



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE PROTEASAS  
FÚNGICAS EN LA HIDRÓLISIS DE PROTEINA**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA  
P R E S E N T A  
ING. LIZBETH ALQUICIRA PAEZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LILIA ARELY PRADO BARRAGÁN

ASESOR: DR. SERGIO HUERTA OCHOA

MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE DE 2003.

---

EL PRINCIPIO DE LA SABIDURÍA ES EL TEMOR DE DIOS  
Y EL CAMINO DE LA VIDA ES HACIA ARRIBA AL ENTENDIDO.

PROVERBIOS. 1:7; 15:24.

---

*A mis padres*

*Obdulia I. Páez Solares*

*y*

*Joaquín Alquicira Romero*

---

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo:

A mis padres, a mi hermana Yazmín e Hijos, Adán y Oscar por su paciencia, comprensión y sus palabras de aliento para proseguir siempre a la meta.

Dra. Lilia Arely Prado Barragán, por la dirección de esta tesis, por el apoyo incondicional y su amistad. Así como transmitirme el deseo continuo de superación académica.

Dr. Sergio Huerta Ochoa, por su apoyo, su asesoría, paciencia y amistad brindada durante el tiempo que trabajé bajo su dirección.

Dr. Ernesto Favela Torres, Dr. Octavio Loera Corral y Dr. Jorge Gracida por sus comentarios y orientación de este trabajo; así como a mis compañeros de la PP4.

I.B.I. Fernando Arturo Rodríguez Gómez, por su amistad, sus comentarios y apoyo en este trabajo; así como su anhelo de superación que día a día contagia a mi vida.

A mis grandes amigos: Arquí, Neri, Efraín y Carmen Reynoso.

Y finalmente agradezco a Dios por la vida, la fortaleza, su amor y la oportunidad de haber conocido a cada una de estas personas que han dejado huella en mí, y que a través del tiempo me han ayudado a crecer como persona.

---

## RESUMEN

Hoy en día existen en el mercado enzimas de origen fúngico que se emplean para la obtención de hidrolizados de proteína como son: Bioproteasa LA450 (Gygyc Biocon), Delvolase (Gist.Brocades), Novozym FM 2,0L, Alcalase 2,4L grado alimenticio, Neutrasa 0.5L grado alimenticio, Flavourzyme 500 MG y Kojizyme (Novo Nordisk), por mencionar algunas. Pero el uso de este tipo de enzimas encarece la recuperación de proteína, ya que su costo oscila entre 280 y 420 pesos por gramo de enzima (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Bjoern y col., 2000).

Por esta razón se ha propuesto el uso de extractos proteolíticos obtenidos por Fermentación en Medio Sólido (FMS), ya que este es un método en el cual hay una alta producción de enzima (U/mLh) que puede ser específica para el tipo de sustrato de interés, presentando una mayor estabilidad frente a la temperatura y el pH, además que abarata el costo de obtención de hidrolizados (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Pizardi y col., 1999; Pandey y col., 2003).

Para la obtención de dichos extractos proteolíticos, se han empleado hongos filamentosos de las especies *Aspergillus* y *Rhizopus* (Tunga y Banerjee, 1999); presentando mayor actividad enzimática el extracto proteolítico obtenido de la cepa *Aspergillus oryzae* 2095 (21.06 UE/gms) a las 30 horas de fermentación sólida; el cual es estable en un rango de temperatura de 30 a 50°C hasta por 120 min, posterior a este tiempo la actividad se reduce en un 40%. Así mismo, el pH óptimo y temperatura óptima de actividad del extracto son 7.0 y 54°C respectivamente.

El extracto proteolítico obtenido de la cepa de *Aspergillus oryzae* 2095 comparado con una enzima comercial (Flavourzyme 500 MG<sup>®</sup>) en términos del coeficiente de especificidad ( $\alpha$ ) por el sustrato empleado, es de 6.05 y 4.82 respectivamente. Es decir, que el extracto proteolítico es más específico que la enzima comercial.

---

## CONTENIDO

	Página
Dedicatorias	2
Agradecimientos	4
Resumen	5
Contenido	6
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras	12
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1. INTRODUCCIÓN	12
<b>CAPÍTULO 2</b>	
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Definición de enzima	19
2.2 Propiedades químicas y físicas de las enzimas	19
2.3 Clasificación de las enzimas	20
2.3.1 Clasificación de las proteasas dependiendo de su sitio activo	21
2.4 Naturaleza de las reacciones enzimáticas	23
2.4.1 Ecuación de Michaelis – Menten	23
2.4.2 Transformaciones de la ecuación de Michaelis – Menten	30
2.5 Condiciones que afectan las reacciones enzimáticas	31
2.5.1 Concentración de la enzima y el sustrato	32
2.5.2 Efecto del pH	33
2.5.3 Efecto del pH en la estabilidad de la enzima	34
2.5.4 Efecto de la temperatura	34
2.5.5 Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima	35

---

2.6 Especificidad de las enzimas	36
2.6.1 Tipos de especificidad	37
2.6.1.1 Baja especificidad	37
2.6.1.2 Especificidad de grupo	37
2.6.1.3 Especificidad absoluta	37
2.6.1.4 Especificidad estereoquímica	38
2.6.2 Medición de la especificidad de las enzimas	38
2.7 Aplicaciones de las enzimas en la industria	39
2.7.1 Hidrolizados de proteína	42
2.7.1.1 Métodos comúnmente utilizados en la producción de hidrolizados	42
2.7.1.1.1 Métodos químicos	42
2.7.1.1.2 Métodos enzimáticos	43
2.8 Obtención de enzimas	44
2.8.1 Fermentación en medio sólido	44
2.8.1.1 Características de la fermentación sólida	45
2.8.1.2 Uso de microorganismos en la fermentación sólida	47

### **CAPÍTULO 3**

3. ANTECEDENTES	50
-----------------	----

### **CAPÍTULO 4**

4. OBJETIVOS	54
4.1 Objetivo General	54
4.2 Objetivos Específicos	54

---

## CAPÍTULO 5

5. MATERIALES Y MÉTODOS	56
5.1 Microorganismos utilizados	56
5.2 Selección de cepas productoras de proteasas	56
5.2.1 Preparación de medios de cultivo	56
5.2.1.1 Agar leche descremada	56
5.2.1.2 Agar harina de pescado	57
5.2.1.3 Agar caseína sin vitaminas	57
5.2.2 Inoculación de las cepas para la selección	58
5.3 Fermentación en medio sólido	58
5.3.1 Preparación del sustrato (harina de pescado)	59
5.3.2 Preparación del soporte	59
5.3.3 Preparación del inóculo	59
5.3.3.1 Conteo de esporas	60
5.3.4 Condiciones iniciales de la fermentación	61
5.4 Obtención del extracto proteolítico	62
5.5 Determinación de la actividad enzimática	62
5.5.1 Método de Kunitz	63
5.5.1.1 Muestra	63
5.5.1.2 Testigo	63
5.5.2 Método de Lowry	64
5.5.3 Curva Patrón de Tirosina	64
5.6 Determinación de las condiciones óptimas del extracto proteolítico obtenido	65
5.6.1 Temperatura óptima	65
5.6.2 pH óptimo	66
5.7 Determinación de las condiciones de estabilidad del extracto proteolítico obtenido	66
5.7.1 Estabilidad térmica	66
5.8 Determinación de la especificidad del extracto proteolítico obtenido	67

---

5.9 Determinación de la especificidad de la enzima comercial (Flavorzyme®)	68
---	----

## **CAPÍTULO 6**

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	70
6.1 Crecimiento de las cepas en medio agar caseína	70
6.2 Crecimiento de las cepas en medio harina de pescado	72
6.3 Crecimiento de las cepas en medio leche descremada	74
6.4 Comparación de la relación crecimiento de las cepas y formación de halos de hidrólisis	76
6.5 Fermentación en medio sólido	78
6.5.1 Fermentación con la cepa <i>Aspergillus oryzae</i> 2095	79
6.5.2 Fermentación con la cepa <i>Aspergillus niger</i> 2088	81
6.5.3 Fermentación con la cepa <i>Aspergillus niger</i> ANH-15	83
6.5.4 Fermentación con la cepa <i>Rhizopus oryzae</i> 2340	84
6.5.5 Comparación de la fermentación de las cepas ensayadas	86
6.6 Caracterización del extracto proteolítico de <i>A. oryzae</i> 2095	87
6.6.1 Temperatura óptima	87
6.6.2 pH óptimo	88
6.6.3 Estabilidad térmica	89
6.7 Determinación de la especificidad del extracto proteolítico obtenido	90
6.8 Determinación de la especificidad de la enzima comercial (Flavorzyme®)	93
6.9 Comparación de la especificidad del extracto proteolítico obtenido con la especificidad de la enzima comercial (Flavorzyme®)	95

## **CAPÍTULO 7**

7. CONCLUSIONES	99
-----------------	----

---

## **CAPÍTULO 8**

8. BIBLIOGRAFÍA	101
-----------------	-----

### **ANEXOS**

A. Conversión de rpm (revoluciones por minuto) a unidades G	109
B. Curva Patrón de Tirosina	110

---

## INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
2.1	Clasificación internacional de enzimas (Lehninger, 1993)	21
2.2	Especificidad de algunos sustratos de la $\beta$ -galactosidasa de <i>E. coli</i> (Badui, 2000)	39
2.3	Enzimas de uso industrial	40
5.1	Condiciones de la fermentación sólida	61
5.2	Curva Patrón de Tirosina	64
6.1	Relación entre el halo de hidrólisis <sup>a</sup> y el crecimiento de la cepa <sup>a</sup>	78
6.2	Especificidad de la enzima comercial y el extracto crudo enzimático	97

---

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Hidrólisis de un enlace peptídico de una proteína	22
2.2	Reacción enzimática de la carboxipeptidasa A	23
2.3	Reacción enzima - sustrato representada esquemáticamente	24
2.4	Determinación de la velocidad inicial	24
2.5	Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción	25
2.6	Transcurso de la formación de un complejo ES en función del tiempo	28
2.7	Representación gráfica de la ecuación de Lineweaver – Burk	31
2.8	(a) Efecto de la concentración del sustrato y (b) efecto de la concentración de la enzima en la actividad enzimática (Lehinger, 1993)	32
2.9	Efecto del pH sobre la actividad enzimática	33
2.10	Representación esquemática de la velocidad de inactivación de las enzimas a diferentes valores de pH	34
2.11	Efecto de la temperatura en la actividad enzimática	35
2.12	Efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas	36
5.1	Esquema de la preparación de medios de cultivo	57
5.2	Método de siembra para la selección de cepas productoras de proteasas	58
5.3	Preparación del sustrato	59
5.4	Cámara de Neubauer	60
5.5	Observación microscópica de la cámara de Neubauer	60
5.6	Metodología de la determinación de la estabilidad térmica del extracto proteolítico obtenido	67
6.1	Cepas inoculadas en medio agar caseína	71
6.2	Cepas inoculadas en medio agar harina de pescado	73
6.3	Cepas inoculadas en medio agar leche descremada	75
6.4	Comparación de los halos de hidrólisis (a) <i>A. oryzae</i> 2095	

---

	y (b) <i>A. niger</i> 2088	76
6.5	Gráfica comparativa del diámetro de crecimiento de las cepas	76
6.6	Gráfica comparativa de la formación de halos de hidrólisis	77
6.7	Actividad enzimática del extracto proteolítico de <i>A. oryzae</i> 2095	79
6.8	Perfil del porcentaje de humedad (a) y pérdida de peso en el matraz (b), durante la fermentación de <i>A. oryzae</i> 2095	81
6.9	Actividad enzimática del extracto proteolítico de <i>A. niger</i> 2088	81
6.10	Perfil del porcentaje de humedad (a) y pérdida de peso en el matraz (b), durante la fermentación de <i>A. niger</i> 2088	82
6.11	Actividad enzimática del extracto proteolítico de <i>A. niger</i> ANH-15	83
6.12	Perfil del porcentaje de humedad (a) y pérdida de peso en el matraz (b), durante la fermentación de <i>A. niger</i> ANH-15	84
6.13	Actividad enzimática del extracto proteolítico de <i>R. oryzae</i> 2340	85
6.14	Perfil del porcentaje de humedad (a) y pérdida de peso en el matraz (b), durante la fermentación de <i>R. oryzae</i> 2340	86
6.15	Gráfica comparativa de las fermentaciones sólidas	86
6.16	Temperatura óptima del extracto proteolítico obtenido de <i>A. oryzae</i> 2095	88
6.17	pH óptimo de actividad del extracto proteolítico obtenido	89
6.18	Actividad enzimática residual del extracto proteolítico	90
6.19	Gráfica de Michaelis – Menten para el extracto proteolítico obtenido	91
6.20	Gráfica de Lineweaver –Burk del extracto proteolítico obtenido	91
6.21	Comparación de las velocidades obtenidas, teórica y experimental para el extracto proteolítico obtenido	92
6.22	Gráfica de Michaelis – Menten para la enzima comercial	93
6.23	Gráfica de Lineaweaver – Burk para la enzima comercial	94
6.24	Comparación de las velocidades obtenidas, teórica y experimental	95
6.25	Comparación de la grafica de Michaelis – Menten para el extracto proteolítico obtenido y la enzima comercial (Flavourzyme 500 MG <sup>®</sup> )	96

---

*CAPÍTULO 1*  
***INTRODUCCIÓN***

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes estrategias para recuperar la proteína del pescado (principalmente de aquellas especies menos favorecidas en el consumo humano), uno de ellos es mediante tratamientos químicos (acción directa de un ácido o una base 6N con el músculo de pescado) o enzimáticos (acción de un enzima con actividad proteolítica) que originan productos totalmente solubles, liberando péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres que posteriormente son recuperados, además del bajo contenido graso que depende de la especie empleada (Pizardi y col., 1999; Perera y Aurrekoetxea, 2001; San Pedro y col., 1986).

La hidrólisis enzimática presenta diferentes ventajas frente a los métodos químicos de procesado para la obtención de hidrolizados proteicos entre las que se pueden citar:

- La especificidad de acción de la enzima, lo que posibilita el control de las características en el producto final.
- Las condiciones de reacción son suaves en las que tiene lugar la digestión de las proteínas permitiendo obtener un producto soluble de elevada calidad, ya que el músculo no es sometido a temperaturas y pH extremos ni a la acción de disolventes orgánicos, bases o ácidos que pudieran disminuir el valor nutritivo del producto final.
- La no destrucción de aminoácidos esenciales que hace que la proteína retenga su valor nutritivo mejor que los hidrolizados ácidos y básicos tradicionales.
- Y la inactivación del enzima por calentamiento haciéndose innecesaria su eliminación del medio de reacción (Pizardi y col., 1997).

Por ello, la hidrólisis enzimática aparece como una de las tecnologías más extendidas para la obtención de hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la pesca.

---

Hoy en día existen en el mercado enzimas de origen fúngico que se emplean para la obtención de hidrolizados como son: Bioproteasa LA450 (Gygyc Biocon), Delvolase (Gist.Brocades), Novozym FM 2,0L, Alcalase 2,4L grado alimenticio, Neutrasa 0.5L grado alimenticio, Flavourzyme 500 MG y Kojizyme (Novo Nordisk), por mencionar algunas (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Bjoern y col., 2000). Pero el uso de este tipo de enzimas encarece la recuperación de la proteína, ya que su costo oscila entre 280 y 420 pesos por gramo de enzima. Cabe señalar que existen varias posibilidades de elección de la enzima para una buena obtención de hidrolizados de proteína de pescado como es su origen microbiano, tipo de reacción catalizada, naturaleza del centro catalítico, especificidad del sustrato, concentración del sustrato, pH óptimo de actividad, así como la relación costo - rendimiento (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Bjoern y col., 2000).

Por esta razón se ha propuesto el uso de extractos proteolíticos obtenidos por Fermentación en Medio Sólido (FMS), ya que este es un método en el cual hay una alta producción de enzima (U/mLh) que puede ser específica para el tipo de sustrato de interés, presentando una mayor estabilidad frente a la temperatura y el pH, además que abarata el costo de obtención de hidrolizados (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Pizardi y col., 1999; Pandey y col., 2003).

En el presente trabajo, se determinó la especificidad del extracto proteolítico obtenido por fermentación en medio sólido de una cepa fúngica previamente seleccionada de 4 cepas fúngicas para ser comparada con la especificidad de una enzima comercial (Flavorzyme 500 MG, Novo Nordisk).

Este trabajo fue estructurado en 8 capítulos; en el capítulo 1 se describe brevemente la importancia de la producción de extractos proteolíticos específicos que pudieran ser empleados en la recuperación de proteína de origen marino. Posteriormente en la revisión bibliográfica (Capítulo 2) se desarrollaron aspectos teóricos tanto de la obtención de dichos extractos como los parámetros que influyen en su actividad enzimática. En el capítulo 3 se establecen los antecedentes bibliográficos de este

---

trabajo. En el capítulo 4 se plantean los objetivos que se cubrieron en el presente trabajo, los cuales se desarrollaron siguiendo la metodología descrita en el capítulo 5. Los resultados y discusiones, así como las conclusiones se establecen en el capítulo 6 y 7 respectivamente. Finalmente el capítulo 8 presenta la bibliografía empleada en esta tesis.

---

*CAPÍTULO 2*

*REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

---

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Definición de enzima

Una enzima es una molécula proteica globular capaz de catalizar y acelerar reacciones químicas específicas, en un factor de  $10^{12}$  a  $10^{20}$  respecto a las reacciones no catalizadas enzimáticamente (Madigan y col., 1999; Whitaker, 1994). La actividad molar de las enzimas es muy alto; una molécula de enzima puede transformar hasta 600,000 moléculas de sustrato por segundo, como es el caso de Anhidrasa carbónica, 12,500 para lactasa y 700 para invertasa (Fennema, 1993).

Todas las enzimas son proteínas producidas por células vivas, son las más variadas y más altamente especializadas por los sustratos. Se han descubierto en diferentes organismos miles de enzimas distintas cada una, las cuales catalizan un tipo diferente de reacciones químicas y funcionan en soluciones acuosas en condiciones químicas muy suaves de temperatura y pH. Por lo general estas sustancias tampoco afectan el equilibrio de una reacción química, sino que simplemente la aceleran hasta alcanzar el equilibrio.

Aunque todas las enzimas inicialmente se producen en las células, algunas son excretadas a través de las paredes de éstas y funcionan en el medio celular; por lo que se pueden reconocer 2 tipos de enzimas según el sitio donde actúen: enzimas intracelulares o *endoenzimas* (funcionan en la célula), y enzimas extracelulares o *exoenzimas* (actúan fuera de la célula).

### 2.2 Propiedades químicas y físicas de las enzimas.

Como las enzimas son proteínas combinadas con otros grupos químicos, poseen las mismas propiedades y características de las proteínas: se desnaturalizan con el calor, precipitan con el etanol o concentraciones elevadas de sales

---

inorgánicas como el sulfato de amonio y no dializan a través de membranas semipermeables.

Algunas enzimas no requieren para su actividad más grupos químicos que residuos de aminoácidos; otros requieren un componente químico adicional (que se necesita de su adición para activar su función enzimática) llamado *cofactor* el cual puede ser uno o varios iones inorgánicos tales como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ ; o un complejo orgánico o metalorgánico denominado *coenzima* (generalmente el complejo de la vitamina B). Algunas enzimas requieren *tanto* una coenzima *como* uno o más iones metálicos unidos covalentemente a la proteína enzimática, este se denomina *grupo prostético*. Una enzima complejo catalíticamente activo junto con su coenzima y/o iones metálicos se denomina *holoenzima*. La parte proteica de tal enzima se denomina *apoenzima* o *apoproteína*.

### 2.3 Clasificación de las enzimas

Muchas enzimas se han nombrado añadiendo el subfijo “asa” al nombre del sustrato o a una palabra que describe su actividad. Así la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y la DNA polimerasa cataliza la síntesis de DNA. Otras enzimas, tales como la pepsina y la tripsina tienen nombres que no se refieren a sus sustratos. A veces la enzima tiene dos o más nombres, o dos enzimas diferentes tienen el mismo nombre.

Debido a tales ambigüedades y al número siempre creciente de enzimas descubiertas, se ha adoptado por acuerdo de la Unión internacional de Bioquímica un sistema de nomenclatura y clasificación de enzimas (Tabla 2.1). Este sistema distribuye las enzimas en seis clases principales, cada una de ellas con diferentes subclases, según el tipo de reacción catalizada (Lehninger, 1993).

---

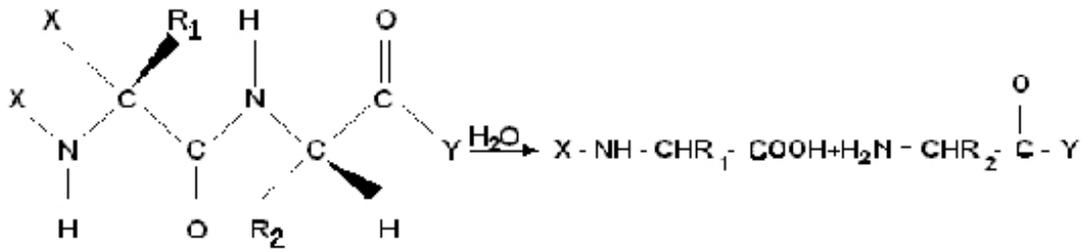
**Tabla 2.1.** Clasificación Internacional de Enzimas (Lehninger, 1993).

N°	Clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidoreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacción de Hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de la molécula dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C – C, C-S, C-O y C-N; mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP.

---

### 2.3.1 Clasificación de proteasas dependiendo de su sitio activo.

Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de Hidrolasas (Tabla 2.1), ya que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo ácido de una aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua, como se observa en la Figura 2.1.



**Figura 2.1.** Hidrólisis de un enlace peptídico de una proteína.

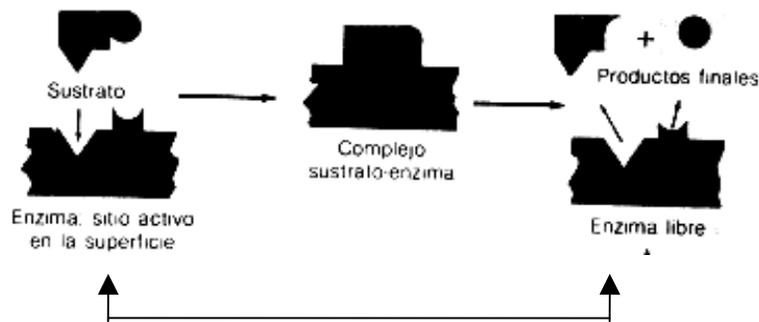
Dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual actúan las proteasas, éstas se clasifican en:

- a) Endopeptidasas: son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína (tripsina y quimotripsina) dando como resultado cadenas de péptidos.
- b) Exopeptidasas: actúan sobre enlaces terminales de una proteína (aminopeptidasa y carboxipeptidasas). Basándose en su sitio de acción sobre el N o el C terminal.
- c) Aminopeptidasas: actúan sobre el N libre terminal de la cadena polipeptídica liberando un aminoácido o un dipéptido o tripéptido.
- d) Carboxipeptidasas actúan sobre el C terminal de la cadena polipeptídica. Se subdividen en cuatro subgrupos dependiendo de su mecanismo catalítico y al grupo funcional presente en su sitio activo.

En la Figura 2.2 se muestra la acción de una carboxipeptidasa "A", que es una exopeptidasa realizando su función en la unión de la gliciltirosina.

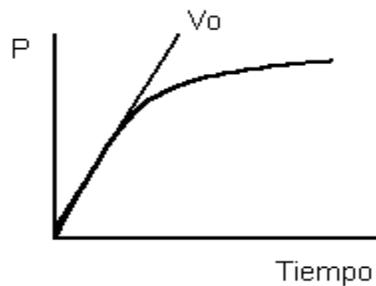


unión de la molécula de sustrato, se hace lábil y sufre un cambio por la enzima en particular. Las moléculas alteradas pierden su afinidad por los sitios activos y por ello son puestos en libertad. Entonces las enzimas quedan libres para combinarse con más sustrato y repetir la acción como se muestra en la Figura 2.3.



**Figura 2.3.** Reacción enzima – sustrato representada esquemáticamente

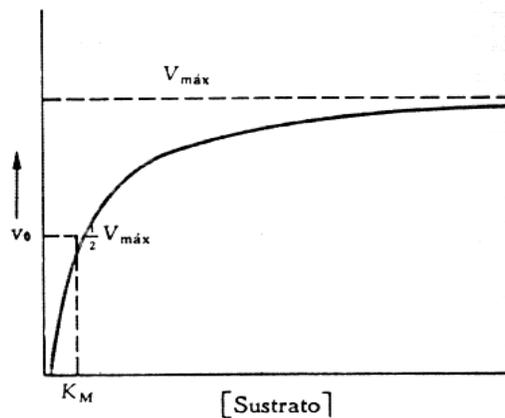
La formación del complejo ES no es medible experimentalmente, pero si lo es la velocidad inicial  $V_0$ , esta es la pendiente de una representación del producto P en función del tiempo de reacción como se observa en la Figura 2. 4.



**Figura 2.4.** Determinación de la velocidad inicial.

En la Figura 2.5 se observa el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción catalizada por la enzima. A una concentración de sustrato baja, la velocidad inicial  $V_0$  es casi proporcional a la concentración del sustrato y la reacción, por lo tanto es aproximadamente de primer orden con respecto al mismo. Sin embargo a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial

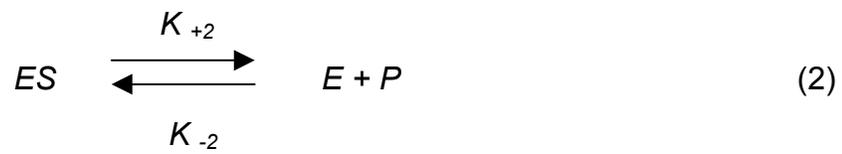
de la reacción disminuye y deja de ser proporcional a la concentración de sustrato; en esta zona el orden de reacción es mixto. Un aumento posterior de la concentración del sustrato, la velocidad de la reacción llega a ser esencialmente independiente de la concentración de sustrato y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante. En este intervalo de concentraciones de sustrato la reacción es esencialmente de orden cero con respecto al sustrato, y se dice entonces que la enzima se halla saturada con su sustrato. Todas las enzimas muestran el efecto de saturación, pero varían ampliamente con respecto a la concentración de sustrato que se necesita para que se manifieste.



**Figura 2.5.** Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción.

Algunas enzimas permanecen libres en condiciones bajas de sustrato y no se alcanza la máxima velocidad  $V_{max}$ . Cuando el sustrato se encuentra en exceso, toda la enzima se transforma en el complejo ES y la reacción se realiza a su máxima velocidad. Bajo óptimas condiciones físicas, la velocidad de la reacción, depende de la concentración de cada una de las tres entidades, sustrato S, enzima E y producto P. Finalmente la reacción entra en equilibrio cuando no ocurren más cambios. Sin embargo si el producto P se quita después de que se produjo (el cual puede servir como sustrato para otra reacción) impedirá el establecimiento del equilibrio; por lo tanto el sustrato S se seguirá convirtiendo en producto P.

Michaelis y Menten desarrollaron en 1913 una teoría general acerca de la acción y cinética de las enzimas, la cual fue ampliada posteriormente por Briggs y Haldane en 1925. Esta teoría, que es fundamental para el análisis cuantitativo de todos los aspectos de la cinética de las enzimas y de la inhibición, se ha desarrollado para el caso sencillo de una reacción en la que sólo hay un sustrato. La teoría de Michaelis – Menten supone que el enzima E se combina en primer lugar con el sustrato S para formar el complejo enzima – sustrato ES, a continuación este último se divide en una segunda etapa, para formar enzima libre y producto P como se expresa en las ecuaciones:



Las ecuaciones anteriores se suponen reversibles donde:

E = concentración de la enzima libre

S = concentración del sustrato

ES = concentración del complejo enzima - sustrato

$K_{+1}$  = constante de velocidad de combinación entre E y S para formar ES

$K_{-1}$  = constante de velocidad de disociación de ES para dar E y S

$K_{+2}$  = constante de velocidad de conversión de ES a P

$K_{-2}$  = constante de velocidad reversible específica.

La ecuación de Michaelis – Menten es la ecuación de velocidad para las reacciones catalizadas por enzimas que sólo actúan sobre un sustrato.

---

El objeto de esta deducción es definir una expresión general para  $V_o$  que es la velocidad inicial de una reacción catalizada enzimáticamente. La velocidad inicial es igual a la velocidad de ruptura del complejo enzima – sustrato por lo que:

$$V_o = k_{+2} [ES] \quad (3)$$

Sin embargo, ya que  $k_{+2}$ , ni  $[ES]$  pueden determinarse directamente, se debe encontrar otra expresión para  $V_o$  en función de otras variables que puedan medirse con más facilidad. La ecuación de velocidad de segundo orden para la formación de ES a partir de E y de S:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1} ([E_T] - [ES]) [S] \quad (4)$$

donde:  $[E_T]$  = concentración de la enzima total.

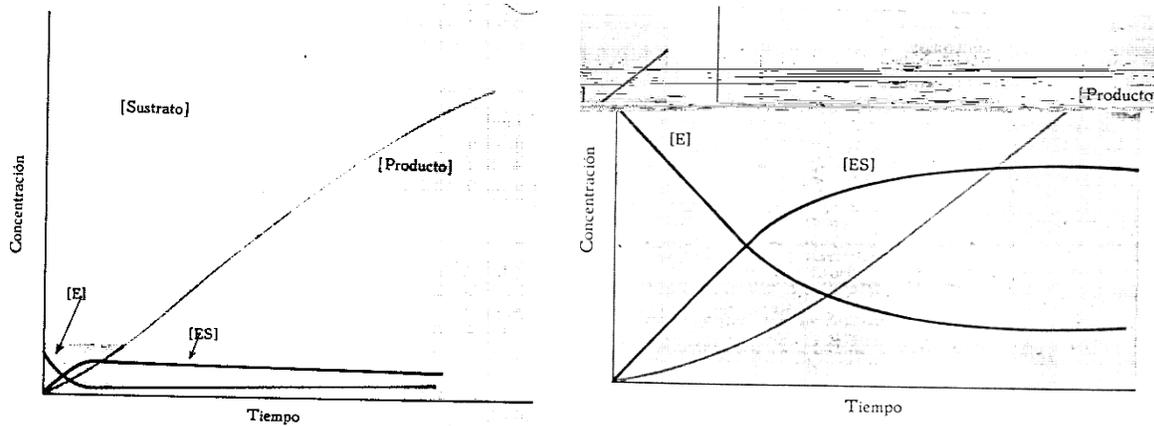
Escribiendo la ecuación de velocidad para la descomposición de ES por suma de dos reacciones; en primer lugar, la reacción que rinde el producto (reacción directa) y después la reacción que produce E + S (la inversa de la ecuación 1) se obtiene:

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1} [ES] + k_{+2} [ES] \quad (5)$$

Cuando la velocidad de formación de ES es igual a su velocidad de desaparición, es decir, cuando el sistema ha alcanzado el estado estacionario, que se define como aquel en que la concentración de ES permanece constante.

$$k_{+1} ([E_T] - [ES]) [S] = k_{-1} [ES] + k_{+2} [ES] \quad (6)$$

En la Figura 2.6 se muestra la variación de cada variable a lo largo del tiempo.



**Figura 2.6.** Transcurso de la formación de un complejo ES en función del tiempo

Reordenando la ecuación (6), se obtiene:

$$\frac{([E_T] - [ES]) * [S]}{[ES]} = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} = k_M \quad (7)$$

En donde a la constante global  $k_M$  se le llama constante de Michaelis – Menten. A partir de esta ecuación se puede obtener la concentración del complejo ES en el estado estacionario, despejando dicho término.

$$[ES] = \frac{[E_T] * [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Sustituyendo la ecuación (3) por su valor en la ecuación (8):

$$V_o = k_{+2} \frac{[E_T] * [S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

Cuando la concentración del sustrato es tan elevada que prácticamente toda la enzima del sistema está presente en forma de complejo ES, es decir, cuando la enzima se halla saturada, se alcanzará la velocidad máxima,  $V_{max}$  dada por:

$$V_{max} = k_{+2} [E_T] \quad (10)$$

---

En la que  $[E_T]$  es la concentración total de la enzima. Sustituyendo  $k_{+2} [E_T]$  por su valor deducido de la ecuación (10) se obtiene:

$$V_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + S} \quad (11)$$

Esta es la ecuación de Michaelis – Menten; y es la Ecuación de la velocidad para una reacción de un solo sustrato, catalizada enzimáticamente. Relaciona la velocidad inicial, la velocidad máxima y la concentración inicial del sustrato a través de la constante de Michaelis – Menten.

De la ecuación de Michaelis – Menten se deriva una relación numérica importante en el caso especial en que la velocidad inicial de la reacción sea exactamente la mitad de la velocidad máxima (como se muestra en la Figura 2.5); es decir, cuando  $V_o = \frac{1}{2} V_{\max}$ , sustituyendo este valor en la ecuación (11) se obtiene:

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + S} \quad (12)$$

Al dividir por  $V_{\max}$  a la ecuación (12) se obtiene

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + S} \quad (13)$$

Reordenando, se transforma en:

$$K_M + [S] = 2 [S] \quad (14)$$

$$K_M = [S] \quad (15)$$

---

La constante de Michaelis – Menten  $k_M$  es igual a la concentración de sustrato en la que la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la velocidad máxima. Las dimensiones de  $k_M$  para una reacción de un solo sustrato son moles por litro, y la constante es independiente de la concentración del enzima. El valor aproximado de  $k_M$  se obtiene gráficamente al representar la velocidad inicial frente a la concentración inicial del sustrato (Figura 2.5). Cabe mencionar que los valores de  $k_M$  y  $V_{max}$  pueden variar con la estructura del sustrato, con el valor de pH y con la temperatura.

Para las enzimas que poseen más de un sustrato, cada uno de ellos exhibe una  $k_M$  característica. En condiciones intracelulares, los enzimas no se hallan necesariamente saturados por los sustratos.

#### 2.4.2 Transformaciones de la ecuación de Michaelis – Menten.

La ecuación de Michaelis – Menten (ecuación 11) puede transformarse algebraicamente en otras formas que son más útiles para la expresión de los datos experimentales. Una de las transformaciones más sencillas se obtiene, tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación de Michaelis – Menten:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M + S}{V_{max} * [S]} \quad (16)$$

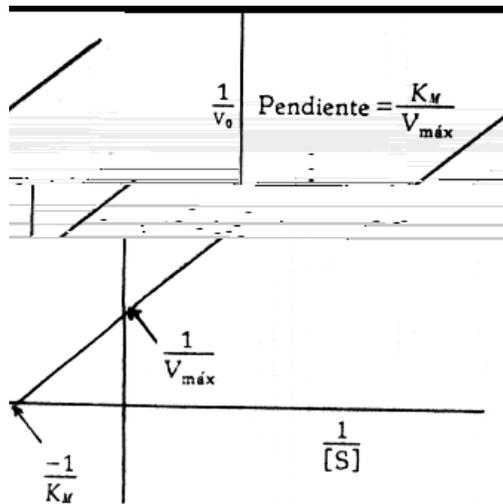
Reordenando se obtiene:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{max} [S]} + \frac{[S]}{V_{max} [S]} \quad (17)$$

Que se reduce a:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (18)$$

La ecuación (18) es la ecuación de Lineweaver – Burk. Cuando se representa  $1/V_o$  contra  $1/[S]$ , obteniéndose una línea recta. La pendiente de la recta es  $k_M/V_{\max}$  y la intersección sobre el eje  $1/V_o$  es  $1/V_{\max}$ . La intersección sobre el eje  $1/[S]$  es  $-1/k_M$ . Esta ecuación se representa en la Figura 2.7.



**Figura 2.7.** Representación gráfica de la ecuación de Lineweaver – Burk.

Tal representación doble recíproca tiene la ventaja de que permite una determinación mucha más exacta del valor de  $V_{\max}$  y  $K_M$ , ya que en la representación sencilla de  $V_o$  frente a  $[S]$  solo se obtiene un valor aproximado como se observa en la Figura 2.5.

La constante de Michaelis se expresa en unidades de concentración y se refiere específicamente a una concentración determinada de sustrato, además es independiente de la concentración de la enzima, y expresa por tanto, la concentración de sustrato necesaria para saturar a la enzima. Si  $K_M$  es grande se precisa una gran cantidad de  $S$  para saturar la Enzima; si  $K_M$  es pequeña, basta una pequeña cantidad de  $S$  para saturar la enzima.

## 2.5 Condiciones que afectan la actividad enzimática.

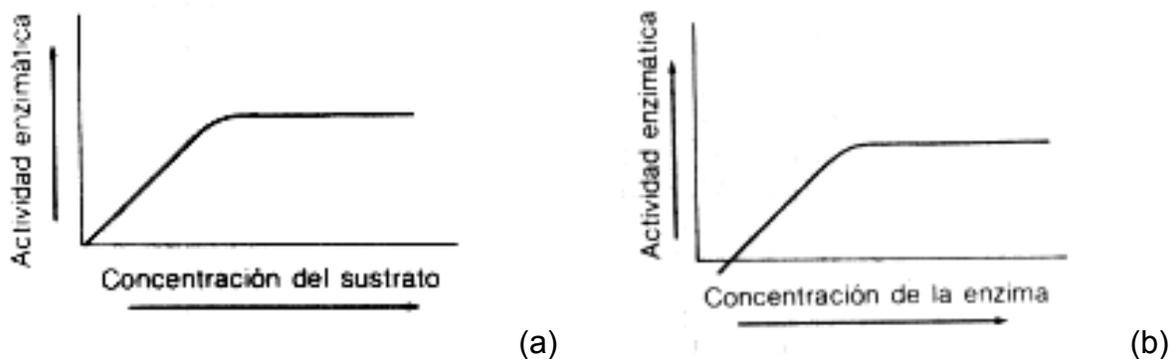
Entre las condiciones que afectan la actividad enzimática de las enzimas se encuentran las siguientes:

- a) Concentración de la enzima
- b) Concentración del sustrato
- c) pH
- d) Temperatura.

### 2.5.1 Concentración de la enzima y el sustrato

Algunas enzimas permanecen libres en condiciones bajas de sustrato y no se alcanza la máxima velocidad. Cuando el sustrato se encuentra en exceso, toda la enzima se transforma en ES y la reacción se realiza a su máxima velocidad. Finalmente la reacción entra en equilibrio cuando no ocurren más cambios. Sin embargo si el producto P se quita después de que se produjo impedirá el establecimiento del equilibrio; por lo tanto el sustrato S se seguirá convirtiendo en producto P.

En la Figura 2.8 (a) se observa el efecto de la concentración del sustrato sobre el índice de la actividad enzimática. El índice aumenta rápidamente con incremento inicial en el sustrato; incrementos posteriores en las concentraciones del sustrato no tienen efecto sobre el índice; ya que este se vuelve independiente de la concentración del sustrato, el mismo efecto ocurre con un incremento de la concentración de la enzima, como se aprecia en la Figura 2.8 (b).



**Figura 2.8.** (a) Efecto de la concentración del sustrato y (b) efecto de la concentración de la enzima en la actividad enzimática (Lehninger, 1993).

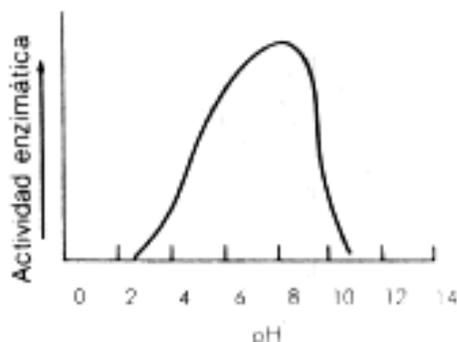
---

## 2.5.2 Efecto del pH

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico en el cual la actividad es máxima; por encima o por debajo de este pH la actividad disminuye. Aunque los perfiles de las curvas de actividad en función del pH de muchas enzimas son acampanados pueden variar considerablemente de forma (Figura 2.9). La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido – base de la enzima y del sustrato, ya que este afecta el grado de ionización de los aminoácidos del sitio activo tanto del sustrato como del complejo enzima-sustrato, e influyendo en la afinidad que tenga la enzima por el sustrato (Badui, 2000).

La forma de la curva de actividad - pH varía con la concentración del sustrato, ya que el valor de  $K_M$  de muchas enzimas varían con el pH (Whitaker, 1994). Estas curvas son mucho más significativas si la enzima se mantiene saturada con el sustrato en todos los valores de pH a los que se experimenta. En muchos estudios de cinética enzimática, el pH se mantiene constante al, o muy próximo pH óptimo.

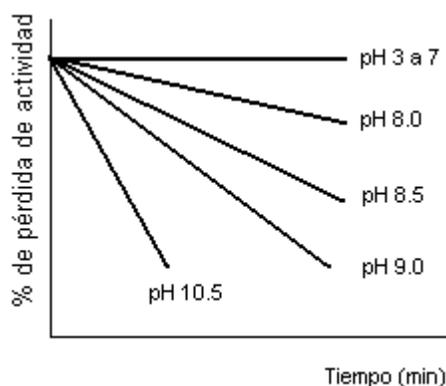
El pH óptimo de una enzima no es necesariamente idéntico al pH de su entorno intracelular normal, el cual puede hallarse a su vez en la pendiente de su curva ascendente o descendente.



**Figura 2.9.** Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

### 2.5.3 Efecto del pH en la estabilidad de la enzima.

El pH influye directamente en la estabilidad de la enzima respecto al tiempo (Figura 2.10), es decir, en el pH óptimo de la enzima, ésta suele ser razonablemente estable a lo largo de los ensayos enzimáticos, pero fuera de este rango de pH hay una pérdida, como se muestra en la Figura 2.10, para el caso de la pepsina, la enzima proteolítica del estómago, cuyo pH óptimo es de 2.0 pero se desnaturaliza rápidamente a pH mayor a 8.0 (Whitaker, 1994).



**Figura 2.10.** Representación esquemática de la velocidad de inactivación de las enzimas a diferentes valores de pH

### 2.5.4 Efecto de la temperatura.

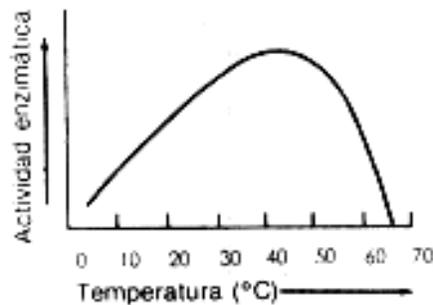
Al igual que ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementan en general con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activa. La velocidad de muchas reacciones se duplica, aproximadamente por cada 10 °C de aumento de temperatura ( $Q_{10} = 2.0$ ). Sin embargo el coeficiente de temperatura  $Q_{10}$ , varía de una enzima a otra según la energía de activación de la reacción catalizada, es decir, de la altura de la barrera de energía para pasar al estado de transición.

---

Aunque las reacciones catalizadas por las enzimas parecen con frecuencia, poseer una temperatura óptima como se muestra en la Figura 2.11, donde se representa la actividad catalítica frente a la temperatura, éstas enzimas al ser proteínas, se desnaturalizan por la acción del calor y se inactivan cuando la elevación de temperatura sobrepasa un cierto punto.

La aparente temperatura “óptima” es por tanto, la resultante de dos procesos: 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura, y 2) el incremento de la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima al sobrepasar una temperatura crítica. Aunque la mayoría de las enzimas se inactivan a una temperatura comprendidas entre 55 y 60°C, algunas de ellas son completamente estables y conservan su actividad a temperaturas muy superiores, por ejemplo las enzimas de diversas especies de bacterias termófilas.

En cambio temperaturas extremadamente bajas, detienen la actividad enzimática pero no las destruyen. Muchas enzimas se pueden conservar manteniéndolas a 0°C o temperaturas más bajas.

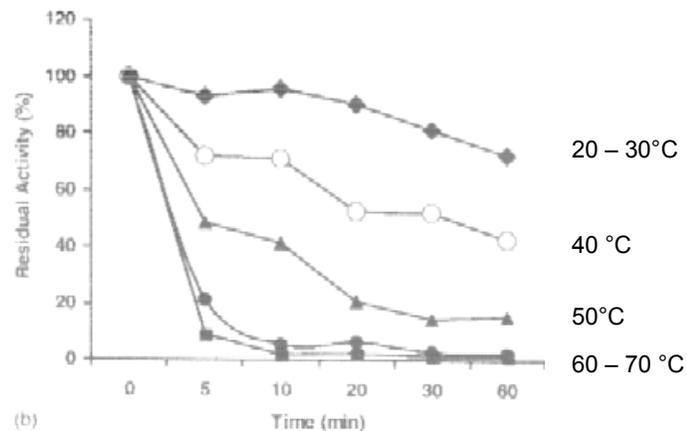


**Figura 2.11.** Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.

### **2.5.5 Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima.**

Cabe mencionar, que aún las enzimas estando en su aparente temperatura óptima suelen perder actividad enzimática dependiendo de la duración del ensayo (Patnaik, 2002).

La estabilidad térmica puede determinarse incubando la enzima en ausencia del sustrato, a diferentes temperaturas, de esta se toma una alícuota en la cual se determina su actividad enzimática a diferentes tiempos. Dando los resultados que se muestran en la Figura 2.12. Donde la enzima es completamente estable (o al menos el % de pérdida es menor) en un rango de 20 a 30°C, pero a temperaturas mayores de 40°C las enzimas pierden un % de actividad, siendo más notorio a temperaturas como 60 y 70°C. (Pandey y col,2003; Whitaker,1994).



**Figura 2.12.** Efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas.

## 2.6 Especificidad de las enzimas.

Las enzimas son altamente específicas para las reacciones que catalizan. Esto es que cada enzima cataliza un *único tipo* de reacción química, es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuestos que deben reunir ciertas características para que puedan ser usados como sustrato.

Esta especificidad está relacionada con la estructura tridimensional de la molécula enzimática, así como la interacción entre el sustrato y la enzima a través del centro activo, dependiendo de la naturaleza de las interacciones entre estos, normalmente de las fuerzas débiles, tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals e interacciones hidrófobas (Madigan y col, 1999).

---

## **2.6.1 Tipos de especificidad de las enzimas.**

Los tipos de especificidad de las enzimas se han dividido en cuatro grupos, éstos son: baja especificidad, especificidad de grupo, especificidad absoluta y especificidad estereoquímica.

### **2.6.1.1 Baja especificidad**

Se denomina como enzima de baja especificidad cuando la enzima no discrimina entre sustratos, sino que se muestra específica únicamente para el enlace a atacar (Badui, 2000).

### **2.6.1.2 Especificidad de grupo**

La especificidad de grupo se presenta cuando las enzimas actúan sobre un sustrato que contiene un determinado enlace y un grupo químico específico al lado de éste; por ejemplo la Tripsina es específica para los enlaces péptido en el lado carboxilo de la arginina y la lisina; igualmente las proteasas vegetales (papaína y ficina) hidrolizan la unión adyacente a aminoácidos básicos, leucina o glicina; por su parte, la pepsina actúa sobre los enlaces que contienen aminoácidos aromáticos o ácidos dicarboxílicos (Badui, 2000).

### **2.6.1.3 Especificidad absoluta**

Se habla de especificidad absoluta cuando la enzima sólo ataca a un sustrato y cataliza sólo una reacción. La mayoría de las enzimas pertenecen a esta categoría (Badui, 2000).

---

#### 2.6.1.4 Especificidad estereoquímica.

La especificidad estereoquímica se refiere a que normalmente utilizan D o L isómeros como sustrato; por ejemplo, todos los monosacáridos en la naturaleza son D, mientras que los aminoácidos pertenecen a la serie L; esta especificidad se entiende si se considera que las enzimas son polímeros integrados por L-aminoácidos y que, consecuentemente, tienen una estructura asimétrica (Badui, 2000).

#### 2.6.2 Medición de la especificidad de las enzimas.

La especificidad de las enzimas está dada cuantitativamente por un coeficiente de especificidad denominado  $\alpha$  (Whitaker, 1994), es decir:

$$\alpha = \frac{V_{max}}{K_M}$$

Donde  $V_{max}$  se expresa como una velocidad, mientras que  $K_M$  es un índice de la afinidad que tiene una enzima por un determinado sustrato; los valores bajos indican que la enzima requiere de bajas concentraciones de sustrato para alcanzar la mitad del valor de la velocidad máxima; por el contrario, los valores altos representan enzimas con poca afinidad hacia el sustrato, ya que es necesaria una elevada concentración de sustrato para lograr  $\frac{1}{2} V_{max}$ . Por ejemplo, la  $\beta$ -galactosidasa extraída de *Escherichia coli*, llamada comúnmente lactasa, puede hidrolizar  $\beta$ -galactósidos con diferentes velocidades, de acuerdo con la afinidad que tenga hacia cada uno de ellos como se observa en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Especificidad de algunos sustratos de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, (Badui, 2000).

Sustrato	$K_M$ (moles /litro)	$V_{max}$ ( $\mu$ moles/ min*mg de enzima)	$V_{max}/ K_M$ $\times 10^4$
o-Nitrofenil $\beta$ - D- galactósido	$1.61 \times 10^{-4}$	178	110
p-Nitrofenil $\beta$ - D- galactósido	$5.31 \times 10^{-4}$	22.4	44
Metilsalicilato - $\beta$ - D- galactósido	$2.50 \times 10^{-3}$	4.2	0.17
Fenil- $\beta$ - D- galactósido	$1.47 \times 10^{-3}$	10.4	0.71
$\alpha$ -Lactosa	$1.90 \times 10^{-3}$	6.55	0.35
Tio-(o-nitrofenil)- $\beta$ - D- galactósido	$1.20 \times 10^{-3}$	0.00	0.00

De la Tabla 2.2 se observa que el o-Nitrofenil  $\beta$ - D- galactósido es el mejor sustrato para esta enzima (aún más que la propia lactosa) y que el grupo nitro en posición *para* ejerce un efecto negativo que se refleja en una  $K_M$  mayor que para orto, razón que se refleja en el coeficiente de especificidad ( $V_{max}/ K_M$ ) (Badui, 2000).

## 2.7. Aplicaciones de las enzimas en la industria

Hoy en día la tecnología enzimática ocupa un lugar preponderante dentro de la biotecnología. Alrededor de un 65% de las enzimas proteolíticas o proteasas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria alimentaria, entre los usos mas comunes se encuentra la maduración de quesos, ablandadores de carnes, producción de hidrolizados de proteína, fabricación de pan, por mencionar algunos (Mitra y col., 1996; Pandey y col., 2003); aunque es conveniente señalar que con las proteasas alcalinas empleadas en detergentes ocupan 25% del total de la distribución, el 10% restante corresponde en las áreas farmacéuticas y analítica (García y col., 1993).

Actualmente se conoce la existencia de más de 2,000 enzimas, de las cuales muchas de ellas han sido aisladas, purificadas y cristalizadas gracias a la experiencia ganada en este terreno (Prave y Faust, 1987).

En la Tabla 2.3 se muestran algunas enzimas de uso industrial, así como sus aplicaciones (Prave y Faust, 1987; Bakir y col., 2001, García y col., 1993).

**Tabla 2.3.** Enzimas de uso industrial.

Enzima	Microorganismo productor	Aplicación	Producción (Ton / anual)	% de ventas a nivel mundial
Proteasa	<i>Bacillus sp.</i>	Maduración de quesos,	500	40
	<i>Mucor miehei</i>	sustitutos de renina Ablandador de carne		
Proteasa fúngica	<i>Aspergillus sp.</i>	Aditivos en detergentes	20	8
$\alpha$ -amilasa	<i>Bacillus sp.</i>	Convierte el almidón en	300	12
	<i>Aspergillus oryzae</i>	azúcares		
Glucosa isomerasa	<i>Streptomyces sp.</i>	Producción de jarabes	50	12
	<i>Bacillus coagulans</i>	fructosados, bebidas refrescantes		
Pectinasa	<i>Aspergillus sp.</i>	Clarificación de jugos y vinos	10	10
Celulasa	<i>Trichoderma reesei</i>	Solubilización de papel	--	< 1
Xylanasa	<i>Rhizopus oryze</i>	Degradación de lignocelulosas y textiles	--	--
Lipasa	<i>Rhizomucor</i>	Elaboración de productos lácteos, degradación de grasas	--	--
	<i>Streptomyces rimosus</i>			
Lactasa	<i>Aspergillus sp.</i>	Hidroliza la lactosa en glucosa y galactos	--	< 1

Las bacterias producen principalmente proteasas alcalinas mientras que las proteasas provenientes de hongos pueden ser ácidas, neutras y alcalinas; lo que ofrece una gran ventaja ya que pueden crecer tanto en medio sólido como líquido.

---

Gracias a que los hongos como *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae* son productores de proteasas alcalinas así como de  $\alpha$ -amilasas, glucosamilasas, lactasas, celulasas, lipasas y pectinasas; estos crecen naturalmente en medios sólidos y se pueden emplear en la fermentación en medio sólido utilizando generalmente salvado de trigo como soporte, además que las enzimas que se extraen de este sistema son de mejor calidad y se necesitan menos solventes para extraerlas (Prave y Faust, 1987).

Para la aplicación industrial de proteasas se recurrió inicialmente a la producción de preparados enzimáticos provenientes, en su mayoría de tejidos animales y vegetales, al incrementarse la demanda de proteasas como consecuencia de su aplicación como aditivo en detergentes utilizados a nivel industrial y doméstico, se desarrollaron tecnologías para producir proteasas de origen microbiano, ya que reúnen propiedades deseables como gran estabilidad en intervalos de pH y temperatura de procesos, así como de la elevada actividad en presencia de compuestos que normalmente inhibirían a las de origen animal y vegetal, además de ser más factible su producción a partir de microorganismos que a partir de tejidos (Cheftel, 1989; Pandey y col., 2003).

Hoy en día existen en el mercado enzimas de origen fúngico que se emplean para la obtención de hidrolizados de proteína como son: Bioproteasa LA450 (Gygyc Biocon), Delvolase (Gist.Brocades), Novozym FM 2,0L, Alcalase 2,4L grado alimenticio, Neutrasa 0.5L grado alimenticio, Flavourzyme 500 MG y Kojizyme (Novo Nordisk), por mencionar algunas (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Bjoern y col., 2000). Pero el uso de este tipo de enzimas encarece la recuperación de la proteína, ya que su costo oscila entre 280 y 420 pesos por gramo de enzima. Cabe señalar que existen varias posibilidades de elección de la enzima para una buena obtención de hidrolizados de proteína como es su origen microbiano, tipo de reacción catalizada, naturaleza del centro catalítico, especificidad del sustrato, concentración del sustrato, pH óptimo de actividad, así como la relación costo - rendimiento (Perera y Aurrekoetxea, 2001; Bjoern y col., 2000).

---

### **2.7.1. Hidrolizados de proteína**

Una aplicación muy importante de las enzimas, es el uso de éstas para la recuperación de proteína de diversos subproductos. Como es el caso de la proteína de subproductos de la pesca; ya que los desperdicios del fileteo en mercados populares van directamente a la basura. De acuerdo a reportes de la FAO en 1994, cerca de  $100 \times 10^6$  toneladas de productos marinos a nivel mundial, el 70 a 80% no son usados para el consumo humano, debido a que no se puede almacenar o congelar para preservarlo por la baja capacidad de almacenaje por parte de la industria pesquera (Bjoern y col., 2000).

Sin embargo con el uso de las enzimas se puede recuperar una cantidad considerable de proteína de alta calidad a través de hidrolizados, los cuales pueden considerarse aptos para el consumo animal; además de tener una vida de anaquel larga ya que se elimina la presencia de microorganismos patógenos que alteran su calidad (Potter, 1978; Bjoern y col., 2000).

#### **2.7.1.1 Métodos comúnmente utilizados en la producción de hidrolizados**

Existen diferentes estrategias para recuperar la proteína del pescado, uno de ellos es mediante tratamientos químicos o enzimáticos que originan productos totalmente solubles, liberando péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres que posteriormente son recuperados, además del bajo contenido graso que depende especialmente de la especie empleada (Perera y Aurrekoetxea, 2001).

##### **2.7.1.1.1 Métodos químicos**

Dentro del tratamiento de la hidrólisis química, este pueden ser de manera ácida o alcalina. La hidrólisis ácida consiste básicamente en someter al músculo de pescado a la acción de un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico 6N y la hidrólisis alcalina con NaOH 6N. Por este método de recuperación de la proteína de pescado,

---

se obtiene un producto de bajo valor nutritivo ya que se presenta la destrucción de aminoácidos esenciales, debido a que las condiciones del tratamiento son severas (San Pedro y col., 1986).

#### **2.7.1.1.2 Métodos enzimáticos**

A diferencia de la hidrólisis química, la hidrólisis enzimática se consigue por medio de la acción de una enzima con actividad proteolítica (Pizardi y col., 1999; Bjoern y Aurrekoetxea, 2000).

La hidrólisis enzimática presenta diferentes ventajas frente a los métodos químicos de procesado para la obtención de hidrolizados proteicos entre las que se pueden citar:

- La especificidad de acción de la enzima, lo que posibilita el control de las características en el producto final.
- Las condiciones de reacción son suaves en las que tiene lugar la digestión de las proteínas permitiendo obtener un producto soluble de elevada calidad, ya que el músculo no es sometido a temperaturas y pH extremos ni a la acción de disolventes orgánicos, bases o ácidos que pudieran disminuir el valor nutritivo del producto final.
- La no destrucción de aminoácidos esenciales que hace que la proteína retenga su valor nutritivo mejor que los hidrolizados ácidos y básicos tradicionales.
- Y la inactivación de la enzima por calentamiento haciéndose innecesaria su eliminación del medio de reacción (Pizardi y col., 1997).

---

Por ello, la hidrólisis enzimática aparece como una de las tecnologías más utilizadas para la obtención de hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la pesca.

Estudios previos demostraron que para que estos hidrolizados sean empleados en alimentos, deben ser péptidos de bajo peso molecular, especialmente di y tripéptidos y en menor grado aminoácidos libres, ya que la presencia de aminoácidos como valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y tirosina imparten sabores amargos (Bjoern y Aurrekoetxea, 2000). Así de esta manera, se obtiene un producto de mayor valor agregado que puede ser utilizado como base o ingrediente para ciertos alimentos (Hernández, 2003).

## **2.8 Obtención de enzimas**

Actualmente uno de los métodos más usados para la obtención de enzimas es la fermentación. Esta puede llevarse a cabo de dos maneras: en cultivo semi-sólido o en cultivo sumergido.

El cultivo semi-sólido, comúnmente llamado fermentación sólida, es la forma más común de producción de enzimas fúngicas la cual presenta ciertas ventajas frente a la fermentación en cultivo sumergido; principalmente la alta productividad de la enzima de interés (García y col., 1993).

### **2.8.1 Fermentación en medio sólido**

La fermentación en medio sólido ha surgido como una tecnología potencial y atractiva para la producción de metabolitos microbianos; en aplicaciones como bioprocesos de bioremediación ha tenido avances considerables, así como la producción de enzimas, antibióticos, surfactantes, biocidas, etc.

La utilización de residuos agroindustriales como sustrato promueve una alternativa de usos. Hoy en día, gracias a aspectos bioquímicos e ingenieriles, particularmente

---

modelos matemáticos de bioreactores (fermentadores) es posible un escalamiento del proceso y algunos diseños han sido desarrollados para su comercialización (Pandey, 2002; Raghavarao y Ranganathan, 2003).

La fermentación en medio sólido está definida como una fermentación en ausencia de agua, sin embargo, el sustrato posee cierto grado de humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo (Pandey, 2002; Raghavarao y Ranganathan, 2003).

La fermentación en medio sólido se torna atractiva para la obtención de proteasas de origen fúngico, principalmente por el uso de una tecnología relativamente simple.

#### **2.8.1.1 Características de la fermentación sólida**

Debido al bajo contenido de agua, la fermentación en medio sólido estimula el crecimiento de las cepas fúngicas, evita contaminaciones microbianas (ya que su crecimiento es a partir del 40 a 70% de humedad), los requerimientos de energía son muy bajos, se producen menos desechos líquidos, permite la producción de metabolitos en mayor concentración, hay una reducción de volumen del equipo por unidad de sustrato bioconvertido en comparación con una fermentación sumergida, la aplicación es directa en la fermentación como medio de conservación de alimentos, y que además aumenta su digestibilidad (Raghavarao y Ranganathan, 2003; Pandey, 2002; Viniegra y col., 2003 ).

La selección del sustrato es una clave importante para la fermentación en medio sólido, ya que debe de proveer de nutrientes y permitir la transferencia de oxígeno, ya que el crecimiento de los microorganismos depende de la interacción entre el O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub>; así como la formación de las enzimas y los productos metabólicos. Para el caso del soporte, este debe de ser inerte como el poliuretano que es el más usado, ya que puede ser relativamente simple y barato en comparación con otros como el

---

salvado de trigo, ya que algunos dificultan la extracción del producto de la fermentación (Raghavarao y Ranganathan, 2003).

La optimización de la fermentación depende de los parámetros iniciales, como son el contenido de humedad, el pH, si el sustrato requiere de pre – tratamientos, humedad relativa, temperatura de incubación, agitación o aereación, tamaño del inóculo, la adición de algunos nutrientes como fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y algunos elementos traza.

En años recientes se ha reportado algunos fundamentos sobre la fermentación en medio sólido como son la transferencia de calor y masa que afectan a la fermentación, ya que una gran cantidad de calor es generado el cual es directamente proporcional a la actividad metabólica de los microorganismos. Los materiales sólidos son usados como conductos térmicos, y si se quiere remover el calor, este puede ser de manera muy lenta, en el caso contrario, si se mantiene ese calor puede desnaturalizar el producto formado. La temperatura en algunos puntos de la fermentación puede ser 20°C arriba de la temperatura deseada de incubación. Para evitar estos problemas se propone el uso de un sistema de aereación idóneo, para no afectar el crecimiento del microorganismo, la formación y germinación de esporas, así como la formación del producto.

A altos contenidos de humedad, afectan la porosidad del sustrato así como el paso de oxígeno, a demás de promover una contaminación microbiana; del mismo modo la actividad de agua del sustrato influye en la actividad microbiana.

El desarrollo y crecimiento de los microorganismos puede ser determinado por la cantidad y composición de gases dentro del bioreactor, así como la velocidad de formación de oxígeno a bióxido de carbono (Pandey, 2002).

---

### 2.8.1.2 Usos de microorganismos en la fermentación sólida.

Tunga y Banerjee (1999) realizaron un sistema de producción de proteasas utilizando un grupo de Ficomycetos, en especial al *Rizhopus oryzae*; ya que en estudios previos se identificó como productor de una proteasas alcalina. Dicho sistema consistió en la fermentación en estado sólido utilizando como soporte salvado de trigo y tomando en cuenta parámetros importantes como son la densidad, el espesor de la cama o soporte y la aereación. La optimización de la producción de la proteasa requirió de 1.0 a 2.0 cm de espesor de la cama o soporte y una aereación de 3 LPM La máxima actividad enzimática de registró bajo condiciones óptimas de temperatura (32°C), un inóculo de  $2 \times 10^5$  esporas / g de soporte y un ajuste de pH 5.5 (Tunga y Banerjee (a), 1999).

Aalbaek y Reeslev (2001) realizaron fermentaciones utilizando 2 medios denominados: complejo y definido. En ambas fermentaciones se controló el pH (3.0 a 5.0), temperatura (32 °C) y aereación (2 LPM); para poder cuantificar la formación de biomasa, producción de proteasas ácidas y glucoamilasas a partir de *Aspergillus niger*. La máxima producción de la proteasa se registró a partir de las 32 horas de fermentación en ambos medios, posterior a este tiempo la producción fue disminuyendo considerablemente. La máxima formación de biomasa se registró a las 23 horas y 16 horas en los medios complejo y definido respectivamente (Aalbaek y Reeslev, 2001).

Tomando en cuenta los estudios previos acerca de las ventajas que ofrece la producción de proteasas de origen fúngico en fermentación sólida; Pizardi y colaboradores (1999) desarrollaron con bastante éxito un proceso de fermentación en sustrato sólido (FSS) con hongos filamentosos para hidrolizar residuos de pescado. Donde probaron varias concentraciones de glucosa y almidones como fuente de carbono, llegando a la conclusión que el proceso de bioconversión se lleva a cabo en presencia o ausencia de estos compuestos, por lo que no es la única fuente que permite sintetizar enzimas proteolíticas, sino que estaría utilizando el

---

microorganismo la fracción nitrogenada o la fracción grasa del sustrato para su metabolismo (Pizardi y col.,1999).

Bakir y colaboradores (2001), realizaron una fermentación con *Rhizopus oryzae* para la producción de endoxylanases, utilizando desechos agroindustriales como salvado de trigo, salvado de soya y bagazo de algodón como fuente de carbono y nitrógeno. Esta enzima tiene sus aplicaciones en la industria como lo es la biodegradación de lignocelulosa así como en la industria del papel. En su trabajo experimental notaron que el uso de los desechos agroindustriales semi hidrolizados incrementaban la formación de la enzima. Esta enzima fue parcialmente purificada del medio de cultivo por precipitación con sulfato de amonio. El pH óptimo y temperatura de la enzima fue de 4.5 y 55°C respectivamente. Además realizaron una caracterización bioquímica de la enzima a través de la cinética propuesta por Michaelis-Menten encontrando los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  con el uso de la gráfica de Lineaweaver-Burk, siendo de 18.5 mg xylano/mL para el  $K_M$  y de 90 IU/mg de proteína para  $V_{max}$ . Estos valores fueron determinados usando diferentes concentraciones de sustrato desde 2.5 a 25 mg xylano/mL, pero no se pudo utilizar mayores concentraciones de éste, debido a la baja solubilidad del xylano (Bakir y col., 2001).

Considerando los trabajos previamente descritos, la fermentación en medio sólido se torna atractiva para la obtención de proteasas de origen fúngico, principalmente por el uso de una tecnología relativamente simple ya que el uso de desechos agroindustriales como sustrato, induce la especificidad de las proteasas producidas, ya que se “obliga” al microorganismo empleado a consumir la fuente de nutrientes disponible en el medio y con ello la formación de proteasas (Raghavarao y Ranganathan, 2003).

---

## *CAPÍTULO 3*

### ***ANTECEDENTES***

---

### 3. ANTECEDENTES

La ingeniería enzimática se inicia el siglo antepasado, cuando Takamine en 1873 patentó las amilasas (diastasas) producidas por hongos en fermentación sólida y Hansen inició, en 1875, una empresa para la extracción de renina de ternera. Takamine se instaló posteriormente en Estados Unidos, alrededor de 1890, para producir la takadiastasa, una mezcla de amilasas y proteasas de *Aspergillus oryzae* (García y col., 1993).

Para el primer cuarto del siglo pasado, ya se usaban enzimas proteolíticas de origen animal y vegetal, habiéndose otorgado una patente a Wallerstein (1910) para el uso de papaína en la clarificación en frío de cerveza y la famosa patente de Rohm en 1913 para el uso de tripsina en detergentes. Así alrededor de 1955 para efectuar el primer escalamiento de un proceso de producción de enzimas por fermentación: la glucosamilasa (García y col., 1993).

Para la aplicación industrial de proteasas se recurrió inicialmente a la producción de preparados enzimáticos provenientes, en su mayoría de tejidos animales y vegetales, al incrementarse la demanda de proteasas como consecuencia de su aplicación como aditivo en detergentes utilizados a nivel industrial y doméstico, se desarrollaron tecnologías para producir proteasas de origen microbiano, ya que este tipo de proteasas reúnen ciertas propiedades deseables como estabilidad en intervalos de pH y temperatura de procesos, así como de la elevada actividad en presencia de compuestos que normalmente inhibirían a las de origen animal y vegetal, además de ser más factible su producción a partir de microorganismos que a partir de tejidos (Cheftel, 1989; Pandey y col., 2003).

Tunga y Banerjee (1999) realizaron un sistema de producción de proteasas utilizando un grupo de Ficomicetos, en especial al *Rizhopus oryzae*; ya que en estudios previos se identificó como productor de una proteasas alcalina. Dicho sistema consistió en la fermentación en estado sólido utilizando como soporte salvado de trigo y tomando en

---

cuenta parámetros importantes como son la densidad, el espesor de la cama o soporte y la aereación. La optimización de la producción de la proteasa requirió de 1.0 a 2.0 cm de espesor de la cama o soporte y una aereación de 3 LPM. La máxima actividad enzimática se registró bajo condiciones óptimas de temperatura (32°C), un conteo de  $2 \times 10^5$  esporas / g de soporte y un ajuste de pH 5.5 (Tunga (a), 1999).

Aalbaek y Reeslev (2002) realizaron fermentaciones utilizando 2 medios denominados: complejo y definido. En ambas fermentaciones se controlaron el pH (3.0 a 5.0), temperatura (32 °C) y aereación (2 LPM); para poder cuantificar la formación de biomasa, producción de proteasas ácidas y glucoamilasas a partir de *Aspergillus niger*. La máxima producción de la proteasa se registro a partir de las 32 horas de fermentación en ambos medios, posterior a este tiempo la producción fue disminuyendo considerablemente. La máxima formación de biomasa se registró a las 23 horas y 16 horas en los medios complejo y definido respectivamente (Aalbaek y Reeslev, 2002).

Tomando en cuenta los estudios previos acerca de las ventajas que ofrece la producción de proteasas de origen fúngico en fermentación sólida, como el bajo contenido de agua, razón que favorece el crecimiento de hongos filamentosos, el volumen que se manipula se ve reducido en comparación con una fermentación sumergida, lo que disminuye el riesgo de contaminación bacteriana; el uso de residuos agro – industriales como sustrato, así como la tecnología se torna atractiva por ser relativamente simple (Pandey, 2002). Pizardi y colaboradores en 1999 desarrollaron con bastante éxito un proceso de fermentación en sustrato sólido (FSS) con hongos filamentosos para hidrolizar residuos de pescado. Donde probaron varias concentraciones de glucosa y almidones como fuente de carbono, llegando a la conclusión que el proceso de bioconversión se lleva a cabo en presencia o ausencia de estos compuestos, por lo que no es la única fuente que permite sintetizar enzimas proteolíticas, sino que el microorganismo utiliza la fracción nitrogenada o la fracción grasa del sustrato para su metabolismo (Pizardi y col., 1999).

---

Por otro lado, el éxito de la producción de las enzimas por fermentación en medio sólido también depende de la especificidad de las enzimas por el sustrato.

Bakir (2001), realizó una fermentación con *Rhizopus oryzae* para la producción de endoxylanases, utilizando desechos agroindustriales como salvado de trigo, de soya y bagazo de algodón como fuente de carbono y nitrógeno. En su trabajo experimental notaron que el uso de los desechos agroindustriales semi hidrolizados incrementaban la formación de la enzima. Esta enzima fue parcialmente purificada del medio de cultivo por precipitación con sulfato de amonio. El pH óptimo y temperatura de la enzima fue de 4.5 y 55°C respectivamente. Además realizaron una caracterización bioquímica de la enzima a través de la cinética propuesta por Michaelis-Menten, encontrando los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  con el uso de la gráfica de Lineaweaver-Burk, siendo de 18.5 mg xylano/mL para el  $K_M$  y de 90 IU/mg de proteína para  $V_{max}$ . Estos valores fueron determinados usando diferentes concentraciones de sustrato desde 2.5 a 25 mg xylano/mL, pero no se pudo utilizar mayores concentraciones de éste, debido a la baja solubilidad del xylano.

---

*CAPÍTULO 4*

***OBJETIVOS***

---

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la especificidad de proteasas fúngicas en la hidrólisis de proteína

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el crecimiento y la formación de halos de hidrólisis de las cepas fúngicas en los medios de cultivo a ensayar
- Seleccionar las cepas fúngicas productoras de proteasas en función del diámetro del halo de hidrólisis formado
- Realizar la fermentación en medio sólido con las cepas fúngicas
- Caracterizar el extracto proteolítico obtenido de la fermentación sólida
- Determinar los parámetros cinéticos del extracto proteolítico obtenido
- Comparar la especificidad del extracto proteolítico con una enzima comercial (Flavorzyme 500 MG<sup>®</sup>)

---

*CAPÍTULO 5*

***MATERIALES Y MÉTODOS***

---

---

---

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Microorganismos utilizados

Los microorganismos que se utilizaron fueron: *Aspergillus niger* ANH - 15, *Aspergillus niger* 2080, *Aspergillus oryzae* 2095 y *Rhizopus oryzae* 2340; de la colección de cepas del grupo de Fermentación en Medio Sólido del Departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa. Estas cepas se conservaron en tubos de agar PDA inclinado.

### 5.2 Selección de cepas productoras de proteasas

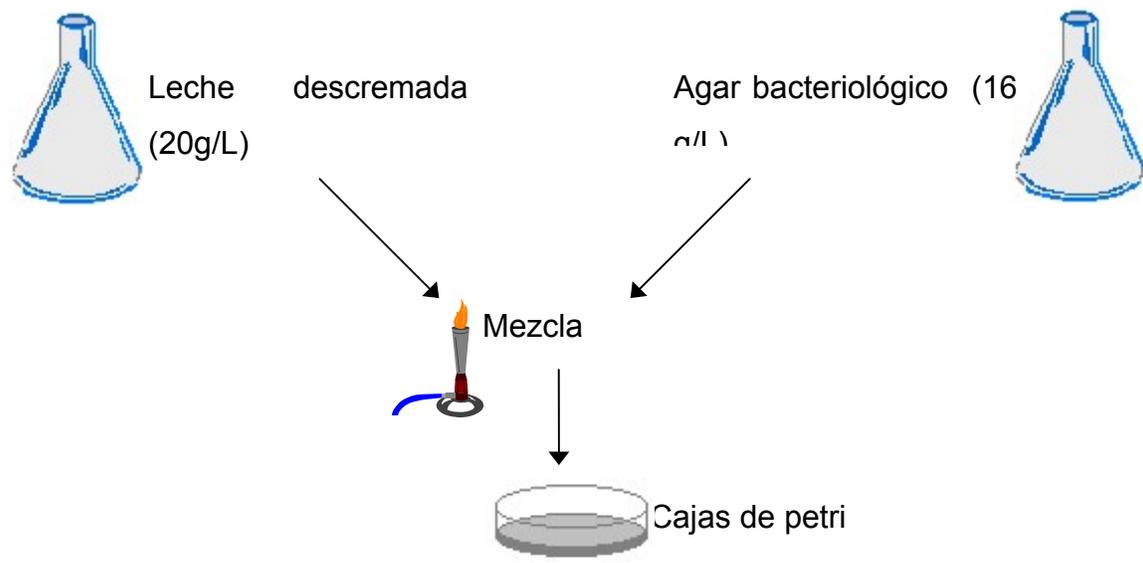
#### 5.2.1 Preparación de Medios de cultivo

##### 5.2.1.1 Agar leche descremada

Leche descremada      20 g/ L

Agar bacteriológico      16 g/ L

En un matraz Erlenmeyer se disolvió la leche descremada en buffer de fosfatos pH 7.0, 50 mM en aproximadamente  $\frac{1}{4}$  del total del volumen a preparar, se esterilizó a 110 °C (10 psi, para evitar reacciones de caramelización) durante 10 minutos. En otro matraz con los  $\frac{3}{4}$  del volumen restante a preparar se disolvió el agar bacteriológico, este se ebulló durante 1 minuto y se esterilizó a 121°C (15 psi) durante 15 minutos. En condiciones asépticas se mezcló la leche descremada con el agar bacteriológico, y se vació en cajas de petri estériles (Ramírez, 1996). Una vez que solidificó el medio, las cajas fueron almacenadas a 4 °C hasta el momento de su uso. Esta técnica se muestra esquemáticamente en la Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Esquema de la preparación de medios de cultivo

### 5.2.1.2 Agar harina de pescado

Harina de pescado      20 g/ L

Agar bacteriológico    16 g/ L

Se preparó del mismo modo que el agar leche descremada (Figura 5.1), a diferencia que el harina de pescado fue previamente tamizada en una malla del número 20.

### 5.2.1.3 Agar caseína sin vitaminas.

Caseína sin vitaminas    20 g/ L

Agar bacteriológico    16 g/ L

Para disolver la caseína, se preparó un buffer de fosfatos pH 7.0, 50 mM; adicionando la caseína en pequeñas porciones con agitación constante y calentamiento (ebullición en baño maría). Disuelta la caseína, se ebulló esta solución por 20 minutos. Posteriormente se esterilizó a 110 °C (10 psi) durante 10 minutos.

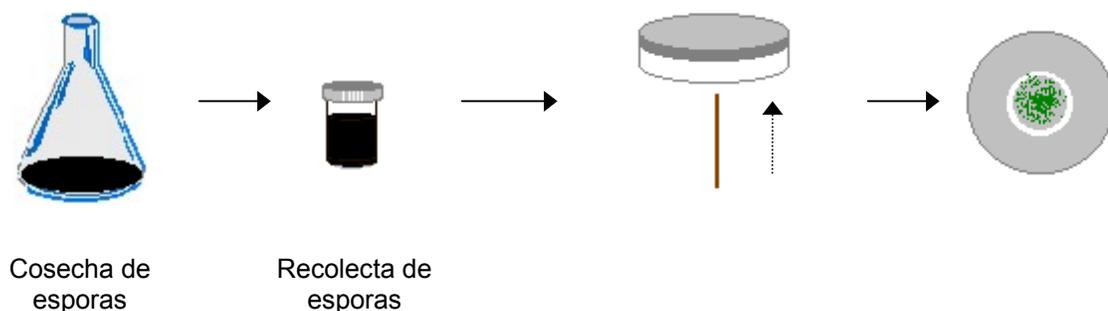
---

Las cajas de este medio de cultivo fueron preparadas del mismo modo que el agar leche descremada (Figura 5.1).

### 5.2.2 Inoculación de las cepas para la selección.

Para cada una de las cepas se realizó una cosecha de esporas con Tween 80 al 0.1% estéril.

En condiciones asépticas y con palillos de madera estériles, se inocularon las cajas de cultivo (previamente preparadas como se explica en el apartado 5.2.1) por el método de siembra por picadura (Prado, 2000) de manera invertida como se observa en la Figura 5.2 para evitar la propagación de las esporas de forma irregular; y de esta manera obtener un crecimiento radial de las cepas así como del halo de hidrólisis.



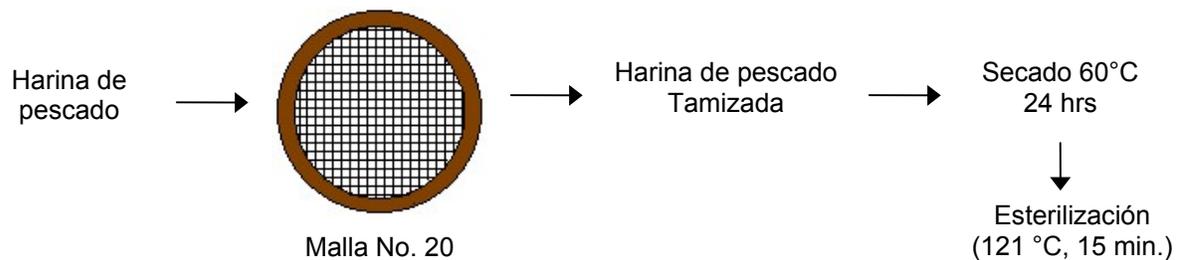
**Figura 5.2.** Método de siembra para la selección de cepas productoras de proteasas.

### 5.3 Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL que se llevaron a peso constante y esterilizados a 121 °C durante 15 minutos (Pandey, 2003; Lu y col., 2003). Además se preparó el sustrato, el soporte y el inóculo como se describe a continuación.

### 5.3.1 Preparación del sustrato (harina de pescado)

Para realizar la fermentación se ocupó harina de pescado como sustrato, el cual fue tamizado con una malla del número 20, posteriormente se sometió a un secado a 60°C durante 24 horas; y finalmente fue esterilizado en un frasco a 121°C por 15 minutos (Figura 5.3).



**Figura 5.3.** Preparación del sustrato

### 5.3.2 Preparación del soporte

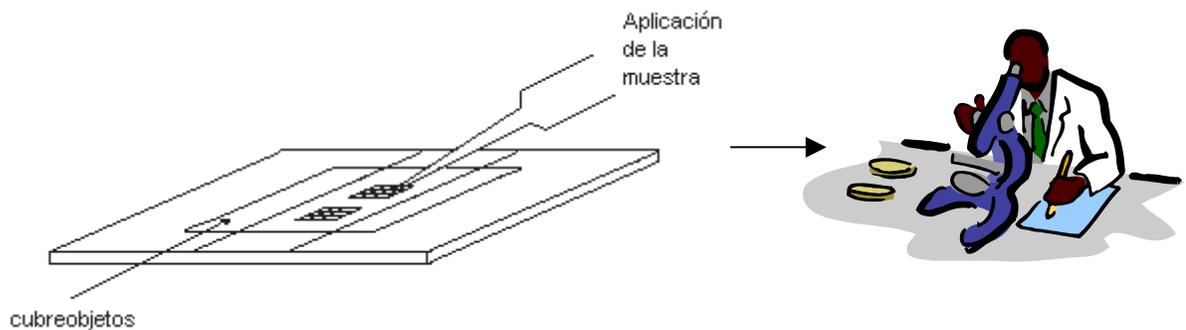
Se utilizó salvado de trigo como soporte para llevar a cabo la fermentación sólida, el cual recibió el mismo tratamiento que el sustrato. Asegurando de esta manera que el sustrato y el soporte tuvieran el mismo tamaño de partícula (Figura 5.3).

### 5.3.3 Preparación del inóculo

Se propagó la cepa a utilizar en matraces Erlenmeyer de 250 mL con Agar Papa Dextrosa (PDA) hasta la esporulación de la misma. Posteriormente se cosecharon las esporas con Tween al 0.1% estéril, y recolectadas en un frasco estéril para realizar el conteo como se explica a continuación.

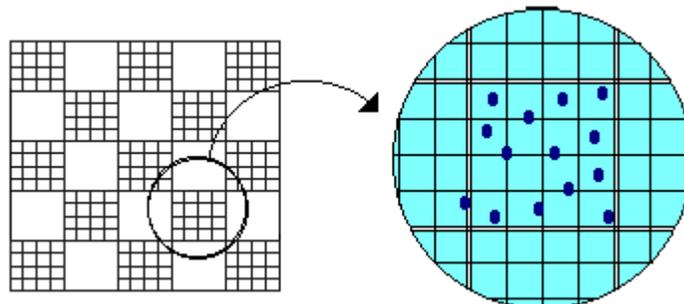
### 5.3.3.1 Conteo de esporas

Una vez cosechadas y recolectadas las esporas en un frasco estéril, se tomó aproximadamente 0.5 mL de la suspensión de esporas y se depositó en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de esporas con ayuda del microscopio óptico con el objetivo 40x (modelo Olympus U-PMTVC 2D03325 Japón), como se muestra en la Figura 5.4.



**Figura 5.4.** Cámara de Neubauer.

Este método se basa en observar al microscopio y contar las esporas presentes en un volumen predeterminado; el cual es un portaobjetos esmerilado que tiene un patrón de cuadrículas con dimensiones conocidas que indican un volumen estándar bajo un cubreobjetos. En esta cámara hay 25 cuadros grandes y cada uno tiene  $0.1 \text{ mm}^3$  ( $0.0001 \text{ mL}$ ), y cada cuadro grande contiene 16 cuadros más pequeños; para obtener la densidad de las esporas, estas son dispersadas por capilaridad y entonces pueden ser contadas al microscopio, como se muestra en la Figura 5.5 (González, 1996; Mádigan y col., 1999).



**Figura 5.5.** Observación microscópica de la cámara de Neubauer.

---

Para determinar el número de esporas por mL, se contaron las esporas contenidas en 10 cuadros grandes (delimitados por dos rayas paralelas), realizando un promedio y sustituyéndolo en la siguiente fórmula.

$$\# \text{ de esporas/ mL} = \text{promedio} * 25 * 10^4 * \text{fd}$$

donde:

promedio es la media aritmética del número de esporas

25 es el número de cuadros totales de la cámara de Neubauer

$10^4$  es el factor de volumen de la cámara de Neubauer

fd es el factor de dilución de la cosecha de esporas.

#### 5.3.4 Condiciones iniciales de la fermentación.

Las condiciones iniciales de la fermentación se muestran en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Condiciones de la fermentación sólida.

Condiciones iniciales	
Inóculo	$2 \times 10^7$ esporas/ g.m.s.*
Humedad	50%
Materia seca	15 gramos
PH	6.0
Temperatura	30 ° C

\* g.m.s. = gramo de materia seca

Una vez preparado todo el material necesario para realizar la Fermentación Sólida, en condiciones estériles se pesó 9 gramos de Harina de pescado y 6 gramos de salvado de trigo para completar en total 15 gramos de materia seca (g.m.s.). Estos fueron introducidos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril.

---

Se inoculó con una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas /gms y se ajustó la humedad al 50% con buffer de fosfatos pH 6.0, pero tomando en cuenta el volumen del inóculo.

Estos matraces fueron introducidos en una cámara de temperatura controlada a 30°C (Pizardi y col., 1999).

Posteriormente con una espátula estéril se mezcló la materia seca, el inóculo y el buffer para asegurar una homogeneidad al inicio de la fermentación, y se finalizó poniendo un tapón de algodón estéril al matraz.

Con la finalidad de cuantificar la actividad proteolítica respecto al tiempo, se realizó la fermentación en varios matraces, pero la obtención del extracto proteolítico se hizo a diferentes tiempos (20, 24, 28, 32 y 46 horas).

#### **5.4 Obtención del extracto proteolítico**

Terminada la fermentación, se realizó la obtención del extracto proteolítico. Pesando 15 gramos de materia fermentada adicionada de buffer de fosfatos pH 7.0, 50 mM en relación 1:1, homogenizándose con una espátula. La extracción se realizó mediante una prensa hidráulica (ERKCO modelo PH-51T) a una presión de 2,000 psi. Posteriormente, el extracto se filtró al vacío usando papel Whatman ® 41. A este filtrado se denominó “extracto proteolítico”.

#### **5.5 Determinación de la actividad enzimática**

Para la determinación de la actividad enzimática de los extractos proteolíticos, se emplearon 2 métodos, los cuales se describen a continuación.

---

### **5.5.1 Método de Kunitz**

Se prepararon las siguientes soluciones:

Caseína al 1% (1 gramo en 100 mL), disuelta en buffer de fosfatos pH 6.0, 50 mM con agitación constante y ebullición durante 10 minutos, así como ácido Tricloro Acético (TCA) 0.4M (Pandey, 2003; Gandolfi y Peralta, 2000).

Este método consta de una muestra y un testigo, con la finalidad de descartar la hidrólisis de la caseína por calentamiento. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

#### **5.5.1.1 Muestra**

- En un tubo de ensaye se adicionó 500  $\mu$ L de caseína incubada a 30°C por 10 minutos y 500  $\mu$ L del Extracto crudo enzimático (diluido 1:10 con buffer de fosfatos pH 7.0) dejándolo actuar por 10 minutos en un baño de temperatura controlada a 30°C.
- Para detener la reacción se adicionó al tubo, 1 mL de TCA con agitación
- Se centrifugo a 19,100 G (Medida relativa de la velocidad de sedimentación de una partícula, ver anexo A) durante 10 minutos

#### **5.5.1.2 Testigo**

- Se incubó la caseína previamente preparada a 30 °C por 10 minutos.
- En un tubo de ensaye se adicionó 500  $\mu$ L de caseína incubada y se dejó por 10 minutos en el baño de temperatura controlada a 30 °C
- Se adicionó 1mL de TCA
- Posteriormente se adicionó 500  $\mu$ L del extracto crudo enzimático (diluido 1:10 con buffer de fosfatos pH 7.0)
- Se centrifugo a 19,100 G durante 10 minutos.

---

### 5.5.2 Método de Lowry

Una vez terminado el método de Kunitz para ambos casos (muestra y testigo) se realizó la siguiente metodología (Gandolfi y Peralta, 2000).

- Se adicionó 500  $\mu$ L del sobrenadante de la muestra en un tubo de ensaye junto con 2.5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.4N y 500  $\mu$ L de reactivo de Folin (1:5 en agua destilada)
- Se dejó reaccionar en un baño de temperatura controlada a 30 °C durante 30 minutos
- Se leyó la absorbancia a 660 nm.
- La absorbancia se comparó con una curva patrón de Tirosina (Anexo B).

El mismo procedimiento se hizo para el testigo.

### 5.5.3 Curva Patrón de Tirosina

Se preparó una curva patrón de Tirosina (18.1 mg/L) como se muestra en la Tabla 5.2 (Gandolfi y Peralta, 2000).

**Tabla 5.2.** Curva Patrón de Tirosina.

Tubo	Tirosina (mL)	H <sub>2</sub> O destilada (mL)	Concentración ( $\mu$ g/mL)
A	0	1.0	Blanco
B	0.2	0.8	3.62
C	0.4	0.6	7.24
D	0.6	0.4	10.86
E	0.8	0.2	14.48
F	1.0	0	18.10

---

La metodología para la curva patrón fue la siguiente:

- Al tubo A se le adicionó 5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.4N y 1 mL de reactivo de Folin (1:5 en agua destilada)
- Se dejó reaccionar en un baño de temperatura controlada a 30 °C durante 30 minutos
- Se leyó la absorbancia a 660 nm.

El mismo procedimiento fue para los tubos B, C, D, E y F. La determinación se realizó por duplicado.

Obtenidas las absorbancias para cada tubo, se graficó el promedio de éstas respecto a la concentración de Tirosina correspondiente, como se muestra en el anexo B.

## **5.6 Determinación de las condiciones óptimas del extracto proteolítico obtenido**

### **5.6.1 Temperatura óptima**

Se siguió la metodología descrita como determinación de la actividad enzimática, a diferencia que en el método de Kunitz (apartado 5.5.1) se varió la temperatura de reacción entre la caseína y el extracto proteolítico para las muestras y testigos, siendo este desde 30 a 70°C (Pandey y col., 2003; Gandolfi y Peralta, 2000).

Posteriormente se realizó el método de Lowry sin ninguna alteración. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para la obtención de la temperatura óptima se graficó la actividad enzimática respecto a la temperatura.

---

## **5.6.2 pH óptimo**

Para esta determinación se siguió la metodología de la actividad enzimática, sólo que en este caso se varió el pH en el cual estaba disuelta la caseína al 1%.

Para el rango de pH 6.0 a 8.0, se utilizó un buffer de fosfatos 0.1M, y para pH 9.0 se utilizó un buffer de Tris 0.13M (Tris – hidroximetil amino metano) y HCl (0.1N), (Pandey y col.; 2003, Gandolfi y Peralta, 2000).

El método de Lowry no fue alterado en ningún paso. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para la obtención del pH óptimo se graficó la actividad enzimática correspondiente al pH que fue utilizado.

## **5.7 Determinación de las condiciones de estabilidad del extracto proteolítico obtenido**

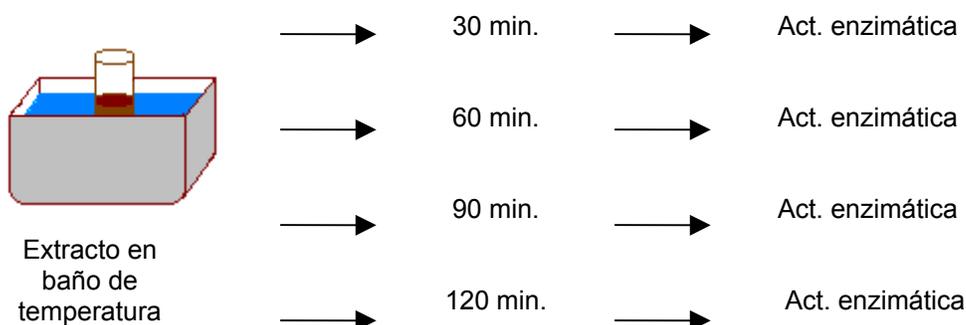
### **5.7.1 Estabilidad Térmica**

Esta determinación consistió en someter al extracto proteolítico obtenido en un baño de temperatura controlada a lo largo de 120 minutos (2 horas) y determinar su actividad enzimática cada 30 minutos para poder verificar su estabilidad térmica como se observa en la Figura 5.6. El rango de temperatura fue desde 5 a 70 °C. (Pandey y col., 2003).

La actividad enzimática se determinó siguiendo la metodología correspondiente, pero la reacción entre la caseína y el extracto proteolítico se realizó a la misma temperatura en que se encontraba incubado el extracto, es decir, si se encontraba el extracto a 60°C, la reacción según el método de Kunitz (apartado 5.5.1.) también fue

---

a 60°C. Pero el método de Lowry no sufrió modificaciones de temperatura de reacción.



**Figura 5.6.** Metodología de la determinación de la estabilidad térmica del extracto proteolítico obtenido

Esta determinación se realizó por triplicado.

### **5.8 Determinación de la especificidad del extracto proteolítico obtenido**

Una vez determinadas las condiciones óptimas de pH y temperatura del extracto proteolítico, se determinó la actividad enzimática variando la concentración de la caseína, la cual fue disuelta en el buffer en el cual fue el óptimo.

La reacción entre la caseína y el extracto proteolítico diluido 1:10 en buffer pH 7.0, se detuvo con TCA a 3 distintos tiempos, es decir, a los 2, 6 y 10 minutos. Para ello fue necesario poner 3 tubos con la caseína y el extracto, es decir, en el tubo 1 se detuvo la reacción a los 2 minutos, mientras que el tubo 2 se detuvo a los 6 minutos y finalmente en el tubo 3 a los 10 minutos. Este mismo procedimiento se realizó para el caso de los testigos, según el método de Kunitz.

Posteriormente se siguió la metodología de Lowry sin alteración alguna.

---

Una vez obtenidas las absorbancias para cada tubo, se comparó con la curva patrón de Tirosina (Anexo B), para poder determinar las velocidades iniciales para cada concentración de caseína.

Dichas velocidades iniciales fueron graficadas respecto a la concentración de caseína empleada, como se observa en la Figura 2.5.

Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

Del mismo modo se graficaron los inversos tanto de las velocidades iniciales como de la concentración de caseína, para poder determinar el  $K_M$  y  $V_{max}$  según la gráfica de Lineaweaver – Burk. (Figura 2.7).

### **5.9 Determinación de la especificidad de la enzima comercial (Flavorzyme®)**

Se realizó exactamente la misma determinación de la especificidad del extracto proteolítico, a diferencia que se empleó la enzima comercial Flavorzyme<sup>®</sup> en lugar del extracto.

La enzima se usó en una concentración de 70 mg/mL, diluida 1:10 en buffer de fosfatos pH 6.0, 0.1M, el cual es el pH óptimo para esta enzima, así como la reacción entre la caseína y la enzima se realizó a 50 °C (temperatura óptima para esta enzima).

Las gráficas se realizaron del mismo modo que en la determinación anterior.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

---

*CAPÍTULO 6*

***RESULTADOS Y DISCUSIONES***

---

---

---

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para cumplir con los objetivos establecidos en el presente trabajo, se realizó una caracterización de crecimiento y formación de halo de hidrólisis de las 4 cepas ensayadas en los medios de cultivo establecidos en la metodología, dando los siguientes resultados.

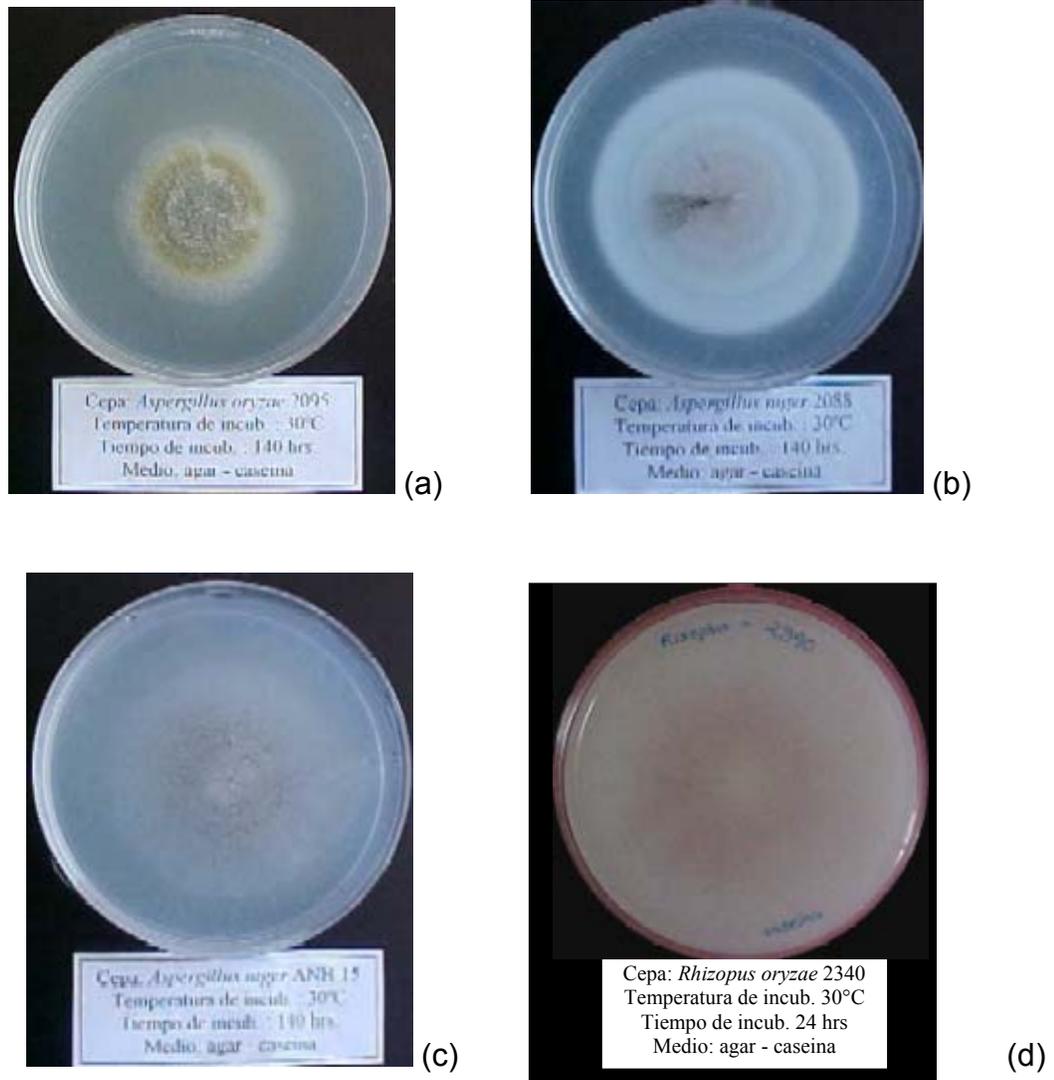
### 6.1 Crecimiento de las cepas en medio agar caseína

Para realizar la caracterización de crecimiento de las 4 cepas ensayadas (*Aspergillus oryzae* 2095, *Aspergillus niger* 2088, *Aspergillus niger* ANH-15 y *Rhizopus oryzae* 2340) fue necesario propagar primeramente las cepas en agar de papa - dextrosa (PDA), así como la preparación de las cajas de medio agar caseína. Posteriormente a la cosecha de esporas de cada una de las cepas, con la ayuda de un palillo estéril se inocularon las cajas de este medio, pero de manera invertida como se observa en la Figura 5.2, para evitar que las esporas de la cepa fueran propagadas en toda el área de la caja; ya que el uso de éste método favorece que el crecimiento de la cepa sea de manera radial, ocurriendo lo mismo en la formación de halos de hidrólisis.

Todas las cajas con este medio (agar caseína) se incubaron 140 horas (aproximadamente 6 días) a 30 °C, excepto para la cepa de *Rhizopus oryzae* 2340 cuyo periodo de incubación fue de 24 horas. Ya que esta cepa presentó mayor velocidad de crecimiento en las primeras 24 horas sin formación de halo de hidrólisis, como se observa en la Figura 6.1 (d).

Para las 3 cepas de *Aspergillus* (Figura 6.1 a, b y c), sólo presentaron crecimiento de manera radial, y debido a que este medio es translúcido no se pudo apreciar la formación de halos de hidrólisis por éste método, a pesar de que solo existe una fuente de nitrógeno, si se compara con los halos formados en el medio leche descremada (Figura 6.3).

Para este tipo de medios (translúcidos) es recomendable acidificar la superficie con HCl para poder apreciar la precipitación de proteínas.



**Figura 6.1.** Cepas inoculadas en medio agar caseína (a) *Aspergillus oryzae* 2095, (b) *Aspergillus niger* 2088, (c) *Aspergillus niger* ANH-15 y (d) *Rhizopus oryzae* 2340.

---

## 6.2 Crecimiento de las cepas en medio agar harina de pescado

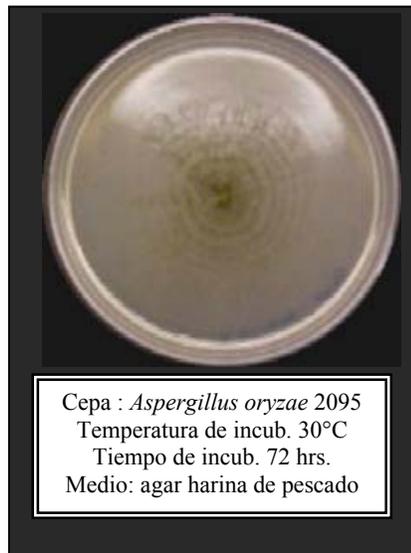
Del mismo modo, se realizó el experimento pero se utilizaron cajas con agar harina de pescado, con la finalidad de observar a través de halos de hidrólisis si las cepas son productoras de proteasas.

En la Figura 6.2. se muestra sólo el crecimiento de las cepas inoculadas en medio agar harina de pescado (a) *Aspergillus oryzae* 2095, (b) *Aspergillus niger* 2088, (c) *Aspergillus niger* ANH-15 y (d) *Rhizopus oryzae* 2340.

La formación de halos de hidrólisis no fue evidente para este medio, por tratarse de un medio complejo que contiene diversas fuentes de carbono y de nitrógeno que pueden ser utilizadas por las cepas para realizar su metabolismo (San Pedro, 1986; Pizardi, 1999).

Según la bibliografía (Pizardi y col., 1999), establece que el harina de pescado contiene cerca del 85% de proteína de alta calidad con una elevada proporción de aminoácidos esenciales de forma digerible, particularmente cisteína, lisina, treonina y triptófano; razón por lo cual no hay dicha formación de halos de hidrólisis, es decir que al haber aminoácidos libres además de otros nutrientes las cepas no tienen la necesidad de activar sistemas enzimáticos o proteolíticos para obtener estos nutrientes (Sánchez y Demain, 2002) ya que se encuentran de manera libre en el medio.

Para que estos halos de hidrólisis pudieran ser observables, el medio empleado debería de contener las fuentes de carbono y nitrógeno pero no de manera libre, para obligar a la cepa a producir proteasas y llevar a cabo su función (fragmentar las proteínas en péptidos de menor tamaño), obteniendo así los nutrientes necesarios para su metabolismo.



(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 6.2.** Crecimiento de las cepas inoculadas en medio agar harina de pescado (a) *Aspergillus oryzae* 2095, (b) *Aspergillus niger* 2088, (c) *Aspergillus niger* ANH-15 y (d) *Rhizopus oryzae* 2340.

---

### 6.3 Crecimiento de las cepas en medio agar leche descremada

Con la finalidad de observar los halos de hidrólisis, se propuso el uso del medio agar leche descremada, ya que se trata de un medio complejo donde los nutrientes no se encuentran de manera libre.

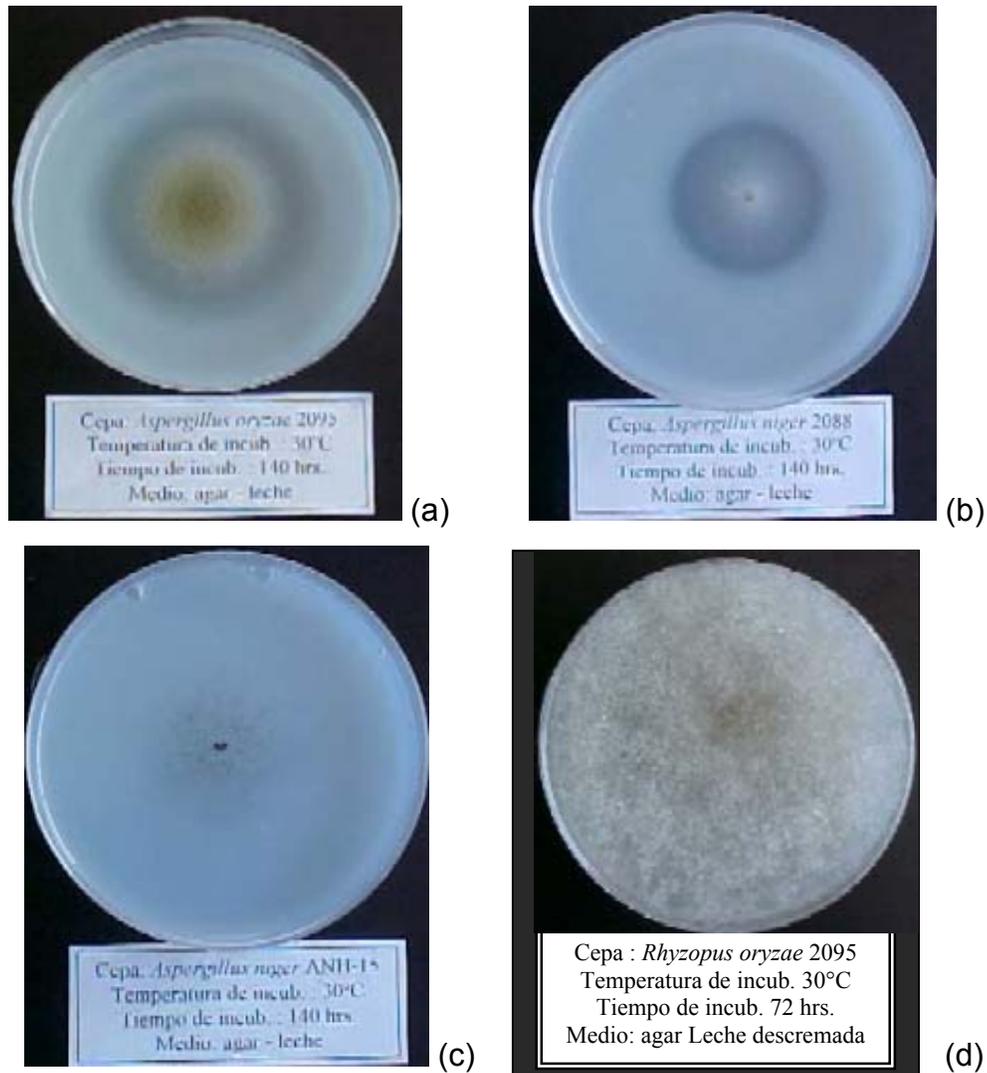
En el medio agar leche descremada, a diferencia de los otros 2 medios empleados (agar caseína y agar harina de pescado), en éste medio fue claramente observable la formación de halos de hidrólisis de manera transparente como se aprecia en la Figura 6.3, es decir, que las cepas para poder obtener los nutrientes necesarios de este medio para realizar su metabolismo tuvieron que producir proteasas, manifestándose esta producción por la formación de halos.

Para el caso de la cepa *Rhizopus oryzae* 2340, no se pudo determinar un halo de hidrólisis debido a su rápido crecimiento, ya que en menos de 24 horas de incubación de las cajas con esta cepa, eran invadidas en su totalidad por el micelio como se observa en la Figura 6.3 d; y para la cepa *Aspergillus niger* ANH-15, el crecimiento fue muy escaso, como consecuencia el diámetro del halo de hidrólisis formado fue muy pequeño (Figura 6.3 c).

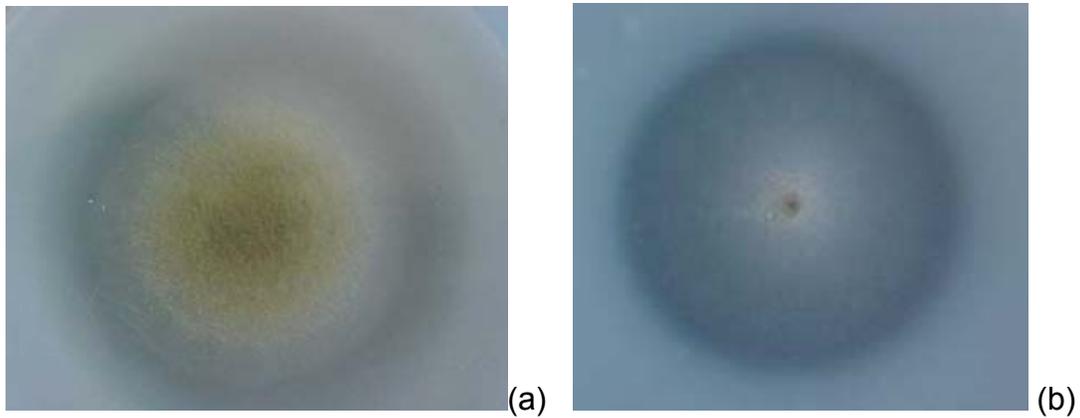
Cabe señalar que el halo que se observó fue distinto entre la cepa *A. oryzae* 2095 y *A. niger* 2088, que fueron las cepas en que se presentó este halo de hidrólisis; para la primera cepa la formación de halo estuvo aparentemente relacionado con el crecimiento del micelio y ocurrió lo contrario para la segunda cepa, como se observa en la Figura 6.4 a y b.

Es decir, que la liberación de proteasas y la actividad de estas mismas que se evidenciaron por la aparición de halos de hidrólisis alrededor de las colonias (García y col., 1992), pudiera estar ligada al crecimiento de la cepa como lo publicó Echeverría (2002), realizando la medición de los diámetros correspondientes a las cepas y los halos de hidrólisis de fosfolípidos. Así mismo el tiempo de incubación

necesario para dicha detección de la actividad enzimática fue de 6 días, sin que se pudiera observar ninguna ventaja al prolongar el tiempo de incubación.



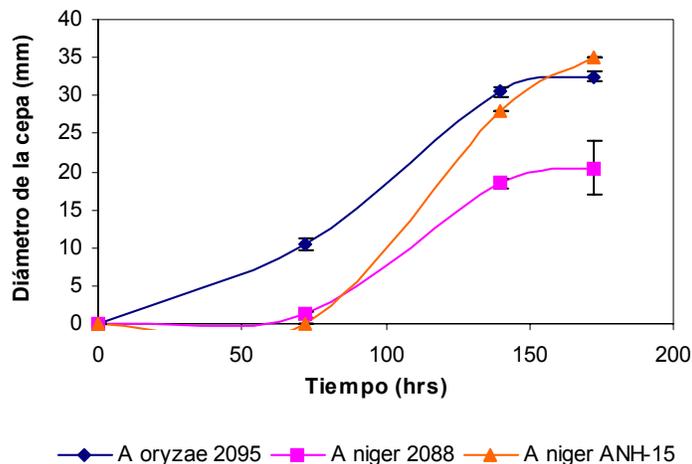
**Figura 6.3.** Cepas inoculadas en medio agar Leche descremada (a) *Aspergillus oryzae* 2095, (b) *Aspergillus niger* 2088, (c) *Aspergillus niger* ANH-15 y (d) *Rhizopus oryzae* 2340.



**Figura 6.4.** Comparación de los halos de hidrólisis. (a) *A. oryzae* 2095 y (b) *A. niger* 2088.

#### 6.4 Comparación de la relación crecimiento de las cepas y formación de halos de hidrólisis.

Debido a que se observó una mejor formación de halos de hidrólisis en el medio agar leche descremada, se realizó una comparación entre el diámetro de crecimiento de la cepa y el diámetro de formación de halo de hidrólisis, como se observa en la Figura 6.5. Estas determinaciones se realizaron por duplicado.

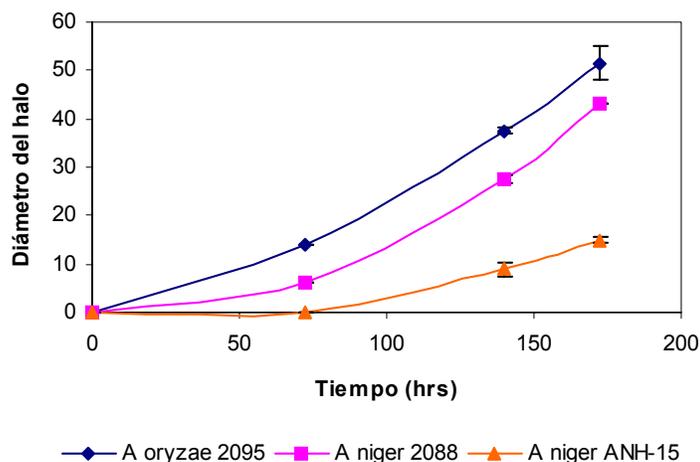


**Figura 5.5.** Gráfica comparativa del diámetro de crecimiento de las cepas

En la Figura 6.5 se observa que la cepa *A. oryzae* 2095 presentó un crecimiento progresivo a diferencia de las otras 2 cepas, como es el caso de *A niger* ANH-15 que hasta después de las 100 horas de incubación presentó crecimiento e incluso al finalizar el tiempo de incubación, el diámetro de la cepa era de 35 mm; si se compara con *A. oryzae* 2095 cuyo diámetro de crecimiento de la cepa fue de 32.5 mm. Para la cepa *A. niger* 2088 su crecimiento fue hasta las 100 horas, pero su diámetro al finalizar solo fue de 20 mm.

En la Figura 6.5 y 6.6 se eliminó a la cepa de *Rhizopus oryzae* 2340, por la dificultad que presentó al determinar tanto su crecimiento como la formación del halo de hidrólisis, porque en menos de 24 horas la formación de micelio invadía en su totalidad la caja de petri.

Los diámetros de la formación de halos de hidrólisis se presentan en la Figura 5.6.



**Figura 6.6.** Gráfica comparativa de la formación de halos de hidrólisis.

La Figura 6.6 representa una comparación de la formación de halos de hidrólisis para las 3 cepas, donde se observa que el halo formado por la cepa *A. oryzae* 2095 es aproximadamente 10mm mayor que el halo formado por la cepa *A. niger* 2088. Aunque en la Figura 6.3c no se aprecia el halo de hidrólisis para la cepa *A. niger* ANH-15, su diámetro fue de 15mm.

Para una mejor apreciación, se hizo una relación entre el halo de hidrólisis respecto al diámetro de crecimiento para cada una de las cepas, como se reporta en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1.** Relación entre el halo de hidrólisis <sup>a</sup> y el crecimiento de la cepa <sup>a</sup>.

Cepa	Diámetro de la cepa (mm)	Diámetro del halo (mm)	Relación (dh / dc)*
<i>A. oryzae</i> 2095	32.5	51.5	1.6
<i>A. niger</i> 2088	20.5	43	2.1
<i>A. niger</i> ANH-15	35	15	0.4

\* dh = diámetro del halo de hidrólisis  
dc = diámetro de la cepa

<sup>a</sup> = 6 días de incubación a 30 °C

Si la relación entre el diámetro del halo de hidrólisis y el diámetro de crecimiento de la cepa es mayor a 1, se puede considerar como una cepa productora de proteasas, como es el caso de *A. oryzae* 2095 y *A. niger* 2088 (Echeverría y col., 2002), donde la relación es de 1.6 y 2.1 respectivamente.

En términos cualitativos se pudo considerar a la cepa de *A. niger* 2088 como la cepa que libera más proteasas, seguida de *A. oryzae* 2095 y finalmente a la cepa de *A. niger* ANH-15.

Para comprobar esta producción de proteasas, se propuso realizar una fermentación en medio sólido utilizando harina de pescado como sustrato para cada una de las cepas.

## 6.5 Fermentación en medio sólido.

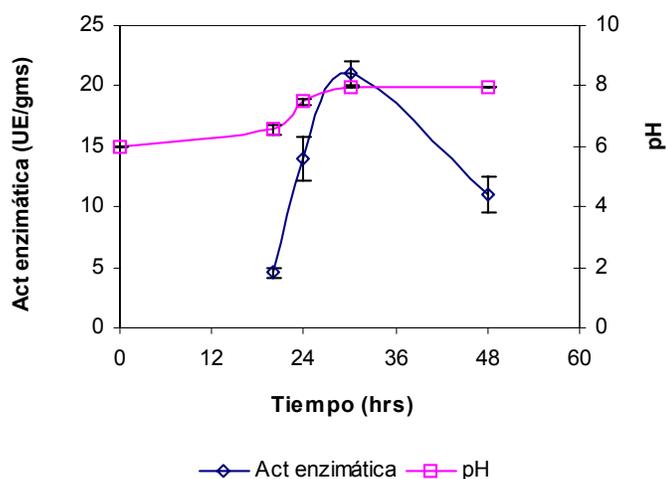
Se realizó la fermentación en medio sólido de acuerdo a la metodología establecida, así como la determinación de la actividad enzimática del extracto proteolítico obtenido de dicha fermentación. Una vez determinada la actividad

catalítica, esta se puede expresar en unidades de actividad enzimática, es decir, como la cantidad de enzima que cataliza la utilización de  $1\mu\text{mol}$  o  $\mu\text{gramo}$  de sustrato por minuto en las condiciones estándar de análisis (Fennema, 1993).

Para este trabajo experimental se definió una unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima que provoca el color equivalente a  $1\mu\text{g}$  de Tirosina por minuto en 2 mL de digestión a pH 6.0 (buffer de fosfatos) a  $30^\circ\text{C}$ . Estos datos (UE) están en base a gramos de materia seca (gms).

### 6.5.1 Fermentación con la cepa *Aspergillus oryzae* 2095

Para realizar la fermentación en medio sólido con la cepa *Aspergillus oryzae* 2095, se empleó harina de pescado como sustrato (tomando en cuenta que es un medio que contiene cerca del 85% de proteína de alta calidad con elevada proporción de aminoácidos libres) y salvado de trigo como soporte, además de las condiciones iniciales que se muestran en la Tabla 5.1. De esta fermentación se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo que fueron nombrados como extractos proteolíticos, en los que se determinó la actividad enzimática reportados como UE/gms como se muestra en la Figura 6.7, así como la variación de pH durante la fermentación de la cepa ensayada.



**Figura 6.7.** Actividad enzimática del extracto proteolítico de *A. oryzae* 2095

---

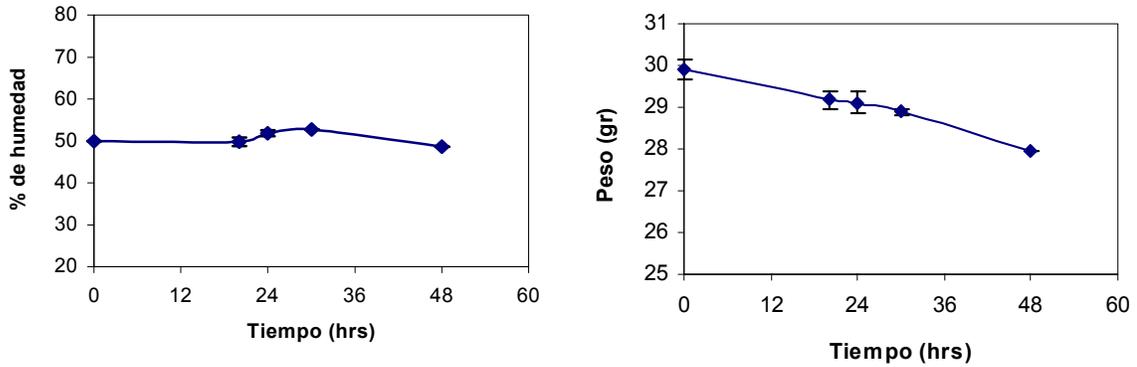
En la Figura 6.7 se reporta la actividad enzimática respecto al tiempo de fermentación, así como la variación de pH; observándose que a las 30 horas de fermentación se obtuvo la máxima actividad enzimática, aproximadamente 21.06 UE/gms, mientras que el pH aumentó en relación de 2 unidades, es decir, de pH 6.0 inicial a pH 8.0 final, por lo que el extracto proteolítico obtenido es alcalino.

Se han reportado proteasas alcalinas producidas por *Conidiobolus coronatus* obtenidas de fermentación sumergida cuya máxima actividad enzimática oscila entre las 30 UE/mL, donde las condiciones óptimas de esta producción es a las 48 horas a 28°C y 200 rpm, siendo el pH inicial de 7.0 a 7.5 (Phadatare y col., 1993).

Los valores de la actividad enzimática para *Aspergillus oryzae* 2095 y *Conidiobolus coronatus*, pueden ser relativamente comparables, tomando en cuenta que se obtuvieron por procesos distintos, fermentación sólida y fermentación sumergida, respectivamente.

Por otro lado se cuantificó la pérdida de peso en el matraz como una medida indirecta de la formación de CO<sub>2</sub>, como se observa en la Figura 6.8 b, dicha pérdida de peso fue continua, es decir, que hubo pérdida de O<sub>2</sub> pero formación de CO<sub>2</sub> como resultado del metabolismo del microorganismo; siendo una cuantificación indirecta de la formación de biomasa (Viniegra y col., 2003; Pandey, 2002).

En la Figura 6.8a, demuestra que la humedad casi se mantuvo constante, asegurando de esta manera el desarrollo de la cepa fúngica empleada en este fermentación, e inhibiendo la formación de bacterias contaminantes (Viniegra y col., 2003).



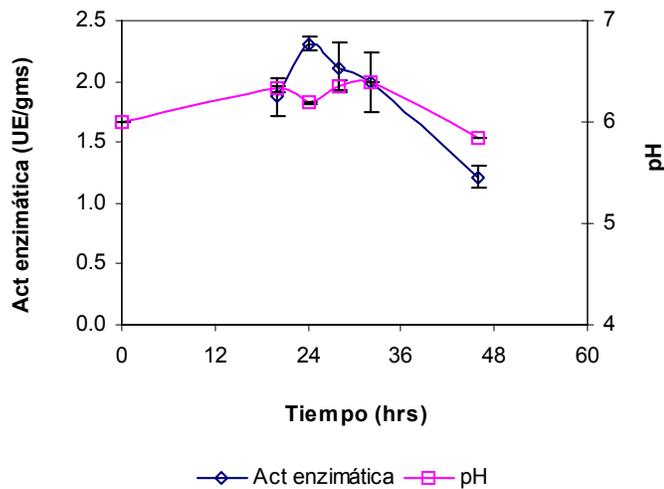
(a)

(b)

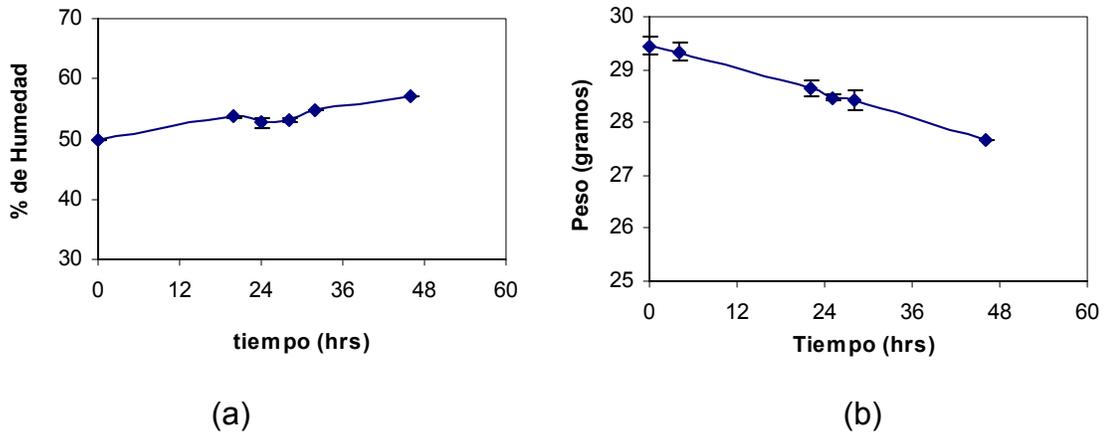
**Figura 6.8.** Perfil del porcentaje de humedad (a) y pérdida de peso en el matraz (b), durante la fermentación de *A. oryzae* 2095.

### 6.5.2 Fermentación con la cepa *Aspergillus niger* 2088

Del mismo modo se realizó la fermentación sólida con la cepa *Aspergillus niger* 2088, así como la cuantificación del pH y % de humedad a lo largo de la fermentación, como se observa en las Figuras 6.9 y 6.10.



**Figura 6.9.** Actividad enzimática del extracto proteolítico de *A. niger* 2088



**Figura 6.10.** Perfil del porcentaje de humedad (a) y pérdida de peso en el matraz (b), durante la fermentación de *A. niger* 2088.

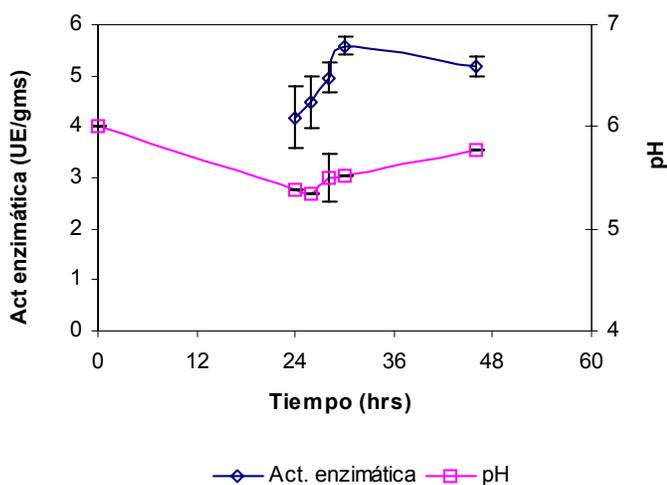
En la Figura 6.9 se puede observar que la máxima actividad enzimática de la cepa *Aspergillus niger* 2088 fue de 2.31 UE/gms a las 24 horas, posteriormente la actividad disminuyó considerablemente hasta 1.2 UE/gms; aunque con la Figura 6.10b demuestra que si hubo crecimiento de la cepa a lo largo de la fermentación, ya que la pérdida de peso del matraz indica que hubo formación de CO<sub>2</sub> como resultado del metabolismo de la cepa (Viniegra y col., 2003; Pandey, 2002).

Respecto a la variación del pH durante la fermentación sólida fue mínima (Figura 5.9), siendo en un inicio de 6.0 y al final de la fermentación de 5.84. De acuerdo al trabajo publicado por Aalbaek (2002), el pH óptimo de actividad para el caso de proteasas ácidas provenientes de cepas de *Aspergillus niger* se detecta a pH 2.7 en buffer de citrato de sodio y ácido cítrico 0.1M. Pero para este trabajo experimental con la finalidad de poder comparar la actividad enzimática de las cepas ensayadas, sólo se manejó un pH para esta determinación (pH 6.0 en buffer de fosfatos). Por lo que no se puede asegurar que se trate de una proteasa cuya máxima actividad enzimática sea en el rango de pH ácido.

Por otro lado, la humedad del medio tuvo un ligero aumento de aproximadamente 7%, partiendo de 50% y al final de la fermentación fue del 57% como se aprecia en la Figura 6.10 a.

### 6.5.3 Fermentación con la cepa *Aspergillus niger* ANH-15

Se realizó la fermentación de medio sólido usando la cepa de *Aspergillus niger* ANH-15, así como harina de pescado como sustrato y salvado de trigo como soporte. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (extractos proteolíticos) y se determinó la actividad enzimática de los mismos según la metodología establecida; dando los resultados que se muestran en la Figura 6.11.

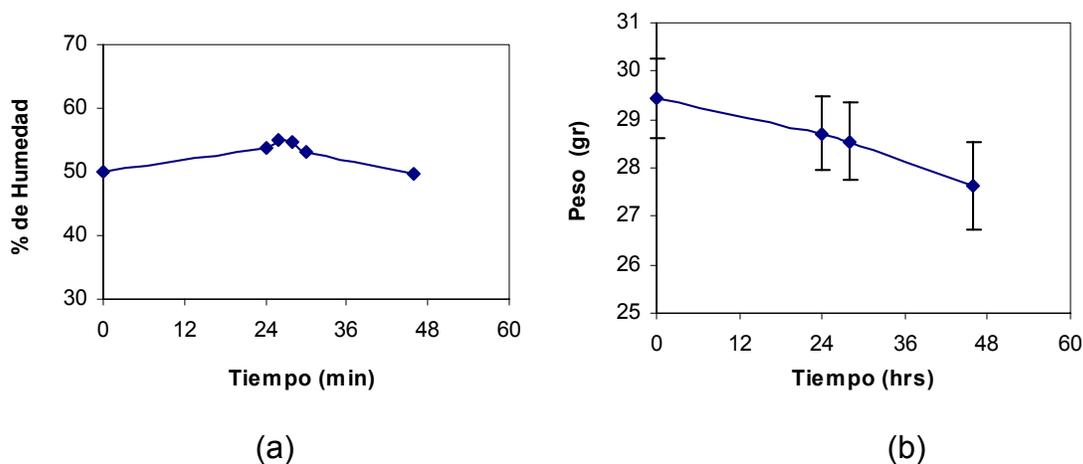


**Figura 6.11.** Actividad enzimática del extracto proteolítico de *A. niger* ANH-15

De la Figura 6.11, se observa que la máxima actividad enzimática del extracto proteolítico obtenido de la cepa *A. niger* ANH-15, fue a las 30 horas de fermentación, siendo de 5.58 UE/gms; a partir de este tiempo, la actividad se mantuvo constante hasta las 48 horas.

Las máximas actividades enzimáticas a pH 2.7, de cepas de *Aspergillus niger* reportadas en la bibliografía (Aalbaek y col., 2002) es de aproximadamente 70 UE/mL, y para pH 7.0 de 28 UE/mL. Por lo que la actividad para la cepa ensayada *A. niger* ANH-15, es mucho menor que lo reportado, pero cabe aclarar que el medio utilizado por Aalbaek y colaboradores era un medio complejo ya que su composición química constaba de extracto de levadura,  $MgSO_4$  y  $K_2HPO_4$ .

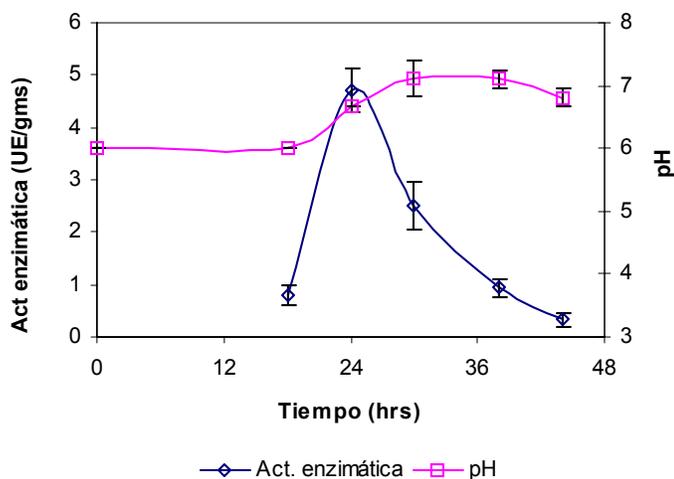
Por otro lado la formación de biomasa fue constante, como se observa en la Figura 6.12 b, donde la pérdida de peso en el matraz donde se realizó la fermentación sólida es continua, y por consiguiente lo es la formación de CO<sub>2</sub> (Viniegra y col., 2003; Pandey, 2002), así como la humedad del medio también fue constante durante la fermentación, evitando con ello el crecimiento de bacterias contaminantes (Figura 6.12 a).



**Figura 6.12.** Perfil del porcentaje de humedad (a) y pérdida de peso en el matraz (b), durante la fermentación *A. niger* ANH-15

#### 6.5.4 Fermentación con la cepa *Rhizopus oryzae* 2340.

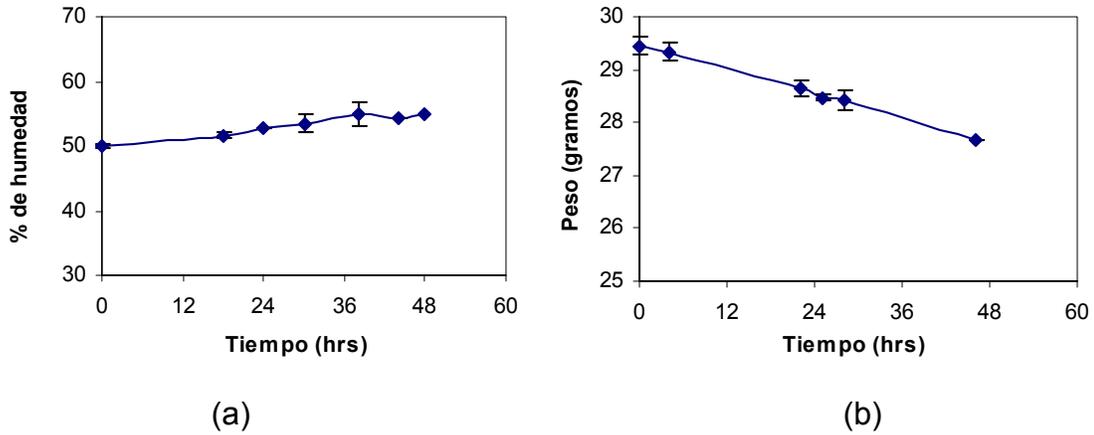
Para esta cepa se realizó la fermentación en medio sólido con harina de pescado, donde se determinó la actividad enzimática a los extractos proteolíticos obtenidos a diferentes tiempos de la fermentación; resultando que la máxima actividad enzimática de la cepa *Rhizopus oryzae* 2340 fue a las 24 horas, siendo de 4.7 UE/gms pero posterior a este tiempo de fermentación la actividad decae considerablemente hasta llegar a 0.6 UE/gms a las 46 horas, sin embargo el pH tuvo una variación de 1 unidad, partiendo de pH 6.0 inicial y pH 7.0 al final de la misma fermentación; tratándose de una cepa productora de proteasas alcalinas (Tunga y col., 1998), esto se muestra en la Figura 6.13.



**Figura 6.13.** Actividad enzimática del extracto proteolítico de *R. oryzae* 2340

La cepa de *R. oryzae* 2340 ha sido reportada como una cepa productora de proteasas alcalinas (Tunga y col., 1998; Tunga y col., 1999 (a); Tunga y col., 1999 (b)), bajo fermentación sólida cuyos parámetros de optimización son 32°C, humedad relativa de 90 a 95%, una concentración de esporas de  $2 \times 10^5$  por gramo de salvado de trigo y humedad del 40%. Su máxima actividad enzimática reportada es de 300 U/gms, cabe aclarar que la unidad U no se especifica en dicha publicación. Por lo que de acuerdo a lo establecido en la bibliografía y lo obtenido de manera experimental, la cepa de *Rhizopus oryzae* 2340, es productora de proteasas alcalinas.

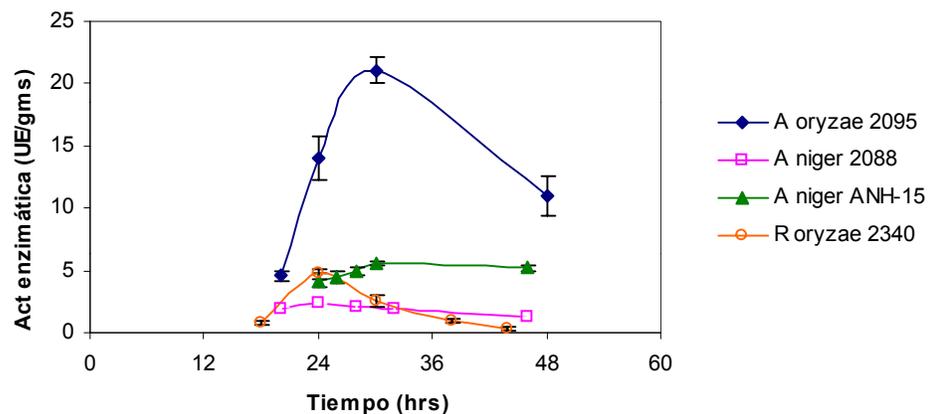
Del mismo modo, la formación de biomasa fue constante, como se observa en las Figuras 6.14 a y b, donde se presenta la variación de la pérdida de peso en el matraz que indica la formación de CO<sub>2</sub> (Viniegra y col., 2003; Pandey, 2002), es decir que el crecimiento de la cepa fue gradual, así como la humedad del medio solo tuvo un incremento de 4%, partiendo del 50% de humedad y al final de la fermentación fue de 54%, evitando el desarrollo de bacterial contaminantes que llegaran a influir en a producción de proteasas.



**Figura 6.14.** Perfil del porcentaje de humedad (a) y pérdida de peso en el matraz (b), durante la fermentación *R. oryzae* 2340.

### 6.5.5 Comparación de la fermentación de las cepas ensayadas.

La Figura 6.15 es un resumen de los resultados de las fermentaciones con cada una de las cepas ensayadas, donde se observa claramente que la cepa que presentó mayor actividad enzimática fue *A. oryzae* 2095 con aproximadamente 20 UE/gms a las 30 horas de fermentación, seguida por *A. niger* ANH-15, *R. oryzae* 2340 y finalmente *A. niger* 2088.



**Figura 6.15.** Gráfica comparativa de las fermentaciones sólidas.

---

Cabe señalar que de las 4 cepas, 2 de ellas son productoras de proteasas alcalinas (*A. oryzae* 2095 y *R. oryzae* 2340) mientras que las 2 restantes lo son para proteasas neutras (*A. niger* 2088 y *A. niger* ANH-15).

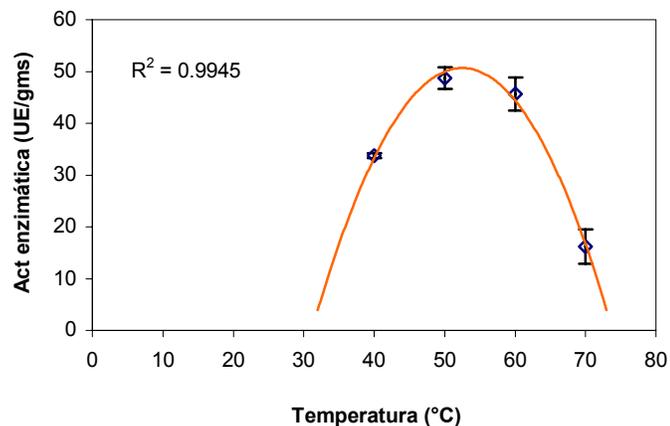
A pesar que en la caracterización física por formación de halos tanto la cepa *A. oryzae* 2095 y *A. niger* 2088 fueron las cepas en las que se observó mejor formación de halos de hidrólisis (Figura 6.4) así como la relación del diámetro del halo de hidrólisis respecto al diámetro de crecimiento de la cepa fue mayor a 1 (Tabla 6.1), y se consideraron como cepas productoras de proteasas, solo *A. oryzae* 2095 tuvo una mayor producción de proteasas en la fermentación, usando harina de pescado para inducir su especificidad.

Por lo tanto, la proteasa obtenida de *A. oryzae* 2095 considerada la cepa en la que se presenta la mayor actividad enzimática, es la que se utilizó para realizar una caracterización de pH, temperatura óptima, estabilidad térmica así como para realizar la comparación de especificidad respecto a una enzima comercial.

## **6.6 Caracterización del extracto proteolítico obtenido de *A. oryzae* 2095.**

### **6.6.1 Temperatura óptima**

Una vez que se obtuvo la proteasa de *A. oryzae* 2095, que fue la cepa con mayor actividad enzimática en un tiempo de fermentación de 30 horas, ésta se caracterizó bajo la metodología establecida, probando un intervalo de temperatura desde 40 a 70°C, dando los resultados que se muestran en la Figura 6.16.

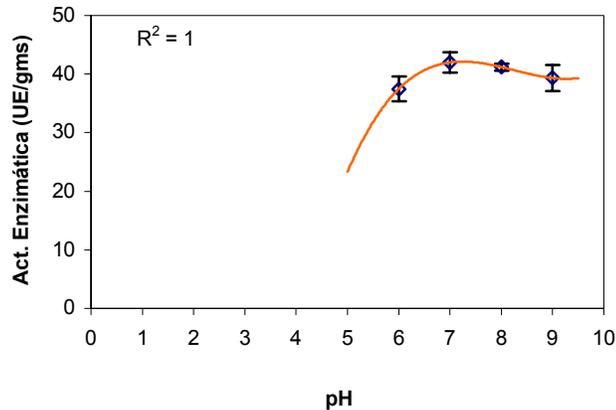


**Figura 6.16.** Temperatura óptima del extracto proteolítico obtenido de *A. oryzae* 2095

La temperatura óptima para este extracto proteolítico es de 54°C, según la línea de tendencia, si se compara con lo reportado en la bibliografía. Para el caso de una proteasa proveniente de *Bacillus cereus* BG1, su temperatura óptima de actividad enzimática es de 60°C (Ghorbel y col.,2003); y para una proteasa alcalina termoestable de *Bacillus pumilus*, su máxima actividad enzimática se reporta en un rango de temperatura de 55 a 60°C (Kumar, 2002).

### 6.6.2 pH óptimo

Una vez determinada la temperatura óptima del extracto proteolítico obtenido, se utilizó esta misma para realizar la determinación del pH óptimo según la metodología. Los resultados de la Figura 6.17 demuestran que el pH óptimo de la proteasa es de 7.0; además que la actividad enzimática casi se conserva estable si se incrementa el pH hacia un rango alcalino (pH 8 –9), confirmando de esta manera junto con la Figura 6.7 la naturaleza de la proteasa (proteasa alcalina).



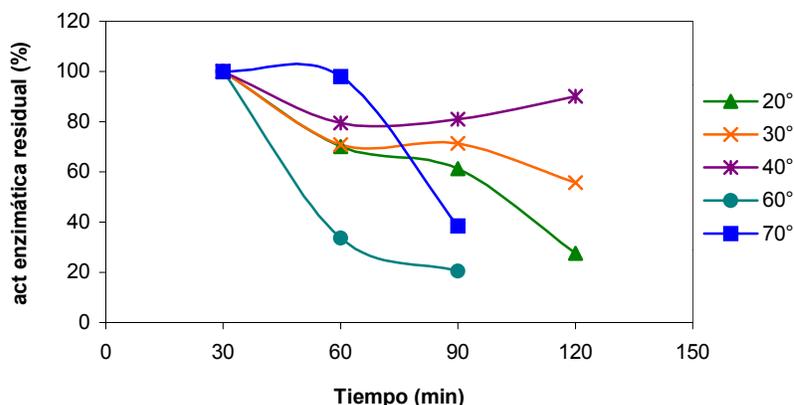
**Figura 6.17.** pH óptimo del extracto proteolítico obtenido.

Del mismo modo, el pH óptimo de este extracto puede ser comparado con lo establecido con la bibliografía. Para el caso de la proteasa obtenida por *Bacillus cereus* BG1, su pH óptimo de actividad está en el rango de 7.0 a 8.0 (Ghorbel y col., 2003); y para proteasas obtenidas por la cepa de *Coridiobolus coronatus* es de 7.0 (Phadatara y col., 1993).

### 6.6.3 Estabilidad térmica

Siguiendo la metodología para esta determinación, la cual consistió en incubar a diferentes intervalos de temperatura por aproximadamente 2 horas al extracto proteolítico de la cepa *Aspergillus oryzae* 2095 obtenido a las 30 horas de fermentación sólida, y en el cual se determinaba la actividad enzimática cada 30 minutos, dando los resultados que se muestran en la Figura 6.18.

De acuerdo a la Figura 6.18, se puede observar que el extracto proteolítico obtenido de la cepa de *A. oryzae* 2095 es estable en un rango de temperatura de 30 a 50 °C, mientras que a partir de los 60°C la actividad disminuye considerablemente hasta en un 60% de actividad respecto al tiempo.



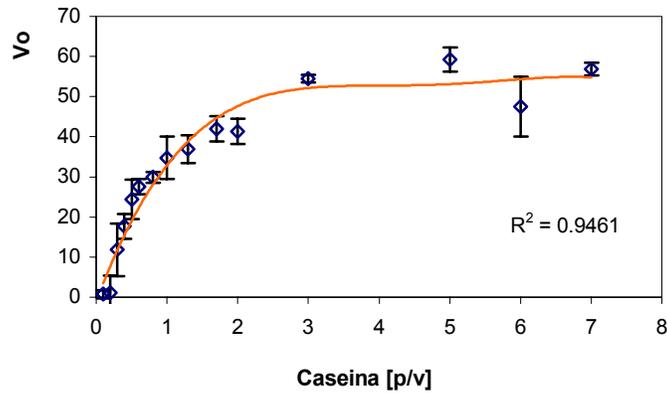
**Figura 6.18.** Actividad enzimática residual del extracto proteolítico.

Por ello Pandey (2003) y Patnaik (2002) sugieren que las determinaciones de actividades enzimáticas no deben ser de larga duración, para evitar que la proteasa se inestabilice térmicamente, llegando a provocar la desnaturalización de la misma.

Cabe mencionar que para el caso de la actividad residual a 70°C tiene un incremento en su actividad, es decir que a esa temperatura la estructura molecular de la proteasa obtenida sufre un cambio que permite un aparente incremento de actividad (Lenhinger, 1991), el cual no se considera como una temperatura en la cual sea estable la proteasa, ya que después de después de los 60 minutos de incubación pierde el 60% de su actividad.

## 6.7 Determinación de la especificidad del extracto proteolítico obtenido

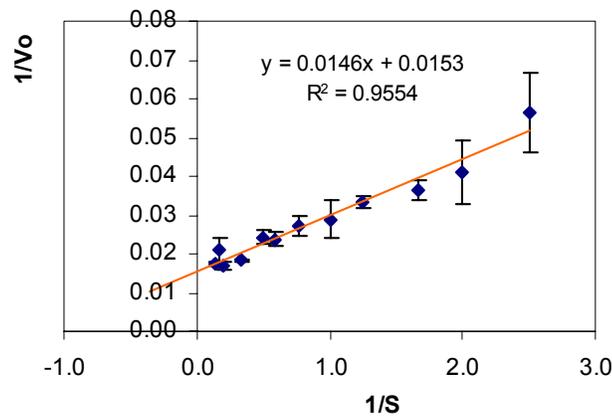
Utilizando el extracto proteolítico obtenido de la cepa *A oryzae* 2095 después de 30 horas de fermentación, se determinó las velocidades iniciales para cada una de las concentraciones experimentadas como se indica en la metodología, dando los resultados mostrados en la Figura 6.19.



**Figura 6.19.** Gráfica de Michaelis – Menten para el extracto proteolítico obtenido

La Figura 6.19 muestra la gráfica de Michaelis – Menten para el extracto proteolítico obtenido de la cepa *Aspergillus oryzae* 2095, utilizando los valores obtenidos de su caracterización (pH 7.0 y temperatura óptima de 54 °C), variando las concentraciones del sustrato (caseína (p/v)).

Para obtener los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  se graficaron los inversos de las velocidades iniciales y de la concentración de caseína, como se aprecia en la Figura 6.20.



**Figura 6.20.** Gráfica de Lineweaver –Burk del extracto proteolítico obtenido.

Algebraicamente se realizaron las determinaciones correspondientes al  $K_M$  y  $V_{max}$ , a partir de los valores obtenidos de la Figura 6.20

$$m = K_M / V_{max} = 0.1653 \text{ g} \cdot \text{min} / \mu\text{mol de Tirosina}$$

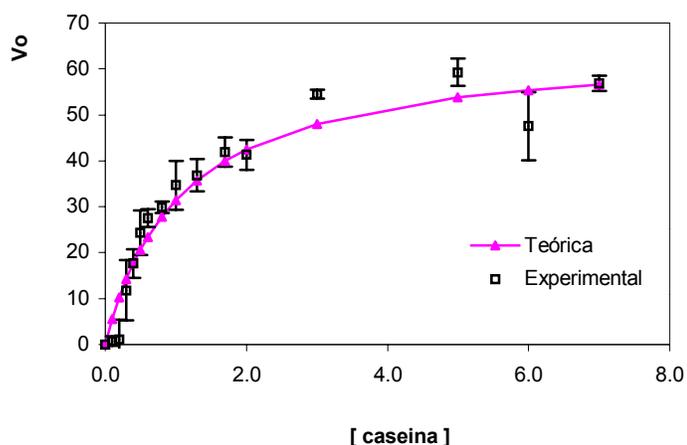
De acuerdo a la ecuación que se muestra a continuación, el valor de la intersección sobre el eje  $1/v_0$  equivale a  $1/V_{max}$ , es decir;  $0.0153 \text{ mL} \cdot \text{min} / \mu\text{mol de Tirosina}$ ; despejando los valores de  $V_{max}$  y  $K_M$  se obtienen los siguientes datos:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$V_{max} = 65.36 \text{ UE/gms y } K_M = 10.80 \text{ mg/mL}$$

Estos datos de  $K_M$  y  $V_{max}$  se sustituyeron en la ecuación de Michaelis – Menten, obteniéndose así los datos de velocidades iniciales pero de manera teórica, como se muestra en la Figura 6.21.

Ecuación de Michaelis – Menten : 
$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + S}$$



**Figura 6.21.** Comparación de las velocidades obtenidas, teórica y experimental para el extracto proteolítico obtenido.

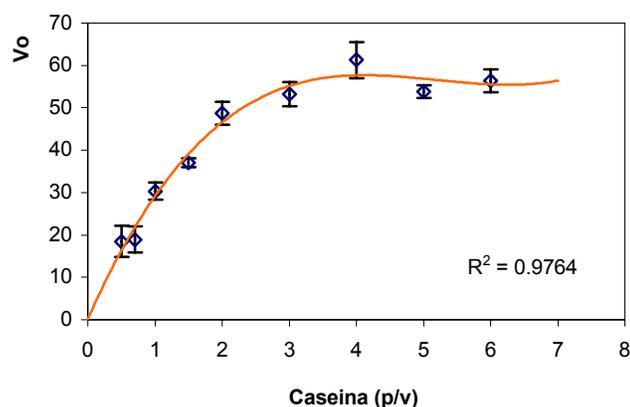
---

De la Figura 6.21, se observa que los valores experimentales siguen la misma tendencia que los valores obtenidos teóricamente, utilizando la ecuación de Michaelis – Menten.

Con la finalidad de poder comparar los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$ , se realizó este mismo experimento pero utilizando una enzima comercial Flavorzyme 500 MG<sup>®</sup>.

### 6.8 Determinación de la especificidad de la Enzima comercial

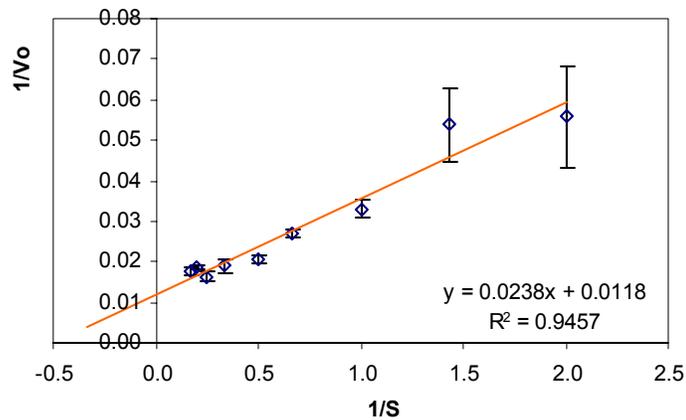
La enzima comercial empleada en esta determinación fue (Flavorzyme 500 mG<sup>®</sup>). Esta determinación consistió en obtener las velocidades iniciales de reacción entre el sustrato empleado a diferentes concentraciones (caseína) y la enzima comercial, dando los resultados que se muestran en la Figura 6.22.



**Figura 6.22.** Gráfica de Michaelis – Menten para la enzima comercial.

La Figura 6.22 muestra la gráfica de Michaelis – Menten para la enzima comercial, utilizando sus valores óptimos de pH y temperatura (6.0 y 50°C respectivamente) y variando las concentraciones del sustrato (caseína p/v).

Para obtener los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  se graficaron los inversos de los valores tanto de las velocidades iniciales como de la concentración del sustrato, como se indica en la Figura 6.23.



**Figura 6.23.** Gráfica de Lineaweaver – Burk para la enzima comercial

De la Figura 6.23, se obtuvo el valor de la pendiente algebraicamente dando como resultado:

$$m = K_M / V_{max} = 0.2074 \text{ g} \cdot \text{min} / \mu\text{mol de Tirosina}$$

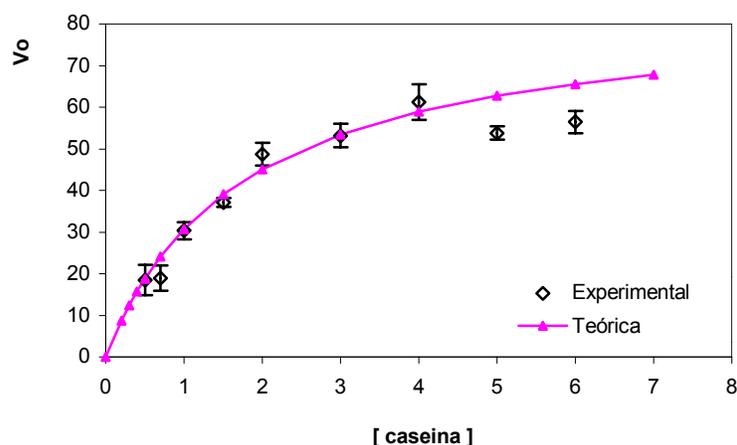
De acuerdo a la Figura 2.7 y a la ecuación que se muestra a continuación, el valor de la intersección sobre el eje 1/vo equivale a 1/Vmax, es decir; 0.0118 mL\*min/μmol de Tirosina.; despejando los valores de Vmax y KM se obtienen los siguientes datos:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$V_{max} = 84.75 \text{ UE/gms}$$

$$K_M = 17.57 \text{ mg/mL}$$

Con los datos de KM y Vmax se determinó la gráfica de Michaelis – Menten pero de manera teórica, usando la ecuación respectiva ( ecuación11, página 16).



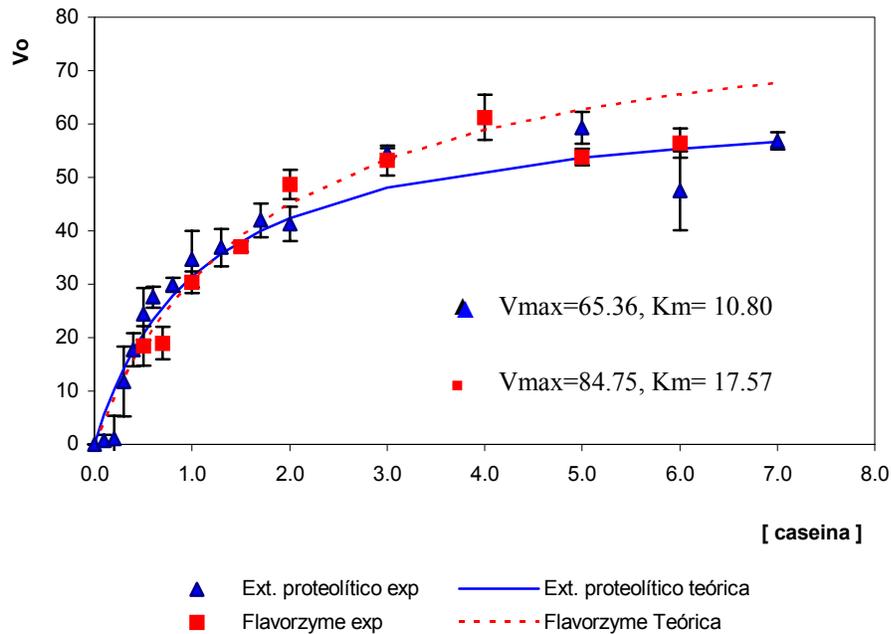
**Figura 6.24.** Comparación de las velocidades obtenidas, teórica y experimental.

De la Figura 6.24, se observa que los valores experimentales siguen la misma tendencia que los valores obtenidos teóricamente, utilizando la ecuación de Michaelis – Menten.

### 6.9 Comparación de la especificidad del extracto proteolítico obtenido con la especificidad de la enzima comercial.

Una vez que se realizaron las determinaciones de  $K_M$  y  $V_{max}$  para el extracto proteolítico obtenido por fermentación sólida usando la cepa de *Aspergillus oryzae* 2095 y los valores correspondientes de  $K_M$  y  $V_{max}$  para la enzima comercial empleada Flavorzyme 500 MG<sup>®</sup>, se realizó una grafica comparativa del comportamiento de las velocidades iniciales de reacción entre la enzima y el sustrato, probando este último en diferentes concentraciones, partiendo desde 0.1 % hasta el 7% de caseína, cabe aclarar que no fue posible probar más concentraciones de sustrato debido a la baja solubilidad que presenta después del 7%.

La Figura 6.25 muestra la comparación de las gráficas de Michaelis – Menten obtenidas para el caso de el extracto proteolítico obtenido de la cepa *A. oryzae* 2095 y gráfica de la enzima comercial.



**Figura 6.25.** Comparación de la grafica de Michaelis – Menten para el extracto proteolítico y la enzima comercial.

En la Figura 6.25 se muestran los valores de las velocidades iniciales como las velocidades ajustadas a la ecuación de Michaelis – Menten utilizando los valores obtenidos de  $K_M$  y  $V_{max}$  respectivos para el extracto crudo enzimático y de la enzima comercial.

De esta Figura se observa que los valores tanto experimentales como calculados de la enzima comercial son mas altos respecto a los valores del extracto proteolítico. Y esto se comprueba con los valores de especificidad calculados como se muestra en la Tabla 6.2, la cual es un resumen de los valores obtenidos de  $K_M$  y  $V_{max}$  para el extracto proteolítico y los valores de la enzima comercial Flavorzyme 500 MG<sup>®</sup>.

**Tabla 6.2.** Especificidad de la enzima comercial y el extracto crudo enzimático.

Enzima	$K_M$ (mg caseína / mL)	$V_{max}$ (UE/ gms)	$\alpha$ ( $V_{max} / K_M$ )
Extracto proteolítico	10.80	65.36	6.05
Flavorzyme 500 MG	17.57	84.75	4.82

Debido a que el valor de  $K_M$  es mayor para Flavorzyme (17.57 mg/mL) nos indica que se necesita una mayor concentración de caseína para saturar a la enzima, que es el punto medio de la velocidad máxima, y para el extracto crudo enzimático se requiere un poco menos de caseína para lograr dicho punto (10.80 mg/mL). Así mismo, el valor de  $K_M$  es el índice de la afinidad que tiene cada una de estas enzimas por el sustrato, es decir, que a menor valor de  $K_M$  es mayor la afinidad por el sustrato, comparando ambos valores, el extracto crudo enzimático presenta más afinidad por el sustrato empleado (caseína). Esto se comprueba con el valor de especificidad de la Tabla 6.2, donde es más bajo para el extracto proteolítico que para Flavorzyme; aunque la diferencia que se presenta entre estos dos no es muy grande.

Sin embargo la  $V_{max}$  para Flavorzyme 500 MG<sup>®</sup>, es más alta (84.75 UE/gms) si se compara con la  $V_{max}$  del extracto proteolítico de la cepa *A. oryzae* 2095 el cual es de 65.36 UE/gms. Aunque en términos del valor  $\alpha$  (coeficiente de especificidad) es mayor para el extracto proteolítico el cual es de 6.05 respecto al Flavorzyme 500 MG<sup>®</sup> siendo de 4.82, es decir, que el extracto proteolítico es más específico por el sustrato por 1.23 unidades.

---

*CAPÍTULO 7*

***CONCLUSIONES***

---

## 7. CONCLUSIONES

El Agar leche descremada fue el mejor medio para la observación de halos por el método descrito; en contraste, en el agar caseína por ser translúcido no se pudo apreciar la formación de halos de hidrólisis. Así mismo, tampoco se observaron halos en el medio agar harina de pescado, esto puede deberse a que se trata de un medio complejo que contiene diversas fuentes de carbono y nitrógeno que pueden ser utilizadas por la cepa para realizar sus funciones metabólicas, de tal manera que no requiere producir proteasas para proveerse de nutrientes.

De las 4 cepas fúngica ensayadas, la que presentó mejor crecimiento y formación de halo de hidrólisis fue *Aspergillus oryzae* 2095 en el medio de cultivo agar leche descremada. Del mismo el extracto proteolítico producido por la cepa *Aspergillus oryzae* 2095 fue el que presentó la máxima actividad enzimática del extracto proteolítico (21.06 UE/gms) que se obtuvo por fermentación sólida, usando harina de pescado.

El pH óptimo de actividad para este extracto proteolítico es de 7.0, y temperatura óptima de 54 °C, siendo estable en un rango de temperatura de 30 a 50°C.

Este extracto proteolítico presenta una mayor constante de afinidad ( $K_M$ ) y coeficiente de especificidad ( $\alpha$ ) por el sustrato empleado (10.8 mg/mL y 6.05 respectivamente) en comparación con una enzima comercial Flavorzyme 500 MG<sup>®</sup> (17.6mg/mL para  $K_M$  y 4.82 para  $\alpha$ ).

Se propone el uso de este extracto proteolítico dados los valores de especificidad, para realizar hidrolizados de pescado y así recuperar la proteína; lo cual representa una alternativa para ser incorporada en sistemas alimenticios.

---

*CAPÍTULO 8*

***BIBLIOGRAFÍA***

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aalbaek, T. y Reeslev, M. (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.
- Badui Dergal, S. (2000). Química de los alimentos. Editorial Pearson Educación. D.F. México. Pp. 589 - 593.
- Bakir, U., Yavasvaoglu, S., Guvenc, F. y Ersayin, A. (2001). An endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial Technology*. 29: 328 – 334.
- Banerjee, R. y Bhattacharya, B. (2002). Evolutionary operation as a tool of optimization for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 3642: 1-7.
- Beynon, R.J. (1994). Proteolytic enzymes : A practical approach IRL. Press. England. Pp. 14-17.
- Bjoern, L., Lied, E. y Espe, M. (2000). Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 80: 581 – 589.
- Bouchez, P y Azzi, D. (1991). Biotechnology. Use of hydrolytic enzymes in preprocessing of feedstuffs. En “Nutritional Strategies and Aquaculture waste C.B.” Cowey and C.Y. Cho. Pp. 91 – 101.
- Bruguera, M.T., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J. (1997). Determinación de actividades enzimáticas en cepas de *Microsporium canis* y *Microsporium gypseum*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 14: 119-124.

- 
- Buchanan, R.E. y Gibbons, N. (1974). *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 8ª edition. Editorial. Board. USA. Pp. 750.
  - Cheftel, J. (1989). *Proteínas alimentarias*. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp. 35-42.
  - Diniz, F. M. y Matin, A.M. (1997). Fish protein hydrolysates by enzymatic processing. *Agro-Food-Industry Hi-Technology*. May/Jun. Pp. 9-13.
  - Echeverría, A., Durante, A.G., Acrechavala, A. y Negroni, R. (2002). Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19: 95-98.
  - Eisenthal, R. y Danson, M.J. (1993). *Enzyme assays : A practical approach*. Oxford University Press. England. Pp. 47-53.
  - Fersht, A. (1980). *Estructura y mecanismos de las enzimas*. Editorial Reverté S.A. Madrid. España. Pp. 15 – 32.
  - Fennema, R. (1993). *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia. España. Pp 415 - 422, 427- 437.
  - Gandolfi Boer, C. y Marina Peralta, R. (2000). Production of extracellular protease by *Aspergillus tamaritii*. *Journal Basic of Microbiology*. 40: 75 – 81.
  - García Garibay, M., Quintero Ramírez, R. y López Canales A. (1993). *Biología Alimentaria*. 1ª edición. Limusa Noriega Editores. México. Pp. 103, 577 – 578, 582 - 593.

- 
- García, R., Cocha, J.M., Ramírez, P. Y Contreras, G. (1992). Perfil de exoenzimas de *Pseudomonas aeruginosa*. Reuniones científicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. <http://www.unmsm.edu.pe/BIOLOGIA/reunion/c3r84.htm>
  - Gervais, P. y Molin, P. (2002). The role of water in solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 3637: 1-17.
  - Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A. y Nasri, M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 513 - 518.
  - González Moran, Ma. Genoveva. (1996). Técnicas de biología celular. AGT editor. S.A. 1ª edición. Pp. 154 – 155
  - Hernández Rodríguez, Blanca E. (2003). Caracterización fisicoquímica, reológica y funcional de fracciones peptídicas obtenidas a partir de hidrólisis enzimática de proteínas de músculo de mero (*Epinephelus morio*). Tesis de maestría en Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa, México. Pp. 86-87.
  - Kumar, C.G. (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Letters in Applied Microbiology*. 34: 13-17.
  - Lehninger, L. Albert. (1991). Bioquímica. 2ª Edición. Editorial Omega. Barcelona España. Pp. 195 – 206.
  - Lehninger, L. Albert. (1993). Principios de Bioquímica. 2ª Edición. Editorial Omega. Barcelona. España. Pp. 196 – 237.

- 
- Lescic, I. y Vukelic, B. (2001). Substrate specificity and effects of water-miscible solvents on the activity and stability of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 29: 548 – 553.
  - Lu Wenqing, Li Defa y Wu Yubo. (2003). Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 305 –311.
  - Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (1999). Brock Biología de los microorganismo. Prentice Hall. 8ª edición. Madrid. Pp. 118 – 120, 151-158.
  - Mitra, P., Chakraverty, R. y Chandra, A. (1996). Production of proteolytic enzymes by Solid State Fermentation – an Overview. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 55: 439 – 442.
  - Nigam, P. y Singh, D. (1996). Processing of Agricultural Wastes in Solid State Fermentation for Microbial Protein Production. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 55: 373 – 380.
  - Pandey, A. (2002). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 3636: 1 – 4.
  - Pandey, A., Germano, S., Osaku, C.A., Rocha, N.S. y Soccol, C.R. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* Produced by Solid – State Fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 246 – 251.
  - Parin,. M.A. y Zugarramundi, A. (2001). Aspectos económicos del Procesamiento y uso de Ensilados de pescado. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Argentina. Pp. 1-16.

- 
- Patnaik Pratap, R. (2002). Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 198-200.
  - Pelczar Michael, J. (1982). Microbiología. 4ª Edición. Editorial Mc Graw – Hill. México. Pp. 130 – 139, 780.
  - Perera, M.N. y Aurrekoetxea, G. (2001). Congreso Nacional de Acuicultura. Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados de peces de acuicultura. Sukarrieta Bizkaina España. <http://aquatic.inizar.es/N3/art1302/azti1.htm>
  - Phadatare, S., Deshpande, V. Y Srinivasan, M. (1993). High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme and Microbial Technology*. 15: 72-76.
  - Pizardi, C.A., Gutierrez, M.C, Fernández, C.D. y Fernández, J.A. (1999). Producción piloto de hidrolizado de residuos de pescado por fermentación en sustrato sólido con hongos filamentosos. *Centro Panamericano de Ingeniería Sanitari y Ciencias del Ambiente (CEPIS)*. Lima Perú.
  - Potter, N. (1978). La ciencia de los Alimentos. Editorial, Harla México. Pp. 481 – 482.
  - Prado Barragán, L. A. (2000). Curso de Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa. México.
  - Prave, P. y Faust, U. (1987). Fundamentals of Biotechnology. Ed. VCH. Federal Republic of Germany. Pp. 493 – 501.

- 
- Raghavarao, K. y Ranganathan, T.V. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 121 – 135.
  - 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.
  - Roussos, S., Lonsane, B.K. y Viniegra González, G. (1997). Advances in solid state fermentation. 1a edición. Kluwer Academic Publisher. London. Pp. 7-9.
  - San Pedro, G. López Benito, M. y Pastoriza, L. (1986). Cabezas y vísceras de túnidos: su aprovechamiento para alimentación animal. Informe técnico n° 137 del instituto de investigaciones pesqueras. Barcelona. España. Pp. 1-11.
  - Sánchez, S. y Demain, A.L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. Review. *Enzyme and Microbial Technology*. 6153: 1-12.
  - Stanier, Roger. (1986). Microbiología. 4ª Edición. Ediciones Repla. Barcelona España. Pp. 127, 667 – 671.
  - Stefanova, M.E., Davies, C., Nicholas, R.A y Gutheil, W.G. (2002). pH, inhibitor, and substrate specificity studies on *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1597: 292-300.
  - Tunga, R. y Banerjee, R. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation . *Bioprocess Engineering*. 19:187- 190.
  - Tunga, R. y Banerjee, R. (a) (1999). Some studies on optimization of extraction process for protease production in solid state fermentation. *Bioprocess Engineering*. 20: 485 –489.

- 
- Tunga, R. y Banerjee, R. (b) (1999). Studies of physical parameters for large scale protease production by SSF . *Bioprocess Engineering*. 21:107 – 112.
  - Viniegra González, G., Favela Torres, E., Aguilar, C.N., Romero Gómez, S.J, Díaz Godínez, G. y Augur, C. (2003). Advances of fungal enzyme production in solid state fermentation over liquid fermentation system. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 157-167.
  - Whitaker, J.R. (1994). Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Pecker. New York. N.Y. Pp. 3-5, 274-278, 377-382, 391, 469-495,
  - Yang, S. y Wang, J. (1999). Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. *Botanic Bulletin of Academia Sinica*. 40: 259-265.

---

***ANEXOS***

---

---

## ANEXO A

### Conversión de rpm (revoluciones por minuto) a unidades G.

En la caracterización y escalamiento de las centrífugas frecuentemente se emplea el factor G., que es la medida relativa de la velocidad de sedimentación de una partícula en un campo centrífugo con respecto a su velocidad de sedimentación en el campo gravitacional.

Este factor puede ser determinado por medio de la siguiente fórmula:

$$G = 5.6 \times 10^{-7} N^2 D$$

Donde:

N son las revoluciones por minuto (rpm)

D es el diámetro del tazón de la centrífuga o punto de interés en mm

G es una unidad adimensional.

Para el caso de este trabajo experimental se manejaron 14,000 rpm y el diámetro del tazón de la centrífuga es de 174 mm; dando una G de:

$$G = 5.6 \times 10^{-7} (14,000)^2 (174 \text{ mm}) = 19,098.24$$

$$G \approx 19,100.$$

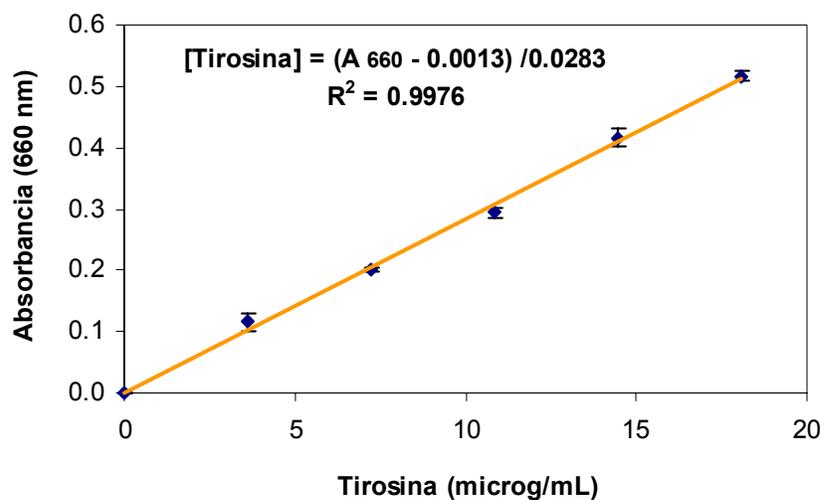
---

## ANEXO B

### Curva Patrón de Tirosina.

Para determinar actividad enzimática en términos de proteína soluble se realizó una curva patrón de Tirosina como se explica en la Tabla 5.2.

Se graficaron los datos de las absorbancias obtenidos con respecto a la concentración de Tirosina ( $\mu\text{g}$ ) correspondiente y se realizó un ajuste de datos por regresión lineal simple como se muestra en la Figura A1.1.



**Figura A1.1.** Curva Patrón de Tirosina