

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZATAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**“COMPARACIÓN ENTRE UN EXTRACTO COMERCIAL Y UN
EXTRACTO PROTEOLÍTICO FÚNGICO PRODUCIDO POR
FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA
PRESENTA

MARÍA DE JESÚS GARCÍA GÓMEZ

DIRECTORA
CO-DIRECTOR
ASESOR

DRA. LILIA ARELY PRADO BARRAGÁN
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
DR. SERGIO HUERTA OCHOA

MÉXICO, D.F., AGOSTO, 2008.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El presente trabajo de Tesis fue desarrollado con la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el No. de registro 133291.

COMITÉ TUTORIAL

Directora

Dra. Lilia Arely Prado Barragán

Profesor Titular "C"

Departamento de Biotecnología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

lapb@xanum.uam.mx

Co-Director

Dr. Octavio Loera Corral

Profesor Titular "C"

Departamento de Biotecnología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

loera@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Profesor Titular "C"

Departamento de Biotecnología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

sho@xanum.uam.mx

Iztapalapa, D.F. a 13 de Agosto de 2008

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis "COMPARACIÓN ENTRE UN EXTRACTO COMERCIAL Y UN EXTRACTO PROTEOLÍTICO FÚNGICO PRODUCIDO POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO" que presentó:

María de Jesús García Gómez

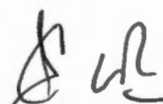
Jurado:



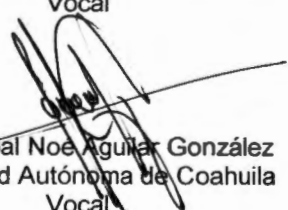
Dr. Ernesto Favela Torres
Universidad Autónoma Metropolitana
Presidente



Dra. Araceli Tomasini Campocosio
Universidad Autónoma Metropolitana
Secretaria



Dr. Carlos Regalado González
Universidad Autónoma de Querétaro
Vocal



Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Universidad Autónoma de Coahuila
Vocal

DEDICATORIA

*A Dios por manifestarse en mi vida en momentos
en los que he perdido la fé y esperanza*

*A mis padres, Enrique y Ma. de Jesús, por su infinito amor, apoyo
incondicional y sus valiosas enseñanzas de superación y lucha constante*

*A mi esposo, Juan, por su amistad, amor, apoyo y
comprensión, pero sobre todo por compartir su vida conmigo*

*A mis hermanos Edna, Amalia y Enrique por estar presentes en
los momentos más importantes de mi vida ofreciéndome su apoyo*

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité tutorial Dra. Lilia Arely Prado Barragán, Dr. Octavio Loera Corral y Dr. Sergio Huerta Ochoa por la formación y el apoyo.

A los miembros del jurado Dr. Ernesto Favela Torres, Dra. Araceli Tomasini Campocosío, Dr. Carlos Regalado González y Dr. Cristóbal Noé Aguilar González por su valioso tiempo y las aportaciones realizadas a este trabajo.

A mis profesores en la Universidad Autónoma Metropolitana que compartieron sus conocimientos, particularmente al Dr. Gustavo Viniegra González.

A todas las personas que me brindaron su amistad y apoyo a lo largo del tiempo en el que se realizó este trabajo.

A todos mis compañeros de la PP4 y del laboratorio W por su compañía.

A Gloria, Arturo, Blanca, Patty Estrada, Tere Flores, Sra. Mary, Oscar Núñez, Marcos López y Divanery por sus comentarios de aliento y su amistad.

A mis compañeros de generación César, Citlali y Laura por su compañerismo y apoyo.

Contenido

Página

Índice general.....	i
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	vii
 1. ABSTRACT.....	 x
RESUMEN.....	xii
 2. INTRODUCCIÓN	
2.1. Enzimas.....	1
2.2. Procedencia de las enzimas.....	2
2.3. Producción de enzimas.....	3
2.3.1. Fermentación en medio líquido (FML).....	3
2.3.2. Fermentación en medio sólido (FMS).....	6
2.3.3. FMS vs. FML.....	10
2.4. Proteasas.....	11
2.4.1. Fuentes de proteasas.....	12
2.4.2. Clasificación de las proteasas.....	13
2.4.3. Cinética de la reacción proteolítica.....	16
2.4.4. Actividad y estabilidad de las proteasas.....	18
2.4.5. Preparaciones comerciales de proteasas.....	20
2.4.6. Aplicación de las proteasas.....	22
2.4.6.1. Detergentes.....	22
2.4.6.2. Industria Peletera.....	22
2.4.6.3. Industria Farmacéutica.....	23
2.4.6.4. Industria de los Alimentos.....	23
2.4.6.5. Producción de hidrolizados.....	23
2.4.6.6. Otras.....	24

3. ANTECEDENTES

3.1. Antecedentes.....	25
3.1.1. Producción de proteasas.....	25
3.1.2. Producción de hidrolizados enzimáticos de proteína de pescado.....	28

4. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Justificación.....	30
4.2. Hipótesis.....	33
4.3. Objetivos.....	34
4.3.1. General.....	34
4.3.2. Específicos.....	34

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Producción del extracto proteolítico.....	35
5.1.1. Microorganismos.....	35
5.1.1.1. Conservación de cepas.....	35
5.1.1.2. Medios de cultivos para la propagación de hongos.....	35
5.1.2. Selección en placa de cepas fúngicas proteolíticas.....	36
5.1.3. Selección del medio de cultivo para la producción del extracto proteolítico.....	38
5.1.4. Fermentación en medio sólido (FMS).....	39
5.1.4.1. Preparación del medio de cultivo.....	39
5.1.4.2. Preparación del inóculo.....	39
5.1.4.3. Efecto de la adición de glucosa sobre la producción de proteasas por fermentación en medio sólido.....	40
5.1.4.4. Condiciones del cultivo.....	40
5.1.4.5. Obtención del extracto crudo.....	41
5.1.4.6. Métodos analíticos.....	41
5.1.4.6.1. Determinación del pH.....	41
5.1.4.6.2. Determinación de Aw y humedad.....	41

5.1.4.6.3. Determinación de la actividad proteolítica.....	41
5.1.4.7. Cinética de producción de proteasas con dos tamaños de partícula del soporte inerte.....	43
5.1.5. Fermentación en medio líquido (FML).....	43
5.1.5.1. Preparación del medio de cultivo.....	43
5.1.5.2. Determinación de proteína al medio de cultivo.....	43
5.1.5.3. Inóculo.....	44
5.1.5.4. Condiciones del cultivo.....	44
5.1.5.5. Obtención del extracto crudo.....	45
5.1.5.6. Métodos analíticos.....	45
5.1.5.6.1. Determinación del pH.....	45
5.1.6.5.2. Determinación de la actividad proteolítica.....	45
5.1.6. Zimogramas para la detección <i>in situ</i> de la actividad proteolítica en los extractos crudos obtenidos por FMS y FML.....	45
5.2. Comparación entre el extracto fúngico proteolítico y un extracto comercial.....	46
5.2.1. Caracterización parcial de los extractos proteolíticos.....	46
5.2.1.1. Determinación de las condiciones óptimas de actividad de los extractos.....	47
5.2.1.2. Determinación de las condiciones de estabilidad de los extractos.....	47
5.2.2. Comparación del grado de hidrólisis entre los extractos.....	48
6. RESULTADOS Y DISCUCIONES	
6.1. Determinación de la composición de la harina de pescado.....	50
6.2. Selección de cepas fúngicas productoras de proteasas.....	51
6.3. Medio de cultivo para la producción del extracto proteolítico.....	55
6.3.1. Selección del soporte inerte y relación harina de pescado-soporte inerte.....	55
6.3.2. Selección de la concentración de glucosa y cepa con mayor actividad proteolítica.....	57

6.3.3. Efecto del tamaño de partícula de soporte inerte (PUF) en la producción de proteasas por FMS.....	64
6.4. Comparación de la producción de proteasas por FMS y FML.....	67
6.5. Zimogramas para la detección <i>in situ</i> de la actividad proteolítica en los extractos crudos obtenidos por FMS y FML.....	74
6.6. Comparación entre el extracto crudo enzimático producido por <i>A. oryzae</i> 2095 por FMS y un extracto comercial.....	76
6.6.1. Caracterización bioquímica de los extractos.....	77
6.6.1.1. Determinación del pH y temperatura óptimos de actividad.....	77
6.6.1.2. Determinación de la estabilidad al pH y la temperatura.....	79
6.6.2. Determinación del grado de hidrólisis de los extractos.....	82
7. CONCLUSIONES.....	85
8. PERSPECTIVAS.....	87
9. BIBLIOGRAFÍA.....	88
10. ANEXO. Artículo publicado.....	99

INDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
No.		No.
1	Tamaño de los fermentadores para diversos procesos industriales	4
2	Ventajas y desventajas de la FML	5
3	Tipos de reactores utilizados en FMS y sus aplicaciones	9
4	Ventajas y desventajas de la FMS	10
5	Fuentes de obtención de enzimas proteolíticas	12
6	Preparaciones comerciales de proteasas y origen de su obtención	21
7	Características principales de algunos reportes de proteasas obtenidas por fermentación	27
8	Procedencia y medio de propagación de las cepas utilizadas	36
9	Indicadores empleados en el agar harina de pescado para observar el cambio en el pH del medio debido a la hidrólisis de la harina de pescado	37
10	Proporciones de harina de pescado y soporte inerte con las que se prepararon las mezclas	39
11	Condiciones iniciales de la FMS	40
12	Curva estándar de tirosina	42
13	Curva estándar de BSA	44
14	Condiciones iniciales de la FML para la producción de proteasas	45
15	Composición de harinas de pescado utilizadas como medio de fermentación para la obtención de proteasas	51

TABLA		PÁGINA
No.		No.
16	Índice de potencia (I_p) en placas de agar leche descremada a las 56 h de incubación	54
17	Parámetros de selección de la relación harina de pescado/soporte inerte (agrolita ó espuma de poliuretano PUF)	56
18	pH, actividad de agua (A_w) y porcentaje de humedad (% H) de medios de fermentación con 0, 5, 10 y 15% de glucosa a las 0, 36 y 72 h de fermentación	58
19	Comparación de la actividad proteolítica de los extractos de <i>Aspergillus oryzae</i> 2095 obtenidos por fermentación en medio sólido y líquido con los reportados en la literatura	72
20	Pesos moleculares de proteasas obtenidas a partir de diferentes microorganismos	76
21	Comparación de la temperatura y el pH óptimo de actividad y de estabilidad de algunos extractos proteolíticos reportados en la literatura y los obtenidos en este trabajo	81
22	Comparación de la eficiencia hidrolítica, de algunos extractos proteolíticos reportados en la literatura y los obtenidos en este trabajo, sobre productos de origen acuático	84

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
No.		No.
1	Distribución de la venta mundial de enzimas	11
2	Reacción hidrolítica de una proteína por acción de una proteasa	12
3	Curvas de pH de actividad para Alcalasa y Neutrasa actuando sobre hemoglobina desnaturalizada	19
4	Curvas de temperatura de actividad a diferentes tiempos de reacción de hidrólisis de soya con Alcalasa (pH 8)	20
5	Crecimiento fúngico sobre placas de agar harina de pescado incubadas a 30°C durante 72 h	52
6	Alcalinización del medio en placas de agar harina de pescado con RF durante el crecimiento de <i>A. oryzae</i> 2095 a 30°C (72 h)	52
7	Crecimiento de hongos filamentosos sobre placas de agar leche descremada (8%) incubadas a 30°C durante 56 h	54
8	Curvas de secado de las mezclas harina de pescado-agrolita y harina de pesado espuma de poliuretano (PUF) en diferentes proporciones	56
9	Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad proteolítica (pH 7) de <i>A. niger</i> 2088 crecido en FMS utilizando una mezcla 70/30 (p/p) de harina de pescado-espuma de poliuretano con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente	60
10	Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad proteolítica (pH 7) de <i>A. niger</i> ANH15 crecido en FMS utilizando una mezcla 70/30 (p/p) de harina de pescado-espuma de poliuretano con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente.	61

FIGURA	PÁGINA
No.	No.
11 Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad proteolítica (pH 7) de <i>A. oryzae</i> 2095 crecido en FMS utilizando una mezcla 70/30 (p/p) de harina de pescado-espuma de poliuretano con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente	63
12 Cinética de producción de proteasas con <i>Aspergillus oryzae</i> 2095 crecido en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente	64
13 Producción de extractos proteolíticos extracelulares con actividad neutra y alcalina de <i>Aspergillus oryzae</i> 2095 crecido en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 1.5 mm respectivamente	65
14 Producción de extractos proteolíticos extracelulares con actividad neutra y alcalina de <i>Aspergillus oryzae</i> 2095 crecido en FML utilizando medio harina de pescado	67
15 Producción de extractos proteolíticos extracelulares con actividad neutra y alcalina de <i>Aspergillus oryzae</i> 2095 crecido en (a) FMS utilizando medio harina de pescado-espuma y en (b) FML utilizando medio harina de pescado	69
16 Perfil de extractos proteolíticos de <i>A. oryzae</i> 2095 producidos por FMS y FML	75
17 Temperatura y pH óptimos de Flavourzyme 500 MG®	78
18 Temperatura y pH óptimos de actividad del extracto crudo (EC) de <i>Aspergillus oryzae</i> 2095 crecido en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente	78

FIGURA		PÁGINA
No.		No.
19	Efecto del pH sobre la estabilidad del (a) extracto crudo de <i>Aspergillus oryzae</i> 2095 crecido en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente, y (b) Flavourzyme 500 MG®.	79
20	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del (a) extracto crudo de <i>Aspergillus oryzae</i> 2095 crecido en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente, y (b) Flavourzyme 500 MG®.	80
21	Actividad hidrolítica de EC y Flavourzyme 500 MG® sobre músculo de mero	82

ABSTRACT

Proteolytic extract (PE) was produced by *Aspergillus oryzae* 2095 from fish flour under fermentation. The effect of initial glucose concentration (0-15 %), polyurethane foam particle size (0.5 and 1.5 mm) and kind of culture on proteases production was examined. Maximal protease titres at pH 7 and 10 ($79.71 \pm 1.68 \text{ UL}^{-1}$ and $120.78 \pm 5.07 \text{ UL}^{-1}$, respectively) were obtained at 44 h using a mix of fish flour (FF) as sole substrate with polyurethane foam particle size of 0.5mm (70:30 ratio w/w) under solid state fermentation (SSF). The optimum activity and stability at pH (6-10) and temperature (30-70°C) of proteolytic extract and commercial protease (Flavourzyme 500 MG®) were compared using casein as substrate. The optimum activity for both extracts was at pH 8 and 50°C. PE exhibited high caseinolytic activity (higher than 80%) in all pH values tested while Flavourzyme 500 MG® retained the same percentage in a pH range of 6-8. Similar results were observed for thermal stability because PE kept 100% of residual activity when was incubating at 30 and 40°C during 120 min while 50, 60 and 70°C residual activities were 22, 13 and 2% respectively. For Flavourzyme 500 MG® residual activities at 30 and 40°C were 50%, at 50°C was smaller than 20% while at 60 and 70°C the extract was inactivated. The half-lives of proteases produced by *Aspergillus oryzae* 2095 and Flavourzyme 500 MG® at 50°C were 52 and 25 min, respectively. Furthermore, the degree of hydrolysis for both extracts was determinated on muscle of giant sea bass (*Epinephelus morio*) at the same casein activity level. The degree of hydrolysis was higher with proteases from *Aspergillus oryzae* 2095 than Flavourzyme 500 MG® (22.2 and 9.1 %DH, respectively) on fish muscle

ABSTRACT Y RESUMEN

CAPÍTULO 1

protein under the same reaction conditions at 60 min. These results indicate that fish flour is an excellent inexpensive substrate to produce fungal proteases under SSF, which can be used to hydrolyze fish industry by-products better than commercially enzyme obtained from the same fungal species.

RESUMEN

Un extracto proteolítico fúngico (EP) fue producido por fermentación utilizando harina de pescado como sustrato. Se analizó el efecto de la concentración inicial de glucosa (0-15%), el tamaño de partícula de la espuma de poliuretano (0.5 y 1.5 mm) y el tipo de cultivo sobre la producción de proteasas. La actividad proteolítica máxima a pH 7 y pH 10 ($79.71 \pm 1.68 \text{ UL}^{-1}$ y $120.78 \pm 5.07 \text{ UL}^{-1}$, respectivamente) fue obtenida por fermentación en medio sólido (FMS) a las 44 h sin adición de glucosa cuando se utilizó espuma de poliuretano de 0.5 mm. El pH (6-10) y temperatura (30-70°C) óptima de actividad y de estabilidad del EP producido por FMS y un extracto fúngico comercial (Flavourzyme 500 MG®) fueron comparadas utilizando caseína como sustrato. El pH y temperatura óptimos de actividad para ambos extractos fue 8 y 50°C, respectivamente. El EP conservó el 80% de su actividad original a todos los valores de pH analizados después de 2 h de incubación a 50°C, mientras que Flavourzyme 500 MG® retuvo el mismo porcentaje de actividad solo a valores de pH de 6 a 8. Resultados similares fueron observados para la estabilidad térmica, ya que EP mantuvo 100% de su actividad residual cuando fue incubado a 30 y 40°C durante 120 min, mientras que a 50, 60 y 70°C las actividades residuales fueron 22, 13 y 2% respectivamente. Para Flavourzyme 500 MG® la actividad residual a 30 y 40°C fue de 50%, a 50°C menor del 20%, mientras que a 60 y 70°C el extracto fue inactivado. El tiempo de vida media para las proteasas producidas por *Aspergillus oryzae* 2095 y Flavourzyme 500 MG® a 50°C fue de 52 y 25 min, respectivamente. Por otro lado, el grado de hidrólisis para ambos extractos fue analizado sobre músculo de mero

(*Epinephelus morio*) al mismo nivel de actividad. Las proteasas de *Aspergillus oryzae* 2095 proporcionaron mayor grado de hidrólisis que Flavourzyme 500 MG® sobre el músculo de pescado (22.2 y 9.1 %GH, respectivamente) a 60 min bajo las mismas condiciones de reacción. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la harina de pescado es un sustrato económico que puede ser utilizado para obtener proteasas fúngicas por fermentación en medio sólido, las cuales pueden ser usadas para hidrolizar subproductos de la industria pesquera con mayor actividad hidrolítica que las enzimas comerciales obtenidas por fermentación en medio líquido con hongos de la misma especie.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

2.1. Enzimas

2.1.1. Generalidades de las enzimas

En los últimos años, se ha observado un aumento en la contaminación del medio ambiente como consecuencia de las actividades relacionadas con el desarrollo humano. Esto ha incrementado el interés en la utilización de los subproductos generados en diversos sectores industriales tales como agricultura, pesca, y alimentos, como lácteos, cárnicos, etc. La transformación catalítica de estos residuos permite obtener productos con valor agregado y con alguna aplicación específica.

Con el progreso de la biotecnología, se han desarrollado varios procesos para la obtención de un amplio espectro de catalizadores naturales, a los cuales se les conoce con el nombre de enzimas. El empleo de las enzimas en una gran variedad de aplicaciones industriales se debe a que tienen muchas ventajas en comparación con los tradicionales catalizadores químicos. Algunas de estas ventajas se mencionan a continuación:

- a. Son de origen natural y por lo tanto no son tóxicas
- b. Presentan mayor especificidad por lo que se reducen reacciones secundarias indeseables
- c. Funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH
- d. Actúan a bajas concentraciones de la enzima
- e. Su velocidad puede ser controlada al ajustar el pH, temperatura, concentración de la enzima y del sustrato
- f. Son fácilmente inactivadas una vez que es alcanzado el grado de transformación deseado.

Una de las principales limitantes del uso de las enzimas, es que su obtención puede ser muy costosa sin embargo, en la actualidad existen

innovaciones tecnológicas que logran hacer más económica la producción de estos catalizadores como se describe más adelante (Voet y Voet, 1992).

2.2. Procedencia de las enzimas

En el Manual de Nomenclatura de las Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica se incluyen cerca de 2500 reacciones catalizadas por enzimas. Sin embargo, sólo unas 40-50 enzimas son producidas a escala industrial a partir de microbios, plantas o animales. La comercialización de enzimas de origen animal y vegetal ha disminuido debido principalmente a las limitaciones políticas y económicas que existen para la producción de las mismas. Por ésta razón, la mayoría de las enzimas que son comercialmente importantes se producen a partir de un número limitado de microorganismos.

Los microorganismos producen una variedad amplia de enzimas potencialmente útiles, muchas de las cuales son extracelulares (Gacesa y Hubble, 1990). En particular, los hongos ofrecen varias ventajas sobre otro tipo de microorganismos debido a que son capaces de producir cantidades elevadas de proteína y secretarla al medio de cultivo lo cual facilita su recuperación (Sandhya y col., 2005), glucosilan las proteínas, son generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés), producen una gama amplia de productos de interés industrial como biopesticidas, alimentos fermentado, ácidos orgánicos, etc. (Mitchell y col., 2000), además pueden ser crecidos sobre una gran variedad de sustratos económicos como subproductos agrícolas (Li y col., 2000). Dentro de los géneros de hongos filamentosos más usados para la producción de enzimas y metabolitos se encuentran *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, etc. (Mitra y col., 1996; Mitchell y col., 2000; Sandhya y col., 2005, Wang y col., 2005a, 2005b).

2.3. Producción de enzimas

Las enzimas microbianas son producidas generalmente por fermentación. Dependiendo de la cantidad de líquido libre en el sustrato, los procesos de fermentación pueden clasificarse en fermentación en medio líquido (FML) o en medio sólido (FMS) (Mitchell y col., 2000). A continuación se describen las características de cada uno de estos sistemas de producción.

2.3.1. Fermentación en medio líquido (FML)

La FML se define como el crecimiento de microorganismos en un caldo nutritivo que puede contener alrededor de 50 g/L de solutos, por lo tanto tiene un contenido de agua de 95%. Dicho caldo de cultivo se parece y comporta de manera similar al agua pura (Mitchell y col., 2000).

2.3.1.1. Factores que afectan la producción de enzimas en FML

La FML es un método de producción utilizado principalmente en los países occidentales para la producción de enzimas, antibióticos y otros productos. Los factores principales que influyen en la obtención de productos mediante este bioproceso son:

a) Tamaño del fermentador

El tamaño de los fermentadores puede variar de 5 a 10 L para escala de laboratorio y hasta 500,000 L para escala industrial. El tamaño del fermentador depende del proceso (Tabla 1)

**Tabla 1. Tamaño de los fermentadores para diversos procesos industriales
(Madigan y col., 1999)**

Tamaño del fermentador (L)	Producto
1-20,000	Enzimas para diagnóstico, sustancias de biología molecular
40-80,000	Algunas enzimas antibióticas (β -lactamasa)
100-150,000	Antibióticos β -lactámicos y aminoglicosídicos, proteasas, amilasas, transformación de esteroides, aminoácidos
200,000-500,000	Aminoácidos (ácido glutámico)

Los fermentadores industriales son de acero inoxidable y tienen acoplados tubos y válvulas para controlar el proceso (Nielsen y col, 1994)

b) Inóculo

Para obtener resultados reproducibles existen procedimientos específicos para almacenar y propagar a los microorganismos. Los cultivos de reserva son almacenados en congelación ($\leq -80^{\circ}\text{C}$) o liofilizados. El inóculo se prepara sembrando, en cultivo sólido o líquido, una alícuota de la cepa conservada. Con este inóculo denominado "semilla" se inocula el fermentador semilla que representa de 4-12% del volumen total del fermentador principal el cual es inoculado con dicho volumen (Nielsen y col., 1994).

c) Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo contiene nutrientes para el microorganismo tales como almidón, proteína de soya o aceite de palma; varias sales como fosfato de potasio y algunas veces vitaminas (Nielsen y col., 1994). La producción de enzimas extracelulares es fuertemente afectada por los componentes del medio como son la presencia y concentración de azúcares y fuentes de nitrógeno (relación C/N) fácilmente metabolizables (Gupta y col., 2002a)

d) Oxígeno disuelto (DO en inglés)

El oxígeno disuelto puede ser controlado por aireación, agitación, presión y/o velocidad de suministro de O_2 . La velocidad de consumo de O_2 y producción de CO_2 son generalmente medidos y proporcionan información sobre el comportamiento metabólico del microorganismo y por lo tanto de la producción de biomasa, enzimas o metabolitos de interés (Nielsen y col., 1994).

e) Temperatura y pH

Estos parámetros son monitoreados y controlados ya que influyen directamente tanto en el crecimiento microbiano como en la obtención del producto de interés. La temperatura se controla mediante las camisas de refrigeración y/o los serpentines internos a través de los cuales circula agua fría o vapor. Mientras que el pH se controla con la adición de ácidos o bases al medio de cultivo (Nielsen y col., 1994)

2.3.1.2. Ventajas y desventajas de la FML

Las principales ventajas y desventajas de este bioproceso se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la FML (Mitchell y col., 2000)

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Permite la obtención de una amplia variedad de productos a partir de una gran diversidad de microorganismos	Frecuentemente el medio contiene ingredientes altamente procesados que son costosos.
Cuando se utilizan medios definidos hay mayor reproducibilidad entre lotes de producción.	La actividad de agua es muy elevada y permite el crecimiento de microorganismos contaminantes
La agitación durante el proceso permite que no haya limitación en la difusión de los nutrientes.	Se ha observado represión catabólica a altas concentraciones de sustrato
El alto contenido de agua en el medio facilita el control de la temperatura.	La transferencia de gas de la fase líquida a la sólida es usualmente limitante
El desarrollo de fermentadores con sensores acoplados permite controlar los parámetros del proceso tales como pH y concentración de sustrato mediante la adición de los compuestos adecuados.	El procesamiento "downstream" requiere la remoción de grandes volúmenes de agua por lo que es costoso
La biomasa, consumo de sustrato y la generación de producto pueden ser cuantificadas de manera directa	Se producen volúmenes grandes de líquido residual
La recuperación de los productos es más fácil	

2.3.2. Fermentación en medio sólido (FMS)

La FMS es definida como un proceso de bioconversión que involucra el crecimiento de microorganismos, típicamente hongos, sobre un sustrato sólido húmedo en ausencia de agua libre (Ooijkaas y col., 2000). El uso de hongos filamentosos en este bioproceso se debe principalmente a que las condiciones bajo las cuales se realiza la FMS son similares a las que ellos crecen en la naturaleza y a las características descritas anteriormente (Sección 2.2).

La obtención de enzimas microbianas por FMS es de alrededor del 5% del total de enzimas comercializadas. En los países orientales se ha utilizado desde hace siglos, mientras que en las últimas décadas su uso se ha extendido a países latinoamericanos.

2.3.2.1. Factores que afectan la producción de enzimas en FMS

El crecimiento de los microorganismos, así como las actividades relacionadas a éste, como son la secreción de enzimas hidrolíticas o metabolitos pueden ser afectadas por factores tales como:

a) Naturaleza de la fase sólida usada

Dependiendo de las características de la fase sólida, se distinguen dos tipos de sistemas de FMS. El primero, más comúnmente utilizado y descrito, involucra el cultivo sobre sustratos naturales. En este tipo de sistema el material natural sirve como soporte y fuente de nutrientes. Los materiales naturales típicamente usados son subproductos agrícolas compuestos principalmente por almidón, celulosa o lignocelulosa. La mayor desventaja de este tipo de materiales es que la fuente de carbono constituye parte de su estructura, así que, durante el crecimiento del microorganismo el medio sólido es degradado, cambiando sus características físicas y geométricas, reduciendo por consiguiente la

transferencia de calor y masa. El uso de sustratos naturales limita las posibilidades de alterar la composición del medio cuando se requiere la optimización del proceso de FMS.

El segundo sistema de cultivo, menos usado, comprende el crecimiento de microorganismos sobre un soporte inerte impregnado con un medio líquido definido. Este presenta varias ventajas en comparación con el primer sistema descrito. Algunas de estas ventajas son: su estructura es constante durante el proceso, lo que permite mejorar la transferencia de calor y masa; la recuperación del producto es menos complicada porque no hay contaminantes procedentes del sustrato, permite diseñar el medio de cultivo para la obtención del producto de interés, los balances de masa para procesos de modelamiento pueden ser fácilmente establecidos debido a que la concentración de nutrientes es conocida. Algunos de los soportes inertes usados en FMS son cáñamo, agrolita, espuma de poliuretano (PUF en inglés) y vermiculita (Ooijkaas y col., 2000).

b) Composición del medio de producción

Igual que en la FML, el tipo, fuente y naturaleza del carbono y nitrógeno son los factores más importantes para el proceso de FMS, ya que pueden influenciar el crecimiento del microorganismo, así como la producción de metabolitos, enzimas y esporas. La fuente de carbono representa la energía que estará disponible para el microorganismo. Ésta puede ser un compuesto simple como la glucosa (monosacárido), o un compuesto complejo como almidón o celulosa (polisacárido) (Pandey y col., 2001; Mitchell y col., 2000).

c) Temperatura

La mayoría de los microorganismos utilizados en este proceso se desarrollan en un intervalo de temperatura muy restringido (20–45°C).

Ésta tiene un efecto significativo durante el desarrollo de los procesos biológicos como la desnaturalización de proteínas, inhibición enzimática, promoción o inhibición en la producción de metabolitos, muerte celular, entre otros (Pandey y col., 2001; Mitchell y col., 2000).

d) Tamaño de partícula del soporte inerte y/o sustrato empleado

El tamaño de partícula es un parámetro importante, ya que afecta la relación área superficial/volumen y la densidad de empaque; su optimización representa conjuntar de manera eficiente la accesibilidad de nutrientes y la disponibilidad de oxígeno. El empleo de soportes inertes, molidos y tamizados a tamaños de partícula de hasta 0.5 mm proveen gran área superficial para el crecimiento del hongo, y debido a que el tamaño de la partícula permanece constante se previenen problemas con la transferencia de calor y masa (Pandey y col., 2001; Mitchell y col., 2000).

e) Humedad y actividad de agua (A_w)

La importancia del agua en el sistema es debido al hecho de que la gran mayoría de las células viables se caracterizan por tener un contenido de humedad del 70-80%. Por lo tanto, la humedad y A_w implican la necesidad de considerar la cantidad de agua que debe de ser añadida al sustrato con la finalidad de satisfacer los requerimientos del sistema (Pandey y col., 2001; Mitchell y col., 2000).

f) pH del medio

El pH es un parámetro importante para cualquier proceso de fermentación. Cada microorganismo tiene un intervalo de pH para su crecimiento y actividad con un valor óptimo en ese intervalo. En FMS su control es un problema sin resolver, debido a la falta de equipo apropiado y electrodos que determinen el pH en materiales sólidos, y a

la existencia de gradientes de pH causados por las características heterogéneas del proceso (Pandey y col., 2001; Mitchell y col., 2000).

g) Concentración de O_2 y CO_2 en la atmósfera gaseosa

Se ha demostrado que la composición de gas es un parámetro relevante para la producción de enzimas por hongos filamentosos en FMS, porque las presiones parciales del O_2 y CO_2 influyen en el microambiente gaseoso que rodea al microorganismo y afecta su sistema regulatorio (Villegas y col., 1993) por lo que su control es importante durante la producción de biomasa, enzimas y otros metabolitos.

h) Tipo y diseño del reactor

Este parámetro puede afectar enormemente la productividad. Algunos de los reactores utilizados en las FMS se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Tipos de reactores utilizados en FMS y sus aplicaciones (Aikat y Bhattacharyya, 2001)

TIPO DE REACTOR	APLICACIONES
Reactor de caja o adaptaciones	Efectivo para fermentaciones aeróbicas (hongos con alto crecimiento superficial).
Fermentador de lecho profundo	Obtención de altos rendimientos enzimáticos.
Bioreactor de columna empacada	Producción de biomasa y esporas.

2.3.2.2. Ventajas y desventajas de la FMS

Las principales ventajas y desventajas de éste bioproceso se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de la FMS (Mitchell y col., 2000)

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Se utilizan subproductos agrícolas como sustratos, los cuales contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo	El contenido de nutrientes en el sustrato puede ser variable
Los sustratos utilizados son relativamente económicos y su pretratamiento sencillo	El crecimiento puede estar limitado por la difusión de nutrientes
El bajo contenido de agua previene el crecimiento de microorganismos contaminantes	Pueden existir problemas de sobrecalentamiento por la restricción en la remoción de calor metabólico
Las concentraciones elevadas de sustrato permiten la obtención de concentraciones elevadas de producto	El control del proceso es complicado por la dificultad para hacer mediciones en línea de los parámetros de fermentación
La aireación es menos forzada ya que la presión es más baja en los fermentadores	La medición de la biomasa es difícil debido a la heterogeneidad del medio
El procesamiento "downstream" puede ser sencillo ya que los productos están más concentrados	Los extractos pueden contaminarse con componentes del sustrato
El volumen de agua residual producido durante el procesamiento "downstream" es escaso	La cinética de crecimiento y los fenómenos de transporte son pobremente caracterizados

2.3.3. Fermentación en medio sólido vs. Fermentación en medio líquido

Recientemente la FMS ha incrementado su importancia en naciones industrializadas y desarrolladas principalmente por las ventajas que presenta sobre la FML (Tabla 3 y Tabla 4), como son:

1. Simplicidad en el equipo
2. Bajos costos de producción
3. Uso de residuos agroindustriales como sustrato
4. Volúmenes reducidos de aguas residuales
5. Rendimientos altos en la producción de enzimas
6. Productos más concentrados y estables
7. Requerimientos bajos de energía

Estas ventajas son especialmente interesantes para la obtención de enzimas a partir de subproductos agrícolas en países en vías de desarrollo (Aikat y Bhattacharyya, 2001; Couri y col., 2000; Ferreira y col., 1999; Fernández-Lahore

y col., 1998; Ikasari y Mitchell, 1994; Malathi y Chakraborty, 1991; Battaglino y col., 1991; Fukushima y col., 1991).

2.4. Proteasas

De las miles de enzimas conocidas, sólo algunas se producen a escala industrial y son comercializadas debido a su gran variedad de aplicaciones en diversos sectores de la industria de transformación biotecnológica.

Las proteasas representan uno de los tres grupos más grandes de enzimas industriales comercializadas mundialmente (Fig. 1), con aproximadamente el 60% del total (Srinubabu y col., 2007; Germano y col., 2003).

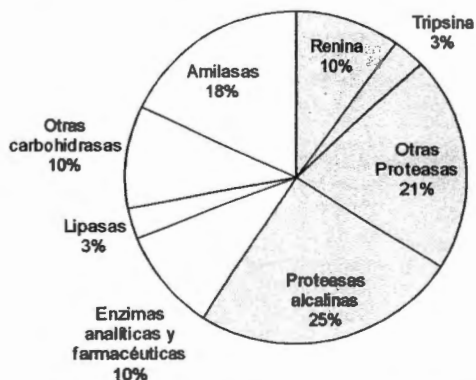


Fig. 1 Distribución de la venta mundial de enzimas. Las secciones sombreadas representan el total de proteasas comercializadas (Rao y col., 1998).

Las proteasas pertenecen a la familia de las hidrolasas y se caracterizan por catalizar la degradación de otras proteínas con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Las enzimas proteolíticas actúan sobre el enlace peptídico rompiéndolo, liberando el grupo amino y el grupo carboxilo como se muestra en la Figura 2.

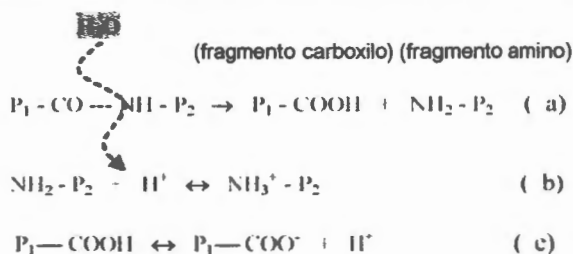


Fig. 2 Reacción hidrolítica de una proteína por acción de una proteasa (Sousa y col., 2004)

Las proteasas constituyen un amplio y complejo grupo de enzimas que difieren en sus propiedades tales como especificidad por un sustrato, naturaleza del sitio activo, mecanismo catalítico, pH óptimo, temperatura óptima y perfil de estabilidad. El estudio relacionado con tales propiedades es fundamental para las proteasas, ya que del conocimiento de las características de dichas enzimas depende su aplicación a nivel industrial (Sumantha y col., 2005).

2.4.1. FUENTES DE PROTEASAS

Las proteasas son fisiológicamente necesarias para los organismos vivos, por lo que se encuentran en plantas, animales y microorganismos. En la Tabla 2 se mencionan algunas de las fuentes de obtención de enzimas proteolíticas.

Tabla 5. Fuentes de obtención de enzimas proteolíticas (Sumantha y col., 2005)

ORIGEN	ENZIMAS
VEGETAL	
Piña	Bromelina
Higo	Ficina
Papaya	Papaina
ANIMAL	
Intestino	Tripeina
Páncreas	Quimotripeina
Estómago de vertebrados	Pepsina
Estómago de animales amamantando	Renina
MICROORGANISMOS	
Hongos	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteasas ácidas, neutras y alcalinas
<i>Aspergillus niger</i>	Proteasa alcalina
<i>Rhizopus oryzae</i>	Proteasa alcalina.
Bacterias	
<i>Bacillus subtilis</i>	Proteasas alcalina.
<i>Bacillus licheniformis</i>	Proteasa alcalina.

2.4.2. Clasificación de las proteasas

En el código enzimático (EC por sus siglas en inglés) para la nomenclatura de enzimas, todas las enzimas proteolíticas (hidrolasas peptídicas) se encuentran dentro de la subclase 3.4, que a su vez se subdivide en 3.4.11-19 para las exopeptidasas y 3.4.21-24 para las endopeptidasas.

- Exopeptidasas

- ✓ Las aminopeptidasas (EC 3.4.11) actúan sobre el N libre terminal de la cadena polipeptídica liberando un aminoácido, un dipéptido o tripéptido. Son abundantes en la naturaleza ya que se localizan intracelularmente o unidas a la membrana celular, sin embargo, es difícil encontrarlas en preparaciones comerciales
- ✓ Las carboxipeptidasas (EC 3.4.12) actúan sobre el C terminal de la cadena polipeptídica (Rao y col., 1998). Se subdividen en cuatro subgrupos dependiendo de su mecanismo catalítico y al grupo funcional presente en su sitio activo: serina-carboxipeptidasa (EC 3.4.16), metalocarboxipeptidasas (EC 3.4.17) y cisteína-carboxipeptidasas (EC 3.4.18). Muchas proteasas comerciales, en particular las de origen fúngico, contienen apreciables cantidades de carboxipeptidasas (Adler-Nissen, 1993)

- Endopeptidasas

Las cuatro clases principales de endopeptidasas son:

- ✓ Serínproteasas (EC 3.4.21): tienen un grupo imidazol y un grupo aspartilcarboxilo en el sitio activo. Son inhibidas por el compuesto llamado di-isopropil-fosfluorato, el cual reacciona con el grupo hidroxilo de un residuo específico serilo en el sitio activo. Las serínproteasas incluyen a la familia de la quimotripsina, tripsina, elastasa, trombina, subtilisina y la proteasa α -lítica.

- ✓ Sulfhidrilproteasas (EC 3.4.22): también llamadas tiolproteasas o cisteínproteasas. En este grupo se encuentran las enzimas de origen vegetal como la papaína, la ficina y la bromelina; el sitio activo está formado por los residuos de Cys e His. Las enzimas de este grupo se inhiben por la presencia de compuestos con iones de sulfhidrilo.
- ✓ Proteasas aspárticas (EC 3.4.23): los grupos catalíticos en el sitio activo son los grupos carboxilos de los dos residuos de ácido aspártico. Este grupo de enzimas también se conoce con el nombre de carboxilproteasas o proteasas ácidas ya que presentan un pH óptimo entre 2 y 4.
- ✓ Metaloproteasas (3.4.24): dentro de su sitio activo se encuentran presentes iones metálicos divalentes; por lo que se inhiben con la presencia de agentes quelantes de metales (Adler-Nissen, 1993; Whitaker, 1994; Rao y col., 1998)

Las proteasas, en base al pH de actividad y estabilidad, pueden clasificarse como:

1. Proteasas ácidas

Las proteasas ácidas son un grupo de enzimas proteolíticas que digieren proteínas y péptidos en solución ácida en intervalos de pH entre 2 y 6. Dentro de esta clasificación se incluyen las aspartato proteinasas, cisteína proteinasas y las metaloproteinazas; las más conocidas son la pepsina, gastricina, quimosina y catepsina D. Generalmente son producidas por hongos, levaduras, plantas, animales y raras veces por bacterias (Rao y col., 1998). Las proteasas ácidas, en particular las producidas por *Aspergillus*, se han estudiado poco a pesar de ser muy importantes en la producción de bebidas y en panificación (Tremacoldi y col., 2004)

2. Proteasas neutras

Las proteasas neutras son activas a pH 7 (Rao y col., 1998), o valores cercanos a este (pH 7.5, (Sandhya y col., 2005); pH 6-8, (Adler-Nissen, 1993)). En este grupo se encuentran la cisteína proteasa, metaloproteasas y algunas serina proteasas (Rao y col., 1998). Este tipo de enzimas son importantes en la industria de los alimentos porque poseen especificidad sobre enlaces de aminoácidos hidrofóbicos a pH neutro, reduciendo de esta manera el sabor amargo de los hidrolizados de proteína (Sumantha y col., 2005). El tratamiento con proteasas neutras también ha demostrado ser efectivo en el aislamiento de almidón de arroz (Sandhya y col., 2005).

3. Proteasas alcalinas

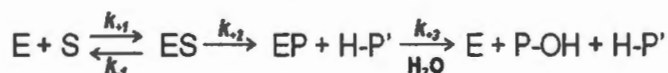
Las proteasas alcalinas son un importante grupo de enzimas que ocupan aproximadamente el 25% de las enzimas comercializadas mundialmente (Kumar y col., 2004). En el año 2006 el valor total de la venta mundial de proteasas provocó una derrama económica entre 680 y 800 mil millones de dólares (Sharma y col., 2007).

Las proteasas alcalinas se caracterizan por presentar una actividad enzimática óptima y estabilidad en regiones con pH alcalinos cuyos valores van entre 8 y 13 (Tremacoldi y col., 2007). Algunos de los microorganismos que han sido utilizados para la producción industrial de proteasas alcalinas son bacterias, principalmente del género *Bacillus* (Ghorbel y col., 2003) y hongos de diversos géneros, siendo quizás el género *Aspergillus* el más empleado (Tremacoldi y col., 2007; Sharma y col., 2007; Tremacoldi y col., 2005). Este tipo de enzimas se han usado principalmente como ingrediente activo de los detergentes (Sharma y col., 2007), en el tratamiento de pieles, en la modificación del gluten de trigo y en la industria farmacéutica (Tremacoldi y col., 2005).

2.4.3. Cinética de la reacción proteolítica

Las enzimas proteolíticas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y selectividad. El mecanismo de catálisis en la mayoría de las proteasas se lleva a cabo en etapas secuenciales que son:

1. Formación del complejo de Michaelis-Menten entre el sustrato y la enzima
2. Rompimiento del enlace peptídico
3. Liberación de la enzima



donde S es el sustrato, P y P' son los péptidos resultantes. El paso 2, es determinante para la velocidad de la reacción. Esto significa que la velocidad de la reacción total está determinada por k_{+2} (k_{cat}) y K_M es aproximadamente igual a la constante de disociación, k_{-1}/k_{+1} . En otras palabras, la clásica cinética de Michaelis-Menten es observada durante la hidrólisis de una proteína.

El resultado neto de la reacción hidrolítica por la ruptura de cada enlace peptídico es la formación de un grupo amino y un grupo carboxilo libres (Fig. 2). En solución acuosa, estos grupos estarán parcialmente ionizados dependiendo del pH del medio. Se estima que los valores de pK a 25°C para los grupos -COOH y +HN- en polipéptidos están comprendidos entre 3.1-3.6 y 7.5-7.8 respectivamente. Por lo que a valores de pH < 3.1-3.6 el grupo carboxílico estará parcialmente disociado en más del 50% y el grupo amino completamente protonado; presentándose una captura de 0.5 a 1.0 equivalente de H^+ por cada equivalente de enlace peptídico fragmentado, incrementado el pH si éste no es controlado. Por otro lado, si el pH es mayor a 7.5-7.8 del grupo amino se encuentra parcialmente protonado y el carboxilo completamente disociado, liberándose de 0.5 a 1.0

equivalentes de H^+ por cada equivalente de enlace peptídico fragmentado, disminuyendo en consecuencia el pH si éste no es controlado (Adler-Nissen, 1993; Guadix y col., 2000).

El grado de hidrólisis (DH en inglés) se define como el porcentaje del número total de enlaces peptídicos de una proteína que han sido rotos durante la reacción de hidrólisis. Es un concepto que se introdujo como medida para el control del sabor amargo de las proteínas parcialmente hidrolizadas (Adler-Nissen, 1986). Sin embargo, el mejoramiento de las características de los hidrolizados en cuanto a su solubilidad, capacidades espesante y espumante, contenido de péptidos bioactivos, así como la reducción de hidrolizados con potencial alergénico pueden ser obtenidos cuando hay un cuidadoso control de la reacción de hidrólisis, es decir, del DH (Smyth y FitzGerald, 1998).

Existen numerosos métodos para la estimación del DH, éste puede ser determinado cuantificando la cantidad de nitrógeno liberado, el cual se solubiliza en presencia de un agente precipitante como ácido tricloroacético (TCA), por el método de Kjeldahl o determinaciones espectrofotométricas en la región visible después de una reacción colorimétrica. Otro método, es la determinación de la concentración de los grupos α -amino liberados durante la reacción hidrolítica mediante la titulación con formol o el uso de compuestos que reaccionen específicamente con los grupos amino tales como ácido trinitrobencensulfónico (TNBS), α -ftaldialdehído (OPA), ninhidrina o fluroescamina. Otra forma de monitorear el proceso es por osmometría, donde la disminución de la presión osmótica en el punto de congelación puede ser utilizada para calcular los cambios de osmolaridad durante la hidrólisis (Spellman y col., 2003). El DH también puede ser determinado mediante el principio del pH-stat, que consiste en la titulación de la mezcla de hidrólisis con un ácido o una base durante la reacción con la finalidad de mantener el pH constante; el consumo del titulante puede ser relacionado cuantitativamente con la ruptura de enlaces peptídicos y puede ser calculado sencillamente mediante la siguiente ecuación:

$$DIH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100\%$$

donde h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos en la proteína del sustrato (meq/g_{proteína} o mmol/g_{proteína}); h es el número de enlaces peptídicos rotos; B es el consumo de la base en ml, N_b es la normalidad de la base, α es el promedio del grado de disociación de los grupos α -NH y MP es la masa de la proteína en g (Adler-Nissen, 1986; Sousa y col., 2004).

2.4.4. Actividad y estabilidad de las proteasas

La aplicación de las proteasas en la industria depende de cuatro propiedades básicas que son: pH y temperatura de actividad, así como pH y temperatura de estabilidad. Típicamente, los proveedores de enzimas de uso industrial presentan esta información en forma de curvas de actividad que muestran la actividad relativa a diferentes valores de pH o temperatura bajo ciertas condiciones de ensayo. Las curvas de estabilidad muestran la actividad relativa residual después de la exposición a valores dados de pH o temperatura por un periodo definido de tiempo.

✓ pH de actividad y estabilidad

Las diferentes proteasas tienen una variedad de valores de pH óptimos. Con base en esto, las proteasas se clasifican usualmente en alcalinas, neutras o ácidas, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, esta clasificación y los valores de pH óptimos no deben de ser aceptados dogmáticamente, ya que la actividad enzimática de varias proteasas no está limitada a un estrecho intervalo alrededor del pH óptimo (Fig. 3). Las curvas de estabilidad son utilizadas para elegir las condiciones de aplicación. En algunos casos, se han observado proteasas que son estables a valores de pH en los cuales no presentan su máxima actividad.

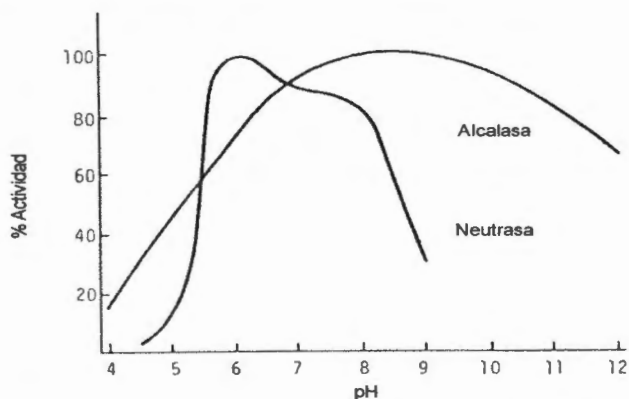


Fig. 3 Curvas de pH de actividad para Alcalasa y Neutrasa actuando sobre hemoglobina desnaturalizada (Adler-Nissen, 1993)

✓ Temperatura de actividad y estabilidad

Las proteasas, como otras enzimas, presentan un aumento de la actividad específica cuando se incrementa la temperatura, debido al aumento de la velocidad a la cual el sustrato es hidrolizado. Sin embargo, al someter una enzima a altas temperaturas se observa la inactivación térmica de la misma. El rápido descenso de la actividad causado por la desnaturalización provoca un efecto en el incremento de la actividad específica de la enzima dando como resultado una "aparente" temperatura óptima de actividad, dicho en otras palabras, los tiempos de reacción largos disminuyen la temperatura óptima (Fig. 4). Por lo tanto, la temperatura óptima de una enzima está en función del tiempo de reacción utilizado en el ensayo. Por otro lado, las curvas de estabilidad a la temperatura muestran la disminución relativa de la actividad con el tiempo a diferentes temperaturas. Las curvas de estabilidad son usualmente determinadas en una solución amortiguadora con un valor de pH cercano al de estabilidad (Adler-Nissen, 1993).

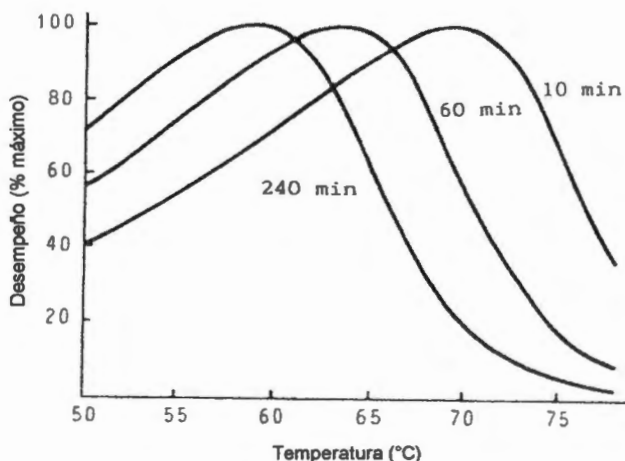


Fig. 4 Curvas de temperatura de actividad a diferentes tiempos de reacción de hidrólisis de soya con Alcalasa (pH 8) (Adler-Nissen, 1993)

2.4.5. Preparaciones comerciales de proteasas

Las proteasas comerciales son suministradas como preparaciones líquidas que contienen la enzima activa en una solución diluida o como preparaciones sólidas con rellenos inertes. Existen algunas razones para no utilizar industrialmente proteasas cristalinas puras. La primera, es que no son muy estables durante el almacenamiento. Consecuentemente, la actividad específica de la preparación enzimática variará de manera impredecible a menos de que se le adicionen estabilizadores. La segunda es que el uso de proteasas cristalinas a gran escala podría representar un peligro para la salud debido al riesgo de inhalación por el manejo de la enzima.

La actividad de las proteasas está dada en unidades internacionales (UI), que significa, microequivalentes de enlaces peptídicos hidrolizados por minuto. De aquí que las unidades de actividad podrían tener una relación significativa con el grado de hidrólisis. Por otro lado, existe un extenso número de unidades arbitrarias con base en la particularidad de los ensayos con que son determinadas

y la unidad de actividad es expresada como la cantidad de materia proteica digerida después de un tiempo dado. La mayoría de los ensayos utilizan hemoglobina desnaturalizada o caseína.

Las preparaciones de proteasas, al igual que las de otras enzimas, deben ser almacenadas en lugares secos y frescos o en refrigeración. Para su manejo deben de tenerse algunas precauciones como evitar su inhalación así como seguir todas las recomendaciones de los proveedores (Adler-Nissen, 1993)

En la Tabla 6 se muestran algunas de las proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado.

Tabla 6. Preparaciones comerciales de proteasas y origen de su obtención (Guadix y col., 2000)

ENZIMA	ORIGEN
Alcalasa 0.6L	<i>Bacillus licheniformis</i>
Neutrasa	<i>Bacillus subtilis</i>
Protease 600L	<i>Bacillus subtilis</i>
Fungal-protease	<i>Aspergillus oryzae</i>
P.E.M. 2500 S	Tripsina porcina, tripsina bovina quimotripsina bovina
Corolase PP	<i>Aspergillus oryzae</i>
Corolase PS	<i>Aspergillus oryzae</i>
Corolase 7089	<i>Bacillus subtilis</i>
Corolase 7092	<i>Aspergillus oryzae</i>
Corolase 7093	<i>Aspergillus oryzae</i>
Corolase 7107	<i>Aspergillus niger</i>
Bromelaína Takamina	Vegetal (piña)
Papaína Takamina	Vegetal (papaya)
Flavourzyme 500 MG	<i>Aspergillus oryzae</i> .

2.4.6. Aplicación de las proteasas

La especificidad amplia de la acción hidrolítica de las proteasas ha permitido su aplicación extensa en diversos sectores industriales tales como alimentos, detergentes, peletería, farmacéutica, así como en la elucidación de la estructura de proteínas. A continuación se describe como son empleadas en cada una de las áreas mencionadas.

2.4.6.1. Detergentes

Las proteasas alcalinas forman parte de la composición de la mayoría de los detergentes biológicos. El 25% del total de las enzimas vendidas mundialmente son proteasas alcalinas, de las cuales el 35% se utilizan en este rubro (Kumar y col., 2004). Son el ingrediente estándar de todos los tipos de detergentes para uso de lavado doméstico, además se utilizan para limpiar lentes de contacto y dentaduras. Las proteasas son ideales para esta aplicación porque presentan especificidad del sustrato y remueven gran cantidad de manchas, tienen actividad elevada en valores altos de pH y de temperatura, además de ser compatibles con otros agentes oxidantes y quelantes que se encuentran en los detergentes (Basu y col., 2007; Tremacoldi y col., 2007; Tremacoldi y col., 2005).

2.4.6.2. Industria peletera

Se han utilizado como alternativa para aumentar la calidad de las pieles obtenidas en el proceso de curtido y de este modo reducir la contaminación que ocasionan los agentes químicos empleados con anterioridad (Srinubabu y col., 2007)

2.4.6.3. Industria farmacéutica

Una amplia variedad de proteasas específicas son usadas en el desarrollo de agentes terapéuticos. Por ejemplo, proteasas de administración oral provenientes de *Aspergillus oryzae* han sido usadas como auxiliares digestivos, las colagenasas clostridiales o subtilisina es usada en combinación con un amplio espectro de antibióticos en tratamientos de quemaduras o heridas, también se encontró que una proteasa alcalina de *Conidiobolus coronatus* podría ser capaz de reemplazar a la tripsina en cultivos de células animales (Tremacoldi y col., 2007; Wang y col., 2005b).

2.4.6.4. Industria de los Alimentos

Las proteasas son las enzimas más empleadas en la industria de los alimentos. Las proteasas han sido utilizadas para la producción de quesos, para hidrolizar proteínas que provocan el enturbiamiento durante la elaboración de la cerveza, se adicionan a la harina de trigo para mejorar las propiedades reológicas de la masa de panificación, en la producción de proteínas modificadas que tengan una mayor capacidad emulsificante, espumado, solubilidad, etc.; también se utilizan para la recuperación de proteínas de desperdicios de origen animal (sangre, vísceras, pescado, etc.) (Basu y col., 2007; Mireles y Morrissey, 2002; Ellouz y col., 2001)

2.4.6.5. Producción de hidrolizados proteicos

Los hidrolizados proteicos se emplean ampliamente en la tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales (solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante) (Guadix y col., 2000). Los hidrolizados de proteína, se obtienen mediante tratamientos que solubilizan la proteína, liberando péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres que posteriormente son recuperados. Una de las tecnologías más extendidas para la obtención de

hidrolizados proteicos es la hidrólisis enzimática, debido a las ventajas que presenta frente a los métodos químicos, siendo una de las principales la obtención de un producto final de alto valor nutritivo (Aurrekoetxea y Perera, 2002). Las preparaciones comerciales de proteinasas crudas son usadas extensamente en la industria de los alimentos para preparar hidrolizados proteicos. La manipulación de las condiciones de la reacción de hidrólisis puede, algunas veces, ser usada para definir las características del producto final. Sin embargo, la especificidad de la enzima en una preparación de proteinasas establece el tipo de péptido producido, así como las propiedades de un hidrolizado y por lo tanto, su aplicación (Neklyudov y col., 2000).

2.4.6.6. Otras

Las proteasas juegan un rol importante en la investigación básica. Su selectividad hacia algunos tipos de enlaces peptídicos es usada para elucidar la relación estructura-función en la síntesis de péptidos y en la secuenciación de proteínas (Srinubabu y col., 2007).

ANTECEDENTES

CAPÍTULO 3

3.1. Antecedentes

3.1.1. Producción de proteasas

Con el propósito de conocer los procesos de obtención y caracterización de algunos de los tipos de proteasas que tienen aplicaciones industriales se han realizado múltiples investigaciones. Existen varios reportes de la producción de proteasas por FML a partir de hongos filamentosos como *Aspergillus oryzae* (Wang y col., 2005a; Sandhya y col., 2005; Samarnatam y col., 1999), *Aspergillus fumigatus* (Wang y col., 2005b), *Aspergillus tamarai* (Boer y Peralta, 2000), *Aspergillus flavus* (Hossain y col., 2006) y *Aspergillus niger* (Basu y col., 2007; Yang y Lin, 1998).

Por otro lado, para la producción de proteasas por FMS a partir de hongos filamentosos se encuentran disponibles varios reportes. Dentro de los géneros más estudiados se encuentran *Penicillium* (Germano y col., 2003), *Aspergillus niger* (Couri y col., 2000), *Aspergillus niger* ANH15 (Villegas y col. 1993), *Rhizopus oryzae* (Aikat y Bhattacharyya, 2001; Tunga y col., 1998), *Rhizopus oligosporus* (Ikasari y Mitchell, 1994), *Mucor bacilliformis* (Fernández-Lahore y col., 1998), *Aspergillus sojae* (Sardjono y Knol, 1998), *Aspergillus oryzae* (Sandhya y col., 2005; Sardjono y Knol, 1998; Battaglino y col., 1991) y *Aspergillus flavus* (Malathi y Chakraborty, 1991).

En estas investigaciones, para ambos tipos de sistemas de producción, se analizaron varios factores que influyen en la producción de proteasas entre los que se incluyen el tipo de reactor empleado (Aikat y Bhattacharyya, 2001); adición de fuentes de carbono y nitrógeno de fácil asimilación al medio de cultivo (Boer y Peralta, 2000; Yang y Lin, 1998); la agitación y la aireación (Yang y Lin, 1998; Sardjono y Knol, 1998; Villegas y col. 1993); la optimización del proceso de producción de proteasas para la obtención de mayores rendimientos (Wang y col., 2005a; Tunga y col., 1998; Ikasari y Mitchell, 1994; Malathi y Chakraborty, 1991;

Battaglino y col., 1991) y la adición de inductores (Basu y col., 2007; Boer y Peralta, 2000; Malathi y Chakraborty, 1991). En algunos trabajos caracterizaron y purificaron el extracto proteolítico (Hossain y col., 2006; Wang y col., 2005b; Boer y Peralta, 2000; Samarnatarn y col., 1999). Finalmente, en algunos otros reportaron la aplicación de los extractos crudos o enzimas parcialmente purificadas, como aditivos de detergentes (Germano y col., 2003), para la extracción de aceite de pulpa de frutos tropicales o semillas de oleaginosas (Couri y col., 2000) o como agentes depilatorios en el curtido de pieles (Malathi y Chakraborty, 1991).

A pesar de ser tan distintas entre sí, las investigaciones antes mencionadas, tanto las realizadas por FMS como FML, tienen en común el uso de residuos agroindustriales como sustrato, con excepción de Wang y col. (2005b), que utilizaron un medio de caparazones de camarón y langosta, y Basu y col. (2007) que utilizaron polvo de escamas de pescado.

En la Tabla 7 se resumen las características principales de cada uno de los trabajos antes mencionados.

Tabla 7. Características principales de algunos reportes de proteasas obtenidas por fermentación

Tipo de cultivo	Microorganismo	Sustrato	t de máxima producción	Tipo de enzima	Nivel de producción	Óptimo		Estabilidad		Ref.
						pH	T (°C)	pH	T (°C)	
FML	<i>Aspergillus oryzae</i>	Mezcla de harinas de salvado de trigo y soya	80 h	NR	≈ 18 U/L	NR	NR	NR	NR	106
FML	<i>Aspergillus oryzae</i>	Salvado de trigo	72 h	PN	8.7 U/gMS	NR	NR	NR	NR	80
FML	<i>Aspergillus oryzae</i>	Soya desgrasada, lactosa y caiteña	72 h	PAI	14,100 U/mL	8-9	45	ND	ND	78
FML	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2% de polvo de caparazones de camarón y langosta	6 d	SP	1 U/mL	8	40	6-10	50	107
FML	<i>Aspergillus tamarii</i>	1% de harina de soya	6 d	NR	160 U/mL	≈ 7.5	45	6-9.5	30-50	15
FML	<i>Aspergillus flavus</i>	NR	NR	SP	NR	8	45	5-9	35-60	43
FML	<i>Aspergillus niger</i>	Destilado ligero de arroz con 4% de aceite de soya	8 d	PAC	200 U/mL	NR	NR	NR	NR	109
FML	<i>Aspergillus niger</i>	Escamas de pescado	14 d	MP	2776 U	7	50	6-9	30	11
FMS	<i>Penicillium</i> sp. LPB-5	Masa de soya desgrasada	48 h	SP	NR	6.5	45	6-9	35-45	34
FMS	<i>Aspergillus niger</i>	Salvado de trigo	42 h	NR	5.27 U/mL	NR	NR	NR	NR	19
FMS	<i>Aspergillus niger</i>	Salvado de trigo	36 h	PA	74.3 U/gMS	NR	NR	NR	NR	104
FMS	<i>Rhizopus oryzae</i>	Salvado de trigo	17 d	NR	6381 U	NR	NR	NR	NR	5
FMS	<i>Rhizopus oryzae</i>	Salvado de trigo (ST)	6 d	NR	341 U/g ST	NR	NR	NR	NR	100
FMS	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Salvado de arroz	72 h	NR	3.9x10 ⁵ PU/gSSI	NR	NR	NR	NR	47
FMS	<i>Mucor bacilliformis</i>	Salvado de trigo	72-96 h	PAC	700 PU/g ST	NR	NR	NR	NR	28
FMS	<i>Aspergillus oryzae</i>	Lupino (L)	6 d		1500U/gL, 1800U/gS	NR	NR	NR	NR	81
FMS	<i>Aspergillus sojae</i>	Soya (S)			1900U/gL, 1700U/gS	NR	NR	NR	NR	80
FMS	<i>Aspergillus oryzae</i>	Salvado de trigo	72 h	PN	31.2 U/gMS	NR	NR	NR	NR	12
FMS	<i>Aspergillus oryzae</i>	Cáscara y salvado de arroz (7:3)	72-96 h	PN y PAI	1946 PU/g sustrato	NR	NR	NR	NR	
FMS	<i>Aspergillus flavus</i>	Salvado de trigo	48 h	PN	6.54 U/mL	7.5 y 9.5	NR	3-8	NR	60

NR: no reportado; PAC: proteasa ácida; PN: proteasa neutra; PAI: proteasa alcalina; MP: metaloproteasa; SP: serina proteasa; gMS: gramo de materia seca; g ST: gramo de salvado de trigo; gSSI: gramo de sustrato sólido inicial; gL: gramo de lupino; gS: gramo de soya.

3.1.2. Producción de hidrolizados enzimáticos de proteína de pescado

Como se mencionó anteriormente, el interés de producir proteasas es por la aplicación que puedan tener, como método alternativo, dentro de un proceso biotecnológico. Uno de estos procesos es la producción de hidrolizados a partir de residuos de origen acuático, en donde se ha analizado el uso de enzimas comerciales y producidas en laboratorios académicos. Por ejemplo, Sumaya-Martínez (2001), optimizó el proceso de hidrólisis enzimática de subproductos de carpa dorada (*Carassius auratus*) con Flavourzyme® (complejo comercial de exo y endopeptidasas) para la recuperación de fracciones peptídicas con propiedades nutricionales y funcionales. Las condiciones óptimas para la hidrólisis (pH=5.9, T=53°C, S:B ^{proporción sustrato/buffer} =14.7% y [E]=80 LAPU ^{unidad leucina aminopeptidasa}) no fueron las adecuadas para obtener valores altos en la recuperación de nitrógeno (9.5%) (Sumaya-Martínez y col., 2004), sin embargo, dentro de ésta fracción recuperada se encontraron péptidos mayores de 10 kDa con capacidad emulsificante comparable a la clara de huevo. Trabajos posteriores fueron realizados con la finalidad de evaluar la funcionalidad de péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de subproductos de carpa dorada (Estrada-Corona, 2002) utilizando Flavourzyme®. Con las condiciones óptimas para la obtención del hidrolizado (pH=7, T=50°C, [E]=50 LAPU ^{unidad leucina aminopeptidasa} /g, t=15 min) se obtuvieron péptidos de 44 kDa, pudiéndose separar fracciones de péptidos mayores y menores de 30 kDa. A pesar de que dichas fracciones presentaron propiedades funcionales y nutricionales, tuvieron un sabor amargo ligeramente perceptible. Por otro lado, Hernández-Rodríguez (2003) caracterizó las propiedades fisicoquímicas, reológicas y funcionales de hidrolizados proteicos obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de músculo de mero utilizando Flavourzyme®. Se produjeron fracciones (F) de péptidos favoreciendo las actividades endo y exo (pH 5 y 7, respectivamente) del complejo enzimático con pesos moleculares menores y mayores a 30 kDa (30 kDa-pH 5<F>30 kDa-pH 5 y 30 kDa-pH 7<F>30 kDa-pH 7). En general, las propiedades funcionales de las fracciones obtenidas fueron adecuadas en sistemas alimentarios que requieren

alta solubilidad (>80%), baja viscosidad, capacidad espumante; sin embargo, la fracción menor a 30 kDa a pH 7 presentó alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, lo cual es indicativo de la presencia de sabor amargo (Adler-Nissen, 1993).

Se ha reportado, que la distribución de tamaños moleculares en los hidrolizados está en función de la enzima utilizada y del grado de hidrólisis alcanzado, pero es prácticamente independiente de las condiciones de operación utilizadas (Guadix y col., 2000; Sumaya-Martínez y col., 2004). Por lo tanto, se requiere de una enzima proteolítica que tenga las características necesarias para llevar a cabo la hidrólisis proteica adecuadamente. La selección de la enzima depende de su origen, pH óptimo, temperatura óptima, de la estabilidad, especificidad y actividad/costo (Dumay, 2006). En este sentido Alquicira-Paez (2003) determinó la especificidad de proteasas fúngicas (*Aspergillus oryzae* 2095) producidas por FMS utilizando una mezcla de harina de pescado y salvado de trigo en la hidrólisis de proteína. Los valores óptimos de actividad para este extracto proteolítico se obtuvieron a pH 7.0 y 54 °C, siendo estable en un intervalo de temperatura de 30 a 50°C. Cuando la especificidad del extracto proteolítico se comparó con una preparación comercial (Flavourzyme 500 MG®), el extracto proteolítico presentó mayor afinidad ($K_M = 10.8 \text{ mg/mL}$) y especificidad ($\alpha = 6.05$) por el sustrato empleado que Flavourzyme 500 MG® ($K_M = 17.6 \text{ mg/mL}$, $\alpha = 4.82$).

CAPÍTULO 4

JUSTIFICACIÓN
HIPÓTESIS
OBJETIVOS

4.1. Justificación

En México, el potencial de pescado capturado es de aproximadamente 1,286,107 toneladas por año, de las cuales 989,194 toneladas son destinadas al consumo humano directo; 264,250 toneladas para el consumo humano indirecto y 32,663 toneladas para uso industrial. Sin embargo, durante el proceso de captura, comercialización, procesamiento industrial y venta al menudeo, los productos de origen pesquero no son totalmente aprovechados (Anuario estadístico de pesca, 2003).

Durante la industrialización de los productos pesqueros, se desechan grandes cantidades de subproductos ricos en proteínas sin ningún intento por recuperar la proteína que hay en ellos. Por otro lado, debido a factores culturales, hábitos y otros aspectos, tales como apariencia, tamaño inusual y sabor, sólo algunas de las especies del total de la captura son altamente comerciales y consumidas, a pesar de que prácticamente todas las especies de pescado tienen la misma calidad nutricional debido a las proteínas presentes en ellas (Bárzana y García-Garibay, 1994; Venugopal, 1994). Tanto la industrialización, como el consumo directo de productos pesqueros, generan altos costos en la remoción de los desechos y la contaminación del medio ambiente.

Una magnífica alternativa para remediar este problema sería la recuperación y modificación de proteínas de pescado presentes en los subproductos, así como el desarrollo de una nueva industria que ofrezca productos alternativos prometedores para el área agrícola y de alimentos (Kristinsson y Rasco, 2000a). La proteína de pescado, siendo de origen animal, es una buena fuente de aminoácidos esenciales y por lo tanto tiene gran valor nutricional.

Los hidrolizados de proteína de pescado (HPP) han mostrado tener excelentes propiedades funcionales incluyendo, alta solubilidad, buenas propiedades emulsificantes, de espumado y de ligadores de agua. La selección del sustrato, la proteasa empleada y el grado de hidrólisis pueden afectar las propiedades fisicoquímicas del hidrolizado resultante (Vieira y col., 1995; Kristinsson y Rasco, 2000a, 2000b), por lo que ésta debe de realizarse de acuerdo a la aplicación que se le vaya a dar al hidrolizado (Imm y Lee, 1999).

La selección de las enzimas para la obtención de los hidrolizados de subproductos de origen pesquero depende de su origen, pH y temperatura óptima y de estabilidad, especificidad, actividad y costo (Dumay, 2006). Actualmente se comercializan una gran variedad de extractos proteolíticos; sin embargo, su uso está limitado por sus altos costos (16-24 euros/g) (Aurrekoetxea y Perera, 2002).

Los extractos proteolíticos pueden ser producidos por bacterias (género *Bacillus*), hongos (*Aspergillus* el género más estudiado), hongos imperfectos, levaduras, etc. (Kumar y Takagi, 1999). Las proteasas extraídas a partir de bacterias del género *Bacillus* han demostrado tener mayor capacidad hidrolítica que aquellas provenientes de hongos como *Aspergillus* (Imm y Lee, 1999; Bárzana y García-Garibay, 1994; Venugopal, 1994). Sin embargo, los extractos proteolíticos obtenidos por *Aspergillus niger* han demostrado que proporcionan menor sabor amargo a los hidrolizados (Venugopal, 1994). Los hongos del género *Aspergillus* de las especies *oryzae*, *awamori* y *niger* han sido seleccionados como microorganismos productores de enzimas porque crecen rápidamente en una amplia variedad de sustratos, como desechos agroindustriales que son abundantes y económicos; además son considerados GRAS, producen y excretan algunos tipos de proteínas activas, incluyendo algunas de importancia industrial y finalmente pueden ser producidos a gran escala en sistemas de fermentación variados, incluyendo fermentación en medio líquido y en medio sólido (Aguilar y col., 2004).

Una alternativa para la obtención de extractos proteolíticos en países en vías de desarrollo consiste en la fermentación en medio sólido (FMS) de subproductos de origen agrícola o pesquero (harina de pescado), lo cual permite obtener productos concentrados y estables (Fernández-Lahore y col., 1998) que tengan mayor especificidad por sustratos similares a partir de los cuales fueron obtenidos. En este sentido, surge la siguiente interrogante: ¿Al utilizar harina de pescado como sustrato para producir un extracto proteolítico fúngico por fermentación sólida se tendrá un producto concentrado y estable que tenga mayor actividad hidrolítica que un extracto comercial sobre subproductos de la industria pesquera?

El presente trabajo intentó responder a dicha interrogante con el propósito de contribuir al conocimiento en esta área, se estudió la producción de un extracto proteolítico fúngico por fermentación utilizando como sustrato harina de pescado y se evaluó el efecto de la harina de pescado en la especificidad del extracto proteolítico en subproductos de la industria pesquera en comparación con un extracto comercial.

4.2. Hipótesis

El uso de harina de pescado como sustrato en fermentación permitirá la obtención de un extracto proteolítico concentrado y estable con mayor actividad hidrolítica en subproductos de la industria pesquera en comparación con un extracto proteolítico comercial.

4.3. Objetivos

4.3.1. General

Comparar la estabilidad y la especificidad entre un extracto proteolítico fúngico producido por fermentación utilizando harina de pescado como sustrato y un extracto fúngico comercial.

4.3.2. Específicos

1. Seleccionar una cepa fúngica productora de proteasas
2. Seleccionar la mezcla harina de pescado/soporte inerte que tenga las características adecuadas para obtener un extracto proteolítico por fermentación sólida
3. Evaluar el efecto del tamaño de partícula del soporte y la adición de una fuente de carbono simple en la producción de proteasas por fermentación sólida
4. Comparar la producción de proteasas por fermentación sólida y líquida
5. Caracterizar el extracto proteolítico fúngico producido y el extracto proteolítico comercial
 - a) Determinar el pH y la temperatura óptima
 - b) Determinar la estabilidad al pH y a la temperatura
6. Comparar el grado de hidrólisis obtenido por el extracto proteolítico fúngico producido con un extracto proteolítico comercial

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Producción del extracto proteolítico

5.1.1. Microorganismos

Las cepas fúngicas empleadas en este proyecto fueron *Aspergillus niger* C28B25, *Aspergillus niger* DAR-2, *Aspergillus niger* AD96-4, *Aspergillus niger* 2088, *Aspergillus oryzae* 2095 y *Aspergillus niger* ANH15. En la Tabla 8 se indica el origen de dichos microorganismos.

5.1.1.1. Conservación de las cepas fúngicas

Para conservar las cepas de hongos filamentosos empleadas en este proyecto, se realizó el siguiente protocolo. Se propagaron las cepas en los medios correspondientes (Tabla 8), se cosecharon las esporas usando Tween 80 (0.05%) disuelto en una solución de leche descremada al 3%. Esta solución se esterilizó 20 min a 10 psi (110 °C). Previamente se prepararon viales de vidrio de 3 cm con sílica gel (malla 60-200, J. T. Baker, USA) hasta la mitad de su volumen y se esterizaron en autoclave (15 min a 15 psi y 120 °C). Posteriormente, los viales fueron colocados en una estufa a 60 °C por 24 h (ligemente destapados). Inmediatamente después fueron trasladados a un desecador con conexión al vacío por una hora. Con el material y en condiciones estériles, se adicionaron 100 µL de la suspensión de esporas a cada vial y se homogeneizaron en un vórtex. Se realizó un control negativo poniendo 100 µL de la solución de Tween 80 y leche descremada sin esporas y se trató como las demás muestras. Todos los viales inoculados y etiquetados fueron regresados al desecador con vacío con la tapa ligeramente abierta (12 h). Finalmente, se cerró rápidamente la tapa de cada vial y se le puso una capa de parafilm en la tapa. Se realizó el control de viabilidad a los 10 días colocando unos cuantos granos de sílica con esporas en cajas Petri con medio de cultivo apropiado, se realizó lo mismo con el control negativo (Loera y col., 1999; Perkins, 1977).

5.1.1.2. Medios de cultivos para la propagación de hongos

Los microorganismos utilizados fueron propagados en los medios de cultivo descritos en la Tabla 8.

Tabla 8. Procedencia y medio de propagación de las cepas utilizadas.

NOMBRE DEL HONGO	PROCEDENCIA	MEDIO DE PROPAGACIÓN
<i>Aspergillus niger</i> ANH-15	CECT*	PDA*
<i>Aspergillus niger</i> 2088	CECT*	PDA*
<i>Aspergillus oryzae</i> 2095	CECT*	PDA*
<i>Aspergillus niger</i> C28B25	IRD-UAM**	Medio mínimo
<i>Aspergillus niger</i> DAR2	IRD-UAM**	Medio mínimo
<i>Aspergillus niger</i> AD96-4	IRD-UAM**	Medio mínimo

*Colección Española de Cultivos Tipo, ** Instituto de Investigación para el Desarrollo (Francia)
– Universidad Autónoma Metropolitana, *Agar dextrosa-papa

La composición del medio mínimo fue en g/L: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 12.6; K_2HPO_4 , 11.8; urea, 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; FeSO_4 , 0.29; MnSO_4 , 0.001; CuSO_4 , 0.001; ZnCl_2 , 0.001; sacarosa, 100; agar bacteriológico, 15.

5.1.2. Selección en placa de cepas fúngica proteolíticas

La selección de las cepas productoras de proteasas se hizo en base a la formación de halos de hidrólisis en medios que contienen proteínas como fuente de C y N. Los medios de cultivo utilizados fueron agar harina de pescado y agar leche descremada y se prepararon como se describe a continuación.

5.1.2.1. Agar harina de pescado

La harina de pescado fue caracterizada antes de preparar el agar harina de pescado. Se utilizó harina de pescado (adquirida en una forrajería) tamizada con malla del No. 20. A ésta se le determinó el contenido de nitrógeno por el método de Micro-Kjeldahl, azúcares totales por el método fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956), actividad de agua (AQUA Lab CX2), contenido de humedad (Termobalanza Ohaus MB 45) y análisis elemental del contenido total de C, H, N (Analizador Elemental 2400 CHNO/S, Perkin Elmer, Torrance, CA).

Para preparar el medio agar harina de pescado, en un matraz Erlenmeyer se suspendieron 20g de harina de pescado previamente tamizada, 16 g de agar

bacteriológico y 0.25 g de indicador (Tabla 9) en 1000 mL de agua destilada. Este medio se llevó a ebullición y se esterilizó a 121 °C (15 psi) durante 15 min.

Tabla 9. Indicadores empleados en el agar harina de pescado para observar el cambio en el pH del medio debido a la hidrólisis de la harina de pescado.

Indicador	Intervalo de transición (pH)	Color del ácido	Color de la base
Rojo fenol	6.4 – 8.0	Amarillo	Rojo
Timolftaleína	8.3 – 10	Incoloro	Azul

5.1.2.2. Agar leche descremada

En un matraz Erlenmeyer se disolvieron 20 g de leche descremada (Svelty, Nestlé®) en 250 mL de agua destilada y se esterilizó a 110 °C durante 10 min. En otro matraz se disolvieron 16 g de agar bacteriológico en 750 mL de agua destilada, éste se llevó a ebullición y se esterilizó a 121 °C (15 psi) durante 15 min. En condiciones asépticas se mezclaron la leche descremada con el agar bacteriológico, esta mezcla se vació en cajas de Petri estériles (Ramírez y Luna, 1996).

5.1.2.3. Preparación del inóculo y determinación del índice de potencia

Las cepas fueron propagadas en los medios señalados en la Tabla 8 e incubadas durante 7 días a 30 °C. Para cada una de las cepas se realizó una cosecha de esporas con Tween 80 al 0.1% previamente esterilizado a 121 °C (15 psi) durante 15 min. En condiciones asépticas y con palillos de madera estériles, se inocularon las cajas de agar leche-descremada y agar harina de pescado por el método de siembra por picadura de manera invertida para favorecer el crecimiento radial y la observación de la formación del halo. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 72 h, después del tiempo de incubación se realizó la medición de los diámetros de las colonias y de los halos de hidrólisis para calcular el índice de potencia, I_P :

$$I_P = (D_h) (D_c)^{-1}$$

Donde I_p se define como la relación entre el área que se puede hidrolizar por cada unidad de área de la colonia, D_h es el diámetro del halo de hidrólisis en cm y D_c es el diámetro de la colonia expresado en cm (Herrera, 2003).

5.1.3. Selección del medio de cultivo para la producción del extracto proteolítico

El medio de cultivo empleado para la producción de proteasas estuvo compuesto por una porción de la harina de pescado y otra proporción de un soporte inerte. Las características de los soportes analizados, así como la selección del soporte inerte y la relación harina de pescado/soporte inerte se describen a continuación.

5.1.3.1. Selección del soporte inerte

Se analizaron las características de los soportes inertes agrolita y espuma de poliuretano.

5.1.3.1.1. Agrolita

La agrolita es una piedra de origen volcánico compuesta principalmente de sílice, de estructura amorfa y porosa, con una buena retención de agua en su superficie y químicamente inerte, por lo que es un buen soporte en el proceso de fermentación. Previo a su utilización, la agrolita fue tamizada (12/16) para obtener un tamaño de partícula de 1.19-1.68 mm, y fue lavada 4 veces, dos con agua corriente (caliente) y dos con agua desionizada; se dejó secar en una estufa a 65-70 °C durante 24 h. Posteriormente, se almacenó en desecadores, para evitar su hidratación.

5.1.3.1.2. Espuma de poliuretano

Se utilizó espuma de poliuretano (Expomex, México) con una densidad media de 24 kg/m³ la cual, una vez cortada en fragmentos pequeños, se lavó tres veces: dos con agua corriente y una con agua destilada. A continuación, se exprimió de forma manual y se dejó secar a temperatura ambiente con aireación

forzada por 12 h, después se molió (molino Brandendur OHG 880804) y se tamizó hasta un tamaño de partícula de 0.5 mm y 1.5 mm.

5.1.3.1.3. Determinación de la relación harina de pescado-soporte inerte

Se prepararon mezclas con diferentes proporciones de harina de pescado y soporte inerte (Tabla 10).

Tabla 10. Proporciones de harina de pescado y soporte inerte con las que se prepararon las mezclas.

SOPORTE	RELACIÓN HP-SI (p/p)
Agrolita	50/50
	70/30
	90/10
Espuma de poliuretano	50/50
	70/30
	90/10

Se compararon las texturas (visual) y a cada una de ellas se le determinó el contenido de humedad (Termobalanza Ohaus MB 45) a 130 °C, registrándose los valores de humedad en intervalos regulares de 1 min, durante 30 min.

5.1.4. Fermentación en medio sólido (FMS)

5.1.4.1. Preparación del medio de cultivo

Para la obtención del extracto por FMS se preparó el medio de cultivo con harina de pescado tamizada hasta un tamaño de partícula de 0.84 mm y el soporte inerte seleccionado previamente. Esta mezcla se secó en una estufa (80 °C) durante 12 h y se esterilizó en un frasco a 121 °C por 15 min.

5.1.4.2. Preparación del inóculo

Se utilizaron como inóculo las tres cepas fúngicas que presentaron la mayor actividad proteolítica en las placas de agar leche-descremada. Las cuales fueron propagadas en 50 mL de agar papa-dextrosa (PDA) en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 30 °C durante 7 días. Posteriormente, se cosecharon las esporas con

Tween 80 al 0.1% estéril, y la suspensión fue recolectada en un frasco estéril. Para el conteo de esporas, se tomó una alícuota de 1mL la cual se diluyó 1:20 con agua destilada. Las esporas se cuantificaron por medio de una cámara de Neubauer (Brand, Alemania). Cada columna se inoculó con la suspensión de esporas a una concentración de 2×10^7 esporas por gramo de materia seca (4.5×10^7 esporas por gramo de proteína).

5.1.4.3. Efecto de la adición de glucosa sobre la producción de proteasas por fermentación en medio sólido

El medio previamente seleccionado fue adicionado con 0, 5, 10 y 15% de glucosa con la finalidad de evaluar si la adición de una fuente de carbono de fácil asimilación tendría un efecto sobre la producción de proteasas.

5.1.4.4. Condiciones del cultivo

La fermentación en medio sólido se realizó en reactores tubulares de lecho empacado de 2.5 cm de diámetro por 22 cm de largo (Saucedo-Castañeda y Trejo-Hernández., 1994), cada columna contenía 15 gramos de materia seca (mezcla de harina de pescado y soporte inerte previamente seleccionado), el contenido de humedad fue ajustado con solución reguladora de fosfatos 0.2 M pH 7, finalmente cada columna se inoculó con 2×10^7 esporas por gramo de materia seca (4.5×10^7 esporas por gramo de proteína). Las columnas se incubaron en un baño de temperatura controlada y las condiciones iniciales de la FMS se describen en la Tabla 11. Para la evaluación del efecto de la adición de glucosa se realizaron muestreos a las 36 y 72 horas.

Tabla 11. Condiciones iniciales de la FMS.

Condiciones iniciales	
Humedad	50%
Inóculo	2×10^7 esporas / gramo de materia seca
Aireación	40 cc/min
Temperatura	30°C

5.1.4.5. Obtención del extracto crudo

Terminada la fermentación, se pesaron 15 gramos de materia fermentada y se le adicionaron 15 mL de solución reguladora de fosfatos 0.2 M pH 7.0, se homogeneizaron con una espátula y se dejó reposar esta mezcla durante 30 min a 4 °C. La extracción se realizó mediante centrifugación a 19100 x g. Al sobrenadante obtenido se le denominó "extracto crudo" (EC).

5.1.4.6. Métodos analíticos

5.1.4.6.1. Determinación del pH

El pH se determinó suspendiendo 1 g de materia fermentada húmeda en 10 mL de agua destilada, se homogeneizó con vórtex y se filtró al vacío con filtro Whatman® 41, al filtrado se le determinó el pH con un potenciómetro Conductronic pH120. Se reportó el promedio de tres repeticiones.

5.1.4.6.2. Determinación de Aw y humedad

La humedad se determinó colocando 2 g de la materia fermentada en una Termobalanza Ohaus MB 45 a 130 °C por 15 min. Mientras que la actividad de agua (Aw) se determinó con un higrómetro AQUA Lab CX-2. Los resultados reportados son el promedio de tres determinaciones para cada una de las variables.

5.1.4.6.3. Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica del extracto crudo fue cuantificada por el método de Ichishima (1970) como se describe a continuación. Se mezclaron 0.25 mL de caseína Hammarsten al 2%, disuelta en solución reguladora 0.2 M al pH requerido (citratos pH 2.7, fosfatos pH 7 y carbonatos pH 10), con 0.25 mL de extracto crudo previamente diluido 1:5 con solución reguladora 0.2 M al pH requerido (citratos pH 2.7, fosfatos pH 7 y carbonatos pH 10). Esta mezcla se incubó a 30 °C durante 10 min. La reacción se detuvo con la adición de 0.5 mL de TCA 0.4 M (J.T. Baker) y la mezcla se centrifugó (Centrífuga Allegra 25R, Beckman Coulter. California, USA) a 11182 x g por 15 min a 4 °C. A 0.25 mL del sobrenadante se le

adicionaron 1.25 mL de Na_2CO_3 (J.T. Baker) 0.4 M y 0.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu Fenol (1:5 diluido en agua) (SIGMA). Esta mezcla se incubó por 30 min a 30 °C. Se leyó la absorbancia a 660 nm. Las absorbancias fueron comparadas con una curva patrón de tirosina. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Una unidad proteolítica (U) se definió como la cantidad de enzima que produce el color equivalente a 1 μmol de tirosina en 1 mL de mezcla de reacción por minuto a 30°C al pH ensayado (Ichishima, 1970). La actividad se reportó en términos de U/L de extracto crudo.

La curva estándar de tirosina (PM 181.2 g/mol) (solución madre: 72.4 mg tirosina/500 mL de HCl 0.2 M) se realizó como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Curva estándar de tirosina.

Tubo	Sin. madre (mL)	Sin. reguladora* (mL)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración ($\mu\text{mol/mL}$)
1	0	1.0	0	0
2	0.2	0.8	0.0290	0.1598
3	0.4	0.6	0.0579	0.3196
4	0.6	0.4	0.0869	0.4795
5	0.8	0.2	0.1158	0.6393
6	1.0	0	0.1448	0.7991

*solución reguladora 0.2 M al pH requerido (citratos pH 2.7, fosfatos pH 7 y carbonatos pH 10)

A cada tubo se le adicionaron 5 mL de Na_2CO_3 (J.T. Baker) 0.4 M y 1 mL de reactivo de Folin- Fenol Ciocalteu (SIGMA), previamente diluido en una relación 1:5 en agua destilada. Posteriormente, los tubos se agitaron en vórtex y se incubaron en un baño de temperatura controlada a 30°C durante 30 min. Después de este tiempo se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda25 a una longitud de onda de 660 nm. La determinación se realizó por triplicado y se graficaron los promedios de las absorbancias contra la concentración de tirosina.

5.1.4.7. Cinética de producción de proteasas con dos tamaños de partícula del soporte inerte

Con la cepa y la concentración de glucosa con los que se obtuvo la mayor actividad proteolítica en FMS, se realizó una cinética de producción de proteasas. Se prepararon dos medios de cultivo. El primero compuesto con harina de pescado tamizada hasta un tamaño de partícula de 0.84 mm y el soporte inerte previamente seleccionado con tamaño de partícula de 1.5 mm. Mientras que el segundo contenía harina de pescado tamizada hasta un tamaño de partícula de 0.84 mm y el soporte inerte previamente seleccionado con tamaño de partícula de 0.5 mm. Ambos medios se secaron en una estufa (80 °C) durante 12 h; finalmente se esterilizaron en frascos a 121 °C por 15 min. Las fermentaciones se realizaron bajo las condiciones iniciales previamente descritas (Tabla 11). Se tomaron muestras a diferentes tiempos. A éstas se les determinó cada una de las variables antes mencionadas.

5.1.5. Fermentación en medio líquido (FML)

5.1.5.1. Preparación del medio de cultivo

La harina de pescado se secó en una estufa (80 °C) durante 12 h. Para la preparación del medio de cultivo se pesaron 20 g de harina de pescado y se suspendieron en un litro de solución reguladora de fosfatos 0.2 M pH 6, la suspensión se llevó a ebullición durante 10 min y posteriormente se filtró al vacío usando papel Whatman® 41. El filtrado fue utilizado como medio de cultivo.

5.1.5.2. Determinación de proteína al medio de cultivo

La cuantificación de proteína del medio de cultivo para la FML se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA en inglés, solución madre: 1 mg/mL) como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Curva estándar de BSA.

Tubo	BSA (μL)	H ₂ O (μL)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
1	0	800	0
2	20	780	20
3	40	760	40
4	60	740	60
5	80	720	80
6	100	700	100
7	120	680	120
8	140	660	140

A cada tubo se le adicionaron 200 μL de reactivo de Bradford (Bio Rad) sin diluir. Se agitaron en vórtex y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda25 a una longitud de onda de 595 nm. La determinación se realizó por triplicado y se graficaron los promedios de las absorbancias contra la concentración de BSA.

5.1.5.3. Inóculo

Se utilizó como inóculo la cepa fúngica empleada en la cinética de producción de proteasas por FMS. El inóculo se preparó propagando la cepa en 50 mL de agar papa-dextrosa (PDA) en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 30°C durante 7 días. Las esporas se cosecharon agregando a los matraces Erlenmeyer 30 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.1 % (v/v) por matraz y agitando con una barra magnética para suspender las esporas. Para el conteo de esporas, se tomó una alícuota de 1 mL la cual se diluyó 1:20 con agua destilada. Las esporas se cuantificaron por medio de una cámara de Neubauer (Brand, Alemania). El medio de cultivo se inoculó con una suspensión de esporas a una concentración de 4.5×10^7 esporas por gramo de proteína con la finalidad de adicionar la misma concentración de esporas por gramo de proteína que en la fermentación en medio sólido.

5.1.5.4. Condiciones del cultivo

La fermentación líquida se realizó en un agitador orbital (Lab-Line Instruments, Inc.) utilizando matraces Erlenmeyer de 250 mL, cada uno contenía 50 mL de medio harina de pescado (Sección 5.1.5.1.). Las condiciones iniciales de

la fermentación se describen en la Tabla 14. Se realizaron muestreos a las 0, 24, 36, 40, 44, 48, 60 y 72 h.

Tabla 14. Condiciones iniciales de la FML para la producción de proteasas

Condiciones iniciales	
Inóculo	4.5×10^7 esporas / gramo de proteína
Agitación	150 rpm
Temperatura	30 °C

5.1.5.5. Obtención del extracto crudo

Terminada la fermentación, se filtró el medio al vacío usando papel Whatman® 41. Al filtrado se le denominó extracto crudo (EC).

5.1.5.6. Métodos analíticos

5.1.5.6.1. Determinación del pH

El pH se determinó directamente del extracto crudo empleando un potenciómetro Conductronic pH120. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.1.5.6.2. Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica de los extractos crudos obtenidos a partir de la FML se determinó como se describió anteriormente (Sección 5.1.4.6.3.)

5.1.6. Zimogramas para la detección *in situ* de la actividad proteolítica en los extractos crudos obtenidos por FMS y FML

Para determinar los pesos moleculares “aparentes” de las proteasas responsables de la actividad proteolítica de los extractos crudos obtenidos en el periodo de máxima producción por FMS y FML se utilizó el método descrito por García-Carreño y col. (1993).

La electroforesis SDS-PAGE fue realizada usando acrilamida (Bio Rad) con 12% de T (Laemmli, 1970). Los extractos se diluyeron en la solución reguladora de

muestra (1:5 para los obtenidos por FMS y 1:1 para los obtenidos por FML) sin agentes reductores o SDS. Las muestras, sin calentamiento previo, fueron cargadas en un gel y la electroforesis fue realizada a 4 °C a corriente constante de 100V. Después de que la electroforesis fue completada se realizó la determinación de la actividad proteolítica de acuerdo a lo reportado por García-Carreño y col. (1993) como se describe a continuación. Los geles se desmontaron y se sumergieron en una solución de caseína al 2% en solución reguladora de fosfatos 0.2 M pH 7 o de carbonatos 0.2 M pH 10 previamente enfriada, donde se mantuvieron por un período de 30 min a 4 °C permitiendo la difusión de la caseína al interior del gel, posteriormente se elevó la temperatura a 30 °C para aumentar la actividad de las proteasas. Este período de incubación se extendió hasta 2 h. Los geles se enjuagaron con agua destilada para eliminar el exceso de sustrato y en un solo paso se fijaron y tiñeron con una solución de azul de Coomasie R-250 0.1% durante 2 h, se destiñeron con una solución de metanol-ácido acético (40%-10%, respectivamente) hasta que se revelaron las bandas de proteína.

5.2. Comparación entre el extracto fúngico proteolítico y un extracto comercial

El extracto proteolítico fúngico, producido por el método de fermentación con el que se obtuvo la mayor actividad proteolítica, se comparó con Flavourzyme 500 MG® (Novo Nordisk). Este extracto comercial es un complejo proteasa/peptidasa fúngico producido por fermentación líquida utilizando una cepa seleccionada de *Aspergillus oryzae* que no ha sido genéticamente modificada. Este extracto tiene actividades endoproteasa y exopeptidasa.

5.2.1. Caracterización parcial de los extractos proteolíticos

Los extractos proteolíticos fueron caracterizados parcialmente en cuanto a su pH y temperatura óptimos, así como su estabilidad al pH y la temperatura como se describe a continuación.

5.2.1.1. Determinación de las condiciones óptimas de actividad de los extractos

5.2.1.1.1. Temperatura óptima de actividad

La temperatura óptima de actividad para ambos extractos se determinó utilizando caseína (Hammarsten) al 2% como sustrato. La actividad proteolítica se cuantificó como se describió previamente (Sección 5.1.4.6.3.). La temperatura de incubación durante la reacción entre cada uno de los extractos con el sustrato se analizó en un intervalo desde 30 °C hasta 70 °C. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se graficaron los promedios de la actividad proteolítica contra la temperatura.

5.2.1.1.2. pH óptimo de actividad

La evaluación del pH óptimo de actividad para cada extracto se realizó determinando la actividad proteolítica en una solución de caseína (Hammarsten) al 2% alternando los valores de pH. Para el intervalo de pH de 6 a 7 se utilizó solución reguladora de fosfatos 0.2 M; de pH 8 a 9, solución reguladora de Tris-HCl 0.2 M y para pH 10 solución reguladora de carbonatos 0.2 M. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se graficaron los promedios de la actividad proteolítica contra pH.

5.2.1.2. Determinación de las condiciones de estabilidad de los extractos

5.2.1.2.1. Estabilidad a la temperatura

Con la finalidad de analizar la estabilidad térmica, ambos extractos proteolíticos fueron sometidos a diferentes temperaturas por un periodo de 120 min. Se realizó un muestreo cada 30 min y se determinó la actividad proteolítica a las condiciones óptimas de temperatura y pH de actividad de cada uno de los extractos. El intervalo de temperatura analizado fue de 30 a 70 °C. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se graficó el promedio del porcentaje de actividad residual contra el tiempo.

5.2.1.2.2. Estabilidad al pH

La estabilidad al pH se realizó diluyendo ambos extractos con solución reguladora a diferentes pH e incubándolos a la temperatura óptima de actividad durante 120 min. Se realizó un muestreo cada 30 min y se determinó la actividad proteolítica a las condiciones óptimas de temperatura y pH de actividad para cada uno de los extractos. El intervalo de pH analizado fue de 6 a 10. Para el intervalo de pH de 6 a 7 se utilizó solución reguladora de fosfatos 0.2 M; de pH 8 a 9, solución reguladora Tris-HCl 0.2 M y para pH 10 solución reguladora de carbonatos 0.2 M. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se graficaron los promedios del porcentaje de actividad residual contra el tiempo.

5.2.2. Comparación del grado de hidrólisis entre los extractos

La comparación de la eficiencia hidrolítica de ambos extractos fue realizada mediante la determinación del grado de hidrólisis de cada uno de ellos sobre músculo de mero como se describe a continuación.

5.2.2.1. Determinación del grado de hidrólisis

Una mezcla de 40 g de músculo de mero (*Epinephelus morio*) (Proveniente de Puerto Progreso, Yucatán; comercializado en "La Nueva Viga", D.F.) con 100 mL de solución reguladora Tris-HCl 0.2 M (pH óptimo de cada extracto) fue homogeneizada en baño de hielo con una licuadora manual y se filtró a través de una coladera. El sustrato fue diluido con solución reguladora Tris-HCl 0.2 M (pH óptimo de cada extracto) hasta una concentración de 1% en 100 g de mezcla de reacción. Cada mezcla fue ajustada al pH y temperatura óptimos de cada extracto proteolítico. Entonces, cada uno de los extractos proteolíticos fue adicionado a una concentración de 24 U/g de sustrato. Esta preparación fue hidrolizada, usando el método de pH-stat (Adler-Nissen, 1986), en un vaso de 250 mL bajo condiciones controladas de temperatura, pH y velocidad de agitación. El pH durante la hidrólisis se mantuvo constante por la adición de NaOH 0.5 N, la cantidad de NaOH fue registrada a intervalos de 1 min por 1 h. Un blanco sin la enzima fue realizado a las mismas condiciones para cada uno de los extractos, la cantidad de NaOH

consumida fue sustraída de la cantidad de NaOH consumida por las muestras con la finalidad de eliminar el efecto de las proteasas endógenas del pescado.

El grado de hidrólisis (%GH) es definido como el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados y fue calculado de acuerdo a lo reportado por Adler-Nissen (1986).

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Determinación de la composición de la harina de pescado

La composición del medio de producción es un parámetro clave porque los factores nutricionales tales como fuente de carbono, nitrógeno y metales traza, pueden influenciar el crecimiento y la producción de metabolitos, enzimas y esporas (Ooijkaas y col., 2000).

El contenido de proteína de la harina de pescado utilizada en este trabajo se comparó con el de otras harinas de pescado que se han usado como medios de cultivo en fermentaciones para la obtención de proteasas. Los resultados obtenidos mostraron que los porcentajes de proteína del sustrato utilizado se encuentran dentro del intervalo de valores de contenido de proteína de las harinas de pescado reportadas en la bibliografía (Tabla 15). Además, la composición de la proteína en la harina de pescado, varía de acuerdo a la especie y secciones del pescado utilizadas (músculo, piel, esqueleto, escamas, etc.), así como la proporción de las mismas en el producto final, incrementándose el contenido de proteína cuando la proporción de músculo es mayor (Tabla 15).

Tabla 15. Composición de harinas de pescado utilizadas como medio de fermentación para la obtención de proteasas [(1) (2), (3) (Ellouz y col., 2001); (4) (Pizardi y col., 1999)]

PRODUCTO	PROTEÍNA (%)(B.S.)
Harina de pescado utilizada en este proyecto	62.8
Harina de sardina (pescado entero) ¹	64.3
Harina de sardina (cabeza y vísceras) ²	45.5
Harina de sardina (carne pescado) ³	80.0
Harina de sardina (vísceras, cabeza, huesos, escamas, piel, aletas) ⁴	62.7

El análisis elemental mostró que el contenido de carbono fue de 43.25%, el de nitrógeno 10.60% (10.05% por el método de Kjeldahl) y el de hidrógeno 6.44%.

Sin embargo, sólo 1.45% son carbohidratos totales (calculados por el método fenol-sulfúrico), los cuales pueden ser utilizados como fuente de carbono fácilmente asimilable, el resto del carbono se encuentra como parte estructural de otras macromoléculas presentes en la harina de pescado, por ejemplo, proteínas; por lo que se requiere de la presencia de un complejo enzimático en el microorganismo que permita su asimilación. En algunas de las harinas de pescado reportadas para la producción de proteasas no se encontraron carbohidratos (Stephanopoulos, 1993; Ellouz y col., 2001; Pizardi y col., 1999). Se sabe que el contenido de carbohidratos de la mayoría de las carnes es de 1.5% (Badui, 1995), por lo tanto, la presencia de carbohidratos en la harina de pescado utilizada en este estudio puede deberse a que para su elaboración se utilizó músculo de pescado.

6.2. Selección de cepas fúngica productoras de proteasas

El propósito de esta etapa fue seleccionar a las cepas que tuvieran actividad proteolítica, mediante el uso de placas con medio agar harina de pescado y medio agar leche descremada (Shekine y col., 1969).

En el medio agar harina de pescado todas las cepas presentaron crecimiento (Fig. 5), observándose más abundante para las cepas de *A. niger* AD96-4 y *A. oryzae* 2095, y muy escaso para las cepas *A. niger* DAR2 y *A. niger* C28B25. En este medio de cultivo no se evidenció la producción de enzimas proteolíticas mediante la formación de halos de hidrólisis durante el periodo de incubación para ninguna de las cepas, esto pudo deberse a que dicho medio es translúcido. Por ésta razón, se consideró que la adición de un indicador podría ayudar a detectar un cambio en el pH del medio harina de pescado causado por la formación de compuestos debido a la hidrólisis de la proteína presente en la harina de pescado. Se seleccionaron 2 indicadores que abarcan intervalos de pH neutros y alcalinos (Tabla 9, Sección 5.1.2.1.).

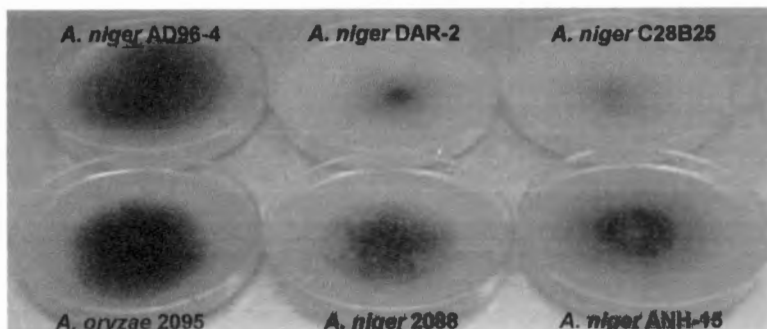


Fig. 5. Crecimiento fúngico sobre placas de agar harina de pescado incubadas a 30°C durante 72 h.

El medio agar harina de pescado es de color café translúcido (Fig. 5) y conservó este color cuando se le adicionaron los indicadores por separado, es decir, se encontraban en su forma ácida. Una vez que se inocularon los medios que contenían los indicadores, con las cepas fúngicas se observó lo siguiente: en el medio que contenía rojo fenol (RF), los cambios en el pH del medio fueron evidentes, para todas las cepas, desde las 24 h de incubación, observándose una coloración roja (Fig. 6). Esto pudo deberse a que el pH inicial del medio se encontraba en un intervalo de pH ácido, lo cual fue corroborado por el indicador (forma ácida), así que durante la hidrólisis de la harina de pescado los grupos carboxílicos liberados se encontraban disociados, mientras que los grupos amino estaban totalmente protonados (Adler-Nissen, 1993; Guadix y col., 2000), esto pudo provocar un incremento del pH hasta el intervalo de transición del indicador (6.4-8.0), observándose de ese modo la coloración roja del medio (forma básica del indicador).

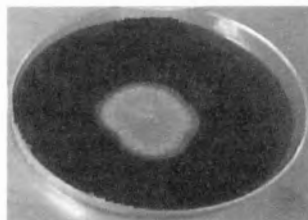


Fig. 6. Alcalinización del medio en placas de agar harina de pescado con rojo fenol (RF) durante el crecimiento de *A. oryzae* 2095 a 30°C (72 h)

Por otro lado, a pesar de que todas las cepas crecieron en el medio agar harina de pescado con timolftaleína, no se observó ningún cambio en la coloración del mismo. Esto pudo ser debido a que el pH final del medio no aumentó hasta el intervalo de transición de pH de la timolftaleína, es decir, el pH del medio estaba por debajo de 9.3.

Los resultados antes mencionados sugieren que durante la hidrólisis de la harina de pescado, para su utilización como fuente de carbono y de nitrógeno, se produjeron proteasas neutras o alcalinas debido al pH alcanzado en el medio de cultivo. Observaciones similares fueron reportadas por Te Biesebeke y col. (2005) cuando el pH del medio de cultivo (agar con trigo molido) en el que crecieron *Aspergillus oryzae* ATCC16868 alcanzó un valor de 6.8. Esto sugiere que la secreción de proteasas neutras o alcalinas podría estar regulada por el pH del medio (Te Biesebeke y col., 2005; Iwashita, 2002).

El crecimiento de las cepas fúngicas sobre agar harina de pescado indicó que todas ellas poseen un sistema proteolítico que les permite utilizar este sustrato como fuente de carbono y de nitrógeno. Para seleccionar las cepas con mayor capacidad proteolítica, se analizó su crecimiento sobre placas de agar leche descremada.

En el medio agar leche descremada (pH 6.6), de las 6 cepas analizadas, *A. niger* ANH-15, *A. niger* 2088 y *A. oryzae* 2095 presentaron actividad proteolítica, la cual se manifestó a través de la formación de un halo translúcido en placas de agar leche descremada (Fig. 7). Esto puede explicarse por la hidrólisis de la caseína presente en el medio de cultivo (Shekine y col., 1969), lo cual se manifiesta con la decoloración del medio y la aparición de dicho halo, este fenómeno se observó a partir de las 24 horas de incubación y el diámetro del halo aumentó de manera proporcional al crecimiento radial de las cepas fúngicas. Para las cepas de *A. niger* DAR2, *A. niger* C28B35 y *A. niger* AD96-4 se manifestó un crecimiento escaso sobre las placas con medio agar leche descremada (Fig. 7) y

la formación del halo no se observó, esto pudo deberse a que estas cepas no poseen un sistema proteolítico que les permita hidrolizar las proteínas de la leche en oligopéptidos o aminoácidos que puedan utilizar como fuente de carbono.

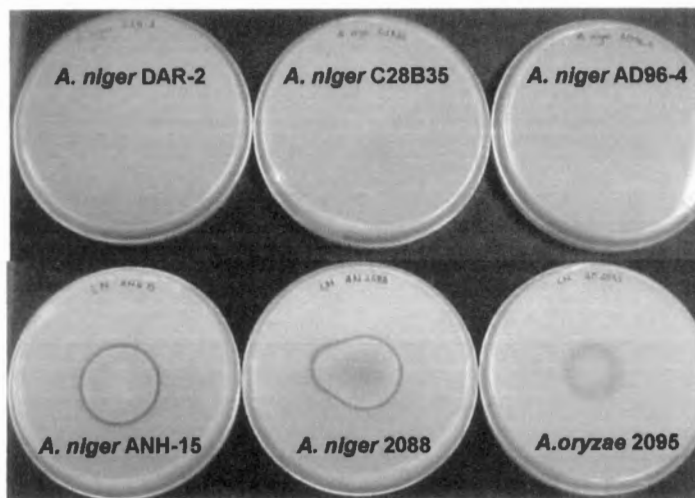


Fig. 7. Crecimiento de hongos filamentosos sobre placas de agar leche descremada (8%) incubadas a 30°C durante 56 h

A las cepas que manifestaron la formación halo de hidrólisis en las cajas de agar leche descremada a las 56 h (*A. niger* ANH-15, *A. niger* 2088 y *A. oryzae* 2095) se les midió el diámetro del halo y de la colonia para calcular el índice de potencia, el cual puede servir como una herramienta para comparar cualitativamente a diferentes cepas productoras de una misma enzima (Herrera, 2003). En la Tabla 16 se muestran los diámetros de los halos (D_h , cm) y de las colonias (D_c , cm) que se utilizaron para calcular el índice de potencia (I_p).

Tabla 16. Índice de potencia (I_p) en placas de agar leche descremada a las 56h de incubación

Cepa	(D_c , cm)	(D_h , cm)	$I_p = (D_h) (D_c)^{-1}$
2095	1.1±0.05	2.1±0.1	1.9
2088	1.9±0.1	2.9±0.1	1.5
ANH15	2.2±0	3.2±0.05	1.4

En base a los resultados anteriores, las cepas seleccionadas para las siguientes fermentaciones fueron las que se presentan en la Tabla 16, ya que se demostró que dichas cepas son capaces de producir enzimas proteolíticas, lo cual fue visualizado mediante la formación de halos de hidrólisis en placas de agar leche descremada, y pueden crecer con harina de pescado como única fuente de carbono y nitrógeno.

6.3. Medio de cultivo para la producción del extracto proteolítico

6.3.1. Selección del soporte inerte y relación harina de pescado-soporte inerte

La harina de pescado es un excelente sustrato para FMS, ya que contiene los nutrientes necesarios para las actividades celulares, por lo que no es necesario adicionar ingredientes tales como sales y glucosa para producir proteasas e inclusive las proteínas sirven como fuente de carbono (Ellouz y col., 2001). Sin embargo, la harina de pescado tiende a aglomerarse cuando aumenta su contenido de humedad, por lo que la adición de un soporte inerte que le confiera la textura adecuada durante la fermentación es necesario. Con la finalidad de seleccionar la proporción entre el sustrato y un soporte inerte se prepararon mezclas que contenían diferentes relaciones de harina de pescado-soporte inerte (agrolita ó espuma de poliuretano). Dicha selección se hizo tomando como base la humedad de saturación y la textura de las mezclas, dado que en la FMS se observan limitaciones en la transferencia de calor y masa (Te Biesebeke y col., 2002; Mitchell y col., 2000), por lo que se requiere que la mezcla permita la aireación y la difusión de nutrientes.

En la Fig. 8 se observa que con la mezcla 50/50 (p/p) de harina de pescado-espuma de poliuretano (HP/PUF) se obtuvo la mayor humedad (85.76%), esto pudo deberse a la capacidad de absorción de agua del PUF y de la harina de pescado. De manera inversa, la mezcla con la que se obtuvo la menor humedad (53.73%) fue con la de harina de pescado-agrolita 90/10 (p/p).

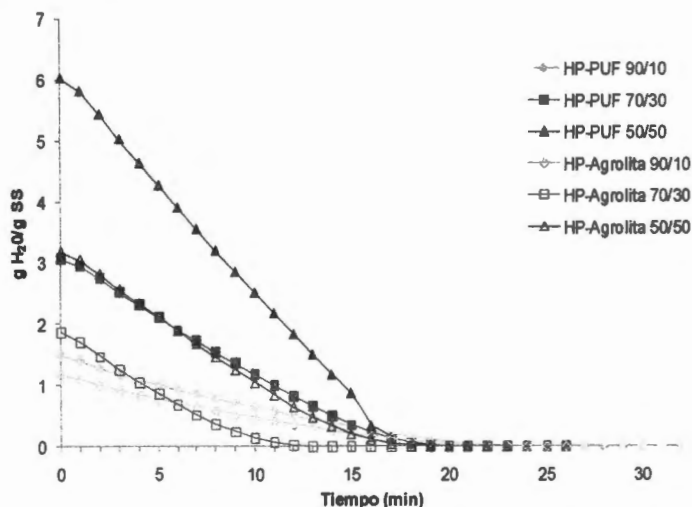


Fig. 8. Curvas de secado de las mezclas harina de pescado-agrolita y harina de pescado-espuma de poliuretano (PUF) en diferentes proporciones.

Los parámetros utilizados para la selección de la relación harina de pescado-soporte inerte se describen en la Tabla 17, en la que se observa que la textura mejoró conforme aumentó la proporción de soporte inerte en las mezclas, esto puede explicarse por la tendencia que tiene la harina de pescado de aglomerarse por ser altamente higroscópica. De la misma manera, la humedad de saturación aumentó cuando el soporte inerte estuvo presente en mayor proporción y fue más elevada para las mezclas que contenían PUF, esto pudo deberse a que el PUF tiene la capacidad de absorber más agua.

Tabla 17. Parámetros de selección de la relación harina de pescado/soporte inerte (agrolita ó espuma de poliuretano PUF) (+): poco aglomerada, (++) : aglomerada, (+++) : muy aglomerada

SOPORTE	HP/SI	% H SAT.	TEXTURA
Agrolita 20	50/50	76.03	+
Agrolita 20	70/30	65.03	++
Agrolita 20	90/10	53.73	+++
PUF	50/50	85.76	+
PUF	70/30	75.39	++
PUF	90/10	59.88	+++

Conjuntado todos los factores mencionados anteriormente, se seleccionó la mezcla que presentó una textura que proporcionara la humedad suficiente para proveer de agua al hongo durante el proceso de fermentación permitiendo la transferencia de calor y masa. La mezcla seleccionada fue harina de pescado-espuma de poliuretano en una proporción 70/30 (p/p) respectivamente, la cual tuvo una humedad de saturación de 75.39%.

6.3.2. Selección de la concentración de glucosa y cepa con mayor actividad proteolítica

El diseño del medio de cultivo para la obtención de biomasa, enzimas o metabolitos secundarios ha sido utilizado desde hace siglos para mejorar los procesos de fermentación. La relación C/N es muy importante ya que define los productos obtenidos en procesos fermentativos; el valor óptimo de esta relación puede variar desde 10 hasta 100. Sin embargo, valores mayores a 100 han sido reportados para la degradación de madera por hongos de podredumbre blanca cuya relación C/N varía entre 160 y 400 dependiendo del tipo de madera y del microorganismo (Doelle y col., 1992). También existen reportes de valores de relaciones C/N de hasta 6.25 para el crecimiento de células (Parekh y col., 2000). Particularmente, para la producción de proteasas, Battaglini y col. (1991) reportaron como óptima (1946 UP/g SS) una relación CHO/proteína de 6.6 con un medio que contenía cáscara y salvado de arroz en una relación 7:3.

Con la harina de pescado que se utilizó para la realización de este trabajo se obtuvo una relación C_{total}/N y CHO/proteína de 4 y 0.023 respectivamente. El valor de ésta última estuvo por debajo del reportado para la producción de proteasas como se mencionó anteriormente, esto pudo ser debido a que la cáscara y salvado de arroz tienen un contenido de carbohidratos mayor que el contenido de proteína. Tomado en consideración esto, se planteó evaluar el efecto de la adición de glucosa al medio de cultivo sobre la actividad proteolítica (pH 7) de los extractos, utilizando las cepas previamente seleccionadas.

Además de la relación C/N, existen otras variables que son importantes dentro de los procesos fermentativos, tales como pH, humedad y actividad de agua (Aw) del medio, ya que éstas determinan de manera importante el metabolismo de los microorganismos y por consiguiente la producción de compuestos de interés (Ooijkaas y col., 2000; Iwashita, 2002). Por esta razón, se determinaron y compararon estas variables en cada uno de los medios analizados. En la Tabla 18 se muestran los valores de pH, Aw y humedad obtenidos al inicio, a las 36 y 72 horas de fermentación de los medios con 0, 5, 10 y 15 % de glucosa inicial inoculados con las 3 cepas fúngicas seleccionadas (*A. niger* ANH-15, *A. niger* 2088 y *A. oryzae* 2095).

Tabla 18. pH, actividad de agua (Aw) y porcentaje de humedad (% H) de medios de fermentación con 0, 5, 10 y 15% de glucosa a las 0, 36 y 72 h de fermentación.

CEPA	Inicio			36 h			72 h		
	pH	Aw	% H	pH	Aw	% H	pH	Aw	% H
SIN GLUCOSA									
<i>A niger</i> ANH-15	5.46	0.989	48.81	6.40	0.987	48.16	6.91	0.969	51.23
<i>A niger</i> 2088	5.38	0.989	48.25	6.88	0.985	50.11	8.20	0.964	51.53
<i>A oryzae</i> 2095	5.62	0.990	48.95	6.50	0.986	50.33	8.33	0.967	51.25
5 % GLUCOSA									
<i>A niger</i> ANH-15	5.51	0.986	48.91	6.34	0.984	50.33	6.87	0.964	51.82
<i>A niger</i> 2088	5.41	0.987	48.61	6.91	0.980	50.17	7.70	0.963	51.78
<i>A oryzae</i> 2095	5.67	0.989	49.18	6.62	0.981	50.23	8.15	0.965	51.80
10 % GLUCOSA									
<i>A niger</i> ANH-15	5.43	0.983	48.39	6.29	0.982	50.82	6.70	0.963	52.01
<i>A niger</i> 2088	5.37	0.984	48.29	6.52	0.977	50.64	7.54	0.962	51.51
<i>A oryzae</i> 2095	5.62	0.986	48.92	6.81	0.979	50.76	8.10	0.963	51.95
15 % GLUCOSA									
<i>A niger</i> ANH-15	5.43	0.982	47.79	6.18	0.976	50.28	6.44	0.962	54.60
<i>A niger</i> 2088	5.37	0.983	48.01	6.07	0.975	50.20	7.47	0.961	53.20
<i>A oryzae</i> 2095	5.62	0.985	49.05	6.73	0.973	50.25	8.09	0.960	52.75

Como puede observarse en la Tabla 18 los valores de pH aumentaron conforme transcurrió el tiempo de fermentación y esta tendencia fue observada con los 3 microorganismos empleados (*A. niger* ANH-15, *A. niger* 2088 y *A. oryzae* 2095), esto pudo deberse al aumento del nitrógeno amoniacal en el medio como fue observado por George y col. (1997) cuando utilizaron harina de soya para la producción de proteasas por FMS. Este fenómeno también fue reportado por

Sparringa y Owen (1999) durante la proteólisis del tempeh. Es decir, con medios que, al igual que el utilizado en este trabajo, tienen un alto contenido de nitrógeno (Sharma y col. 2007).

Por otro lado, se observó una disminución de la A_w (Tabla 18) conforme aumentó la concentración de glucosa inicial en los medios (0, 5, 10 y 15%), esto pudo deberse a que esta hexosa, por ser un compuesto polar, se hidrata en presencia de agua mediante la formación de enlaces por puentes de hidrógeno (Badui, 1995) haciendo de esta forma menos disponible el agua para el microorganismo. Al final de la fermentación (72 h) la A_w (Tabla 18) descendió de 0.990 a 0.960 aproximadamente con las 4 concentraciones de glucosa y los 3 microorganismos, posiblemente por la acumulación de aminoácidos producidos por la hidrólisis de las proteínas o por la síntesis de polioles producidos a A_w entre 0.96-0.97 (Ruijter y col., 2004; Te Biesebeke y col., 2002).

En cuanto a la humedad del medio (Tabla 18), se observó un ascenso de 47-48% a 50-54% hacia el final del bioproceso (72 h), dependiendo de la concentración de glucosa en el medio; esta variación pudo ser causada por la actividad metabólica (Malathi y Chakraborty, 1991), o el agua proveniente del aire saturado; la cual probablemente, fue absorbida por la harina de pescado sin hidrolizar ya que ésta es altamente higroscópica.

Con respecto al efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de proteasas, a las 36 horas se observó para la cepa de *Aspergillus niger* 2088 que conforme aumentó la concentración de glucosa en el medio, 0, 5 y 10%, la actividad proteolítica se incrementó a 2.4 ± 1.28 , 5 ± 0.06 y 13 ± 3.54 U/L, respectivamente. Pero cuando el medio estuvo adicionado con 15% de glucosa, no se detectó la producción de proteasa (Fig. 9). Esto pudo deberse a que este microorganismo utiliza la fuente de carbono más fácil de asimilar sin que haya una disminución en la actividad proteolítica, pero con 15% de glucosa en el medio hay una represión en la producción de proteasas. Resultados similares fueron

encontrados por Boer y Peralta (2000), quienes observaron un descenso en la producción de proteasas cuando aumentaron de 1 a 2% la concentración de glucosa al medio. A las 72 h se observó que la actividad proteolítica (pH 7) de los extractos obtenidos con los medios con 0, 5 y 10% de glucosa se mantuvo constante (3 ± 0.91 , 4 ± 2.03 , 11 ± 4.72 U/L, respectivamente), pero con el medio con 15% de glucosa dicha actividad fue evidente (4 ± 0.004 U/L) (Fig. 9). Esto pudo deberse al agotamiento del sustrato de fácil asimilación, por lo que el microorganismo secreta proteasas al medio para hidrolizar la harina de pescado y obtener de las proteínas presentes en ella la fuente de carbono.

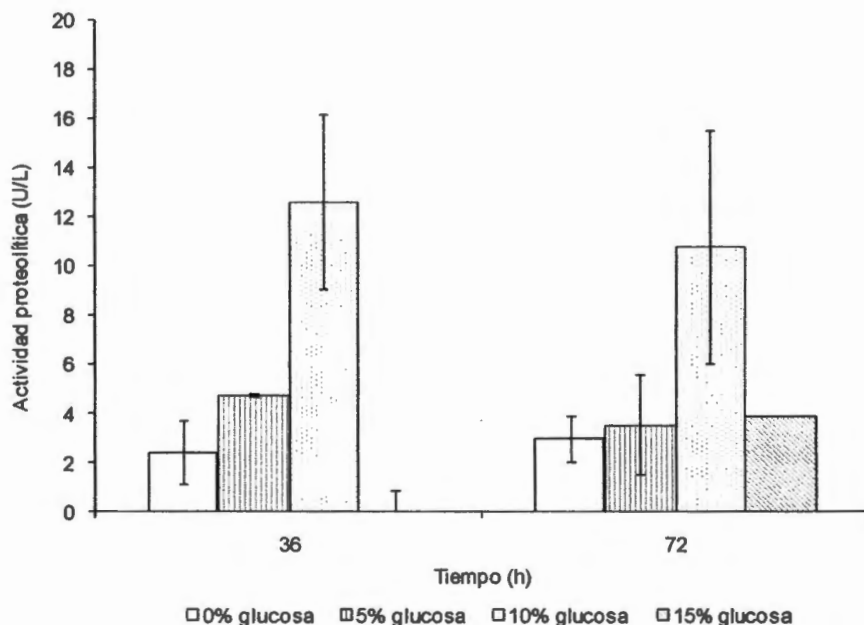


Fig. 9. Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad proteolítica (pH 7) de *A. niger* 2088 crecido en FMS utilizando una mezcla 70/30 (p/p) de harina de pescado-espuma de poliuretano con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente.

Por otro lado, con la cepa de *Aspergillus niger* ANH15 (Fig. 10), fue evidente la producción de proteasas a las 36 h de fermentación cuando se le

adicionó al medio 5 y 15 % de glucosa, sin embargo, a las 72 h hubo un descenso en la producción de proteasas con esos medios; mientras que en los medios con 0 y 10% de glucosa se observó un aumento a ese mismo tiempo. Con ésta cepa no se encontró un patrón que pudiera explicar el efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad proteolítica (pH 7).

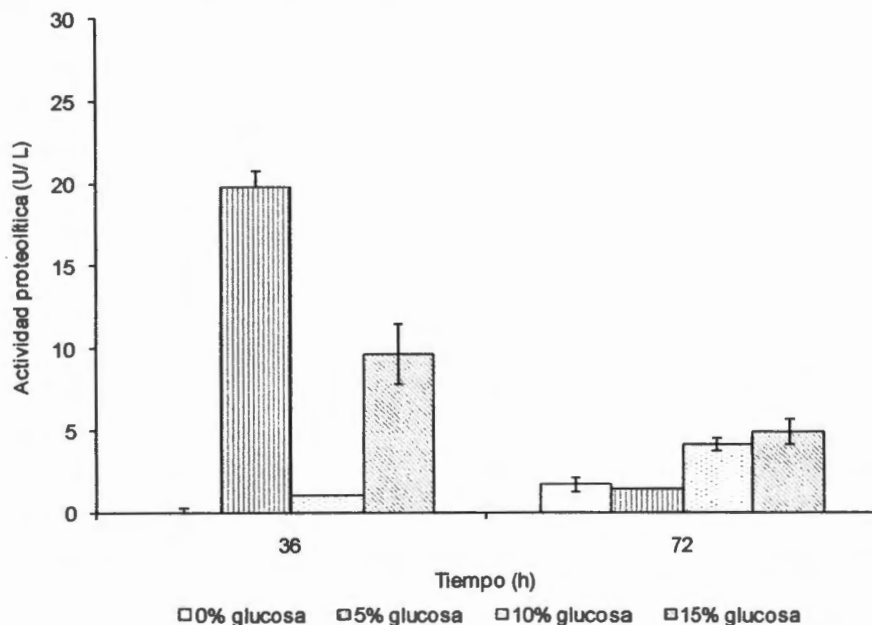


Fig. 10. Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad proteolítica (pH 7) de *A. niger* ANH15 crecido en FMS utilizando una mezcla 70/30 (p/p) de harina de pescado-espuma de poliuretano con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente.

Con la cepa de *Aspergillus oryzae* 2095 (Fig. 11) no se encontró diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en la actividad proteolítica a pH 7 entre los medio sin glucosa y con 5% de glucosa a las 36 h (89.2 ± 2.14 y 89.8 ± 1.47 U/L, respectivamente). Al mismo tiempo, un efecto negativo en la producción de proteasas fue observado cuando los medios contenían 10 y 15% de glucosa (14.9 ± 3.42 y 4.9 ± 0.88 U/L, respectivamente). Algunos reportes describen que un medio con proteína suplementado con monosacáridos (glucosa, arabinosa y galactosa), disacáridos

(lactosa, almidón, sacarosa y maltosa) u otra fuente de carbono (salvado de trigo o harina de soya) mejoran la producción de proteasas por hongos como *Aspergillus tamarii* o *Aspergillus oryzae* 1521 (Boer y Peralta, 2000; Samaratnam y col., 1999). Sin embargo, Boer y Peralta (2000) observaron que en FML un incremento de glucosa, de 1 a 2%, en un medio con 1% de gelatina redujo la producción de proteasas (de 110.5 a 48 U/mL), un efecto similar sobre la actividad proteolítica fue observado cuando adicionaron al medio más de 2% de harina de soya como sustrato. Este mecanismo regulatorio, conocido como represión por glucosa, se ha observado cuando más de una fuente de carbono están presentes en el medio y los microorganismos catabolizan la fuente de carbono que les proporciona rápidamente energía para su crecimiento (Sánchez y Demain, 2002), afectándose la producción de una enzima de interés, en este caso proteasas, aún cuando haya un inductor presente en el medio (Aguilar y col., 2004).

Por otro lado, a las 72 h en los medios con 0 y 5% de glucosa se observó un descenso en la producción de proteasas (Fig. 11), esto pudo deberse a la autohidrólisis de las proteasas como fue reportado previamente por Ikasari y Mitchell (1994). Además, en los medios con 10 y 15% de glucosa se incrementó la producción de proteasas, lo cual pudo deberse a que la disminución de glucosa hacia el final de la fermentación provocó que el hongo hidrolizara la harina de pescado para obtener sus requerimientos nutricionales de carbono y nitrógeno, esto sugiere que la producción de proteasas puede ser causada por estrés fisiológico (Aguilar y col., 2004).

Los resultados antes mencionados demuestran que la harina de pescado podría ser utilizada como único sustrato para la producción de enzimas proteolíticas y su producción puede ser regulada por inducción, es decir, los niveles basales de proteasas liberan péptidos de bajo peso molecular que pueden entrar a la célula e inducir la síntesis de proteasas (Venugopal, 1994)

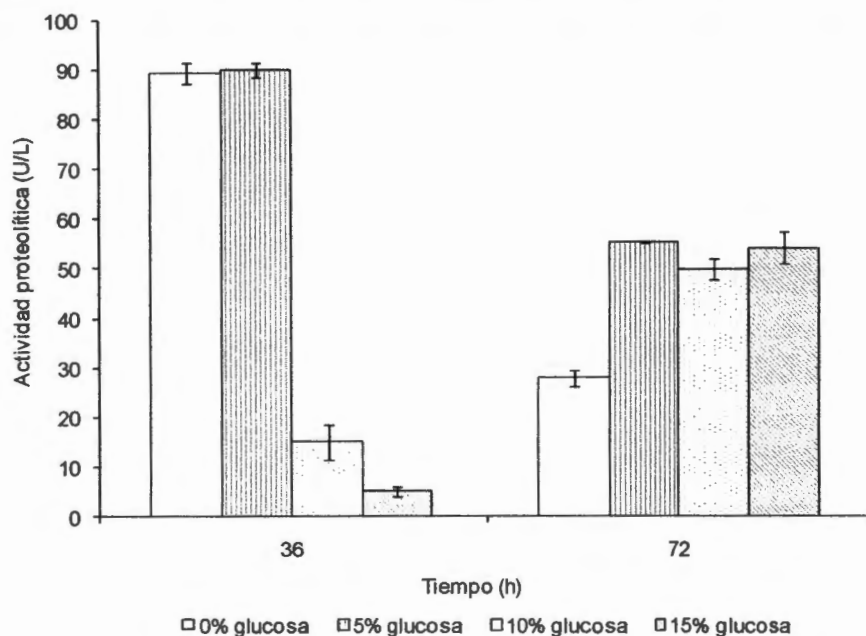


Fig. 11. Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad proteolítica (pH 7) de *A. oryzae* 2095 crecido en FMS utilizando una mezcla 70/30 (p/p) de harina de pescado-espuma de poliuretano con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente.

Los resultados anteriores permitieron seleccionar a *Aspergillus oryzae* 2095 y el medio de cultivo sin glucosa para realizar una cinética de producción de proteasas con la finalidad de determinar el tiempo de máxima producción y la actividad proteolítica a pH ácido (2.7), neutro (7), alcalino (10). A pesar de que *Aspergillus oryzae* ha sido reportado como productor de proteasas ácidas, neutras y alcalinas (Battaglini y col., 1991) los resultados mostraron que, bajo las condiciones de este estudio, la actividad proteolítica a pH 2.7 no se detectó, mientras que la actividad proteolítica a pH 7 y 10 sí fue observada (Fig. 12). Esto pudo deberse a que el pH del medio desde las 44 horas hasta el final de la fermentación (pH 7.75-8.33) favoreció la producción de extractos proteolíticos con actividad a pH neutro (7) y alcalino (10), observaciones similares fueron reportados previamente (Te Biesebeke y col., 2005; Iwashita, 2002; Battaglini y

col., 1991). La producción de extractos con actividad proteolítica inició a las 24 horas de fermentación alcanzándose la actividad máxima a las 44 horas (Fig. 12), siendo mayor la actividad proteolítica alcalina (120.78 ± 5.07 U/L) que la neutra (79.71 ± 1.69 U/L).

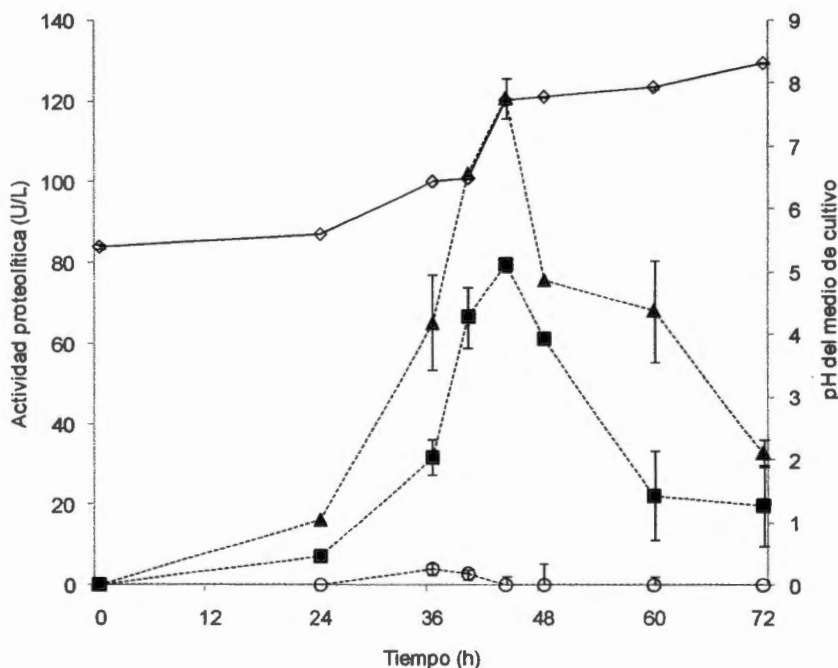


Fig. 12. Cinética de producción de proteasas con *Aspergillus oryzae* 2095 crecido en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente. Actividad proteolítica a pH 2.7 (○), actividad proteolítica a pH 7 (■), actividad proteolítica a pH 10 (▲) y pH del medio (◇)

6.3.3. Efecto del tamaño de partícula del soporte inerte (PUF) en la producción de proteasas por FMS

Con la finalidad de evaluar el efecto del tamaño de partícula del soporte inerte (PUF) en la producción de proteasas por FMS se analizaron 2 medios, uno contenía harina de pescado y PUF con tamaño de partícula de 0.5 mm (Fig. 12) y

el otro harina de pescado y PUF con tamaño de partícula de 1.5 mm (Fig. 13). La actividad proteolítica alcalina (pH 10) en el medio con PUF de 1.5 mm se observó después de las 24 horas de incubación (5.75 U/L), mientras que la actividad proteolítica neutra (pH 7) inició a las 36 horas (8.39±1.01 U/L) (Fig. 13). Por otro lado, en el medio con PUF de 0.5 mm la actividad proteolítica neutra y alcalina fueron observadas desde las 24 h de incubación (7.19 U/L y 16.14 U/L respectivamente), siendo la actividad proteolítica alcalina mayor durante todo el bioproceso (Fig. 12).

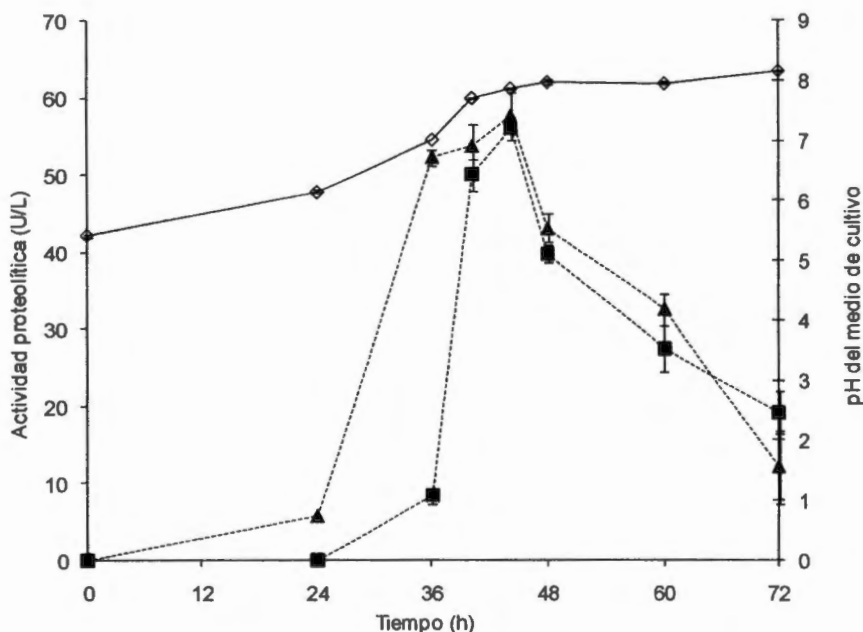


Fig. 13. Producción de extractos proteolíticos extracelulares con actividad neutra y alcalina de *Aspergillus oryzae* 2095 crecido en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 1.5 mm respectivamente. Actividad proteolítica a pH 7 (■), actividad proteolítica a pH 10 (▲) y pH del medio (◇).

Para ambos medios, la máxima actividad proteolítica neutra (pH 7) y alcalina (pH 10) fue observada a las 44 h, después de este tiempo la actividad proteolítica

descendió para ambos valores de pH. Esto pudo deberse a la presencia de catabolitos nitrogenados como aminoácidos y amoníaco (Venugopal, 1994) como fue observado por Fukushima y col. (1989) durante la producción de proteasas por *Aspergillus oryzae* NISL 1913. Sin embargo, también es posible que la disminución en la actividad proteolítica después del tiempo de máxima actividad se haya debido a la autoproteólisis, un perfil similar fue observado por Ikasari y Mitchell (1994) durante la producción de proteasas por *Rhizopus oligosporus* en FMS utilizando salvado de arroz como sustrato.

Resumiendo, se observó que el tamaño de partícula del soporte inerte tuvo efecto sobre la producción de proteasas ya que la actividad proteolítica a pH 7 y 10 fue 1.3 y 2.1 veces mayor en el medio con PUF de 0.5 mm (79.71 ± 1.69 U/L y 120.78 ± 5.07 U/L) que en el medio con PUF de 1.5 mm (55.96 ± 0.16 U/L y 57.59 ± 3.05 U/L). Estos resultados concuerdan con Huang y col. (1985) quienes observaron un efecto positivo en el crecimiento de *Aspergillus kopperi* cuando se disminuyó el tamaño de partícula del arroz desde malla 8 hasta malla 30.

El tamaño de partícula, tanto el del sustrato como el del soporte, es muy importante, porque éste afecta la relación área superficial/volumen de la partícula, así como la densidad de empaque. Estos factores tienen un efecto sobre los fenómenos a microescala que ocurren durante la FMS (Mitchell y col., 2000). La mayoría de los estudios de FMS para la producción de proteasas se han hecho utilizando residuos agroindustriales (Tabla 7, Sección 3.1.1.), que funcionan simultáneamente como soporte y sustrato. Sin embargo, durante el bioproceso existe una degradación del sustrato lo que puede ocasionar problemas de transferencia de calor y masa (Ooijkaas y col., 2000). En este sentido, los resultados aquí presentados contribuyen al conocimiento en la producción de enzimas proteolíticas obtenidas por FMS utilizando una mezcla de harina de pescado y espuma de poliuretano, la cual no ha sido previamente reportada.

6.4. Comparación de la producción de proteasas por FMS y FML

El análisis comparativo de la producción de proteasas por dos sistemas de fermentación fue realizado utilizando para la FMS el medio con harina de pescado y PUF de 0.5mm, mientras que para la FML se utilizó como medio el filtrado de una suspensión de 20 g/L de harina de pescado en amortiguador de fosfatos 0.2 M (pH 7.5). En la FMS (Fig. 12) las actividades proteolíticas neutra y alcalina fueron detectadas desde las 24 h; mientras que en la FML (Fig. 14), se observaron después de las 36 h.

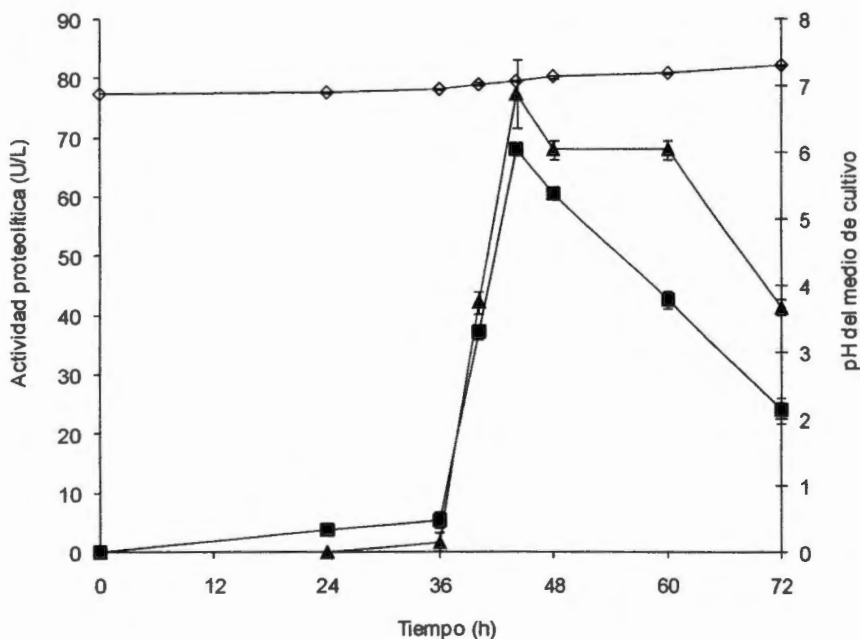


Fig. 14. Producción de extractos proteolíticos extracelulares con actividad neutra y alcalina de *Aspergillus oryzae* 2095 crecido en FML utilizando medio harina de pescado. Actividad proteolítica a pH 7 (■), actividad proteolítica a pH 10 (▲) y pH del medio (◇).

En ambos cultivos, la máxima producción de proteasas, neutras y alcalinas, se alcanzó a las 44 horas de transcurrido el proceso. Las actividades proteolíticas

neutra y alcalina fueron 1.1 y 1.5 veces mayores en la FMS (79.71 ± 1.69 U/L y 120.78 ± 5.07 U/L) que en la FML (68.08 ± 0.60 U/L y 77.47 ± 5.85 U/L), respectivamente. Después del periodo de máxima producción de proteasas, se observó un descenso en la actividad proteolítica. Esto pudo ser debido a limitaciones de nutrientes (Gupta y col., 2002a), o a la producción de aminoácidos y compuestos de bajo peso molecular (Venugopal, 1994; Gupta y col., 2002b). Esto puede estar relacionado con el fenómeno conocido como represión de amonio o represión metabólica por nitrógeno, el cual reprime a las enzimas y permeasas involucradas en la utilización de fuentes de nitrógeno diferentes que el amonio (Martinelli y Kinghorn, 1994).

Se sabe que el pH del medio tiene un efecto sobre los procesos enzimáticos y el transporte de compuestos a través de la membrana celular (Sandhya y col., 2005). Así que la variación de este parámetro modifica la expresión de genes y por lo tanto la secreción de proteínas (Iwashita, 2002; Te Biesebeke y col., 2005). En este contexto, el pH del medio fue ajustado en ambos tipos de cultivo con la finalidad de obtener en el tiempo de máxima producción de proteasas aproximadamente el mismo valor de pH y analizar las enzimas producidas en ambos tipos de sistemas de fermentación. En la FMS, el pH inicial (5.4) se incrementó hasta 8.25 (Fig. 12), esto pudo haber estado relacionado al incremento de amoniaco en el medio como resultado del metabolismo de las proteínas después de la acción de las proteasas. El mecanismo más parecido es la oxidación de aminoácidos durante su utilización como fuente de energía: $RCH(NH_3^+)COO^- + nO_2 \rightarrow nCO_2 + yH_2O + NH_4^+ + OH^- + nATP$, como fue mostrado durante la hidrólisis de tempeh (Sparringa y Owens, 1999). Un efecto similar fue observado durante la producción de proteasas por *Bacillus amyloliquefaciens* en FMS y FML en el que se utilizó harina de soya como sustrato (George y col., 1997). En contraste, una variación menor en el pH (de 7.41 a 7.82) se observó durante la FML (Fig. 14), esto pudo ser debido a que el amoniaco formado se diluyó en el caldo de cultivo. Los valores de pH obtenidos en este trabajo pudieron

haber influido en la producción de extractos con actividad proteolítica neutra y alcalina.

Por otro lado, la comparación de la actividad proteolítica, expresada como unidades por gramo de proteína inicial, de los extractos enzimáticos obtenidos por los dos sistemas de fermentación se presenta en la Fig. 15. En dicha figura se puede observar que la actividad proteolítica de los extractos obtenidos por FMS (Fig. 15a) es menor, en tres órdenes de magnitud, que la actividad de los extractos obtenidos por FML (Fig. 15b). En este sentido, George y col. (1997) observaron una actividad proteolítica aproximadamente 3 veces menor en los extractos obtenidos por FMS (250,000 U/g de frijoles de soya) que en los obtenidos por FML (800,000 U/100 mL de extracto), sin embargo, al concentrar estos últimos observaron una pérdida de la actividad proteolítica. Por otro lado, Díaz-Godínez (2001) durante la producción de exopectinasas por FMS y FML observó la producción de proteasas como productos no deseados, cuyos niveles de producción fueron al menos 3 veces menores en la FMS que en la FML.

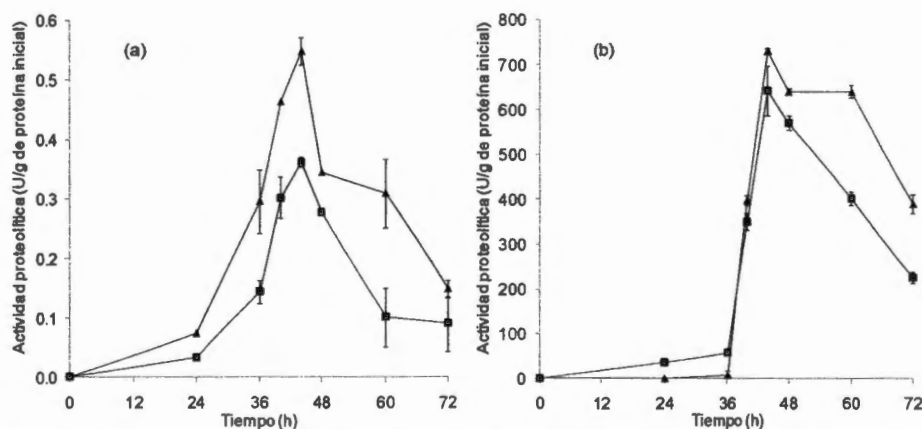


Fig. 15. Producción de extractos proteolíticos extracelulares con actividad neutra y alcalina de *Aspergillus oryzae* 2095 crecido en (a) FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente, y en (b) FML utilizando medio harina de pescado. La actividad proteolítica a pH 7 (■) y a pH 10 (▲) se reporta en U / gramo de proteína inicial.

En la FMS son observados gradientes de nutrientes, concentración de oxígeno, temperatura, disponibilidad de agua y productos. Mientras que en la FML, estas condiciones son casi uniformes en todo el medio (Iwashita, 2002; Te Biesebeke y col., 2005). Sin embargo, la morfología del hongo, su capacidad de asimilar los nutrientes y de crecer dependen del sistema de fermentación utilizado (Díaz-Godínez, 2001). En este trabajo, el medio utilizado para la FMS contenía mayor cantidad de proteína inicial (0.6298 g de proteína/g de harina de pescado) que el medio usado para la FML (0.0053 g de proteína/50 mL de medio filtrado), pero en este último sistema de fermentación la proteína se encontraba de forma homogénea en el medio y por lo tanto más disponible para el microorganismo; sin embargo, el hongo creció en forma de "pellets" lo cual dificulta la difusión de oxígeno y nutrientes a través de él (Díaz-Godínez, 2001). Contrariamente, en la FMS las hifas penetran poco a poco en el sustrato, por lo que sólo una fracción del total de la proteína inicial está accesible para el microorganismo; sin embargo el área superficial disponible para el crecimiento del hongo es mucho mayor que en la FML (Mitchell y col., 2000) por lo que la actividad volumétrica es mayor en la FMS, como se mostró anteriormente (Fig. 12 y Fig. 14).

La diferencia en los tipos de reactores utilizados, la naturaleza del medio de cultivo, las condiciones de los bioprocesos, las metodologías para la recuperación de las enzimas y la determinación de la actividad enzimática, entre muchas otras hacen difícil la comparación entre los resultados obtenidos en este trabajo y los reportados en la bibliografía, tanto para la FMS como para la FML. En la Tabla 19 se resumen las características más relevantes de algunos de los trabajos que reportan la producción de proteasas de hongos filamentosos. Con excepción de Wang y col. (2005a), quienes obtuvieron una actividad proteolítica de 18 U/L cuando fermentaron en medio líquido una mezcla de harina de salvado de trigo y soya, se puede observar (Tabla 19) que los valores de la actividad proteolítica de los trabajos reportados en la literatura son mayores que los obtenidos en este trabajo. La actividad proteolítica la reportaron en términos de U por L, U por mL y U por g de sustrato seco, pero como se puede observar la mayoría de las

investigaciones difirió de la cantidad de sustrato inicial, así como de la concentración de inóculo adicionado al medio de fermentación. En cuanto al tiempo de máxima producción, exceptuando a Couri y col. (2000) y Villegas y col. (1993) quienes reportaron tiempos de producción máxima de 42 y 36 horas respectivamente, las investigaciones de las referencias presentadas en la Tabla 19 reportaron tiempos de máxima producción de proteasas que van desde 40 horas hasta 17 días, mientras que en este trabajo la mayor producción de enzimas proteolíticas se obtuvo a las 44 horas. Por otro lado, a diferencia de Basu y col. (2008), Wang y col. (2005b) y este trabajo, quienes utilizaron como medio de cultivo escamas de pescado, caparazones de camarón y langosta, y harina de pescado respectivamente, el resto de las referencias de la Tabla 19 usaron como medio de fermentación sustratos de origen agrícola.

Tabla 19. Comparación de la actividad proteolítica de los extractos de *Aspergillus oryzae* 2095 obtenidos por fermentación en medio sólido y líquido con los reportados en la literatura.

Tipo de cultivo	Microorganismo	Medio de cultivo	Tipo de reactor	Nivel de inóculo	t máxima producción	Sustrato	Nivel de producción	Ref.
FML	<i>Aspergillus oryzae</i> 2095	Filtrado de medio harina de pescado	Matraces: 50 mL de medio	4.5 x 10 ⁷ esporas/g de proteína	44 h	Caseína 2%	77.47 U/L 730.03 U/g prot. Inicial	Este trabajo
FML	<i>Aspergillus oryzae</i>	Mezcla de harinas de salvado de trigo y soya	Reactor agitado(10L): 7L de medio	0.6 MC/mL	80 h	Caseína	≈ 18 U/L	105
FML	<i>Aspergillus oryzae</i>	Salvado de trigo	Matraces: 40 mL de medio	8 x 10 ⁸ esporas	72 h	Caseína 1%	8.7 U/gMS	79
FML	<i>Aspergillus oryzae</i>	Soya desgrasada, lactosa y casitona	Matraces: 50 mL de medio	10 ⁸ esporas/50 mL	72 h	Caseína 0.6%	14,100 U/mL	77
FML	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2% de polvo de caparzones de camarón y langosta	Matraces: 150 mL de medio	NR	6 d	Caseína 1%	1 U/mL	106
FML	<i>Aspergillus tamarii</i>	1% de harina de soya	Matraces: 50 mL de medio	NR	6 d	Caseína 1%	160 U/mL	15
FML	<i>Aspergillus niger</i>	Destilado ligero de arroz con 4% de aceite de soya	Fermentador de 2 L con 1 L de medio	NR	8 d	Caseína	200 U/mL	108
FML	<i>Aspergillus niger</i>	Escamas de pescado	Matraces con 30 mL de medio	7 x 10 ⁷ esporas/30 mL medio	14 d	Caseína 1%	2776 U	11
FMS	<i>Aspergillus oryzae</i> 2095	Harina de pescado y PUF 0.5 mm (70/30)	Reactores tubulares (30 g de MH)	2x10 ⁷ esporas/g MS	44 h	Caseína 2%	120.78 U/L 0.54 U/g prot inicial	Este trabajo
FMS	<i>Penicillium</i> sp. LPB-5	Masa de soya desgrasada	Matraces	10 ⁸ esporas/g SS	48 h	Azocaseína sulfanilamida	NR	34
FMS	<i>Aspergillus niger</i>	Salvado de trigo	Charolas con 40 g de MF	10 ⁸ esporas/g MF	42 h	NR	5.27 U/mL	19
FMS	<i>Aspergillus niger</i>	Salvado de trigo	Columnas empacadas	2x10 ⁷ esporas/g MS	36 h	Caseína	74.3 U/gMS	103

Tabla 19. Comparación de la actividad proteolítica de los extractos de *Aspergillus oryzae* 2095 obtenidos por fermentación en medio sólido y líquido con los reportados en la literatura. Continuación.....

FMS	<i>Rhizopus oryzae</i>	Salvado de trigo	Reactor de lecho empaquetado (20 g ST)	7.2 x 10 ⁷ esporas/g MS	17 d	Caseína 2%	6381 U	5
FMS	<i>Rhizopus oryzae</i>	Salvado de trigo (ST)	Matraces con 10 g de medio	2x10 ⁵ esporas/g ST	6 d	Caseína	341 U/g ST	99
FMS	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Salvado de arroz	Matraces con 10 g de medio	10 ⁷ esporas/mL	72 h	BSA	3.9x10 ³ PU/gSSI	47
FMS	<i>Mucor bacilliformis</i>	Salvado de trigo	Matraces con 10 g de medio	5x10 ⁵ esporas/g SS	72-96 h	Leche descremada 10%	700 PU/g ST	27
FMS	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus sojae</i>	Lupino (L) Soya (S)	Cajas Petri con 30 g de medio	1% de cultivo semilla	6 d	Dimeticaseína (10 mg/mL)	1500U/gL, 1800U/gS 1900U/gL, 1700U/gS	80
FMS	<i>Aspergillus oryzae</i>	Salvado de trigo	Matraces con 10g de sustrato	8 x 10 ³ esporas	72 h	Caseína 1%	31.2 U/gMS	79
FMS	<i>Aspergillus oryzae</i>	Cáscara y salvado de arroz (7:3)	Matraces con 10g de sustrato	5x10 ⁷ esporas/mL	72-96 h	Caseína 1%	1946 PU/g sustrato	12
FMS	<i>Aspergillus flavus</i>	Salvado de trigo	Matraces con 10 g de sustrato	NR	48 h	Caseína 2.5%	6.54 U/mL	60

Resumiendo, en este trabajo se obtuvieron en un periodo de tiempo corto proteasas fúngicas por fermentación de una mezcla de harina de pescado y espuma de poliuretano, la cual no ha sido reportada previamente.

6.5. Zimogramas para la detección *in situ* de la actividad proteolítica en los extractos crudos obtenidos por FMS y FML

Los zimogramas son una herramienta útil para los extractos crudos con actividad, ya que permiten evidenciar las proteínas con actividad enzimática de interés, es este caso con actividad proteolítica. Además proporcionan una perspectiva de las isoenzimas o grupos de ellas presentes en los extractos crudos obtenidos por cada sistema de fermentación, permitiendo comparar el número y posición (peso molecular) de las enzimas.

En los zimogramas a pH 7 y pH 10 (Fig. 16) con los extractos crudos obtenidos por FMS y FML en este trabajo se puede observar que existen isoenzimas en ambos tipos de cultivo y éstas tienen un peso “aparente” aproximado entre 70 kDa y 103 kDa.

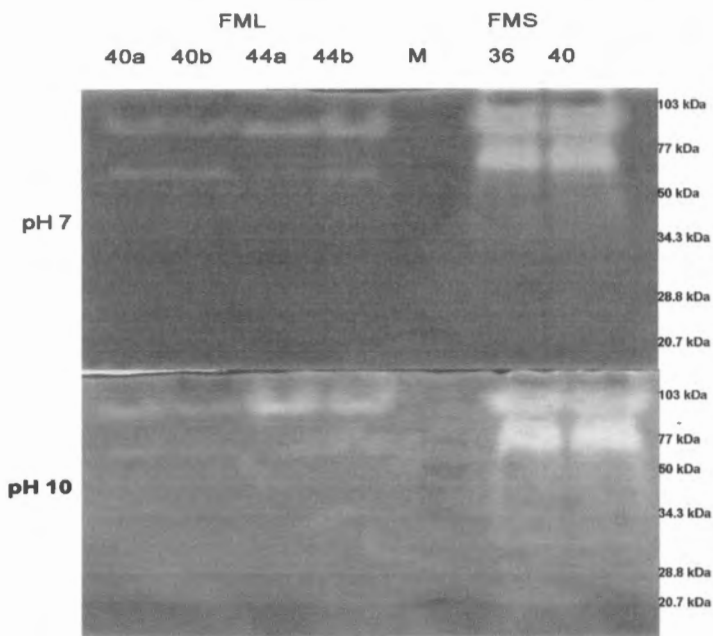


Fig. 16. Perfil de extractos proteolíticos de *Aspergillus oryzae* 2095 producidos por fermentación en medio sólido (FMS) y líquido (FML) (a y b son 2 muestras diferentes).

Alrededor del tiempo de máxima producción de proteasas (44 h), se observaron isoformas (70 y 103 KDa) en los extractos obtenidos por FML y FMS. Es importante mencionar que las muestras fueron diluidas 1:5 y 1:1 para los extractos crudos obtenidos por FMS y FML respectivamente, es decir, al mismo nivel de dilución utilizado para la cuantificación de la actividad proteolítica, por lo que el grosor de las bandas en los zimogramas (Fig. 16), generadas por los extractos obtenidos por FMS (Fig. 12), podría indicar mayor actividad proteolítica que con los extractos provenientes de la FML (Fig. 14), como fue corroborado previamente (Sección 6.4) cuando se comparó la producción de proteasas en esos sistemas de cultivo. Por otro lado, la similitud en los perfiles enzimáticos a valores de pH de 7 y 10 podría ser debida a que las zonas activas en los geles son causadas por las mismas enzimas y no por isoformas con actividad diferenciada, es decir, al igual que muchas otras enzimas, las proteasas tienen actividad en un intervalo amplio de pH, por ejemplo, las proteasas alcalinas actúan a valores de

pH que van desde 4 hasta 12 (Capítulo 2, Sección 2.4.4., Fig. 3) (Adler-Nissen, 1993).

El peso molecular "aparente" de las proteasas producidas por *Aspergillus oryzae* 2095 en este trabajo fueron mayores que las producidas por *Aspergillus flavus* (Hossain y col., 2006), *Aspergillus niger* AB₁₀₀ (Basu y col., 2007), *Aspergillus terreus* (Chakrabarti y col., 2000), *Aspergillus oryzae* (Sharma y col., 2007), *Aspergillus clavatus* (Tremacoldi y col., 2007); similares al de las reportadas para *Aspergillus niger* Bo-1 (Aalbaek y col., 2002) y *Pleurotus ostreatus* (Palmieri y col., 2001); o menores que el de las proteasas de *Aspergillus fumigatus* TKU003 (Wang y col., 2005b) como puede observarse en la Tabla 20. Esto significa que bajo las condiciones de este trabajo las proteasas responsables de la actividad proteolítica tienen pesos moleculares que no han sido previamente reportados, particularmente para hongos de la misma especie.

Tabla 20. Pesos moleculares de proteasas obtenidas a partir de diferentes microorganismos.

Microorganismo	Peso (KDa)	Ref.
<i>Aspergillus oryzae</i> 2095	70, 103	Éste trabajo
<i>Aspergillus fumigatus</i> TKU003	124	107
<i>Aspergillus flavus</i>	46	43
<i>Aspergillus niger</i> AB ₁₀₀	30.9	11
<i>Aspergillus niger</i> Bo-1	59, 73, 91	1
<i>Aspergillus terreus</i>	37	16
<i>Pleurotus ostreatus</i>	75	70
<i>Aspergillus oryzae</i>	33	80
<i>Aspergillus clavatus</i>	35	97

6.6. Comparación entre el extracto crudo enzimático producido por *A. oryzae* 2095 por FMS y un extracto comercial (Flavourzyme 500 MG®)

El extracto crudo (EC) producido por *Aspergillus oryzae* 2095 en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente, se utilizó para realizar la

comparación con un extracto proteolítico comercial de origen fúngico denominado Flavourzyme 500 MG®.

6.6.1. Caracterización bioquímica de los extractos

6.6.1.1. Determinación de pH y temperatura óptimos de actividad

El pH y la temperatura óptimos de la actividad proteolítica de ambos extractos fueron analizados en un intervalo de 6-10 y 30-70°C, respectivamente, utilizando caseína como sustrato.

El pH óptimo para la actividad proteolítica fue de 8 y 9, para Flavourzyme 500 MG® (Fig. 17) y el extracto crudo (EC) (Fig. 18), respectivamente. Sin embargo, no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) en la actividad proteolítica a valores de pH de 8 y 9 para el EC (Fig. 18). Para ambos extractos, la temperatura óptima para la actividad proteolítica fue a 50°C (Fig. 17 y 18).

Los resultados obtenidos para el EC son similares a los reportados en la literatura. Samaratnam y col. (1999) reportaron la producción de proteasas por *A. oryzae* U1521 en un medio con soya desgrasada, lactosa, casitona y KH_2PO_4 $5\text{H}_2\text{O}$. La enzima fue inhibida por PMSF lo que indicó que pudo ser una serina proteasa con pH óptimo entre 8 y 9, con lo cual se demostró efectivamente que la enzima era una proteasa alcalina. Esta enzima mostró tener una temperatura óptima de actividad de 45°C. En otro estudio, *Aspergillus tamarii* mostró la mayor actividad a valores de pH entre 6 y 10, siendo su temperatura óptima de 45°C (Boer y Peralta, 2000). También las proteasas producidas por *Aspergillus flavus* mostraron que su pH y temperatura óptimos fueron de 8 y 45°C, respectivamente (Hossain y col., 2006). Además, las propiedades de pH y temperatura óptimas del EC, son similares a las de proteasas comerciales disponibles (Beynon y Bond, 1989) y otras producidas por otras fuentes microbianas (Gupta y col., 2002a; Kumar y Takagi, 1999), empleadas en alimentos para animales, peletería y otras aplicaciones.

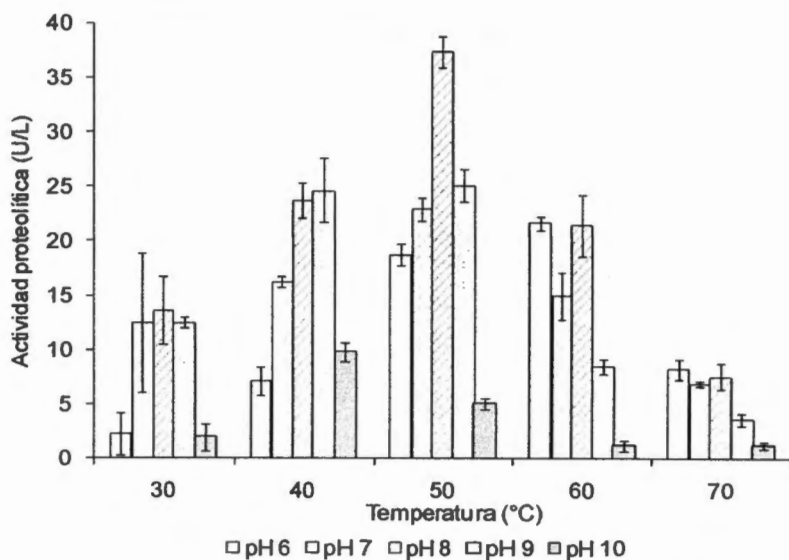


Fig. 17. Temperatura y pH óptimos de Flavourzyme 500 MG®

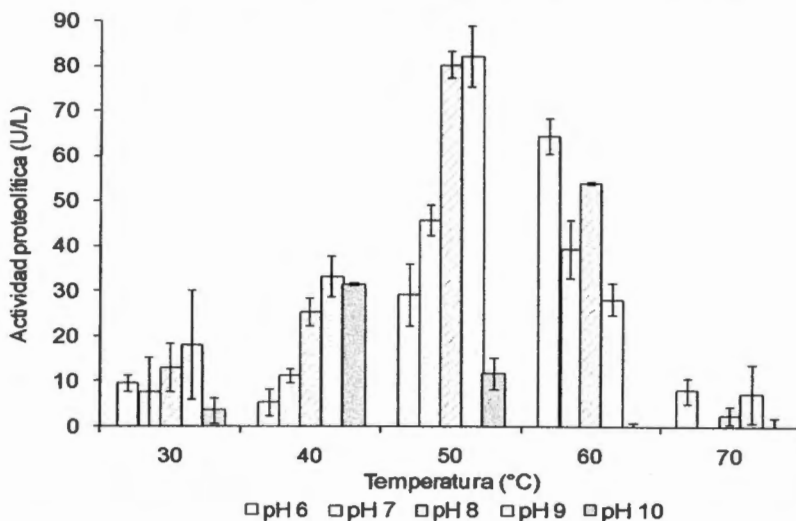


Fig. 18. Temperatura y pH óptimos del extracto crudo (EC) de *Aspergillus oryzae* 2095 crecido en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente.

6.6.1.2. Determinación de la estabilidad al pH y la temperatura

En cuanto a la estabilidad de los extractos a diferentes valores de pH en la Fig. 19a se puede observar que el EC fue muy estable en un amplio intervalo de después de 2 horas mantuvo más del 80% de su actividad original a todos los valores de pH analizados. Por su parte, Flavourzyme 500 MG[®] retuvo el 80% o más de su actividad original a valores de pH entre 6 y 8, un descenso en la actividad residual fue observado a pH de 9 y 10 (Fig. 19 b).

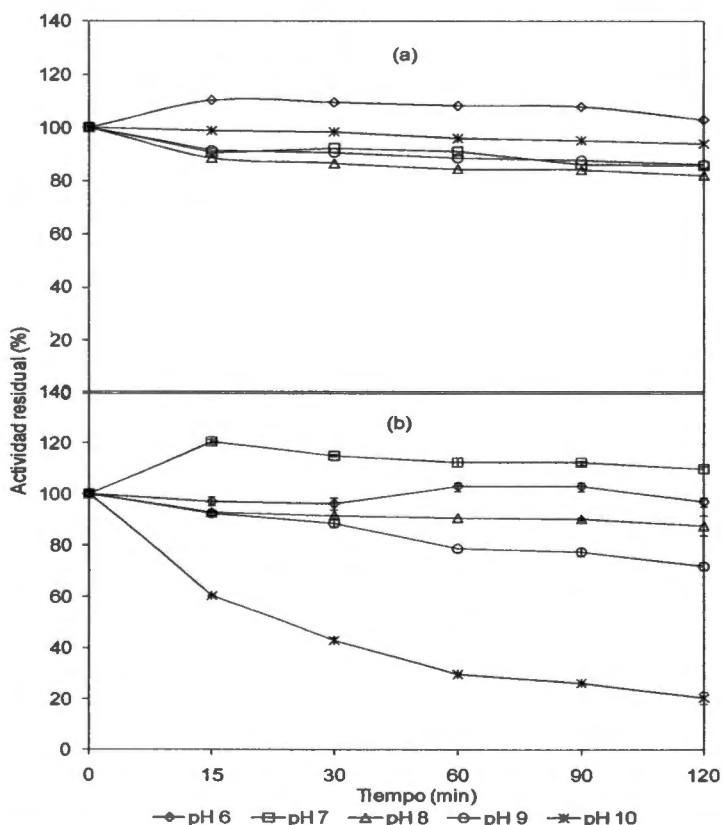


Fig. 19. Efecto del pH sobre la estabilidad del (a) extracto crudo de *Aspergillus oryzae* 2095 crecido en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente, y (b) Flavourzyme 500 MG[®].

Por otro lado, la temperatura tuvo mayor efecto sobre la actividad proteolítica de los extractos enzimáticos como se muestra en la Fig. 20. El EC a 30 y 40°C mantuvo el 100% de su actividad, pero después de 2 h de incubación a 50, 60 y 70°C sólo retuvo el 22, 13 y 2% de su actividad respectivamente. La estabilidad térmica de Flavourzyme 500 MG® fue más afectada que la del EC a 30 y 40°C, ya que sólo el 50% de su actividad inicial fue retenida después de 120 min de incubación. Cuando el extracto comercial fue sometido a 50 y 60°C por un periodo de incubación de 2 h tuvo una actividad proteolítica residual de 14.5 y 2.7% respectivamente, mientras que a 70°C durante el mismo tiempo de incubación Flavourzyme 500 MG® fue inactivado (Fig. 20b).

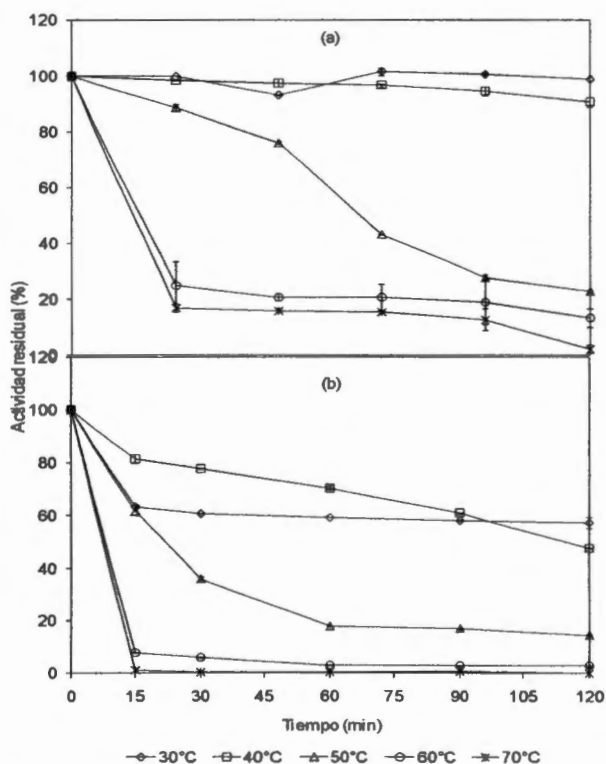


Fig. 20. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del (a) extracto crudo de *Aspergillus oryzae* 2095 crecido en FMS utilizando harina de pescado-espuma de poliuretano (70/30 p/p) con tamaño de partícula 0.84 mm y 0.5 mm respectivamente, y (b) Flavourzyme 500 MG®.

Las tendencias de la actividad residual de estabilidad al pH y la temperatura, por arriba del 100%, han sido reportadas recientemente para proteasas de fruta madura (Vallès y col., 2007). Por otro lado, los tiempos de vida media a la temperatura óptima (50°C) de EC y Flavourzyme 500 MG® fueron de 52 y 25 min respectivamente, es decir, el EC es 2 veces más estable que Flavourzyme 500 MG® bajo las condiciones ensayadas. Estos resultados son muy cercanos a los tiempos de vida media reportados para *Aspergillus tamarri* a 50 y 55°C, los cuales fueron 75 y 20 min, respectivamente (Boer y Peralta, 2000). En general, los valores de pH y temperatura de estabilidad para el EC y Flavourzyme 500 MG® obtenidos en este trabajo se encuentran dentro del intervalo de valores reportados para extractos comerciales o producidos en laboratorios de investigación, para *Aspergillus oryzae* (Guadix y col., 2000; Smyth y FitzGerald, 1998) y otras especies de *Aspergillus* (Wang y col., 2005b; Samaratarn y col., 1999; Hossain y col., 2006) (Tabla 21), lo cual hace atractivo su uso en aplicaciones biotecnológicas.

Tabla 21. Comparación de la temperatura y pH óptimo de actividad y de estabilidad de algunos extractos proteolíticos reportados en la literatura y los obtenidos en este trabajo.

ENZIMA	ORIGEN	ÓPTIMO		ESTABILIDAD		REF
		pH	T(°C)	pH	T(°C)	
	<i>A. oryzae</i> 2095	8-9	50	6-10	30-50	Este trabajo
	<i>A. oryzae</i> U1521	8-9	45	6-9.5	30-55	78
	<i>A. tamarri</i>		45			15
	<i>A. flavus</i>	8	45			43
Fungal protease	<i>A. oryzae</i>			6-9	45-55	36
Corolase PS				5-7	50-60	
Corolase 7092				6-9	35-45	
Corolase 7093				7-9	40-50	
Neutrase	<i>B. subtilis</i>			6-8	45-55	36
Corolase 7089				6-8.5	55-60	
Alcalase 0.6L	<i>B. licheniformis</i>	8	50	4-11.5	50-60	37
						36

6.6.2. Determinación del grado de hidrólisis de los extractos

Para evaluar el grado de hidrólisis de ambos extractos se hizo una cinética de hidrólisis (1 h) sobre músculo de mero, adicionando los extractos al mismo nivel de actividad (24 U/g sustrato). El EC mostró una actividad hidrolítica mayor (22.2%) que Flavourzyme 500 MG® (9.1%) (Fig. 21). La actividad hidrolítica elevada del EC en subproductos de la industria pesquera pudo deberse a su "especificidad" mayor, puesto que fue producido con un sustrato (harina de pescado) de la misma naturaleza que el utilizado para determinar el GH. Este fenómeno fue observado cuando se comparó el grado de hidrólisis de una serinaproteinasa visceral de salmón Atlántico con varios extractos comerciales sobre salmón Atlántico (Kristinsson y Rasco, 2000b).

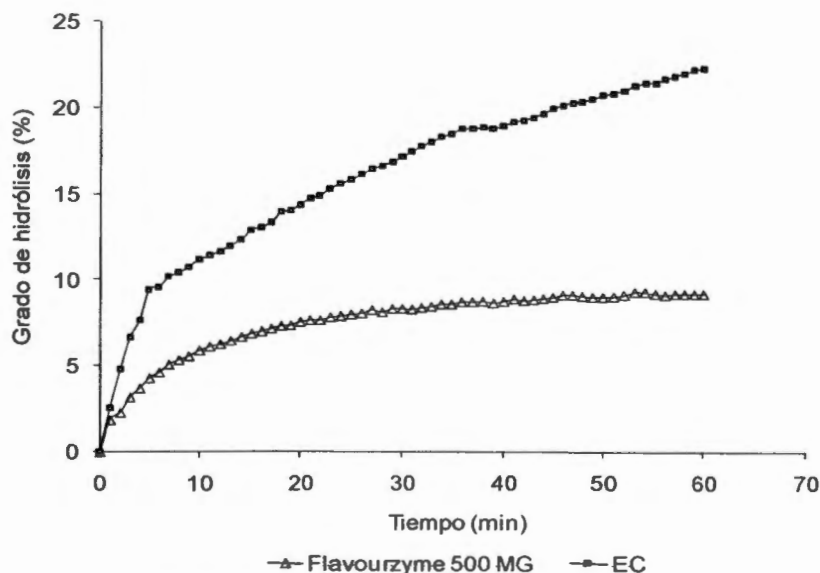


Fig. 21. Actividad hidrolítica de EC y Flavourzyme 500 MG® sobre músculo de mero

Existen varios reportes sobre la obtención de hidrolizados proteicos de pescado en los cuales se utilizaron una variedad amplia de enzimas comerciales y de extractos producidos de diferentes formas (Tabla 22). Algunos de estos se describen brevemente a continuación con la finalidad de poder hacer una comparación de los resultados obtenidos en este trabajo. Kristinsson y Rasco (2000a y 2000b) evaluaron las propiedades bioquímicas y funcionales de hidrolizados de músculo de salmón Atlántico obtenidos con diferentes proteasas comerciales y un extracto endógeno del salmón, adicionados al mismo nivel de actividad con base en Azocoll. Los porcentajes de grado de hidrólisis (%GH) obtenidos después de 3 h de reacción fueron 14% para Corolase 7089 y el extracto enzimático endógeno; y tan sólo de 7, 6 y 5% para Flavourzyme 1000L, Corolase PN-L y Alcalase 2.4L, respectivamente. Guérard y col. (2001) reportaron un grado de hidrólisis de 23.3% después de 5.5 h de reacción con Alcalase 2.4L sobre vísceras de atún aleta amarilla. Aurrekoetxea y Perera (2002) obtuvieron el mayor grado de hidrólisis (aproximadamente 17%) en 30 min cuando utilizaron Bioproteasa LA450 sobre residuos cocidos de túnidos (piel, colas, espinas y migas) destinados a la elaboración de harinas de pescado. Similarmente, Ellouz y col. (2003), obtuvieron GH entre 25 y 30% y entre 4 y 6% cuando hidrolizaron polvo de carne de pescado (sardina) con Alcalase y proteasa MN7 (producida por *Pseudomona aeruginosa* MN7 a partir de harina de pescado), respectivamente. En un estudio reciente, Sumaya-Martínez y col. (2004), después de obtener las condiciones óptimas para la hidrólisis de subproductos de carpa dorada utilizando Flavourzyme® obtuvieron un GH de 35.1% después de 120 min.

Tabla 22. Comparación de la eficiencia hidrolítica, de algunos extractos proteolíticos reportados en la literatura y los obtenidos en este trabajo, sobre productos de origen acuático

SUSTRATO	ENZIMA	COND. HIDRÓLISIS			% GH	REF.
		pH	T (°C)	t (h)		
Músculo de mero	<i>A. oryzae</i> 2095	8	50	1	22.2	Este trabajo
	Flavourzyme 500 MG®				9.1	
Salmón Atlántico	Corolase 7089			3	14	52 y 53
	Flavourzyme 1000L				7	
	Corolase PN-L				6	
	Alcalase 2.4L				5	
Visceras de atún aleta amarilla	Alcalase 2.4L	8	50	5.5	23.3	37
Residuos de túnidos cocidos	Bioproteasa LA450	8.5	55	0.5	17	8
Polvo de carne de pescado	Alcalase	8	60	3	25-30	26
	Proteasa MN7				4-6	
Subproductos carpa dorada	Flavourzyme			2	35.1	93

En base a lo anterior, el EC mostró una actividad hidrolítica, en un periodo de tiempo menor, comparable con varias de las preparaciones comerciales que se encuentran disponibles, aún cuando no se optimizaron las condiciones de hidrólisis. Esto puede ser de gran interés ya que se facilitaría la aplicación del EC a escala industrial en donde se requieren procesos cortos para disminuir costos de producción. Además, se ha reportado que en periodos largos de hidrólisis de proteínas, se producen péptidos de peso molecular bajo (<1.4KDa) y aminoácidos libres, que reducen el valor nutricional y las propiedades funcionales de los hidrolizados, lo cual puede restringir su uso en procesos biotecnológicos (Sumaya-Martínez y col., 2004).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

En base a los resultados presentados en el capítulo anterior se puede concluir de manera general que la harina de pescado es un excelente sustrato para la producción de proteasas por FMS, debido a sus características nutricionales y su bajo costo (\$6.00/kg), como fue observado bajo las condiciones en las que se desarrolló este trabajo. Es importante señalar que no existen reportes previos en cuanto a la producción de proteasas por FMS en los que se utilicen mezclas de un sustrato natural con un soporte inerte, por lo que este trabajo es novedoso en ese sentido. Por otro lado, los resultados muestran que el EC tiene características de actividad y estabilidad, comparables a las de extractos comerciales, que podrían ser atractivas para su utilización en la producción de hidrolizados de proteínas de pescado; obteniéndose por lo tanto, un producto de alto valor agregado a partir de un subproducto de la industria pesquera.

En particular, de los resultados referentes a la producción del extracto proteolítico bajo las condiciones de este trabajo se puede concluir que:

- La FMS con *Aspergillus oryzae* 2095 en un medio de harina de pescado sin glucosa y hasta con 5% de glucosa permitieron la producción de enzimas proteolíticas. Mientras que la adición de glucosa al medio de cultivo en concentraciones igual o mayor a 10% reprimieron la producción de proteasas. Por lo tanto, la harina de pescado puede ser utilizada como único sustrato para el crecimiento de *Aspergillus oryzae* 2095 y la producción de proteasas extracelulares.
- En la fermentación en medio sólido, la reducción del tamaño de partícula del soporte inerte de 1.5 a 0.5 mm tiene un efecto positivo en la producción de proteasas.
- En la FMS la producción de las proteasas inicia 12 h antes que en la FML obteniéndose actividades proteolíticas neutra y alcalina, 1.1 y 1.5 veces

mayores (79.71 U/L y 120.78 U/L) que con la FML (68.08 U/L y 77.47 U/L), respectivamente.

- Para los dos tipos de sistema de producción analizados, la máxima producción de proteasas se obtuvo en la mitad del tiempo que reportan algunos trabajos publicados en los que utilizan *Aspergillus oryzae*.

En cuanto a la comparación entre el extracto proteolítico obtenido en este trabajo y el extracto comercial se pudo concluir que:

- El pH y la temperatura óptimos de actividad, así como la estabilidad al pH y la temperatura del EC es comparable con extractos comerciales que han sido empleados para procesos biotecnológicos, tales como la producción de hidrolizados de proteína de pescado.
- El EC es más estable que el extracto comercial ya que tiene un tiempo de vida media 2 veces mayor a la temperatura óptima (50°C) de ambos extractos.
- El EC mostró porcentajes de grado de hidrólisis comparables, en menor tiempo, a los obtenidos con otras preparaciones comerciales, aún cuando no se optimizaron las condiciones de la reacción sobre subproductos de la industria pesquera. Esto puede indicar que el EC tiene especificidad hacia ese tipo de productos, la cual pudo ser obtenida de la harina de pescado.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

8.1. Perspectivas

Existen varias actividades que podrían realizarse con la finalidad de obtener un mayor conocimiento que defina si podría patentarse y aplicarse la tecnología aquí desarrollada a nivel industrial.

En cuanto al extracto proteolítico fúngico se proponen:

1. La optimización del proceso para la obtención del extracto proteolítico permitiría aumentar el rendimiento en la producción de proteasas.
2. Los resultados del punto anterior podrían ser útiles para realizar un escalamiento a nivel piloto, evaluando las principales variables que afecten el proceso, así como su efecto en las características del extracto proteolítico.
3. Es importante comparar la estabilidad de almacenamiento del extracto proteolítico fúngico con un extracto comercial, y en caso necesario, podría evaluarse el efecto de diferentes estabilizantes utilizados en preparaciones comerciales sobre la actividad proteolítica del EC con el paso del tiempo.
4. Dadas las características del extracto proteolítico fúngico sería interesante evaluar su aplicación en otras áreas tales como uso en detergentes o como agente depilatorio

Por otro lado, en cuanto a la hidrólisis con el extracto proteolítico fúngico producido por FMS se sugiere:

1. La caracterización de los productos de hidrólisis permitiría saber la distribución de los pesos moleculares de los hidrolizados, sus propiedades funcionales y por lo tanto su posible aplicación.
2. En base a los resultados del punto anterior se podría optimizar la reacción de hidrólisis en función de las características de los hidrolizados lo que permitiría la obtención de hidrolizados con aplicaciones específicas.
3. La actividad hidrolítica del extracto proteolítico fúngico podría analizarse para la hidrólisis de productos de origen vegetal tales como la soya.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

1. Aalbaek T., Reeslev M., Jensen B., Eriksen S.H. (2002). Acid protease and formation of multiple forms of glucoamylase in batch and continuous cultures of *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30:410-415.
2. Adler-Nissen J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. UK: Elsevier.
3. Adler-Nissen J. (1993). Proteases. In *Enzymes in Food Processing*, 3rd ed., Eds T. Nagodawithana and G. Reed. Academic Press, London, pp. 159-203.
4. Aguilar C.N., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez R., Prado L.A., Loera O. (2004). Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. *Food Science and Biotechnology*, 13(1): 109-113.
5. Aikat, K., Bhattacharyya, B. (2001) Protease production in solid state fermentation with liquid medium recycling in a stacked plate reactor and in a packed bed reactor by a local strain of *Rhizopus oryzae*. *Process Biochemistry*, 36: 1059-1068.
6. Alquicira-Paez, L. (2003). Determinación de la especificidad de proteasas fúngicas en la hidrólisis de proteína. *Tesis para obtener el grado de Especialista en Biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F.
7. Anuario estadístico de pesca 2003.
8. Aurrekoetxea G. y Perera M.N. (2002). Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados para el cultivo de peces. *Boletín Instituto Español Oceanografía*, 18 (1-4): 87-93.
9. Badui, D.S. (1995) *Química de los Alimentos*. 3ª ed., Ed. Alhambra, México, D.F.
10. Bárzana E. y García-Garibay M. (1994). Production of fish protein concentrates. In *Fishing Processing Biotechnology Applications*. Chapman & Hall, London, pp. 206-221.
11. Basu B.R., Banik A.K. y Das M. (2008). Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB₁₀₀ grown on fish scale. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(4): 349-355.
12. Battaglini R.A., Huergo M., Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B. (1991). Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35: 292-296.

13. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
14. Beynon R.J., Bond J.S. (1989). *Proteolytic Enzymes, a Practical Approach*. IRL Press, Oxford.
15. Boer C.G., Peralta R.M. (2000). Production of extracellular protease by *Aspergillus tamarii*. *Journal of Basic Microbiology*, 40 (2):75-81.
16. Chakrabarti S.K., Matsumura N., Ranu R.S. (2000). Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). *Current Microbiology*, 40: 239-244
17. Cheevadhanarak S., Renno D.V., Saunders G., Holt G. (1991). Cloning and selective overexpression of an alkaline protease-encoding gene from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 151-155.
18. Conesa A., Punt P.J., van Lwijk N., van den Hondel C.A.M.J.J. (2001). The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology*, 33: 155-171.
19. Couri S., Terzi S., Saavedra G.A., Pereira F.S., Augusto da Costa A.C. (2000). Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry*, 36:255-261.
20. Diaz-Godinez G., Soriano-Santos J., Augur C., Viniegra-Gonzalez G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26: 271-275.
21. Díaz-Godínez G. (2001). Comparación de la producción de las enzimas exopectinasas de *Aspergillus niger* obtenidas por fermentación sólida y sumergida. *Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F.
22. Doelle H.W., Mitchell D.A., Rolz C.E. (1992). *Solid substrate cultivation*. Ed. Elsevier Applied Science. Essex, England. pp. 84.

23. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350-356.
24. Dumay J. (2006). Extraction de lipides en voie aqueuse par bioreacteur Enzymatique combine à l'ultrafiltration : Application a la valorisation de co-produits de poisson (*sardina pilchardus*). *Thèse de Doctorat*. Université de Nantes.
25. Ellouz Y., Bayoudh A., Kammoun S., Gharsallah N., Nasri M. (2001). Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on Sardinelle heads and viscera flour. *Bioresource Technology*, 80: 49-51.
26. Ellouz Y., Ghorbel B., Souissi N., Kammoun S. and Nasri M. (2003). Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on fish substrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19: 41-45.
27. Estrada-Corona M.P. (2002). Funcionalidad de hidrolizados enzimáticos de subproductos de carpa dorada (*Carassius auratus*). *Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F.
28. Fernández-Lahore H.M., Fraile E.R., Cascone O. (1998). Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. *Journal of Biotechnology*, 62: 83-93.
29. Ferreira G., Boer C.G., Peralta R.M. (1999). Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamarai* in solid state fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 173: 335-339.
30. Fukushima Y., Itoh H., Fukase T., Motai H. (1991). Stimulation of protease production by *Aspergillus oryzae* with oils in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34: 586-590.
31. García-Carreño F.L., Dimes L.E., Haard N.F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214: 65-69.
32. Gacesa P. y Hubble J. (1990). Tecnología de las enzimas. Ed. Acribia España. pp 15-18.

33. George S., Raju V., Subramanian V., Jayaraman K. (1997). Comparative study of proteases production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. *Bioprocess Engineering*, 16: 381-382.
34. Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N., Socol C.R. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 246-251.
35. Ghorbel B., Sellami-Kamoun A. and Nasri M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 513-518.
36. Guadix A., Guadix E.M., Páez-Dueñas M.P., González-Tello P., Camacho F. (2000). Technological process and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*, 41(1): 79-89.
37. Guèrard F. (2004). New and exciting use of peptides from by-products and under-utilized resources. University of West Britany France. Seminario de Seafoodplus (www.seafoodplus.org).
38. Guèrard F., Dufossè L., De La Broise D., Binet A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 1051-1059.
39. Gupta R., Beg Q.K., Khan S., Chauhan B. (2002a). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 381-395.
40. Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. (2002b). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 15-32.
41. Hernández-Rodríguez, B. (2003). Caracterización fisicoquímica, reológica y funcional de las fracciones peptídicas obtenidas a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas de músculo de mero (*Epinephelus morio*). Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F.

42. Herrera, O. (2003) Obtención y Selección de Cepas de *Aspergillus niger* Sobreproductoras de fitasa. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F.
43. Hossain T., Das F., Marzan L.W., Rahman S., Anwar M.N. (2006). Some properties of protease of the fungal strain *Aspergillus flavus*. *International Journal of Agricultural and Biology*, 8(2): 162-164.
44. Hoyle, N.T., Merrit, J.H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1): 76-79.
45. Huang S.Y., Wang H.H., Wei C.J., Malaney G.W., Tanner R.D. (1985). Kinetics responses of the koji solid state fermentation process. In: Wiseman A, Horwood E, editors. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. England. pp 88-108.
46. Ichishima E. (1970). Methods in Enzymology. In: Perlmann GE, Lorand L, editors. Proteolytic enzymes. U.S.A: Academic Press. pp 397-406.
47. Ikasari L., Mitchell D.A. (1994). Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 10: 320-324.
48. Imm J.Y., Lee C.M. (1999). Production of seafood flavor from Red Hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2360-2366.
49. Iwashita K. (2002). Review: Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94: 530-535.
50. Jarai G., van den Hombergh H., Buxton F.P. (1994a). Cloning and characterization of the *pepE* gene of *Aspergillus niger* encoding a new aspartic protease and regulation of *pepE* and *pepC*. *Gene*, 145: 171-178.
51. Jarai G., Kirchherr D., Buxton F.P. (1994b). Cloning and characterization of the *pepD* gene of *Aspergillus niger* which codes for a subtilisin-like protease. *Gene*, 139: 51-57.
52. Kristinsson H.G., Rasco B.A. (2000a). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 657-666.

53. Kristinsson H.G., Rasco B.A. (2000b). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36: 131-139.
54. Kumar C.G., Joo H.S., Koo Y.M., Paik S.R. and Chang C.S. (2004). Thermostable alkaline protease from a novel marine haloalkalophilic *Bacillus clausii* isolate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20: 351-357.
55. Kumar C.G., Takagi H. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17: 561-594.
56. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
57. Li Z.J., Shukla V., Fordyce A.P., Pedersen A.G., Wenger K.S., Marten M.R. (2000). Fungal morphology and fragmentation behavior in a fed-batch *Aspergillus oryzae* fermentation at the production scale. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(3): 300-312.
58. Loera, O. (1994). Caracterización de mutantes de *Aspergillus niger* sobreproductoras de pectinasas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F.
59. Loera O., Aguirre J., Viniegra-Gonzalez G. (1999). Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 103-108.
60. Malathi S., Chakraborty R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 712-716.
61. Madigan M., Martinko J., Parker J. (1999). Brock Biología de los Microorganismo. Prentice Hall. 8ª edición. Madrid. pp. 430-452.
62. Martin A.M., Porter D. (1995). Studies on the hydrolysis of fish protein by enzymatic treatment. *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*. Elsevier Science.
63. Martinelli S.D., Kinghorn J.R. (1994). *Aspergillus*: 50 years on. Progress in industrial microbiology. Vol. 29. Ed. Elsevier. 1ª edición. The Netherlands. pp. 323-346.

64. Mireles DeWitt C.A., Morrissey M.T. (2002). Parameters for the recovery of proteases from surimi wash water. *Bioresource Technology*, 81: 241-247.
65. Mitchell D.A., Berovic M., Krieger N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 68: 61-138.
66. Mitra P., Chakraverty R., Chandra A.L. (1996). Production of proteolytic enzymes by solid state fermentation an overview. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 55: 439-442.
67. Neklyudov A.D., Ivankin A.N. and Berdutina A.V. (2000). Production and purification of protein hydrolysates (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36 (4): 317-324.
68. Nielsen P., Malmos H., Damhus T., Diderichsen B., Nielsen H., Simonsen M., Schiff H., Oestergaard A., Olsen H., Eigtvad P., Nielsen T. (1994). Enzyme Industrial Applications. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 4th ed. Volume No. 9. John Wiley & Sons, Inc.
69. Ooijkaas LP, Weber FJ, Buitelaar RM, Tramper J, Rinzema, A. (2000). Defined media and inert support: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends of Biotechnology*, 18: 356-360.
70. Palmieri G., Bianco C., Cennamo G., Giardina P., Marino G., Monti M., *et al.* (2001). Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2754-2759.
71. Pandey A., Soccol C.R., Rodríguez-León J.A. and Nigam P. (2001). Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. Asiatech Publishers, New Delhi.
72. Parekh S., Vinci V.A., Strobel R.J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 287-301.
73. Perkins D. (1977). Details for preparing sílica gel stocks. *Neurospora Newsletters*, 24: 16-17.
74. Pizardi C.A., Gutiérrez M., Moreno P., Fernández A. (1999). Producción piloto de hidrolizados de residuos de pescado por fermentación en sustrato sólido

- con hongos filamentosos. *Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente*. Lima, Perú.
75. Ramírez-Gama R.M. y Luna-Millán B. (1996). Manual de prácticas de Microbiología General. Laboratorio de Microbiología experimental. Facultad de Química. UNAM. México. D.F.
76. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 597-635.
77. Ruijter G.J.G., Visser J., Rinzema A. (2004). Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology*, 150: 1095-1101.
78. Samartarn W, Cheevadhanarak S, Tanticharoen M. (1999). Production of alkaline protease by a genetically engineered *Aspergillus oryzae* U1521. *Journal of Genetics Applied Microbiology*, 45: 99–103.
79. Sanchez S., Demain A.L. (2002). Metabolic regulation of fermentation process. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 895-906.
80. Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40 (8): 2689-2694.
81. Sardjono Y.Z., Knol W. (1998). Comparison of fermentation profiles between lupine and soybean by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* in solid-state culture systems. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 46: 3376-3380.
82. Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández M.R. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic Solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, 29: 13-24.
83. Sharma J., Singh A., Kumar R. Partial purification of an alkaline protease from a new strain of *Aspergillus oryzae* AWT 20 and its enhanced stabilization in entrapped Ca-Alginate beads. *The Internet Journal of Microbiology* (08/11/2007 02:14:18 p.m.)
84. Shekine H., Nasuno S., Iguchi N. (1969). Isolation of highly proteolytic mutants from *Aspergillus sojae*. *Agric. Biol. Chem* 33: 1477-1482.

85. Smyth M., FitzGerald R.J. (1998). Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. *International Dairy Journal*, 8: 819-827.
86. Sousa R., Lopes G.P., Tardioli P.W., Giordano R.L.C., Almeida P.I.F. and Giordano R.C. (2004). Kinetic model for whey protein hydrolysis by Alcalase multipointimmobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(2): 147-153.
87. Sparringa R.A, Owens J.D. (1999). Causes of alkalinization in tempe solid substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 677-681.
88. Spellman D., McEvoy E., O'Cuinnb G., FitzGerald R.J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13: 447-453.
89. Srinubabu G., Lokeswari N. and Jayaraju K. (2007). Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *E-Journal of Chemistry*, 4(2): 208-215.
90. Stephanopoulos G. (1993). Biotechnology: Volumen 3 Bioprocessing. Ed. VCH. 2ª. ed. Alemania. pp. 132-133.
91. Sumantha A., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C.R. and Pandey A. (2005). Production and purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 43(4): 313-319.
92. Sumaya-Martínez M.T. (2001). Producción enzimática de hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la industria pesquera. *Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F.
93. Sumaya-Martínez T., Castillo-Morales A., Favela-Torres E., Huerta-Ochoa S., Prado-Barragán L.A. (2004). Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*): A study of hydrolysis parameters using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
94. Tatsumi H., Oshawa M., Tsuji R.F., Murakami S., Nakano E., Motai H., Masaki A., Ishida Y., Murakami K., Kawabe H., Arimura H. (1988). Cloning and

- sequencing of alkaline protease cDNA from *Aspergillus oryzae*. *Agriculture Biology and Chemistry*, 52: 1887-1888.
95. Te Biesebeke R., Ruijter J.G., Rahardjo S.P., Hoogschagen M.J., Heerikhuisen M., Levin A., van Driel K.G.A., Schutyser M.A.I., Dijksterhuis J., Zhu Y., Weber F.J., de Vos W.M., van den Hondel C.A.M.J.J., Rinzema A., Punt P.J. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid state and submerged fermentations. *FEMS Yeast Research*, 2: 245-248.
96. Te Biesebeke R., van Biezen N., de Vos W.M., van den Hondel C.A.M.J.J., Punt P.J. (2005). Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 75-82.
97. Tremacoldi C.R., Carmona E.C. (2005). Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 169-172.
98. Tremacoldi C.R., Watanabe N.K. and Carmona E.C. (2004). Production of extracellular acid proteases by *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 639-642.
99. Tremacoldi C.R., Monti R., Selistre-De-Araújo H.S. and Carmona, E.C. (2007). Purification and properties of an alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 295-299.
100. Tunga R., Banerjee R., Bhattacharyya B.C. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. *Bioprocess Engineering*, 19: 187-190.
101. Vallès D., Furtado S., Cantera A.M.B. (2007). Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 409-413.
102. Venugopal V. (1994). Production of fish protein hydrolyzates by microorganisms. In *Fishing Processing Biotechnological applications*. Chapman & Hall, London, pp. 223-243.
103. Vieira G.H.F., Martin A.M., Saker-Sampaiao S., Sobreira-Rocha C.A., Goncalves R.C.F. (1995). Production of protein hydrolysate from Lobster

- (*Panulirus* spp.). *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*. Elsevier Science. pp. 1405-1415.
104. Villegas E., Aubague S., Alcantara L., Auria R., Revah S. (1993). Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. *Biotechnology Advances*, 11: 387-397.
 105. Voet D., Voet J.G. (1992). Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona, España. pp. 342-354.
 106. Wang R., Law R.C.S., Webb C. (2005a). Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 217-227.
 107. Wang S.L., Chen Y.H., Wang C.L., Yen Y.H., Chern M.K. (2005b). Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 660-665.
 108. Whitaker J.R. (1994). Principles of enzymology for the food science. Ed. Board. New York, USA. pp. 469-497.
 109. Yang F.C., Lin I.H. (1998). Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 397-402.

CAPÍTULO 10

ANEXO

Accepted Manuscript

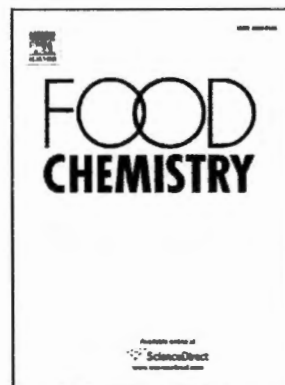
Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation

M.J. García-Gómez, S. Huerta-Ochoa, O. Loera-Corral, L.A Prado-Barragán

PII: S0308-8146(08)00712-7
DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.016
Reference: FOCH 7504

To appear in: *Food Chemistry*

Received Date: 9 November 2007
Revised Date: 10 June 2008
Accepted Date: 11 June 2008



Please cite this article as: García-Gómez, M.J., Huerta-Ochoa, S., Loera-Corral, O., Prado-Barragán, L.A., Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation, *Food Chemistry* (2008), doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.016

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation

M.J. García-Gómez, S. Huerta-Ochoa, O. Loera-Corral, L.A. Prado-Barragán*

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, San Rafael Atlaco #186 Col. 09340 Vicentina CP, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2007
Received in revised form 10 June 2008
Accepted 11 June 2008
Available online xxxxx

Keywords:

Proteases
Aspergillus oryzae 2095
Solid-state fermentation
Fish flour
Degree of hydrolysis

ABSTRACT

Proteolytic extract (CPE) was produced by *Aspergillus oryzae* 2095 under solid state fermentation using a mix of fish flour with polyurethane foam (70:30, w/w) of particle size of 0.5 mm. The proteolytic activity from CPE was compared to a commercial protease (Flavourzyme 500 MG®). The maximal activity for both extracts was found at pH 8 and 50 °C. The half-lives of CPE and Flavourzyme 500 MG® were 52 and 25 min at 50 °C, respectively. Furthermore, the hydrolytic activity for both extracts was tested on muscle of giant sea bass (*Epinephelus morio*), CPE produced a higher degree of hydrolysis (DH) than Flavourzyme 500 MG® (22.2 and 9.1%, respectively) under optimal experimental conditions for each extract.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Total sale of proteases account for about 60 percent of the enzyme world market and have numerous commercial applications in the food industry (Germano, Pandey, Osaku, Rocha, & Soccol, 2003), for protein-degrading additives in detergents, leather dehairing and bating, silver recovery, cleansing solutions, processing of proteinaceous waste, peptide synthesis, and alike (Bakhtiar, Andersson, Gessesse, Mattiasson, & Hatti-Kaul, 2002). Forty percent of the enzymes used today are produced by microorganisms, from them the use of fungi strains for enzyme production have a myriad of advantages as they are generally recognized as safe (GRAS) (Sandhya, Sumantha, Szakacs, & Pandey, 2005) and produce a wide range of extracellular enzymes, therefore the downstream processing is more simple compared to the enzymes obtained from plants or animals (Gupta, Beg, Khan, & Chauhan, 2002a). Additionally, *Aspergillus oryzae* is used extensively to produce a wide variety of industrial enzymes such proteases which have been produced either by solid-state (SSF) or by submerged fermentation (SmF) (Sandhya et al., 2005). Advantages of SSF include simplicity, lower production costs, low wastewater output and high enzyme yields. The most common substrates for SSF include agroindustrial residues (Mitchell, Berovic, & Krieger, 2000) and other disposal materials such as fish processing by-products that could otherwise represent pollution and disposal problems (Ellouz, Bayoudh, Kammoun, Gharsallah, & Nasri, 2001).

Some reports have shown that proteases production by bacteria using fish processing by-products like sardinelle heads and viscera flour (Ellouz et al., 2001), under-utilized fish such as *Johnius dissuumeri* (Venugopal, 1994) and shrimp and crab shell powder as substrate (Wang, Law, & Webb, 2005a). Proteases have a wide industrial application (Banerjee, Sani, Azmi, & Soni, 1999; Germano et al., 2003; Kumar & Takagi, 1999; Rao, Tanksale, Ghatge, & Deshpande, 1998; Wang et al., 2005a). Recently, proteases are being used to produce fish protein hydrolysates (FPH), which allow the fish by-products recovery giving to the peptides with biomedical, nutraceutical, antioxidant, and functional properties including improved solubility, emulsifying, foaming and water-binding (Kim et al., 2001; Kristinsson & Rasco, 2000a).

The aim of this study was to produce a proteolytic extract by *A. oryzae* 2095 under SSF using fish flour as a substrate. The proteolytic extract was characterized in terms pH and temperature for optimal activity and stability and degree of hydrolysis (DH) on fish muscle, values obtained were compared with a commercial extract (Flavourzyme 500 MG®) under optimal activity conditions for each extract.

2. Experimental

2.1. Microorganism and inoculum preparation

A. oryzae 2095 from STCC (Spanish Type Culture Collection, Valencia, Spain) was grown on potato-dextrose agar (BIOXON, Mexico City, MX) plates. Conidiospores were harvested from a 7-days-old culture by suspending in sterile water containing 0.1%

* Corresponding author. Tel./fax: +52 5804 6554.

E-mail address: lapb@xanum.uam.mx (L.A. Prado-Barragán).

Tween 80. Spore suspension was adjusted to desired concentration after counting in a Neubauer chamber (Brand, Germany).

2.2. Culture medium

Fish flour (FF) was purchased from a local feed animal shop (Protein content 0.63 protein g/FF g). It was sieved to obtain an homogeneous size particle of 0.84 mm, then mixed with polyurethane foam (PUF) (Expomex, Edo. Mex., MX) which was previously washed (Zhu, Knol, Smits, & Bol, 1996) and ground to reach particle size of 0.5 mm. FF and PUF were dried in an oven for 12 h at 80 °C. FF was mixed with PUF in a 70:30 (w/w) ratio. The powder mixture was sterilized at 121 °C for 15 min. The cultures were moistened with sterile 0.2 M phosphate buffer pH 7 to the desired water content (50%) and then used as the SSF culture medium.

2.3. Fermentation

Solid fermentation was carried out in packed tubular reactors (2.5 cm diameter for 22 cm length) (Saucedo-Castañeda et al., 1994) with 30 g of culture medium as described above, previously inoculated with 4.5×10^7 spores/g of protein and incubated (72 h) under static conditions at 30 °C with an air flux of 40 cm³ per min. Samples were taken at regular intervals (0, 24, 36, 40, 44, 48, 60, and 72 h), pH and proteolytic activity progress were determined.

2.4. Proteolytic extract

Crude proteolytic extract (CPE) was obtained by adding 30 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 7) and vigorously mixed by using a vortex for 1 min. The solid phase was separated by centrifugation (Allegra 25R Centrifuge, Beckman Coulter, CA, USA) for 15 min at 21,000g at 4 °C and then filtered under vacuum through a Whatman filter paper No. 40. The filtrate was used as a CPE.

2.5. Proteolytic activity assay

Proteolytic activity for CPE and Flavourzyme 500 MG[®] (endo-proteinase and exopeptidase from *A. oryzae* from Novozymes, (Bagsvaerd, Denmark) was determined as follows: 2% casein (Hammerstein, Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN, USA) prepared in 0.2 M buffer at desirable pH (sodium phosphate for pH 6 and 7; Tris–HCl for pH 8 and 9; and carbonate–bicarbonate for pH 10). A mixture of 0.25 ml of casein solution and 0.25 ml enzyme extract (1:5 diluted for CPE and 1:100 for Flavourzyme 500 MG[®] with the appropriate buffer) was incubated at 30 °C for 10 min. The reaction was terminated by adding 0.5 ml of 0.4 M trichloroacetic acid (J.T. Baker, Phillipsburg, PA, USA); this mixture was then centrifuged at 11,100g for 15 min at 4 °C. The supernatant (0.25 ml) was added to 1.25 ml 0.4 M sodium bicarbonate (J.T. Baker) followed by 0.25 ml of 0.4 M of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent (1:5 diluted in water) (SIGMA, St. Louis, MO, USA). This reaction mixture was allowed to stand for 30 min at 30 °C. Absorbance was read against a blank at 660 nm. Samples were analyzed in triplicates. One unit of protease (U) was defined as the amount of enzyme which yields the colour equivalent to 1 µM of tyrosine in 1 ml reaction per minute at 30 °C at each pH value assayed.

2.6. Effect of temperature and pH on enzyme activity

The optimum temperature and pH for CPE and Flavourzyme 500 MG[®] was determined using casein as substrate as described above. Temperature and pH varied from 30 to 70 °C and 6 to 10, respectively. Determinations were carried out in triplicate and data were shown as mean values.

2.7. Temperature and pH stability

To test thermal stability both extracts were incubated without substrate at temperatures ranging from 30 to 70 °C. The pH stability was measured in both diluted extracts (1:10, v/v) in the appropriated buffer (pH 6–10); samples were incubated without substrate at 4 °C. In both experimental units (0.25 ml) were withdrawn at regular intervals during 120 min. Residual activity was assayed at optimum conditions for each extract. Determinations were carried out in triplicate and data were shown as mean values.

2.8. Protein determination

The protein concentration of the CPE and Flavourzyme 500 MG[®] was determined according to Bradford (1976), BSA (Sigma[®]) was used as standard.

2.9. Enzymatic hydrolysis

Forty grams of giant sea bass (*Epinephelus morio*) (Supplied from Puerto Progreso, Yucatan to fish market “La Nueva Viga” in Mexico City) were homogenized in 100 ml of 0.2 M buffer Tris–HCl (pH 8) and filtered through a sieve. This preparation was used as fish muscle hydrolysable substrate (FMHS) at 1% protein concentration. Temperature and pH values of the FMHS were adjusted to pH and temperature optimal values before addition of the enzymatic extracts (CPE and Flavourzyme 500 MG[®] at a time). The pH-stat method was used to determine the DH of each enzymatic extract (Adler-Nissen, 1982) in a 250 ml vessel provided with automatics temperature, pH and stirring speed controls (Mettler DL 21 titrator, Hightstown, NJ, USA). Both proteolytic extracts were then added (at a time) to the FMHS mix at 24 U/g of substrate. The pH was kept constant by automatic addition of 0.5 N NaOH during hydrolysis. The amount added of NaOH was recorded at 1 min intervals for 1 h. A blank with out enzyme was carried out at same conditions, then NaOH consumed was subtracted from the amount the NaOH consumed by samples in order to eliminate auto-hydrolysis effects. Degree of hydrolysis (DH) is defined as the percentage of peptide bonds cleaved and it was calculated according to earlier reports (Adler-Nissen, 1982).

3. Results and discussion

3.1. Culture conditions for protease production

Proteases production by *A. oryzae* 2095 under SSF is shown in Fig. 1. Enzyme production started after 24 h of culture, although

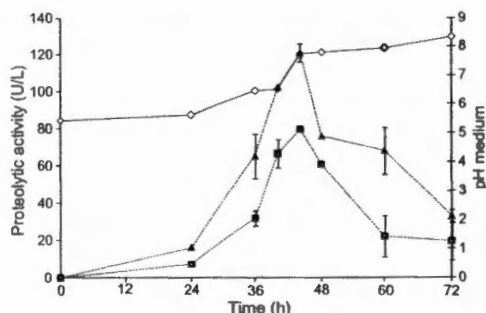


Fig. 1. Protease production by *Aspergillus oryzae* 2095 under SSF: (■) Neutral protease (pH 7), (▲) Alkaline protease (pH 10), (○) pH progress during fermentation.

maximum production was reached at 44 h for both neutral (pH 7) and alkaline (pH 10) proteases (79.71 UI⁻¹ and 120.78 UI⁻¹, respectively). Time of maximal protease production was shorter compared to reports where agro-industrial residues were used. Maximum protease production by *A. oryzae* NRRL 1808 in SSF was showed at 72 h (Sandhya et al., 2005), while *A. oryzae* NRRL 2160 in SSF achieved maximal enzyme yields at 72–96 h (Battaglioli, Huergo, Pilosof, & Bartholomai, 1991). A major peak of activity reached at 50 h by *A. oryzae* during batch fermentation was also reported (Wang et al., 2005a). Furthermore, decrease in protease production after 44 h could be due to nutrient limitations, pH variation (Chu, Lee, & Li, 1992; Sandhya et al., 2005), and production of amino acids and low-molecular-weight compounds which may inhibit protease activity (Gupta, Beg, & Lorenz, 2002b; Venugopal, 1994). Therefore, a reduction time in protease production was achieved by *A. oryzae* 2095 when compared with similar works.

Increase in pH medium was observed throughout fermentation (from 6 to 8); this could be related to ammonia production in the culture medium as a result of protein metabolism after proteases action. The major mechanism is likely to be the oxidation of amino acids during their utilization as energy source: $RCH(NH_3^+)COO^- + NO_2^- \rightarrow NCO_2 + H_2O + NH_4^+ + OH^-$, in accordance to reports during tempe proteolysis (Sparringa & Owens, 1999), which is a medium with high protein content, similar to the fish flour used in this study.

3.2. Comparison between CPE and Flavourzyme 500 MG[®]

In order to compare the CPE and Flavourzyme 500 MG[®], both extracts were characterized in terms of pH and temperature and optimal activity values and stability using casein (2%) as substrate; additionally degree of hydrolysis (DH) was determined on fish muscle (*E. morio*) as means of fish muscle hydrolytic specificity.

3.2.1. Effect of pH and temperature on enzyme activity

The extracts were active within a wide range of pH 6–10 and temperature (30–60 °C). Non-significant difference ($\alpha = 0.05$) was found in maximum enzyme activity at pH 8 and 9 for CPE (Fig. 2a) while for Flavourzyme 500 MG[®] the optimal activity was at pH 8 (Fig. 2b). Both extracts exhibited optimal enzyme activity at 50 °C (Fig. 2a and b). Results for optimal pH and temperature of CPE are in agreement with Samarantam, Cheevadhanarak, and Tanticharoen, (1999) who produced alkaline proteolytic extract by *A. oryzae* U1521 from defatted soybean as a nitrogen source with optimum pH between 8 and 9 and optimum temperature at 45 °C. Boer and Peralta (2000) reported the highest proteolytic activity for *Aspergillus tamarii* from pH 6 to 10, with optimum temperature at 45 °C. Maximum activity was found at pH 8 and 45 °C in proteolytic extracts from *Aspergillus flavus* (Hossain, Das, Marzan, Rahman, & Anwar, 2006). *Monascus purpureus* CCRC31499 produced a protease from shrimp and crab shell powder (SCSP) of marine wastes with optimal pH from 7 to 9 and optimal temperature at 4 °C (Liang, Lin, Yen, Wang, & Wang, 2006). The protease produced by *Thermascus aurantiacus* showed optimally activity at pH 5.5 and 60 °C (Merheb, Cabral, Gomes, & Da-Silva, 2007). Properties of CPE are no just similar to Flavourzyme 500 MG[®] but also to some other microbial and commercially available proteases reported before (De Barros, Marques, Melchionna, & Záchia, 2000; Gupta et al., 2002b; Smyth & FitzGerald, 1998).

3.2.2. Effect of pH and temperature on enzyme stability

The effect of pH on enzyme stability was studied at different pH values at 50 °C for 2 h. The CPE maintained over 80% of its original activity between pH 6 and 10 (Fig. 3a), while Flavourzyme 500 MG[®] retained above 80% of its original activity from pH 6 to 9 (Fig. 3b). Interestingly, CPE retained around 90% of initial activity

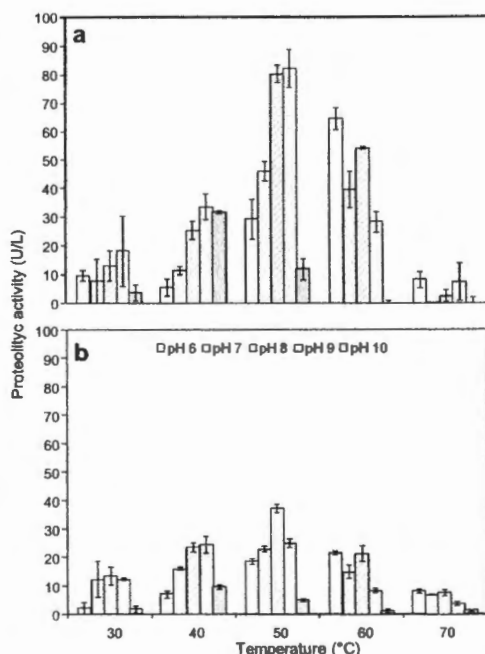


Fig. 2. Effect of pH and temperature on activity of (a) CPE and (b) Flavourzyme 500 MG[®].

at pH 10, whereas Flavourzyme 500 MG[®] retained only 20% of activity. Residual activity values higher than 100% were observed at pH 6 and 7 for CPE and Flavourzyme MG[®], respectively; similar results have been recently reported during a characterization of a proteolytic extract from ripe fruit (Vallès, Furtado, & Cantera, 2007). A protease produced by *M. purpureus* CCRC31499 was stable at pH 5–9 (Liang, Lin, Yen, Wang, & Wang, 2006). *T. aurantiacus* produces a proteolytic extract stable in the pH range 3.0–9.5 for 1 h (Merheb, Cabral, Gomes, & Da-Silva, 2007).

The effect of temperature on enzyme stability was determined at different temperatures at pH 8 for 2 h and residual activity was assayed under standard conditions. As shown in Fig. 4a, CPE maintained 100% of activity after 2 h at 30 and 40 °C; however residual activities were 22, 13 and 2% after incubation at 50, 60 and 70 °C, respectively. In contrast, residual activity of Flavourzyme 500 MG[®] was 60 and 50% at 30 and 40 °C, correspondingly; while at 50, 60 and 70 °C proteolytic activity was almost inactivated (Fig. 4b). The thermal stability of CPE was higher than Flavourzyme 500 MG[®] at most temperatures assayed. Thermal stability up to 50 °C was reported for a metalloprotease from *A. fumigatus* (Markaryan, Morozova, Yu, & Kolattukudy, 1994). The proteolytic extract from *A. fumigatus* was totally inactivated after 30 min incubation at 60 °C (Wang, Chen, Wang, Yen, & Chern, 2005b). The secondary structure of the protease produced by *Nesterenkonia* sp was unaffected at 50 °C (Bakhtiar et al., 2002). Temperature stability at 50 °C for 15 min from alkaline protease from *Bacillus pumilus* DSM 5777 was reported (Vetter Roman, Bernhard Moeller, & Ingo Muecke, 1994). Complete inactivation occurred above 60 °C for neutral protease from *A. oryzae* (Bombara, Pilosof, & Ahón, 1994). Proteases from *M. purpureus* CCRC31499 were stable at 40 °C (Hossain et al., 2006). *T. aurantiacus* produces

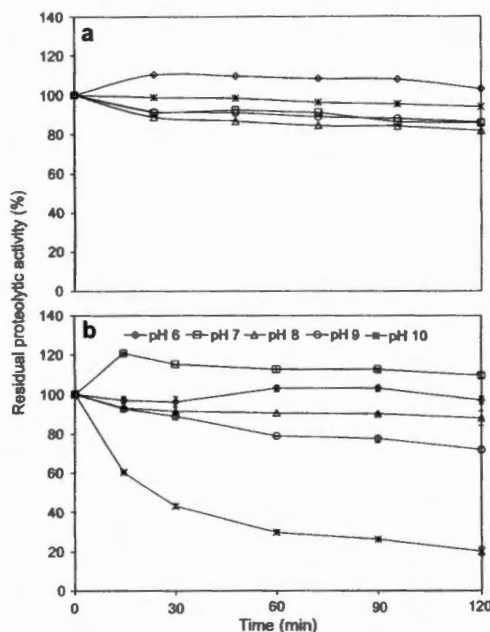


Fig. 3. Effect of pH on stability of (a) CPE and (b) Flavourzyme 500 MG®.

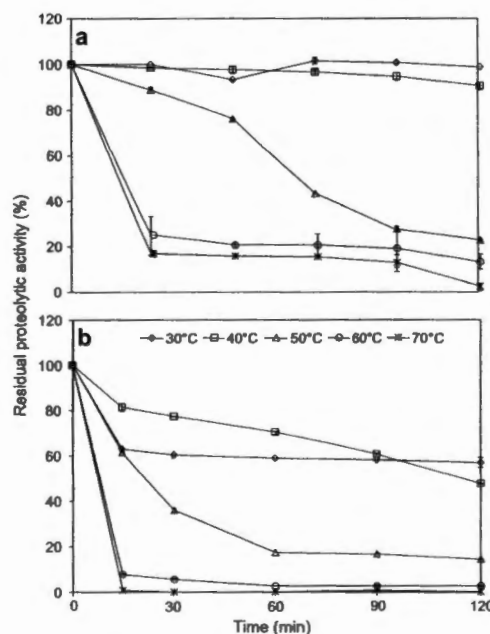


Fig. 4. Effect of temperature on stability of (a) CPE and (b) Flavourzyme 500 MG®.

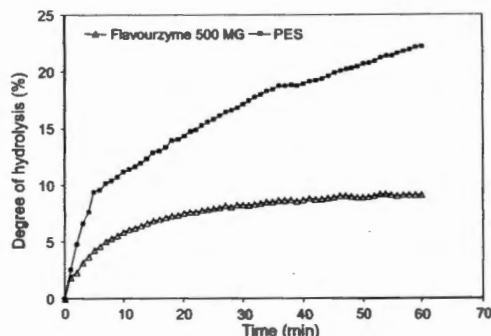


Fig. 5. Degree of hydrolysis of giant sea bass by CPE (■) and Flavourzyme 500 MG® (Δ) at pH 8 and 50 °C.

a proteolytic extract stable up to 60 °C for 1 h (Merheb et al., 2007). Thermal stability of the CPE showed to be higher than the stability of the proteolytic extracts mentioned above.

The values of half-life time ($t_{1/2}$) at 50 °C for CPE and Flavourzyme 500 MG® were 52 and 25 min, respectively. Similar results were observed for proteases from *A. tamarii*, which presented $t_{1/2}$ values of 75 and 20 min at 50 and 55 °C, respectively (Boer & Peralta, 2000). Based on temperature and pH optimal activity and stability, results showed the suitability of CPE for biotechnological applications where temperatures and pH values ranging from 30 to 55 °C and from 6 to 10, respectively are required.

3.2.3. Degree of hydrolysis (DH)

Kinetics hydrolysis (60 min) for CPE and Flavourzyme 500 MG® on giant sea bass is shown in Fig. 5. Proteolytic activity in CPE presented 2.5 times higher DH (22.2%) than Flavourzyme 500 MG® (9.1%). Similar DH patterns have been reported for fish protein hydrolysis (FPH) from Atlantic salmon (Kristinsson & Rasco, 2000a; Kristinsson & Rasco, 2000b), gold carp (Sumaya-Martínez, Castillo-Morales, Favela-Torres, Huerta-Ochoa, & Prado-Barragán, 2005), yellow tuna wastes (Guérard, Dufosse, de La Broise, & Binet, 2001) and herring (Liceaga-Gesualdo & Li-Chan, 1999). Similar DH results were reported for Atlantic salmon when the proteases from its own pyloric extract were compared with four commercial proteases (Kristinsson & Rasco, 2000a). In addition, DH obtained with CPE was higher than those reported previously for FPH (Guérard et al., 2001; Kristinsson & Rasco, 2000a; Kristinsson & Rasco, 2000b). Higher DH levels for CPE could be enhanced since fish flour was used as substrate for CPE production, then higher specificity to fish muscle was obtained.

The results discussed above show that SSF system is a feasible choice to produce CPE by *A. oryzae* 2095 from fish processing by-products, with the advantage that higher pH and temperature stability and DH was achieved when compared to Flavourzyme 500 MG®.

4. Conclusions

The CPE from *A. oryzae* 2095 showed pH and temperature optimum and stability and DH values similar and at times better to microbial and commercial proteolytic extracts previously reported. Additionally the use of fish processing by-products as low-priced substrate for protease production may reduce considerably the cost of the process where protein hydrolysis is involved.

Acknowledgement

García-Gómez acknowledges the scholarship from the National Council for Science and Technology (CONACYT), Mexico.

References

- Adler-Nissen, J. (1982). Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32, 138–156.
- Battaglini, R. A., Huerfano, M., Pilosof, A. M. R., & Bartholomai, G. B. (1991). Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 292–296.
- Bakhtiar, S., Andersson, M. M., Gessesse, A., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2002). Stability characteristics of a calcium-independent alkaline protease from *Nesterenkonia* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 525–531.
- Banerjee, U. C., Sani, R. K., Azmi, W., & Soti, R. (1999). Thermostable alkaline proteases from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, 35, 213–219.
- Boer, C. G., & Peralta, R. M. (2000). Production of extracellular protease by *Aspergillus tamarii*. *Journal of Basic Microbiology*, 40(2), 75–81.
- Bombara, A., Pilosof, R., & Afón, M. C. (1994). Thermal stability of a neutral protease of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Biochemistry*, 18, 31–41.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Chu, I. M., Lee, C., & Li, T. S. (1992). Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 755–761.
- De Barros, S. L. H., Marques, D. N., Melchionna, A. P., & Záchia, A. M. A. (2000). Influence of some commercial proteases and enzymatic associations on the hydrolytic solubilization of deboned poultry meat proteins. *Food Science and Technology International*, 6, 301–306.
- Ellouz, Y., Bayoudh, A., Kammoun, S., Gharsallah, N., & Nasri, M. (2001). Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on Sardinella heads and viscera flour. *Bioresource Technology*, 80, 49–51.
- Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., & Socol, C. R. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 246–251.
- Guérard, F., Dufosse, L., de La Brolse, D., & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 11, 1051–1059.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., & Chauhan, B. (2002a). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 381–395.
- Gupta, R., Beg, Q. K., & Lorenz, P. (2002b). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15–32.
- Hossain, T., Das, F., Marzan, L. W., Rahman, S., & Anwar, M. N. (2006). Some properties of protease of the fungal strain *Aspergillus flavus*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8, 162–164.
- Kim, S. K., Kim, Y. T., Byun, H. G., Nam, K. S., Joo, D. S., & Shahidi, F. (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin of Alaska pollack skin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 1984–1989.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000a). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 657–666.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000b). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36, 131–139.
- Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 1, 561–594.
- Liang, T. W., Lin, J. J., Yen, Y. H., Wang, C. L., & Wang, S. L. (2006). Purification and characterization of a protease extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCR31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 74–80.
- Liceaga-Gessualdo, A. M., & Li-Chan, E. C. Y. (1999). Functional properties of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64, 1000–1004.
- Markaryan, A., Morozova, I. Yu, H., & Kolattukudy, P. E. (1994). Purification and characterization of an elastolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infection and Immunity*, 64, 2149–2157.
- Merheb, C. W., Cabral, H., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 104, 127–131.
- Mitchell, D. A., Berovic, M., & Krieger, N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid-state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 68, 61–138.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597–635.
- Samartnam, W., Cheevadhanarak, S., & Tanticharoen, M. (1999). Production of alkaline protease by a genetically engineered *Aspergillus oryzae* U1521. *Journal of Genetic and Applied Microbiology*, 45, 99–103.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 2689–2694.
- Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M. R., Navarro, J. M., Roussos, S., Dufour, D., & Raimbault, M. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, 29, 13–24.
- Smyth, M., & FitzGerald, R. J. (1998). Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. *International Dairy Journal*, 8, 819–827.
- Sparring, R. A., & Owens, J. D. (1999). Causes of alkalization in tempe solid substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 677–681.
- Sumaya-Martínez, T., Castillo-Morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa, S., & Prado-Barragán, L. A. (2005). Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*): I. A study of hydrolysis parameters using response surface methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 98–104.
- Valles, D., Furtado, S., & Cantero, A. M. B. (2007). Characterization of new proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia adiantha* Bertol. (*Bromeliaceae*). *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 409–413.
- Venugopal, V. (1994). Production of fish protein hydrolysates by microorganisms. In A. M. Martin (Ed.), *Fisheries processing biotechnological applications* (pp. 223–239). London: Chapman and Hall.
- Vetter Roman, Detlef Wilke, Bernhard Moeller, Martina Mueller, Ingo Muecke, & Meike Takenberg et al. (1994). Alkaline proteases from *Bacillus pumilus*. US Patent 5346822, September 13.
- Wang, R., Law, R. C. S., & Webb, C. (2005a). Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 217–227.
- Wang, S. L., Chen, Y. H., Wang, C. L., Yen, Y. H., & Chern, M. K. (2005b). Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 660–665.
- Zhu, Y., Knol, W., Smits, J. P., & Bol, J. (1996). Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 108–112.

Página 42

El segundo párrafo dice: "Una unidad proteolítica (U) se definió como la cantidad de enzima que produce el color equivalente a 1 μ mol de tirosina en 1 mL de mezcla de reacción por minuto a 30°C al pH ensayado....."; **debe decir**, "Una unidad proteolítica (U) se definió como la cantidad de enzima que produce el color equivalente a 1 μ mol de tirosina por minuto a 30°C al pH ensayado.....".

Página 46

En el 3^{er} renglón del primer párrafo dice: "..... la electroforesis fue realizada a 4 °C a corriente constante....."; **debe decir**, "..... la electroforesis fue realizada a 4 °C a un voltaje constante de 100 V".

Página 59

En el 3^{er} renglón del tercer párrafo dice: ".....esta variación pudo ser causada por la actividad metabólica (Malathi y Chakraborty, 1991), o el agua proveniente del aire saturado; la cual probablemente, fue absorbida por la harina de pescado sin hidrolizar ya que ésta es altamente higroscópica."; **debe decir**, "..... esta variación pudo ser causada por la pérdida de la materia seca por efecto del metabolismo o por el equilibrio termodinámico entre la humedad del medio y la humedad del aire (Doelle y col., 1992)."