using succinylated gelatin. *Matrix Biology*, 19(3), 267–273.

Benkiar, A., Nadia, Z. J., Badis, A., Rebzani, F., Soraya, B. T., Rekik, H., ... Jaouadi, B. (2013). Biochemical and molecular characterization of a thermo- and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 83, 129–138.

Benmrad, M. O., Moujehed, E., Elhoul, M., Jaouadi, N., Mechri, S., Rekik, H., ... Jaouadi, B. (2016). A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 961–972.

Bermúdez-García, E., Peña-Montes, C., Castro-Rodríguez, J.A. et al. (2017). AN CUT2, a Thermo-alkaline Cutinase from *Aspergillus nidulans* and Its Potential Applications *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(3), 1014-1036

Bornscheuer, U. T., & Kazlauskas, R. J. (2004). Catalytic Promiscuity in Biocatalysis : Using Old Enzymes to Form New Bonds and Follow New Pathways. *Angewandte Chemie - International Edition*, 43(45), 6032–6040.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254

Castro-Ochoa, D., Peña-Montes, C., & Farrés, A. (2013). Evaluation of strategies to improve the production of alkaline protease PrtA from *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(5), 1672–1682.

Cohen, B. L. (1972). Ammonium Repression of Extracellular Protease in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 71, 293–299.

Cohen, B. L. (1973a). Regulation of Intracellular and Extracellular Neutral and Alkaline Proteases in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol*, 79(2), 311–320.

Cohen, B. L. (1973b). The Neutral and Alkaline Proteases. *Journal of General Microbiology*, (77), 52 1-528.

Copley, S. D. (2003). Enzymes with extra talents : moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 265–272

Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy, M. N., Kalaichelvan, P. T., & Hur, B. K. (2008). Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *Journal of Basic Microbiology*,

48(5), 347–352.

Dadshahi, Z., Homaei, A., Zeinali, F., Sajedi, R. H., & Khajeh, K. (2016). Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes of *Litopenaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. *Food Chemistry*, 202, 110–115.

Damare, S., Raghukumar, C., Muraleedharan, U. D., & Raghukumar, S. (2006). Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 172–181.

Despotovic, D., Vojcic, L., Blanusa, M., Maurer, K. H., Zacharias, M., Bocola, M., ... Schwaneberg, U. (2013). Redirecting catalysis from proteolysis to perhydrolysis in subtilisin Carlsberg. *Journal of Biotechnology*, 167(3), 279–286

Devi, M. K., Banu, A. R., Gnanaprabhal, G. R., And, B. V. P., & Palaniswamy, M. (2010). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, 51(1), 27–35.

Emri, T., & Szilágyi-bónizs, M. (2009). PepJ is a new extracellular protease of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiologica*, 54(2), 105–109.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L., Wortman, J. R., Batzoglou, S., ... Birren, B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(December), 1105–1115.

Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15–32.

Gupta, R. D. (2016). Recent advances in enzyme promiscuity. *Sustainable Chemical Processes*, 4(2), 1–7

Hajji, M., Hmidet, N., Jellouli, K., Vallaey, T., Nasri, M., & Sellami-Kamoun, A. (2010). Gene cloning and expression of a detergent stable alkaline protease from *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*, 45(10), 1746–1752.

Hazen, G. G., Hause, J. A., & Hubicki, J. A. (1965). an Automated System for the Quantitative Determination of Proteolytic Enzymes Using Azocasein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 130(2), 761–768.

Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501–4523.

Hult, K., & Berglund, P. (2007). Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends in Biotechnology*, 25(5), 231–238.

Holmquist, B., & Vallee, B. L. (1976). Esterase activity of zinc neutral proteases. *Biochemistry*, 15(1), 101–107.

Jaouadi, B., Ellouz-Chaabouni, S., Rhimi, M., & Bejar, S. (2008). Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie*, 90(9), 1291–1305

Käfer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus nidulans* and its chromosomal aberrations. *Adv Genetics*. 19:133-131

Katz, M. E., Rice, R. N., & Cheetham, B. F. (1994). Isolation and characterization alkaline protease of an *Aspergillus nidulans* gene encoding an. *Gene*, 150, 287–292.

Katz, M. E., Bernardo, S. M., & Cheetham, B. F. (2008). The interaction of induction, repression and starvation in the regulation of extracellular proteases in *Aspergillus nidulans*: Evidence for a role for CreA in the response to carbon starvation. *Current Genetics*, 54(1), 47–55.

Kawasaki, L., Farrés, A., & Aguirre, J. (1995). *Aspergillus nidulans* Mutants affected in acetate metabolism isolated as lipid nonutilizers. *Experimental Mycology*, 19, 81–85.

Kern, P., Maria, M., & Francisco, L. (2016). Novel inexpensive fungi proteases : Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry*, 198, 119–124.

Kessler, E., Safrins, M., Olson, J. C., & Ohman, D. E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* Is a Staphylolytic Protease *, 268(10), 7503–7508.

Khan, F. (2013). New microbial proteases in leather and detergent industries . *Innovative Research in Chemistry*, 1(1), 1–6.

Khersonsky, O., & Tawfik, D. S. (2010). Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 471–505

Kirk, O. L. E., Christensen, M. W., Damhus, T., & Godtfredsen, S. E. (1994). Enzyme Catalyzed Degradation and Formation of Peroxycarboxylic Acids. *Biocatalysis*, 11, 65–77

Kunitz, M. (1947). Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor : li. General Properties. *The Journal of General Physiology*, 30(4), 291–310.

Laemmli, U. K. (1970): (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage- T4. *Nature*, 227.

Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology Prospecting on Enzymes : Application, Marketing and Engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3).

Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases : Present and future. *FEBS Letters*, 587(8), 1155–1163

Maccabe, A. P., Orejas, M., Tamayo, E. N., Villanueva, A., & Ramo, D. (2002). Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biotechnology*, 96(1), 43–54.

Macchione, M. M., Merheb, C. W., Gomes, E., & Silva, R. (2008). Protease Production by Different Thermophilic Fungi. *Applied Biochemistry and*

Biotechnology, 146, 223–230

Maeda, H., Sakai, D., Kobayashi, T., Morita, H., Okamoto, A., Takeuchi, M., ... Yamagata, Y. (2016). Three extracellular dipeptidyl peptidases found in *Aspergillus oryzae* show varying substrate specificities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 4947–4958.

Maurer, K. H. (2004). Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(4), 330–334.

Murray R., Bender D., Botham K., Kenelly P., Rodwell V., Weil P. (2010) Harper. Bioquímica ilustrada. 28th Ed. Mc Graw Hill

Nelson, David; Cox, Michael. (2013) Lenhinger Principles of Biochemistry 6th Ed. W. H. Freeman and Company, pp 189

Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3(3), 597–611

Nirmal, N. P., & Laxman, R. S. (2014). Enhanced thermostability of a fungal alkaline protease by different additives. *Enzyme Research*, 2014.

Nobeli, I., Favia, A. D., & Thornton, J. M. (2009). Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nature Biotechnology*, 27(2), 157–167.

Novozymes. (2015). The Novozymes Report 2015. Recuperado 11/02/2017
URL:<http://report2015.novozymes.com/service/download-report/the-novozymes-report-2015.pdf>

Olsen, H. S., & Falholt, P. (1998). The role of enzymes in modern detergency. *Journal of Surfactants and Detergents*, 1(4), 555–567.

Page, M. J., & Cera, E. Di. (2008). Review Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 1220–1236

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*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(4), 603–612.

Rinderknecht, H., Geokas, M. C., Silverman, P., & Haverback, B. J. (1968). A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clinica Chimica Acta*, 21(2), 197–203.

Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays In Biochemistry, 59, 1 LP-41. Recuperado a partir de <http://essays.biochemistry.org/content/59/1.abstract>

Salihi, A., Asoodeh, A., & Aliabadian, M. (2016). Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 827–835.

Selvam, R. M., Nithya, R., Devi, P. N., Shree, R. S. B., Nila, M. V., Demonte, N. L., Dharmalingam, K. (2015). Exoproteome of *Aspergillus flavus* corneal isolates and saprophytes: Identification of proteoforms of an oversecreted alkaline protease. *Journal of Proteomics*, 115(March), 23–35.

Siezen, R. J., & Leunissen, J. A. M. (1997). Subtilases : The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 6(3), 501–523.

Singhal, P., Nigam, V. K., & Vidyarthi, A. S. (2012). Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 3(3), 653–669.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Kumar, P. (2016). Microbial enzymes : industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 1–15.

Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S., & Ammani, K. (2015). Commercial Potential of Fungal Protease: Past , Present and Future Prospects. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(4), 218-234

Souza, P. M., Bittencourt, M. L. de A., Caprara, C. C., de Freitas, M., de Almeida, R.

P. C., Silveira, D., ... Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337–46.

Tunga, R., Shrivastava, B., & Banerjee, R. (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*, 38(11), 1553–1558.

vanKuyk, P. a, Cheetham, B. F., & Katz, M. E. (2000). Analysis of two *Aspergillus nidulans* genes encoding extracellular proteases. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 29(3), 201–210.

Voet D., Voet J. Biochemistry 4^a Ed. E.E.U.U., John Wiley & sons,inc., 2011, pp. 496

Vojcic, L., Pitzler, C., Körfer, G., Jakob, F., Ronny Martinez, Maurer, K. H., & Schwaneberg, U. (2015). Advances in protease engineering for laundry detergents. *New Biotechnology*, 32(6), 629–634.

Yin, D. L. T., Bernhardt, P., Morley, K. L., Jiang, Y., Cheeseman, J. D., Purpero, V., ... Kazlauskas, R. J. (2010). Switching Catalysis from Hydrolysis to Perhydrolysis in Pseudomonas. *Biochemistry*, 49, 1931–1942.

Yadav, S. K., Bisht, D., & Darmwal, N. S. (2011). Oxidant and solvent stable alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its characterization. *African Journal of Biotechnology*, 10(43), 8630–8640.

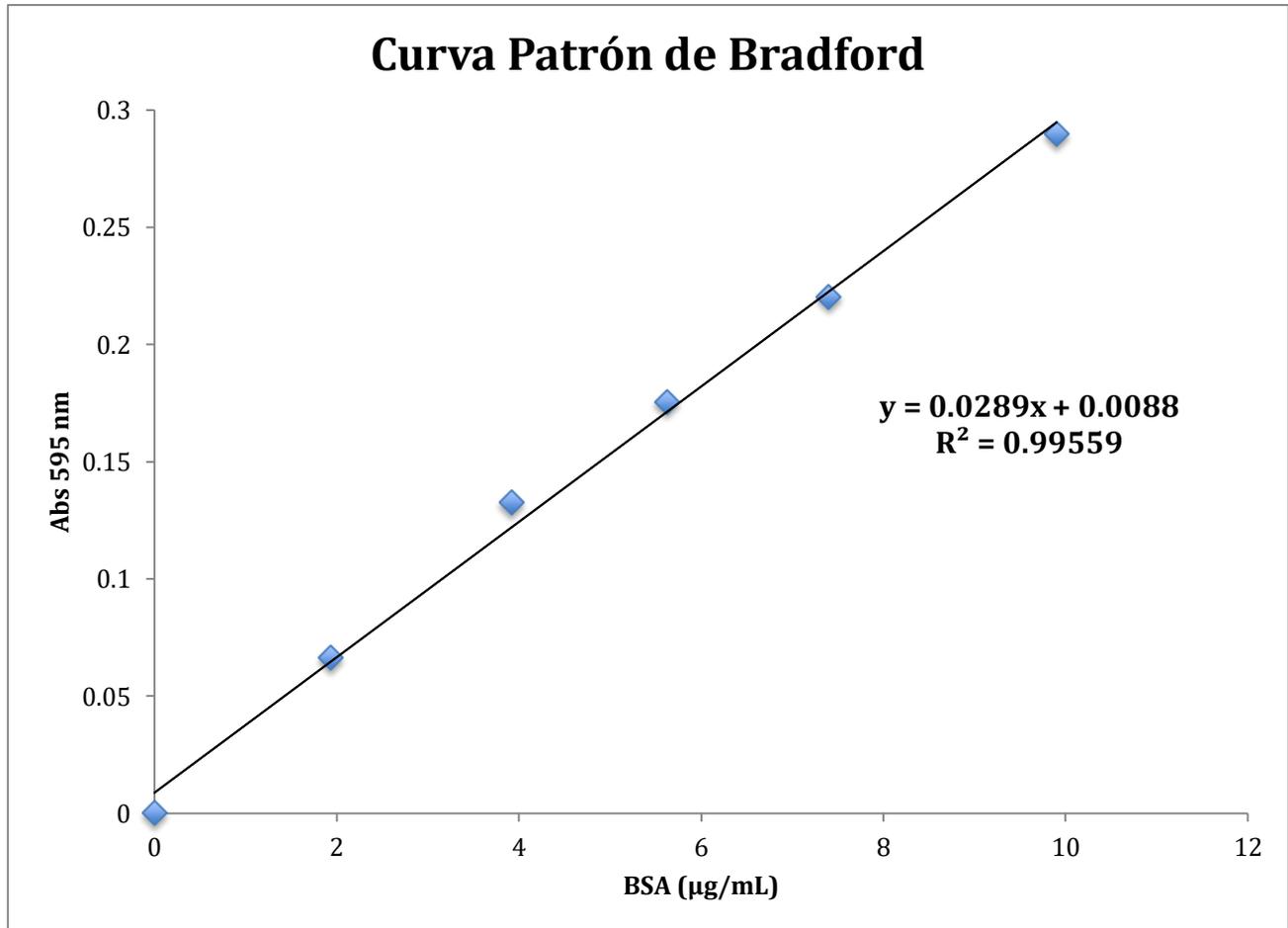
Yadav, S. K., Bisht, D., Tiwari, S., & Darmwal, N. S. (2015). Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4)

Zhang, J., & Zhang, J. (2016). Study on the interaction of alkaline protease with main surfactants in detergent. *Colloid and Polymer Science*, 294(2), 247–255.

Aspergillus nidulans (s.f.). Recuperado el 21/01/2017 de https://www.broadinstitute.org/files/shared/fungi/fgi/sample_whitepaper.pdf

12. ANEXOS

Anexo A Curva patrón de Albumina



Anexo B Curva patrón de *p*-nitrofenol

