



## Purificación de subtilisina por exclusión molecular.

Eduardo Rodríguez Cuevas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Tecnológica de Tecámac. ercvip@gmail.com

***Bacillus subtilis*** produce subtilisina que han tomado un papel importante en la industria. Por tanto es de vital importancia establecer una producción y purificación rentable. La producción se evaluó en medio de cultivo Schaeffer enriquecido con glucosa; incubando a un pH 7, 37°C y 150 rpm por 18 horas. Terminado el tiempo se centrifugó el caldo a 3000 rpm por 10 minutos obteniendo el sobrenadante, este se inoculó en medios de cultivo para corroborar actividad enzimática. Se midió concentración de proteína del extracto crudo por la técnica de Bradford. Obteniendo una concentración de 1882 µg/ml de proteína. Posteriormente se procedió a la purificación por fraccionamiento en cromatografía de exclusión molecular, utilizando como fase estacionaria Sephadex G-50, se recolectaron eluatos de 5 ml, se determinó la presencia de proteína por Bradford. Los eluatos con presencia de proteína fueron las fracciones 3, 4 y 5; se realizó el análisis estadístico y se determinó que la fracción número 4 fue la de mayor concentración teniendo una concentración de 763 µg/ml; la cual se obtuvo a los 49 minutos en el corrimiento cromatográfico. Determinada la presencia de enzima se montó un sistema de electroforesis vertical con geles de poliacrilamida preparados al 15% en los cuales se cargaron las muestras en condiciones reducidas y un marcador de peso molecular para tomarlo como referencia, se realizó el corrimiento; se detuvo en cuanto las muestras avanzaron  $\frac{3}{4}$  partes del gel y se procedió al revelado de las proteínas con el colorante azul de Coomassie R-250. En el gel se observaron barridos en las muestras 3, 4 y 5 lo que demuestra la presencia de proteína en dichos extractos. Con estos resultados se establece un método de purificación económica, dando la pauta a utilizar ahora sustratos de mayor rentabilidad.