

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**  
**UNIDAD DE POSGRADO**

**Purificación y caracterización parcial de proteasas  
extracelulares de *Pseudomonas sp.* de interés  
biotecnológico**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

**AUTOR**

Carol Nathali FLORES FERNÁNDEZ

**ASESOR**

Amparo Iris ZA VALETA PESANTES

Lima – Perú

2018

## RESUMEN

Las proteasas microbianas representan el grupo más importante de enzimas en el mercado global, debido a sus usos en las industrias de detergentes, alimentaria, farmacéutica, peletera, textil, cosmética, química, entre otras; y su aplicación en procesos de biorremediación y manejo de residuos biológicos. En este aspecto, existe un creciente interés de nuevas proteasas para su uso en una amplia gama de procesos biotecnológicos. Por ello, en este estudio se purificaron y caracterizaron proteasas extracelulares de una cepa de *Pseudomonas sp.* aislada de muestras de suelos de los aguajales de Tambopata en Madre de Dios. Las proteasas fueron purificadas mediante cromatografía de intercambio aniónico en un sistema FPLC, utilizando la columna Capto™ Q, seguida por precipitación con sulfato de amonio al 70 %. Se purificaron tres proteasas extracelulares denominadas EI, EII y EIII; siendo EI la que presentó mayor porcentaje de recuperación y factor de purificación de 80,1 % y 5,7. Los pesos moleculares de EI, EII y EIII fueron de 35, 40 y 55 kDa respectivamente. Las enzimas EI y EIII fueron clasificadas como serínmetaloproteasas, en tanto EII como metaloproteasa. El pH óptimo de EI y EII fue 8, mientras que de EIII fue 11. La temperatura óptima de las tres enzimas fue 60 °C. Las proteasas EI y EII incrementaron su actividad en presencia de  $Mn^{+2}$ , sin embargo, estas fueron inhibidas por  $Zn^{+2}$ . En tanto, la proteasa EIII incrementó su actividad en presencia de  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ . Según las características bioquímicas de las tres proteasas extracelulares purificadas de *Pseudomonas sp.* se puede indicar que son alcalinas y termoestables, principalmente la enzima EIII, por lo cual presentan gran potencial biotecnológico para su aplicación en diversos bioprocesos.

**Palabras clave:** Purificación enzimática, *Pseudomonas*, proteasas extracelulares, proteasas alcalinas, FPLC.

## ABSTRACT

Microbial proteases represent the most important group of enzymes in the world market, because they are used in several fields including detergent, food, pharmaceutical, leather, textile, cosmetic, chemistry industry, among others; and in bioremediation processes and waste management. For those reasons, there is a growing interest in discovery of new proteases with characteristics to be applied in a wide range of biotechnological processes. Hence, in this work three extracellular proteases produced by a strain of *Pseudomonas sp.* isolated from soil samples of "aguajales" de Tambopata in Madre de Dios, were purified and characterized. The proteases were purified by anion exchange chromatography in a FPLC system, using a Cpto™ Q column; and ammonium sulfate precipitation 70 %. Extracellular proteases EI, EII and EIII were purified, being EI the enzyme with the highest recovery and purification factor (80, 1 % y 5, 7-fold). Molecular weight of the enzymes EI, EII and EIII were 35, 40 y 55 kDa, respectively. Enzymes EI and EIII were classified as serine proteases depending of metal ions, while EII was classified as a metalloprotease. Optimum pH of enzymes EI and EII was 8, whereas optimum pH of EIII was 11. Optimum temperature of the three purified enzymes was 60 °C. Enzymatic activity of enzymes EI and EII was strongly stimulated by  $Mn^{+2}$ ; however both were completely inhibited by  $Zn^{+2}$ . While enzymatic activity of EIII was slightly increased by  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  and  $Zn^{+2}$ . Based on the results obtained in this work, we can indicate that the three extracellular proteases produced by *Pseudomonas sp.* are thermostable and alkaline, mainly enzyme EIII, and they have a great biotechnological potential to be applied in several bioprocesses.

**Key words:** Enzyme Purification, *Pseudomonas*, extracellular proteases, alkaline proteases, FPLC.