



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN
EXTRACTO PROTEOLÍTICO TERMOESTABLE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A

RICARDO HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. LILIA ARELY PRADO BARRAGÁN
ASESORES: DR. SERGIO HUERTA OCHOA
DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**

MÉXICO D. F.

SEPTIEMBRE DE 2006

El jurado designado por la División de Ciencia Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

Ricardo Hernández Martínez

El día 20 de septiembre del 2006

Director de tesis:



Dra. Lilia Arely de Jesús Prado Barragán

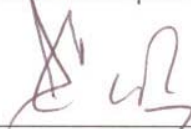
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Jurado:



Dr. Sergio Huerta Ochoa (Asesor)

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Dr. Carlos Regalado González (Asesor)

Universidad Autónoma de Querétaro, Qro. Qro.



Dr. Octavio Loera Corral (Sinodal)

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Dr. Francisco José Fernández Perrino (Sinodal)

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de tesis a las siguientes instituciones:

1. CONACYT, becario No. 188273
2. Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa
Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido (PP4)

A Elena por sus consejos y apoyo brindado.

A mis compañeros de la PP4 por su compañía, apoyo y sobre todo por su amistad.

A mi directora de tesis Dra. Arely Prado por haber aceptado dirigir esta tesis, pero sobre todo por la confianza y apoyo brindados.

Al Dr. Sergio Huerta por su asesoría y amistad.

A mis asesores por el tiempo, conocimientos y atenciones brindadas.

A los Doctores: Octavio Loera, Ernesto Favela, Francisco José Fernández, Gerardo Saucedo, por su ayuda y consejos brindados.

Muy en especial a Neith, Gabriel, Blanquis, Sres. Papa, Puma, Ary. Gracias por su apoyo y comprensión.

A mis padres y hermanos por su apoyo y comprensión

A mis sobrinos Víctor y Evelyn

La verdadera sabiduría está en reconocer la propia ignorancia.

RESUMEN

La producción de enzimas es de gran interés debido a la importancia industrial que tienen. En la actualidad se ha incrementado el interés en la producción de enzimas que puedan tener características de termoestabilidad, las cuales puedan ser empleadas en procesos donde las temperaturas son superiores a 45°C. El objetivo del presente trabajo de investigación fue seleccionar una cepa termotolerante productora de proteasas termoestables, además de la caracterización del extracto proteolítico producido.

A partir de 72 cepas fúngicas se inició una preselección basada en el crecimiento a 45°C, tras la cual fueron seleccionadas 29 cepas. Basada en la producción de proteasas en placas de agar leche descremada se inició una segunda etapa de preselección, en la cual el criterio de selección fue el Índice de Potencia (I. P.). En esta etapa se seleccionaron las tres cepas fúngicas que tuvieron el mayor I. P. (2.2 aB, 2.7 aB y 36 aIV) para analizar su capacidad de producción de proteasas termoestables.

A partir de las cepas fúngicas preseleccionadas se procedió a obtener los extractos proteolíticos mediante cultivos en medio sólido. Debido a la baja actividad proteolítica que presentó se descartó la cepa 2.7 aB. Posteriormente, se evaluaron las condiciones óptimas de reacción enzimática para los extractos proteolíticos producidos por las cepas 36 aIV y 2.2 aB, obteniéndose un pH de 7 y 9 respectivamente, mientras que ambos extractos tuvieron un tiempo de reacción de 3 minutos y 50°C fue su temperatura óptima para ambos extractos.

Una vez optimizadas las condiciones de reacción enzimática se evaluó la estabilidad térmica a diferentes temperaturas (30-80°C), y mediante una cinética de primer orden se determinaron los tiempos de vida media de los extractos proteolíticos. Para el extracto producido por la cepa 2.2 aB se obtuvieron tiempos de vida media de 2.96, 1.07, 0.74, 0.5, 0.33 y 0.16 horas a 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C respectivamente. Por otro lado, el extracto producido por la cepa 36 a IV tuvo una vida media de 1.78, 1.0, 0.8, 0.33, 0.28 y 0.20 a las mismas condiciones de temperatura respectivamente. Debido a que al evaluar la estabilidad térmica no se observó diferencia significativa entre los extractos se continuó trabajando con ambos.

Por último, se evaluaron tres inhibidores de proteasas así como también el efecto que tienen ciertos iones metálicos sobre la actividad proteolítica. Con los resultados obtenidos y utilizando los datos anteriores se concluye que la máxima actividad del extracto producido por la cepa 36 aIV puede deberse a la presencia de una cisteína proteasa neutra mientras que para el extracto producido por la cepa 2.2 aB puede deberse a la presencia de una serina proteasa alcalina.

Contenido

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUCCIÓN | 2 |
| 2 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA | 7 |
| 2.1 Definición de enzima..... | 7 |
| 2.2 Clasificación de las enzimas | 7 |
| 2.2.1 <i>Proteasas</i> | 8 |
| 2.2.1.1 <i>Clasificación de las proteasas</i> | 9 |
| 2.2.1.1.1 Tipo de reacción que catalizan | 9 |
| 2.2.1.1.2 Naturaleza del sitio catalítico | 11 |
| 2.2.1.1.3 pH óptimo de actividad | 13 |
| 2.3 Fuentes de enzimas..... | 15 |
| 2.3.1 <i>Fuentes de proteasas</i> | 15 |
| 2.3.1.1 <i>Proteasas de origen animal</i> | 16 |
| 2.3.1.2 <i>Proteasas de origen vegetal</i> | 16 |
| 2.3.1.3 <i>Proteasas microbianas</i> | 16 |
| 2.3.1.3.1 <i>Proteasas fúngicas</i> | 17 |
| 2.4 Microorganismos termófilos | 17 |
| 2.5 Condiciones que afectan las reacciones enzimáticas | 21 |
| 2.5.1 <i>Efecto del pH</i> | 21 |
| 2.5.2 <i>Efecto de la temperatura</i> | 22 |
| 2.6 Importancia de las enzimas termoestables | 25 |
| 2.7 Importancia de las enzimas en la industria | 26 |
| 2.8 Métodos de producción de enzimas..... | 27 |
| 2.8.1 <i>Fermentación en medio sólido</i> | 29 |
| 3 ANTECEDENTES | 35 |
| 3 ANTECEDENTES | 36 |
| 4 JUSTIFICACIÓN | 40 |
| 5 HIPÓTESIS | 43 |
| 6 OBJETIVOS | 45 |
| 6.1 Objetivo general..... | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 6.2 Objetivos particulares..... | 45 |
| 7 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 47 |
| 7.1 Microorganismos utilizados..... | 47 |
| 7.2 Preselección de cepas productoras de proteasas..... | 48 |
| 7.2.1 Medios de cultivo..... | 48 |
| 7.2.1.1 Agar papa dextrosa..... | 48 |
| 7.2.1.2 Agar leche descremada..... | 48 |
| 7.2.2 Crecimiento a 45°C..... | 49 |
| 7.2.3 Producción de proteasas en placas de agar leche descremada..... | 49 |
| 7.3 Selección de cepas productoras de proteasas | 50 |
| 7.3.1 Preparación del sustrato | 50 |
| 7.3.2 Preparación del soporte..... | 50 |
| 7.3.3 Preparación del inóculo | 50 |
| 7.3.4 Cultivo en medio sólido..... | 51 |
| 7.3.4.1 Obtención del extracto proteolítico | 51 |
| 7.3.5 Determinación de actividad proteolítica | 52 |
| 7.3.5.1 Muestra..... | 52 |
| 7.3.5.2 Testigo..... | 53 |
| 7.3.6 Determinación de proteína..... | 53 |
| 7.3.6.1 Preparación de soluciones..... | 54 |
| 7.4 Determinación de las condiciones óptimas de actividad del extracto proteolítico | 54 |
| 7.4.1 Tiempo de reacción | 54 |
| 7.4.2 Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica | 54 |
| 7.4.3 Efecto del pH en la actividad proteolítica | 55 |
| 7.5 Determinación de la estabilidad térmica del extracto..... | 55 |
| 7.6 Estudios de inhibición | 56 |
| 7.7 Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad proteolítica | 56 |
| 8 8 RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 58 |
| 8 8 RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 8.1 Preselección de cepas productoras de proteasas | 59 |
| 8.1.1 Crecimiento a 45°C..... | 59 |
| 8.1.2 Producción de proteasas en placas de agar leche descremada..... | 59 |
| 8.2 Selección de cepas productoras de proteasas | 63 |
| 8.2.1 Cultivo en medio sólido..... | 63 |
| 8.3 Determinación de las condiciones óptimas del extracto proteolítico | 65 |
| 8.3.1 Tiempo de reacción | 65 |
| 8.3.2 Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica | 67 |
| 8.3.3 Efecto del pH en la actividad proteolítica | 67 |
| 8.4 Determinación de la estabilidad térmica del extracto..... | 70 |
| 8.5 Estudios de inhibición | 3 |
| 8.6 Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad proteolítica | 75 |
| 9 CONCLUSIONES | 79 |
| 10 RECOMENDACIONES | 81 |
| 11 BIBLIOGRAFÍA..... | 83 |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

La capacidad de ciertos organismos para la producción de enzimas es muy valiosa debido a la importancia industrial que tienen dichos metabolitos. Las enzimas se obtienen de diversas fuentes: microbianas (bacterias y hongos), animales y plantas (Sandhya y col., 2005).

Las enzimas microbianas son las que se producen en mayor cantidad, debido a que tienen ciertas ventajas (gran variedad de actividades de forma regular y de calidad uniforme) sobre las obtenidas a partir de plantas y animales. Recientemente, el interés en la producción de enzimas se ha centrado en los hongos, debido a que los procesos de producción de enzimas son más sencillos que en aquellos en los que se utilizan bacterias para dicho propósito. El estudio de los hongos para la producción de enzimas se basaba principalmente en los hongos mesófilos (temperatura óptima de 20 a 45°C), pero en la actualidad se ha incrementado el interés en la producción de enzimas de microorganismos termófilos (temperatura óptima de 45 a 80°C), debido a que éstas tienen características de estabilidad de gran interés industrial. Gracias a la termoestabilidad, las enzimas pueden tener un gran número de aplicaciones en la industria de alimentos, farmacéutica, química, petrolera, papelera, peletera y de detergentes. Además, también pueden ser utilizadas en la síntesis de aminoácidos, síntesis orgánica y para estudiar modelos de termoactividad y

termoestabilidad (Johnvesly y Naik, 2001; Germano y col., 2003; Haki y Rakshit, 2003; Sandhya y col., 2005).

Las enzimas producidas por microorganismos termófilos son capaces de soportar temperaturas altas (20°C por encima de la temperatura de producción). Dicha característica de termoestabilidad es adquirida por factores tales como la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica, la cantidad de puentes de hidrógeno que se forman en la cadena y la cantidad de puentes disulfuro formados, entre otros (Vieille y Zeikus, 2001; Haki y Rakshit, 2003).

Las enzimas se producen principalmente por dos procesos: por fermentación en medio sólido (FMS) y por fermentación en medio líquido (FML). La FMS se utiliza preferencialmente para la producción de enzimas fúngicas ya que, a diferencia de la FML, es un método sencillo y de bajo costo, se obtienen mayores volúmenes de producción y se generan bajas cantidades de agua de desecho, entre otras ventajas (Mitchell y col., 2000; Pandey, 2003, Sandhya y col., 2005).

Las proteasas representan el 60% de la venta total de enzimas en el mercado mundial; actualmente el uso de las enzimas esta limitado por su estabilidad, por ello la producción de enzimas termoestables puede, en parte, ayudar a resolver este problema, además de que los procesos en donde se utilizarían pueden ser menos costosos (Banerjee y col., 1999; Haki y Rakshit, 2003). Actualmente la mayoría de las enzimas se han obtenido de microorganismos mesófilos, con lo cual su aplicación se restringe a sus límites de estabilidad a la temperatura, pH, fuerza iónica, presión y

salinidad. Sin embargo, la capacidad que tienen algunos microorganismos de desarrollarse a altas temperaturas puede representar una alternativa en la producción de enzimas con mayor estabilidad a la temperatura (Lasa y Berenguer, 1993; Van den Burg, 2003). En este sentido, el estudio de cepas fúngicas termotolerantes representa una fuente potencial de enzimas con propiedades novedosas para la aplicación en la industria (Córdova y col., 2003).

En este trabajo se seleccionó una cepa fúngica productora de proteasas termoestables y se caracterizó parcialmente el extracto enzimático producido por fermentación en medio sólido.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Definición de enzima

Las enzimas son catalizadores complejos, constituidas por proteínas globulares, que, aceleran la velocidad de las reacciones químicas en un factor de 10^{12} a 10^{20} respecto a las reacciones no catalizadas enzimáticamente. En comparación, los catalizadores no enzimáticos usados en la industria son órdenes de magnitud menos eficaces, trabajando en condiciones favorables para las enzimas. La actividad molar de las enzimas es muy alta: una molécula de enzima puede transformar hasta 600,000 moléculas de sustrato por segundo (Fennema y Danson, 1993).

La actividad catalítica de las enzimas depende de la integridad de su conformación proteica nativa. Si se desnaturaliza o disocia una enzima en sus subunidades, se pierde normalmente la actividad catalítica. Así, la integridad de la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas enzimáticas es esencial para su actividad catalítica (Lehninger, 1991).

2.2 Clasificación de las enzimas

Muchas enzimas se nombran añadiendo el sufijo “asa” al nombre de su sustrato o a una palabra o frase que describe su actividad. Así la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y la ADN polimerasa cataliza la síntesis de ADN. Otras enzimas, tales como la pepsina y la tripsina tienen nombres que no se refieren a sus sustratos. A veces la misma enzima tiene dos o más nombres, o dos enzimas diferentes tienen el mismo nombre. Debido a la diferencia y número creciente de enzimas descubiertas, se ha

adoptado por acuerdo internacional un sistema de nomenclatura y clasificación de las enzimas. Este sistema distribuye a las enzimas en seis clases principales, cada una de ellas con diferentes subclases, según el tipo de reacción catalizada, como se puede observar en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Clasificación internacional de enzimas.

| No. | Clase | Tipo de reacción catalizada |
|-----|------------------|---|
| 1 | Oxido reductasas | Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H) |
| 2 | Transferasas | Reacciones de transferencia de grupos |
| 3 | Hidrolasas | Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua) |
| 4 | Liasas | Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por formación 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, C-N, mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP |

2.2.1 Proteasas

Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de las hidrolasas, 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 carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua (Rao y col., 1998).

2.2.1.1 Clasificación de las proteasas

Debido a la gran diversidad de acción y estructuras las proteasas no pueden ser clasificadas con el sistema general de nomenclatura enzimática, por ello se clasifican en base a diferentes criterios tales como: tipo de reacción que catalizan, la naturaleza química del sitio catalítico y el pH óptimo al cual se lleva a cabo la reacción con el sustrato.

2.2.1.1.1 Tipo de reacción que catalizan

El sitio catalítico de las proteasas es movido en uno o ambos lados por subsitios de especificidad, cada uno capaz de acomodar la cadena lateral de un solo residuo de aminoácido del sustrato. Los sitios son enumerados del sitio catalítico S1 a Sn hacia el N-terminal y del S1' hasta el Sn' hacia el C-terminal. Los residuos del sustrato son enumerados desde P1 a Pn y desde P1' a Pn', respectivamente, tal y como se ilustra en la figura 2.2.1.1.1 (Rao y col., 1998).

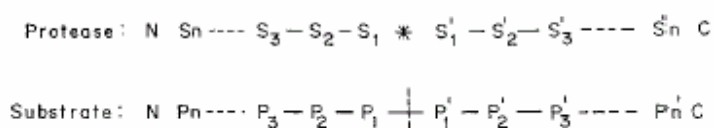


Figura 2.2.1.1.1 Representación del sitio catalítico de las proteasas. * Sitio catalítico, † enlace donde actúa la enzima sobre el sustrato.

Dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual actúan las proteasas, éstas se clasifican en endopeptidasas y exopeptidasas, el mecanismo de acción se puede visualizar en la tabla 2.2.1.1.1.

Tabla 2.2.1.1.1. Clasificación de proteasas de acuerdo al tipo de reacción que catalizan (Rao y col., 1998).

| PROTEASA | MODO DE ACCIÓN ^a | EC. NO. |
|-------------------|-----------------------------|---------------|
| Exopeptidasas | ↓ ●-○-○-○-○-○--- | 3.4.11 |
| Aminopeptidasas | ↓ ●-●-○-○-○-○--- | 3.4.14 |
| Carboxipeptidasas | ↓ ---○-○-○-○-○-●-● | 3.4.16-3.4.18 |
| Endopeptidasas | ↓ ---○-○-○-○-○-●-* | 3.4.21-3.4.34 |

^a Círculos sin rellenar representan residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Círculos oscuros indican aminoácidos terminales, y el asterisco significa bloque terminal. Las flechas representan los sitios de acción de las enzimas.

Endopeptidasas: Son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína (tripsina y quimotripsina) dando como resultado cadenas de péptidos.

Exopeptidasas: Actúan sobre enlaces terminales de una proteína, basándose su sitio de acción sobre el N ó C terminal, dando como resultado aminoácidos libres.

- **Aminopeptidasas:** Actúan sobre el N libre terminal de la cadena polipeptídica liberando un aminoácido o un dipéptido o tripéptido.
- **Carboxipeptidasas:** Actúan sobre el carbonilo terminal de la cadena polipeptídica. Se subdividen en cuatro grupos dependiendo de su mecanismo catalítico y del grupo funcional presente en su sitio activo.

2.2.1.1.2 Naturaleza del sitio catalítico

Basado en el grupo funcional presente en el sitio activo, las proteasas se pueden clasificar en cuatro grupos prominentes: serín proteasas, aspartil proteasas, cisteín proteasas y metaloproteasas (Whitaker, 1994; Rao y col., 1998).

Serín proteasas: Se caracterizan por la presencia de un grupo serina en el sitio activo. Pertenecen al grupo de las exopeptidasas y endopeptidasas. Este tipo de enzimas se inhiben irreversiblemente por 3,4-Dicloroisocumarina (3,4-DCI), Di

isopropilfluorofosfato (DFP), Fluoruro de Fenil Metil Sulfonil (PMSF) y Tosil L- Lisina Clorometil Cetona (TLCK); algunas serín proteasas se inhiben por agentes que inhiben a grupos tiol como el p-Cloromercuribenzoato (PCMB), debido a la presencia de residuos de cisteína cerca del sitio activo. Son generalmente activas a pH neutro y alcalino, con un óptimo entre 7 y 11 (Whitaker, 1994; Rao y col., 1998).

Aspartil proteasas: Comúnmente se conocen como proteasas ácidas pertenecen al grupo de las endopeptidasas y la actividad catalítica depende de residuos de ácido aspártico. Estas enzimas se inhiben con Pepstatina. También son sensibles a compuestos de diazocetona como Diazocetil-DL-Norleucina Metil Ester (DAN) y al 1,2-Epoxi-3(p-nitrofenoxi) Propano (EPNP) en presencia de iones de cobre. Un ejemplo del mecanismo de acción de estas enzimas se ilustra en la figura 2.1.1.2 (Whitaker, 1994; Rao y col., 1998).

Cisteín Proteasas: La actividad de las cisteín proteasas depende de una diada catalítica consistente en cisteína e histidina. Generalmente este tipo de enzimas son activas únicamente en presencia de agentes reductores como HCN o cisteína. Las cisteín proteasas tienen su máxima actividad a pH neutro. Son susceptibles a agentes de sulfhidrilo como el PCMB pero no presentan ningún efecto con el DFP y agentes metálicos quelantes. Su mecanismo de actividad se ilustra en la figura 2.2.1.2 (Whitaker, 1994; Rao y col. 1998).

Metaloproteasas: Su característica principal es que requieren iones metálicos divalentes para su actividad. Estas enzimas son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA pero no por agentes sulfidrilo o el DFP (Whitaker 1994; Rao y col., 1998).

2.2.1.1.3 pH óptimo de actividad

De acuerdo al pH en el que las enzimas presentan la mayor actividad, las proteasas se pueden clasificar en: proteasas alcalinas, neutras y ácidas (Sandhya y col., 2005).

Las proteasas ácidas tienen actividad entre pH 2 y 6. Esta clasificación incluye principalmente aspartil proteasas y algunas cistein proteasas y metaloproteasas. Están constituidas de 380 a 420 aminoácidos y diferentes residuos de aminoácidos constituyen el sitio activo (Rao y col., 1998).

Las proteasas neutras tienen actividad a valores de pH cercano a la neutralidad, y en condiciones ácidas su actividad disminuye. En esta clasificación se incluyen las cisteín proteasas, metaloproteasas y algunas serín proteasas (Rao y col., 1998).

Las proteasas alcalinas tienen actividad en un rango de pH de 8 a 13 y contienen alrededor de 420 a 480 residuos de aminoácidos en la cadena. En esta clasificación se pueden encontrar las serín proteasas (Rao y col., 1998).

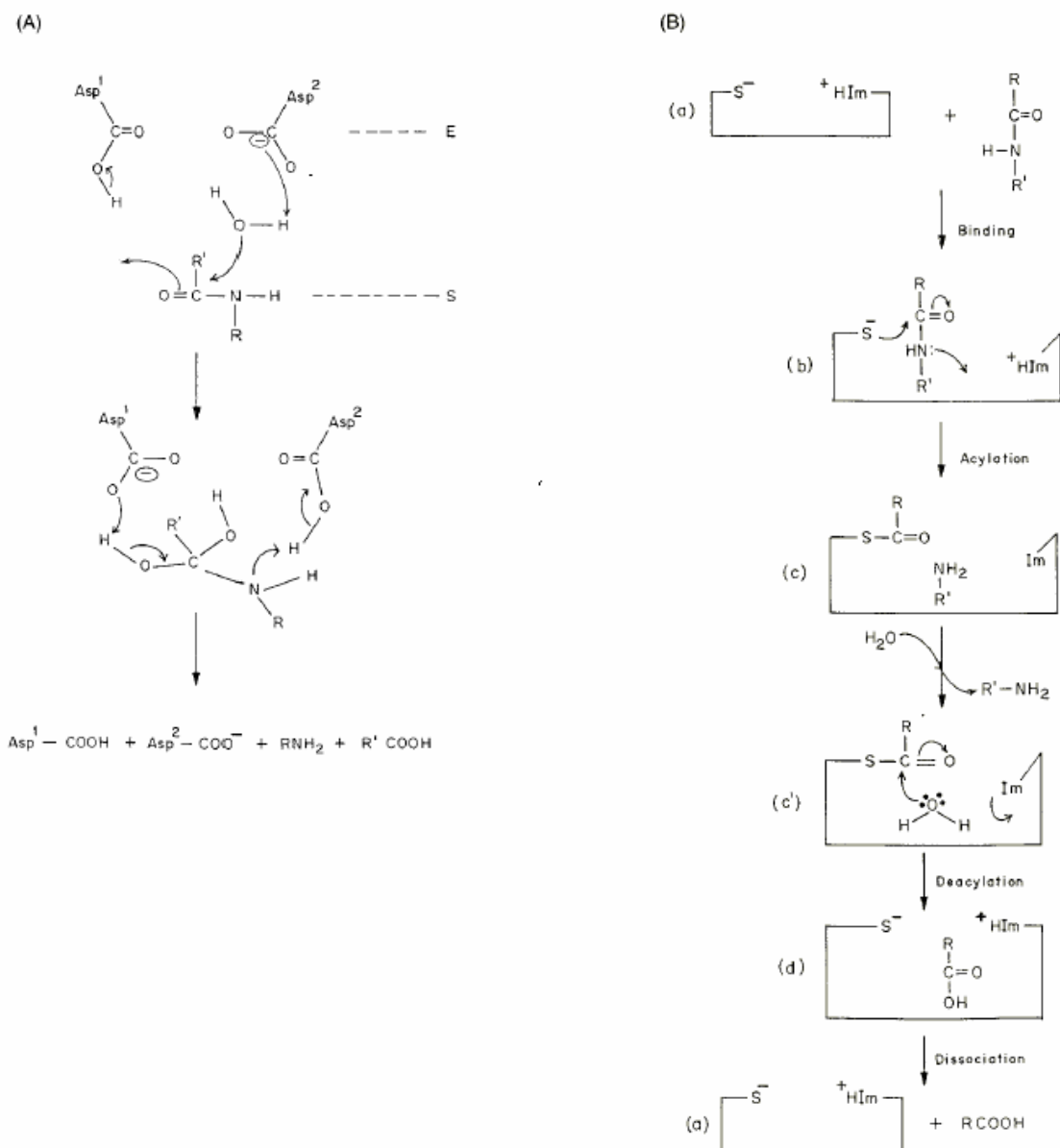


Figura 2.2.1.2. Mecanismos de acción de proteasas. (A) Aspartil proteasas, (B) Cisteín proteasas (Rao y col., 1998).

2.3 Fuentes de enzimas

La capacidad de ciertos organismos para la producción de enzimas es muy relevante, debido a la importancia industrial que tienen dichas enzimas. Las enzimas se obtienen de diversas fuentes, tales como animales, plantas y microorganismos. Las enzimas microbianas son más utilizadas que las derivadas de las plantas o animales ya que usualmente pueden obtenerse en cantidades abundantes, de forma regular y con una calidad uniforme. Además, las enzimas microbianas son generalmente más estables que sus homólogas animales y vegetales y los procesos de producción son más económicos y seguros. La manipulación genética y ambiental para incrementar el rendimiento o la actividad enzimática de las células puede llevarse a cabo fácilmente utilizando células microbianas, debido a su corto periodo de duplicación, a sus relativamente simples exigencias nutricionales y a que los procedimientos para obtener las características deseadas son más fáciles, uno de los grupos de enzimas más estudiado es el de las proteasas (Rao y col., 1998).

2.3.1 Fuentes de proteasas

Hay una diversidad de fuentes de proteasas y éstas pueden obtenerse a partir de plantas, animales y microorganismos.

2.3.1.1 Proteasas de origen animal

La familia de las proteasas de origen animal incluyen la tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina y renina. Son producidas muy puras en cantidades industriales, aunque sin embargo su producción depende de la disponibilidad del ganado para su sacrificio debido a que son extraídas del páncreas de estos (Rao y col., 1998).

2.3.1.2 Proteasas de origen vegetal

La papaína es un ejemplo de proteasa de plantas comúnmente utilizadas en la industria, se extrae de la cáscara de la fruta *Carica papaya*. Otro ejemplo típico de proteasas de plantas es la bromelaína que es extraída del tronco y jugo de la piña. Sin embargo el uso de las plantas como fuente de proteasas esta influenciado drásticamente por factores severos de viabilidad, cultivo, condiciones climáticas de desarrollo y procesos en donde la producción requiere mucho tiempo (Rao y col., 1998).

2.3.1.3 Proteasas microbianas

Proteasas bacterianas neutras y alcalinas son producidas comercialmente por organismos que pertenecen al género *Bacillus*. Las proteasas neutras de origen bacteriano tienen actividad en un rango de pH de 5 a 8. Se caracterizan por su alta afinidad a pares de aminoácidos hidrofóbicos. Su baja termotolerancia es favorable para el control de la actividad durante la producción de hidrolizados con baja degradación por hidrólisis. Las proteasas bacterianas alcalinas se caracterizan por

tener actividad a pH 10 y amplia especificidad por sustratos, su temperatura óptima está alrededor de 60°C. Las propiedades de las proteasas bacterianas alcalinas son apropiadas para usarse en la industria de los detergentes (Rao y col., 1998).

2.3.1.3.1 Proteasas fúngicas

Existen una gran variedad de microorganismos que pueden producir enzimas y dentro de estos destacan los hongos, debido a ciertas ventajas (por ejemplo las enzimas que producen son extracelulares y su proceso de recuperación es sencillo). Existen diversos reportes de biosíntesis de proteasas a partir de hongos, algunas cepas reportadas son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Sandhya y col., 2005).

Los hongos secretan una amplia variedad de enzimas, por ejemplo *Aspergillus oryzae* produce proteasas neutras, alcalinas y ácidas. Las proteasas de hongos pueden ser activas en un amplio rango de pH, así como también tener una amplia especificidad por diferentes sustratos. Generalmente, para producir enzimas fúngicas se utiliza la técnica de fermentación en medio sólido (Rao y col., 1998; Johnvesly y Naik, 2001).

2.4 Microorganismos termófilos

Los microorganismos tienen un rango de temperatura en el cual se pueden desarrollar. A dichas temperaturas se les llama **temperaturas cardinales:**

(temperatura mínima, máxima y óptima de crecimiento). Las temperaturas cardinales varían ampliamente entre los microorganismos. La temperatura de crecimiento de un microorganismo determinado abarca normalmente un margen de 30 grados. De acuerdo a los rangos de temperatura de crecimiento los microorganismos se pueden clasificar en las siguientes categorías:

Los **psicrófilos** que crecen bien a 0°C y tienen una temperatura óptima de 15°C o inferior, la máxima es de aproximadamente 20°C.

Los **psicrótrofos o psicrótrofos facultativos** pueden crecer a 0°C, aunque su temperatura óptima sea de 20 a 30°C y la máxima de casi 35°C

Los microorganismos **mesófilos** crecen a una temperatura óptima de 20 a 45°C, siendo la mínima de 15 a 20°C y la máxima de casi 45°C.

Los **termófilos** pueden crecer a temperaturas de 55°C o superiores. La temperatura mínima es normalmente de 45°C y la óptima de 55 a 65°C.

Algunos **extremófilos** pueden crecer a 90°C o más, y algunos tienen una temperatura máxima de 100 °C (Lehninger, 1991).

Dentro de la clasificación de los termófilos se encuentran organismos tales como bacterias y hongos. conocer que estos microorganismos pueden crecer a temperaturas elevadas es de gran importancia, debido a que sus proteínas, membranas y ácidos nucleicos son extremadamente termoestables y constituyen un

caso idóneo para estudiar los mecanismos de estabilización de macromoléculas y membranas (Lehninger, 1991).

Un gran número de hongos termofílicos han sido aislados por varios investigadores, a partir de materiales calientes y otras fuentes. Se puede asumir que los hongos termófilos así como otros microorganismos termofílicos juegan un papel importante en la descomposición del material de plantas y otros materiales orgánicos a temperaturas elevadas resultando en la termogénesis microbiana (Ifrig y Ogel, 2002).

El primer hongo termófilo estudiado fue *Mucor pusillus*, el cual fue aislado del pan y descrito hace siglos por Lint (Maheshwari y col., 2000). Tiempo después, Tsiklinskaya descubrió otro hongo termófilo, *Thermomyces lanuginosinus*, desarrollado en una papa (Maheshwari y col., 2000). Miehe en 1930 aisló cuatro especies de hongos termofílicos: *Mucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoidium sulfureum* y *Thermoascus aurantiacus*, y comparó las capacidades de los hongos mesofílicos con los termofílicos (Maheshwari y col., 2000), inoculando los hongos individualmente sobre substratos de cultivos puros en frascos estériles y observó que la temperatura final del material depende de la temperatura máxima de desarrollo de los hongos utilizados. Miehe en 1930 (Maheshwari y col., 2000) demostró que el calentamiento del material era causado por los microorganismos presentes. Inicialmente las reacciones exotérmicas de la flora mesofílica presente elevaron la temperatura a $\approx 40^{\circ}\text{C}$. El calentamiento favorece la germinación de

esporas de la microflora termofílica, que eventualmente crece más que la flora mesofílica. Durante el proceso, la temperatura se eleva a más de 60°C (Ifrig y Ogel, 2002).

Usando como variable de respuesta la respiración, Noack en 1970 (Maheshwari y col., 2000) determinó que los hongos termofílicos tienen un inusual incremento en la respiración, por lo que la relacionó con el calentamiento metabólico del medio, permitiendo con esto que se complete rápidamente su ciclo vital. Estos estudios permitieron conocer la capacidad de los hongos termofílicos e impulsaron su estudio en investigaciones posteriores (Ifrig y Ogel, 2002). El estudio de los microorganismos termófilos está tomando un gran interés, en la actualidad debido a que a partir de éstos se pueden producir enzimas termoestables que pueden ser utilizadas en procesos donde se utilizan temperaturas superiores a 45°C, en el futuro puede ser posible diseñar enzimas que puedan actuar a temperaturas muy altas y que tengan un uso industrial importante. En la tabla 2.5 se citan algunos microorganismos extremófilos que han sido aislados y utilizados para la producción de enzimas (Vielle y Zeikus, 2001; Haki y Rakshit, 2003).

Tabla 2.5. Hongos termófilos y enzimas que producen

| HONGO | ENZIMA | SUBSTRATO | REFERENCIA |
|--|----------|------------------|-------------------------|
| <i>Rhizomucor miehei</i> | Lipasa | | Huge- y gensen, 1987 |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Fitasa | Ácido fitico | Berka y col., 1998 |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Lipasa | Glucosa | Jensen y col., 2002 |
| <i>Scytalidium thermophilum</i> | Proteasa | Salvado de trigo | Ifrig y Ogel , 2002 |
| <i>Malbranchea pulchea</i> var. <i>Sulphurea</i> | Proteasa | Caseína | Maheshwari y col., 2000 |

2.5 Condiciones que afectan las reacciones enzimáticas

Las enzimas poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles. Así, cambios en su conformación suelen ir asociados a cambios con la actividad catalítica. Los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de una enzima son la temperatura y el pH.

2.5.1 Efecto del pH

La actividad enzimática exhibe una dependencia significativa de los valores de pH del medio de reacción. A valores de pH crecientes, la actividad se incrementa hasta un máximo (pH óptimo) y decae a valores por encima de este, tal y como se puede

observar en la figura 2.5.1. El comportamiento que se presenta a diferentes valores de pH se debe a dos efectos: la participación directa de grupos iónicos en los mecanismos catalíticos y la participación de los grupos cargados en la estabilización de la estructura de la proteína (Bisswanger, 2002).

Los grupos iónicos frecuentemente se encuentran asociados con la catálisis enzimática, el estado de protonación es esencial para la reacción. Las desviaciones de valores del pH óptimo alteran el estado de protonación de los grupos involucrados y disminuyen los procesos catalíticos (Bisswanger, 2002).

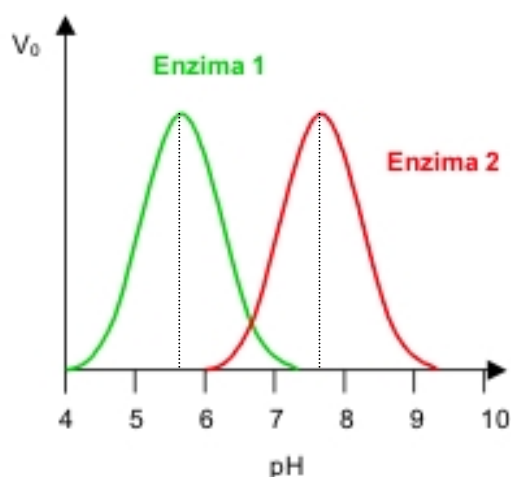


Figura 2.5.1. Efecto del pH en la actividad enzimática.

La línea punteada representa el pH óptimo de cada enzima.

2.5.2 Efecto de la temperatura

De manera similar a las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente se incrementan con la temperatura en un factor de 2-3

por cada 10°C. Conforme aumenta la temperatura, se comunica más energía cinética a las moléculas reactantes resultando en la producción de más colisiones por unidad de tiempo. (Segel, 1968). A temperaturas elevadas el incremento es retardado hasta una máxima velocidad y después de ésta la actividad disminuye, tal y como se puede observar en la figura 2.5.2. El decremento en la tasa de actividad es el resultado de la temperatura en la estabilidad de la enzima, causada por la termosensibilidad natural de la proteína (Bisswanger, 2002).

La temperatura óptima de la enzima es un parámetro de la tasa operacional verdadera. A bajas temperaturas, la tasa de formación de producto es constante, pero a temperaturas elevadas disminuye. El resultado de la disminución de la cantidad total de enzima presente es causado por la desnaturalización en función del tiempo y la temperatura. La estabilidad depende de varios factores, entre los cuales se incluyen el pH, fuerza iónica del medio y la presencia o ausencia de ligandos. Las enzimas de bajo peso molecular, compuestas por una cadena polipeptídica que posee enlaces disulfuro son usualmente más estables al calor que las de elevado peso molecular o que las enzimas oligoméricas (Segel, 1968).

En general, las energías de activación para transformar los reactantes a productos (catálisis) en reacciones catalizadas enzimáticamente están en un rango de 6,000 a 15,000 cal/mol y las energías de desactivación están en un rango de 50,000 a 150,000 cal/mol. A temperaturas elevadas, la desnaturalización se lleva a cabo muy rápidamente, debido a que muchas moléculas tienen suficiente energía para estar

en estado de desnaturalización. El efecto de la temperatura en la estabilidad puede ser determinado experimentalmente incubando soluciones enzimáticas a diferentes temperaturas en ausencia de sustrato bajo condiciones constantes, retirando alícuotas a diferentes intervalos de tiempo y determinando la actividad en mezclas de reacción que contienen al sustrato. La actividad debe ser determinada a pH constante y a la temperatura óptima de la enzima (Whitaker, 1994).

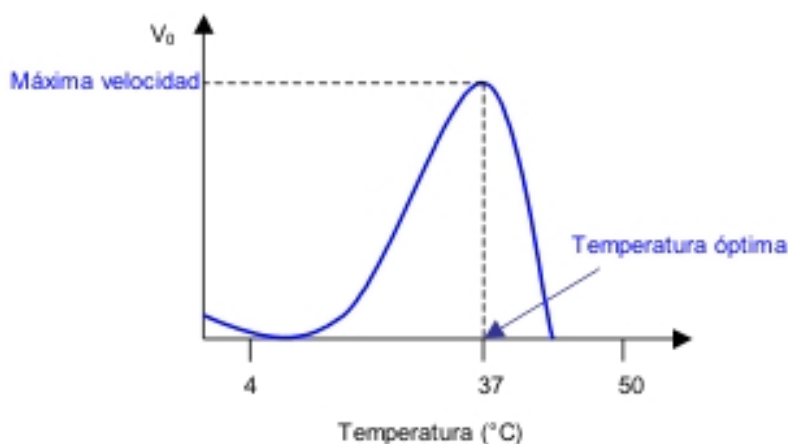


Figura 2.5.2. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.

Un método para cuantificar el efecto que tiene la temperatura en la actividad enzimática es la determinación de Q_{10} , la cual está definida como el incremento en la tasa de reacción cuando se incrementan 10°C en temperatura:

$$Q_{10} = \frac{\text{Tasa de Reacción}_{T+10^{\circ}\text{C}}}{\text{Tasa de Reacción}_T}$$

La Q_{10} se determina observando las tasas de reacción a dos temperaturas diferentes con 10°C de diferencia. Un método cuantitativo que relaciona el efecto de la

temperatura es la ecuación de Arrhenius (Whitaker, 1994), en la cual se puede observar la dependencia de la tasa específica de reacción k , con la temperatura:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

ó

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{2.3RT}$$

Donde k es una constante de la tasa específica de reacción, T es la temperatura en °K y A , E_a son constantes empíricas. E_a es usualmente referida como la energía de activación y A es el factor de Arrhenius. Debido a que el coeficiente Q_{10} varia dependiendo de la E_a de la reacción catalizada, existe una relación entre estos cuando $T_2 - T_1 = 10^\circ\text{C}$, siendo:

$$Q_{10} = e^{10E_a / RT^2}$$

2.6 Importancia de las enzimas termoestables

Las enzimas termoestables se pueden clasificar en tres grupos, de acuerdo al rango de temperatura de estabilidad: termoestables moderadas (45-65°C), termoestables (65-85°C) y termoestables extremas (>85°C) (Demijaran y col., 2001).

Actualmente, el uso de las enzimas está limitado por su estabilidad, sin embargo la experiencia práctica de la ingeniería de proteínas ha demostrado que es posible producir enzimas termoestables a partir de microorganismos termófilos (Yano y Poulos, 2003).

La importancia que han adquirido las enzimas termoestables es debida a que pueden ser utilizadas en procesos industriales exigentes tales como la industria de la piel, lavado de equipo a temperaturas elevadas, la industria de lácteos, la industria del almidón, farmacéutica, de alimentos, textil, síntesis de aminoácidos, hidrolizados de proteína, síntesis orgánica (Jonhvesly y Naik, 2001; Haki y Rakshit, 2003), petróleo, química y papel. Asimismo, la operación a altas temperaturas tiene influencia significativa en la viabilidad y solubilidad de compuestos orgánicos; por ello las enzimas termoestables también son usadas en biorremediación (Becker, 1997).

Debido a que las reacciones enzimáticas son específicas, las enzimas con características de termoestabilidad pueden ser utilizadas para llevar a cabo reacciones que no podía ser posible realizarlas por enzimas mesófilas y por catálisis química. La viabilidad que tienen las enzimas termoestables les proporciona la característica para poder ser utilizadas en nuevas aplicaciones en el futuro (Haki y Rakshit , 2003).

2.7 Importancia de las enzimas en la industria

Las enzimas tienen un interés industrial muy importante. En la figura 2.7 se puede observar la distribución del mercado de las enzimas y su importancia: las proteasas representan el 60% del total de las enzimas del mercado, y las proteasas alcalinas representan el mayor porcentaje de comercialización del mercado (Seong y col., 2004).

Las proteasas tienen una elevada actividad catalítica y substratos específicos, pueden producirse en grandes cantidades y ser económicamente viables. Además tienen una amplia aplicación en diversos procesos, como por ejemplo en la industria de detergentes, textil, hidrolizados de proteínas, carne, fotografía, lácteos, piel, en alimentos horneados, manufactura de productos de soya, síntesis de aspartame, síntesis orgánica, industria farmacéutica (Rao y col., 1998; Jonhvesly y Naik; 2001, Marc y col., 2002; Haki y Rakshit, 2003).

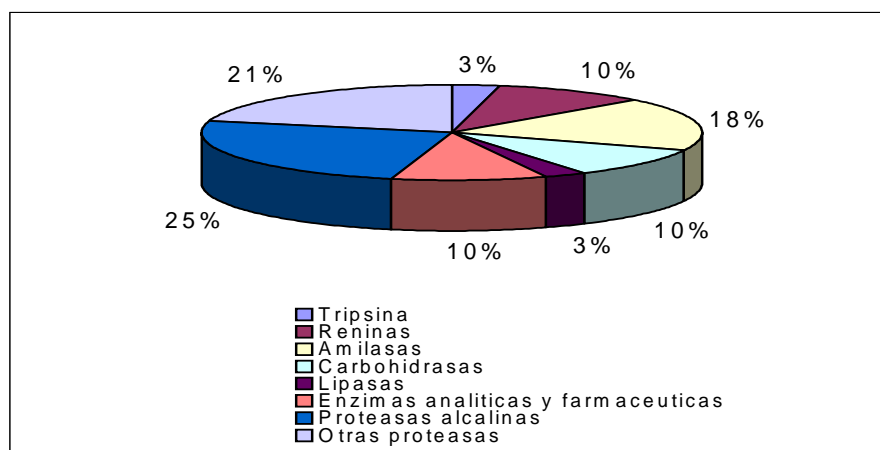


Figura 2.7. Distribución del mercado de las enzimas (Rao y col., 1998).

2.8 Métodos de producción de enzimas

El método tradicional para la producción de enzimas es la fermentación. Los procesos de fermentación se pueden dividir generalmente en dos: fermentación en medio líquido (FML) y fermentación en medio sólido (FMS). La fermentación en

medio sólido involucra el desarrollo de microorganismos en substrato sólido húmedo en ausencia o casi ausencia de agua en el medio (Mitchell y col., 2000).

La frontera entre la fermentación en medio sólido y la fermentación líquida, es el contenido de agua que está entre las partículas de los sustratos en función de absorción del material. Muchos procesos de FMS provocan la utilización de compuestos carbonados poliméricos como fuente de energía, normalmente asociados a estructuras complejas. Estos sólo pueden ser accesibles para el microorganismo después de la degradación o penetración de la pared de la célula. En contraste en la FML, se requieren nutrientes monoméricos solubles, que tienen la capacidad de dispersarse. En consecuencia, la FML tiene una cantidad neta de carbono y energía más accesible. Aun así se han observado una serie de ventajas de la FMS con respecto a la FML, como se puede ver en la tabla 2.8 (Mitchell y col., 2000).

Las proteasas pueden ser producidas en fermentación sumergida y en fermentación sólida, dependiendo de las condiciones que sean requeridas por el microorganismo para la máxima producción de enzima. Un factor muy importante para definir el medio de producción de enzimas es el costo. La fermentación en medio líquido tiene ciertas ventajas tales como son un buen control del proceso y fácil recuperación de las enzimas extracelulares, micelio o esporas; sin embargo los productos están muy diluidos y los extractos enzimáticos son menos estables que los producidos por fermentación en medio sólido. La FMS es el medio ideal para la producción de

enzimas fúngicas y presenta ciertas ventajas dentro de las cuales destacan la simplicidad del método, bajos costos de producción, alta concentración de enzima y bajas cantidades de líquido residual, algunas otras ventajas se presentan en la tabla 2.8. (Sandhya y col., 2005)

2.8.1 Fermentación en medio sólido

La FMS se define como la fermentación que involucra medio sólido, en ausencia (o casi ausencia) de agua libre. Sin embargo, debe poseer sustrato suficiente que soporte el desarrollo y metabolismo del microorganismo. Los aspectos de importancia que deben ser considerados, en general, para el desarrollo de bioprocesos en FMS, incluyen la selección del microorganismo y de un sustrato adecuado, la optimización de los parámetros del proceso y la separación y purificación del producto (Pandey, 2003).

La adecuada selección del sustrato es un punto clave para la FMS, debido a que en este tipo de fermentación el sustrato es insoluble y actúa como un soporte físico y fuente de nutrientes. Para la selección del sustrato se deben tener en cuenta dos consideraciones de gran importancia; una es que el sustrato sea específico para el microorganismo, evitando seleccionar alguno que no pueda ser utilizado por éste. La segunda está relacionada con la producción, usando preferentemente sustratos adecuados para productos específicos. En algunos casos se requiere probar varios

sustratos para seleccionar el más adecuado. De manera similar, debe seleccionarse el microorganismo adecuado para la producción de lo que se requiera.

Otros aspectos relevantes son la selección de los parámetros del proceso y su optimización. Esto incluye parámetros fisicoquímicos y bioquímicos tales como tamaño de partícula, textura inicial, temperatura de incubación, agitación y aeración, edad y peso del inóculo, suplementación de nutrientes como N, P, elementos traza, fuentes de carbono adicional e inductores, extracción del producto y su purificación (Pandey, 2003).

Una de las características de importancia de la FMS es que se minimiza la represión catabólica, además de que se estimula la producción de moléculas reguladoras que favorecen altas producciones de enzima (Aguilar y col., 2004).

Durante la FMS se genera gran cantidad de calor, que es directamente proporcional con las actividades metabólicas del microorganismo. La temperatura puede llegar estar 20°C por arriba de la temperatura de incubación requerida.

Existen otros factores que son muy relevantes en la fermentación en medio sólido, tales como los sustratos que se emplean, el oxígeno, la humedad del medio y la actividad de agua.

Tabla 2.8. Comparación de los sistemas de FMS y FML (Mitchell y col., 2000)

| FMS | FML |
|--|--|
| Algunos productos se producen sólo por estas condiciones. | Varios productos se pueden producir por un amplio rango de microorganismos |
| El medio es relativamente simple y refinado. Puede contener nutrientes necesarios para el desarrollo, únicamente requiere solución mineral. Sin embargo el substrato puede ser variable. | El medio contiene más ingredientes y esto puede elevar el costo de producción. Algunos ingredientes pueden perder solubilidad por acción de los demás componentes. |
| La baja disponibilidad de agua evita el desarrollo de contaminantes | La actividad de agua es muy alta y muchos microorganismos pueden desarrollarse. |
| Mediante la utilización de reactores pequeños se pueden tener grandes producciones. | Se ocupan grandes volúmenes y se obtienen bajas producciones |
| Altas concentraciones de substrato permiten altas concentraciones de producto. | Altas concentraciones de substrato pueden causar problemas reológicos. Puede ser requerida la alimentación de substratos al sistema. |
| La aireación en el sistema se facilita teniendo así la cantidad de oxígeno requerida disponible. | Pueden requerirse presiones altas. La transferencia de gas es usualmente limitada en la fase líquida. |
| El mezclado de partículas es imposible y el desarrollo puede estar limitado por difusión de nutrientes. | Se pueden utilizar mezclas de partículas y la difusión de nutrientes usualmente no es limitada. |
| La remoción de calor metabólico es restringido, provocando problemas de sobrecalentamiento. | Con la adición de agua se puede controlar la temperatura |
| Del proceso pueden obtenerse desde productos simples hasta más concentrados. | El proceso requiere remoción de grandes volúmenes de agua y es caro. La purificación de productos puede ser fácil. |
| La cantidad de líquido residual es mínima. | Se producen grandes volúmenes de líquido residual. |

Substratos: Regularmente los materiales/matrices usados para FMS tienen baja conductividad térmica, por lo que la eliminación del calor del proceso puede ser muy lenta. La temperatura del sustrato es crítica en FMS, pudiendo afectar el desarrollo de microorganismos, la formación de esporas y germinación y la formación de producto.

Oxígeno: En fases tempranas de la FMS la temperatura y concentración de oxígeno permanecen constantes, pero cuando progresa la fermentación el oxígeno se transfiere y el resultado es la generación de calor debido a el metabolismo del microorganismo.

Humedad del medio: Humedades elevadas pueden resultar en una disminución de la porosidad del sustrato, lo que puede afectar a la penetración del oxígeno. Una baja humedad puede favorecer la accesibilidad de los nutrientes por los poros, resultando en un mayor desarrollo microbiano (Pandey, 2003).

Actividad de agua: La relación de agua en FMS debe estar críticamente evaluada, debido a que ésta determina la actividad microbiana. En general, un tipo de microorganismo puede desarrollarse en sistema de FMS con una determinada a_w . La importancia de la a_w se le atribuye a los parámetros de transferencia de masa del agua y solutos sobre las células microbianas. El control de este parámetro puede usarse para modificar la producción de metabolitos o la excreción por los microorganismos (Pandey, 2003).

Así en la FMS existen diversos factores que son de gran importancia para este tipo de fermentación. La variación en estos factores puede tener consecuencias en cuanto a la producción del metabolito requerido.

La fermentación en medio sólido es un proceso que ha sido ampliamente utilizado para la producción de enzimas. Para dicho propósito se han utilizado una gran variedad de sustratos y cepas, tal y como se puede observar en la tabla 2.8.1 (Pandey, 2003).

Tabla 2.8.1. Sustratos y cepas utilizados por diversos autores para la producción de proteasas.

| SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS | | | |
|--|---|---|------------------------------|
| Cepa | Fuente de carbono | Fuente de nitrógeno | Autor |
| <i>Aspergillus flavus</i> | Salvado de trigo | NaNO ₃ | Malathi y Chakraborty , 1991 |
| <i>Thermoactinomyces sp. HS 682</i> | Maltosa, Xilosa | Casaminoacidos | Tsuchiya y col., 1991 |
| <i>Rhizopus oligosporus</i> | Salvado de arroz | Salvado de arroz | Ikasary y Mitchell, 1994 |
| <i>Penicillium expansum</i> | Glucosa | Cascara de arroz | Dahot, 1994 |
| <i>Bacillus brevis</i> | Lactosa | Harina de soya | Banerjee y col., 1999 |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | Salvado de trigo | NaNO ₃ | Aikat y Battacharyya, 2000 |
| <i>Bacillus sp. JB 99</i> | Pasta de piña | NaNO ₃ | Johnvesly y col., 2002 |
| <i>Thermoactinomyces lanuginosus</i> | Glucosa | NH ₄ Cl | Jensen y col., 2002 |
| <i>Rhizopus oligosporus IHS13</i> | Salvado de trigo | Salvado de trigo | Haq y Mukhtar, 2004 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | Harina de trigo | Harina de soya | Wang y col., 2005 a |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Harina de desperdicios de camarón y de cangrejo | Harina de desperdicios de camarón y de cangrejo | Wang y col., 2005 b |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | Salvado de trigo | Salvado de trigo | Sandhya y col., 2005 |

CAPÍTULO 3

ANTECEDENTES ANTECEDENTES

3 ANTECEDENTES

Es conocido que una gran variedad de microorganismos, como bacterias, hongos, levaduras, plantas y tejidos de animales son capaces de producir proteasas. Con el incremento de la demanda industrial surge la posibilidad de producir proteasas de microorganismos exóticos (termófilos, termotolerantes, alcalófilos, etc) que pueden ser utilizados en biocatálisis en la nueva era de la biotecnología (Prakasham y col., 2005).

El primer hongo termófilo estudiado fue *Mucor pusillus*, el cual fue aislado del pan y descrito hace siglos por Lint. Tiempo después Tsiklinskaya descubrió otro hongo termófilo, *Thermomyces lanuginosinus*, desarrollado en una papa (Maheshwari, 2000).

Las enzimas proteolíticas de microorganismos termofílicos tienen importancia económica; las proteasas alcalinas acaparan gran parte del comercio de enzimas. Los estudios sobre producción de enzimas proteolíticas a partir de microorganismos termofílicos son escasos y dentro de los géneros microbianos utilizados para dicho propósito destacan los generos *Bacillus* y *Thermoactinomyces* (Sunita y col., 1999).

Ong y Gaucher en 1976, encontraron una proteasa alcalina es producida por el hongo termofílico *Malbranchea pulchella* var. *Sulfurea*, cuya estabilidad se estimulaba por la adición del ión calcio. Proteasas termoestables neutras y alcalinas

de bacterias termofílicas y actinomicetos han sido encontradas también por algunos investigadores (Maheshwari y col., 2000).

Sunita y col. (1999) realizaron estudios sobre la producción de proteasas alcalinas termoestables extracelulares a partir de *Thermoactinomyces* sp. E79 expresando el gen en *E. Coli* y determinando que la producción es reprimida en el medio de cultivo por la presencia de glucosa.

En 2001, Johnvesly y Naik realizaron estudios en la producción de proteasa alcalina termoestable utilizando la especie termoalcalofílica *Bacillus* sp. JB-99 en un medio de cultivo definido mediante fermentación en medio líquido. El cultivo lo realizaron a 55°C con agitación y estudiaron el efecto de diferentes fuentes de carbono (ácido cítrico, almidón soluble, fructosa y rafinosa) y nitrógeno (NaNO_3 y KNO_3) sobre la producción de proteasas. La enzima producida tuvo una actividad óptima a 70°C y pH 11, sin embargo en presencia de 10 mM de Ca^{2+} la actividad máxima se alcanza a 80°C; la enzima presentó estabilidad de 40 a 70°C. La proteasa se inhibió en presencia de PMSF, con lo cual determinó que se trataba de una proteasa alcalina, sugiriéndose que puede ser usada en la formulación de detergentes (Jonhvesly y Naik, 2001).

Seong y col. en 2004 reportaron el estudio de la producción de serin proteasas a partir de *Streptomyces tendae*, encontrando que dicha enzima tiene un peso molecular de 21 kDa, actividad óptima a 70°C y pH óptimo de 6; presenta una

CAPÍTULO 4

38

estabilidad durante 30 minutos a 55°C y resistencia a detergentes neutros y solventes organicos como Triton X-100, Tween 80, metanol, etanol, acetona y 2-propanol al 5% (v/v).

CAPÍTULO 4

JUSTIFICACIÓN JUSTIFICACIÓN

4 JUSTIFICACIÓN

En México el potencial de captura de pescado es muy importante, para julio de 2005 el pescado capturado fue de 879 389 toneladas, de los cuales 572 133 toneladas fueron destinadas al consumo humano directo; 291 620 para el consumo humano indirecto y 15 636 toneladas para uso industrial. Sin embargo desde el proceso de captura hasta la industrialización el pescado no es aprovechado al 100% (INEGI, 2005). Una cantidad importante de subproductos pesqueros ricos en proteínas provenientes de la industria pesquera son desechados sin darle el valor que se debe, es decir el contenido de proteína es desaprovechado. Además, debido a que los desechos no pueden ser descargados de manera directa, implica una gran inversión. Tradicionalmente, el material de desperdicio del pescado es convertido en harina y se utiliza como alimento para ganado. Utilizar estos productos para la producción de proteasas es de gran importancia debido a los bajos costos que se generarían para la producción, además de que se les podrían encontrar aplicaciones industriales a las enzimas (Ellouz y col., 2001).

La producción de enzimas proteolíticas mediante fermentación en medio sólido, utilizando subproductos de pesca como inductores, puede representar una alternativa para la obtención de productos con valor agregado. Dichas enzimas Por ejemplo, podrían ser utilizadas para la recuperación y modificación de proteínas del pescado, así como también para la producción de hidrolizados de proteína.

Para establecer las diferencias que existen en los patrones de producción de proteasas se utilizó como soporte inerte espuma de poliuretano, la cual es un material poroso, capaz de retener grandes cantidades de medio líquido y que permite tener sistemas de cultivo homogéneos en donde se facilitan los procesos de recuperación de los extractos (Aguilar, 2000).

La base del presente trabajo es la producción de extractos proteolíticos utilizando harina de pescado como inductor y espuma de poliuretano como soporte inerte, sin embargo un aspecto que tiene aún más relevancia es la utilización de cepas termófilas y termotolerantes que pueden conferir termoestabilidad a las enzimas producidas. Dichas cepas fueron aisladas de fuentes en donde los nutrientes principales eran los lípidos y azúcares (Córdova y col, 2003), y aún no han sido estudiadas para la producción de enzimas proteolíticas.

Las enzimas termoestables pueden tener un gran número de aplicaciones comerciales (Haki y Rakshit, 2003). Las proteasas representan el 65% del mercado mundial de enzimas (Rao y col, 1998) y estas enzimas son usadas ampliamente en la industria de alimentos, farmacéutica, piel e industria textil. Las aplicaciones de estas enzimas se pueden incrementar en el futuro, debido a la necesidad de enzimas estables para realizar biocatalisis y que actúen bajo condiciones no habituales, por ejemplo a temperaturas superiores a 45°C (Haki y Rakshit, 2003).

CAPÍTULO 5

HIPÓTESIS HIPÓTESIS

5 HIPÓTESIS

Es posible la obtención de extractos proteolíticos termoestables por fermentación en medio sólido a partir de cepas termotolerantes y utilizando harina de pescado como fuente inductora y espuma de poliuretano como soporte inerte.

CAPÍTULO 6

OBJETIVOS

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Producción y caracterización de un extracto proteolítico termoestable a partir de una cepa termotolerante, resultante de un escrutinio de diferentes cepas fúngicas.

6.2 Objetivos particulares

- Seleccionar una cepa fúngica termotolerante productora de proteasas termoestables.
- Caracterización del extracto enzimático en términos de pH y temperatura óptimos, cofactores necesarios y sensibilidad a inhibidores.
- Evaluación de la termoestabilidad de los extractos proteolíticos.

CAPÍTULO 7

MATERIALES Y MÉTODOS
MATERIALES Y MÉTODOS

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Microorganismos utilizados

Las 72 cepas empleadas pertenecen a la colección del Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad de Guadalajara (ver Tabla 7.1). Las cepas fueron conservadas en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

Tabla No. 7.1. Cepas fúngica utilizadas.

| COLECCIÓN A | COLECCIÓN A | COLECCIÓN B | COLECCIÓN B |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 3 bIII | 31 c IV | 1.4 eB | 2.7 bB |
| 5 bIV | 33 b IV | 1.5 bB | 2.7 cB |
| 7 aIV | 35 b IV | 1.5 cB | 2.8 bB |
| 7 d | 36 a IV | 1.6 B | 2.9 aB |
| 8 a IV | 37 b IVA | 1.6 aB | |
| 8 b | 41 aIV | 1.6 bB | |
| 9 aIV | 42 cV | 1.7 cB | |
| 9 bV | 43 aIV | 1.8 aB | |
| 12 a IV | 46 aIV | 1.8 bB | |
| 13 bIV | 46 cV2 | 1.8 cB | |
| 14 aIV | 48 aIV | 1.8 vB | |
| 16 bIV | 51 aVA | 1.9 aB | |
| 17 dIII | 52 bIV | 1.9 bB | |
| 19 | 52 cV | 1.9 vB | |
| 19 bV | 56 cIV | 1.10 Ab | |
| 21 bIV | 60 bV | 2.1 dB | |
| 21 b IVA | 64 aIV | 2.2 aB | |
| 22 aIV | 66 aV | 2.2 bB | |
| 23 aIV | 67 bIV | 2.2 cB | |
| 25 bIV | 68 aV | 2.5 aB | |
| 25 cIV | 68 a IVA | 2.6 aB | |
| 27 b | 71 bIV | 2.6 bB | |
| 31 aV | | 2.7 aB | |

Nota: La colección A fue aislada de pasta de coco y la colección B fue aislada de bagazo de caña.

7.2 Preselección de cepas productoras de proteasas

Para llevar a cabo la selección de la cepa productora de proteasas termoestables, se realizó una preselección en dos etapas la primera basada en el crecimiento a 45°C y la segunda en la producción de proteasas en placa.

7.2.1 Medios de cultivo

7.2.1.1 Agar papa dextrosa

Agar papa dextrosa (PDA) 39 g/L

En un matraz Erlenmeyer se disolvió el medio, calentando hasta ebullición durante un minuto y se esterilizó a 121°C (15 psi) durante 15 minutos. En condiciones asépticas se vació el medio de cultivo en cajas de Petri estériles.

7.2.1.2 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, 0.1 M en $\frac{1}{4}$ del volumen total a preparar, se esterilizó a 110°C (10 psi, para evitar reacciones de caramelización) durante 10 minutos. En otro matraz se preparó el agar bacteriológico en los $\frac{3}{4}$ de volumen restante, se calentó hasta ebullición durante un 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 las cajas de Petri estériles (Ramírez y Luna., 1996).

7.2.2 Crecimiento a 45°C

Las 72 cepas se inocularon en placas con medio de cultivo PDA y se incubaron a 45°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo se analizó el crecimiento, el experimento se realizó por duplicado.

7.2.3 Producción de proteasas en placas de agar leche descremada

En placas de agar leche descremada se inocularon las cepas mediante la técnica de sembrado por picadura, tal y como se puede observar en la Figura No. 7.2.3 (Prado, 2000; Herrera, 2003). Una vez inoculadas las cajas se incubaron a 45°C durante un periodo de 72 horas, tomando mediciones de los diámetros de la colonia y halo de hidrólisis cada 12 horas.



Figura No. 7.2.3 Método de sembrado para la preselección de cepas productoras de proteasas en placas de agar leche descremada.

7.3 Selección de cepas productoras de proteasas

La selección de las cepas productoras de proteasas se realizó a partir de cultivos en medio sólido, utilizando espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte y harina de pescado como sustrato .

7.3.1 Preparación del sustrato

Se ajustó el tamaño de partícula de la harina de pescado (HP) (ver composición en anexo A), tamizándola con una malla del número 20 (0.841 mm de abertura). Adicionalmente, se le determinó la humedad en la termobalanza, con el fin de ajustar la humedad al valor deseado.

7.3.2 Preparación del soporte

El PUF se lavó con agua caliente, posteriormente se secó a 60°C durante 12 horas y se tamizó con una malla del número 20 (0.841 mm de abertura).

7.3.3 Preparación del inóculo

Las cepas utilizadas se inocularon en matraces Erlenmeyer con PDA, se incubaron a 45°C durante 7 días y las esporas producidas se cosecharon con una solución de Tween 80 al 0.01% y se contaron en una cámara de Neubauer.

7.3.4 Cultivo en medio sólido

Se empacaron columnas de vidrio de 20 cm de longitud por 2.5 cm de diámetro con PUF/HP en una relación 70/30. Además, se ajustaron las condiciones que se muestran en la en la Tabla No. 7.3.4 (Saucedo y col., 1992).

Tabla 7.3.4 Condiciones iniciales de la fermentación en medio sólido

| Condición | Ajuste |
|---------------|-----------------------------------|
| Inóculo | 2×10^7 esporas/ g.m.s. * |
| Humedad | 50% |
| Temperatura | 45°C |
| pH Inicial | 7 |
| Flujo de aire | 40 mL/ min. |

*g.m.s: gramos de materia seca

El ajuste de humedad se realizó con una solución salina (KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, KCl 0.05 g/L) y con el inóculo. En la Figura No. 7.3.4 se puede observar el sistema de fermentación.

7.3.4.1 Obtención del extracto proteolítico

La obtención del extracto proteolítico se realizó mediante prensado, filtrándose a continuación a través de papel Whatman No. 1. El filtrado recuperado se consideró como extracto proteolítico. Los extractos se almacenaron a 4°C hasta el momento de la determinación de la actividad proteasa (Aproximadamente 1 semana).

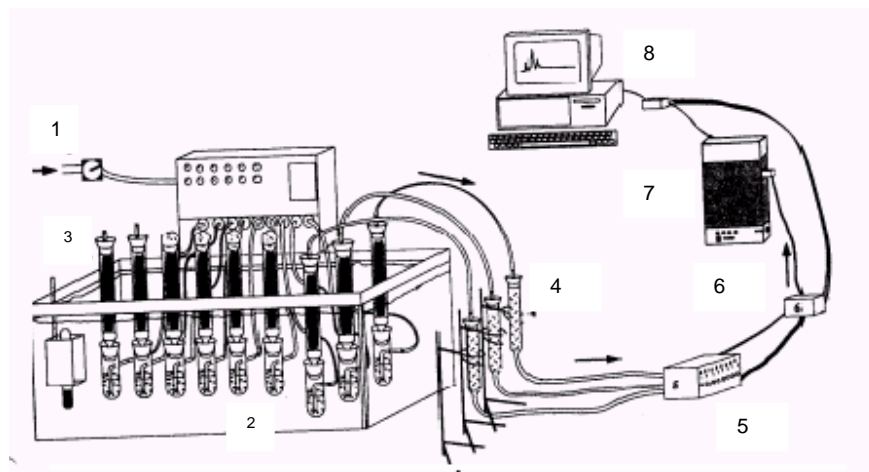


Figura 7.3.4 Representación del sistema de cultivo en medio sólido. 1: Regulación de la presión de aire, 2: control de temperatura con agua, 3: Columnas de fermentación, 4: Tubos con sílica gel, 5: Muestreador de gases, 6: Inyector de gases, 7: Cromatógrafo de gases, 8: Computadora.

7.3.5 Determinación de actividad proteolítica

El ensayo de la actividad proteolítica se realizó utilizando como sustrato una solución de caseína al 1% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7, así como también una solución de ácido tricloro acético (TCA) al 5% (Aikat y Bhattacharyya, 2001). El ensayo se realizó por duplicado a una muestra y un testigo.

7.3.5.1 Muestra

En un tubo de ensaye se adicionaron 950 μ L de solución de caseína y se incuban a 45°C durante 10 minutos, posteriormente se adicionan 50 μ L de extracto enzimático, se agita y se deja reaccionar durante 15 minutos. La reacción es detenida adicionando 1.5 mL de TCA al 5% y se centrifuga a 14 000 x g (medida relativa de la

velocidad de sedimentación de una partícula, ver anexo A) durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtra en papel Whatman No. 1 y se le determina el contenido de proteína liberada.

7.3.5.2 Testigo

En un tubo de ensaye se adicionaron 950 μ L de solución de caseína y se incubaron a 45°C durante 10 minutos, posteriormente se adicionaron 1.5 mL de TCA al 5%, se agito y se dejo reaccionar durante 15 minutos. Finalmente se adicionaron 50 μ L de extracto enzimático y se centrifugo a 14 000 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtra a través de papel Whatman No. 1 y se le determina el contenido de proteína liberada.

7.3.6 Determinación de proteína

La determinación de proteína se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford. Para realizar la determinación de proteína fue necesario preparar el Reactivo de Bradford y una solución de tirosina para construir una curva patrón (Oseas y Zezzi, 2006)..

En un tubo de ensaye se adicionaron 50 μ l de muestra, posteriormente se le agregaron 2.5 mL de reactivo de Bradford, se dejó reposar durante 5 min. y se leyó la

absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se determinó interpolando la absorbancia de la muestra en una curva patrón de tirosina (Ver anexo A).

7.3.6.1 Preparación de soluciones

Reactivo de Bradford (Bio-Rad, No de catalogo 5000002): Se diluyó una parte de reactivo Bio-Rad con cuatro partes de agua destilada y se filtró a través de papel filtro Whatman del número 1.

Solución de tirosina: Pesar 10 mg de tirosina y se afora a 10 mL con buffer de fosfatos pH 7, 0.1 M.

7.4 Determinación de las condiciones óptimas de actividad del extracto proteolítico

7.4.1 Tiempo de reacción

Se siguieron las metodologías descritas para la determinación de actividad proteolítica y proteína, variando el tiempo de hidrólisis en intervalos de un minuto y en un rango de 0 a 7 minutos.

7.4.2 Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica

Para determinar el efecto que tiene la temperatura sobre la actividad proteolítica, se siguió la metodología descrita para la determinación de actividad, variando la temperatura de reacción en intervalos de 10°C en un rango de temperatura de 30 a 80°C (De Azeredo y col., 2004).

7.4.3 Efecto del pH en la actividad proteolítica

Para determinar el efecto que tiene el pH en la actividad proteolítica se siguió la metodología descrita para determinación de actividad, variando el pH de reacción en un rango de 6 a 10. Para ello la solución de caseína al 1% fue preparada a diferentes valores de pH. Para el rango de pH 6 a 8 se utilizó buffer de fosfatos 0.1 M y buffer Tris-HCl 0.1M para el rango de pH entre 9 y 10 (De Azeredo, 2004).

7.5 Determinación de la estabilidad térmica del extracto

Una vez determinadas las condiciones óptimas de reacción del extracto proteolítico (tiempo de reacción, temperatura y pH), se determinó la estabilidad térmica. Esta determinación consistió en la preincubación del extracto enzimático a diferentes temperaturas (30-80°C) durante una hora y la posterior determinación de la actividad proteolítica cada 15 minutos (Sookkheo, 2000).

La cinética de inactivación térmica de las enzimas sigue generalmente una cinética de primer orden, de la forma:

$$A = A_0 e^{-K_d t}$$

Donde:

A: Actividad proteolítica residual

A₀: Actividad proteolítica inicial

K_d: constante de inactivación enzimática

t: tiempo

Las constantes de inactivación k_d y el tiempo de vida media de las proteasas se obtuvo de graficar $\ln (A/A_0)$ contra el tiempo (Mateos, 2005).

7.6 Estudios de inhibición

Se evaluaron tres inhibidores de proteasas: Fluoruro fenil metil Sulfonil (PMSF), inhibidor de serín proteasa; EDTA, inhibidor de metalo proteasas y β -mercaptoetanol, inhibidor de cisteín proteasas. El ensayo se realizó con una concentración final de 1 mM de cada inhibidor, preparados en buffers de fosfatos pH 7, 0.1 M y Tris-HCl pH 9, 0.1 M y agregados al extracto enzimático en relación 1:1. La actividad proteolítica se determinó en las condiciones óptimas del extracto, siguiendo la metodología descrita para la determinación de actividad proteolítica.

Para determinar el efecto de los compuestos evaluados se graficó el % de actividad residual en función de cada compuesto (Sookkheo y col., 2000; Tunga y col., 2003; De Azeredo y col., 2004).

7.7 Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad proteolítica

Una vez determinadas las condiciones óptimas del extracto proteolítico (tiempo de reacción, temperatura y pH), se evaluó el efecto que tienen iones metálicos sobre la actividad proteolítica. Se evaluó el efecto de 8 iones (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ ,

Ba²⁺, Fe²⁺) sobre la actividad proteolítica, preparando soluciones de estos a una concentración de 5 mM y disolviéndolos en la solución de caseína al 1%(Tunga y col, 2003). La actividad proteolítica se evaluó siguiendo la metodología descrita anteriormente.

CAPÍTULO 8

RESULTADOS Y DISCUSIONES

8 RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo se presentan los resultados con los que se alcanzan los objetivos del presente trabajo. Además, se presenta una discusión de los mismos.

8.1 Preselección de cepas productoras de proteasas

Para llevar a cabo la producción y caracterización del extracto proteolítico termoestable se inició con una preselección de cepas, la cual se realizó en dos etapas. La primera basada en el crecimiento a 45°C y la segunda basada en la producción de proteasas en placas de agar leche descremada. Los resultados obtenidos son los que se presentan a continuación.

8.1.1 Crecimiento a 45°C

En esta etapa 72 cepas fúngicas se inocularon en cajas de Petri en medio de cultivo PDA y se incubaron a 45°C durante 7 días. Bajo éstas condiciones de cultivo sólo 29 cepas presentaron crecimiento. Las cepas que crecieron a 45°C se enlistan en la Tabla No. 8.1.1, utilizándose dichas cepas en la siguiente etapa de selección.

8.1.2 Producción de proteasas en placas de agar leche descremada

Las 29 cepas fúngicas preseleccionadas se inocularon por la técnica descrita en la metodología y se midieron los halos de hidrólisis, así como el de la colonia, cada 12 horas. En esta etapa de preselección, 8 cepas formaron halo de hidrólisis,

valorándose su actividad proteolítica de acuerdo al índice de potencia (I. P.). El I. P. es la relación entre el diámetro del halo de hidrólisis y el diámetro de la colonia (Herrera, 2003; Alane y col., 1996).

$$\text{Índice de potencia (I. P.)} = \frac{\text{Diámetro del halo de hidrólisis}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

En la Tabla No. 8.1.2 se observa que las cepas que presentaron un I. P. mayor fueron las 36 aIV, 2.2 aB y 2.7 aB, por lo que fueron las cepas seleccionadas en esta etapa; en las Figuras No. 8.1.1 a 8.1.3 se observan los halos de hidrólisis formados por estas cepas.

Tabla No. 8.1.1 Relación de cepas que crecieron a 45°C

| Colección A | Colección B |
|--------------------|--------------------|
| 7 aIV | 1.4 eB |
| 19 bV | 1.5 bB |
| 22 aIV | 1.5 cB |
| 23 aIV | 1.6 B |
| 27 b | 1.7 cB |
| 31 aV | 1.8 bB |
| 31 cIV | 1.8 cB |
| 35 bIV | 1.9 aB |
| 36 aIV | 2.1 dB |
| 41 aIV | 2.2 aB |
| 46 aIV | 2.7 aB |
| 48 aIV | 2.8 bB |
| 51 aVA | |
| 52 bIV | |
| 66 aV | |
| 68 aV | |
| 68 al A | |

Tabla No. 8.1.2 Relación de cepas que originaron halo de hidrólisis. Mediciones a las 72 horas de incubación.

| CEPA | Dc | Dh | I.P. |
|--------|------|------|------|
| 36 aIV | 3.40 | 3.40 | 1.00 |
| 1.4 eB | 6.30 | 5.00 | 0.79 |
| 1.5 bB | 5.80 | 4.10 | 0.71 |
| 1.5 cB | 6.00 | 5.50 | 0.92 |
| 1.6B | 5.00 | 4.50 | 0.90 |
| 1.9 aB | 6.00 | 5.7 | 0.95 |
| 2.2 aB | 3.40 | 3.50 | 1.03 |
| 2.7 aB | 4.40 | 4.50 | 1.03 |

Nota : Dc: Diámetro de la colonia, Dh: Diámetro del halo de hidrólisis.

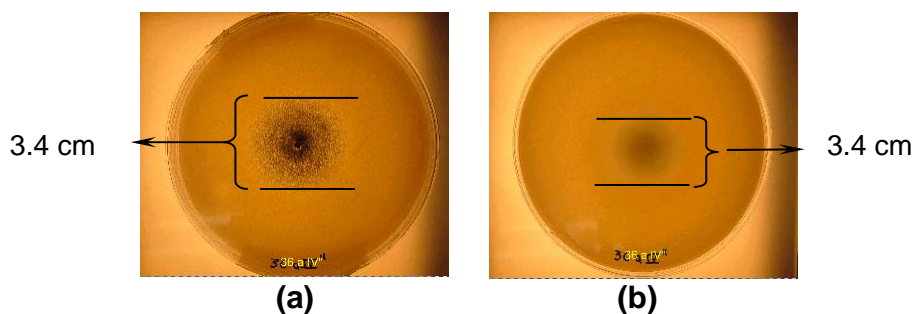


Figura No. 8.1.1 Cepa 36 aIV inoculada en placas de agar leche descremada a las 72 de incubación (a) Diámetro de la colonia , (b) Diámetro del halo de hidrólisis.

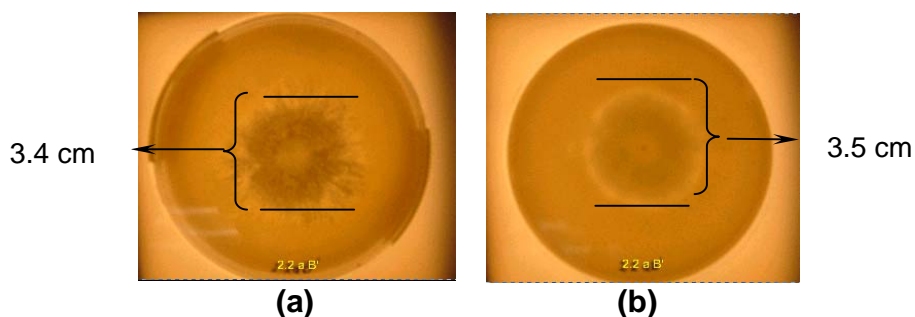


Figura No. 8.1.2 Cepa 2.2 aB inoculada en placas de agar leche descremada a las 72 de incubación (a) Diámetro de la colonia , (b) Diámetro del halo de hidrólisis.

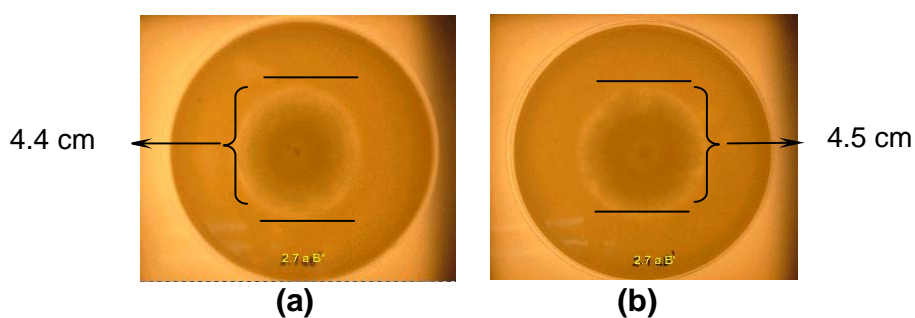


Figura No. 8.1.3 Cepa 2.7 aB inoculada en placas de agar leche descremada a las 72 de incubación (a) Diámetro de la colonia , (b) Diámetro del halo de hidrólisis.

Debido a que el método de I. P. sólo determina cualitativamente la capacidad de producción de proteasas, se procedió a hacer un experimento que permitiera establecer cuantitativamente cuál de las cepas preseleccionadas producía el extracto con mejores características de estabilidad térmica. Se procedió a realizar un cultivo en medio sólido con cada una de las cepas pre-seleccionadas, determinándose la actividad proteolítica y estabilidad térmica de los extractos producidos.

8.2 Selección de cepas productoras de proteasas

La selección de la cepa productora de proteasas termoestables se realizó evaluando la actividad enzimática y estabilidad térmica de los extractos proteolíticos producidos por las tres cepas seleccionadas anteriormente.

En este trabajo experimental las unidades enzimáticas se reportan como Unidades Internacionales (UI), que están definidas como μg de tirosina liberados por minuto.

8.2.1 Cultivo en medio sólido

Para realizar la fermentación en medio sólido se empleó harina de pescado como sustrato (inductor de la producción de proteasas) y espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte y se mantuvieron las condiciones que se muestran en la Tabla No. 7.3.4. Durante la fermentación se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se determinó la actividad proteolítica reportada como UI/mL de extracto enzimático. Es importante señalar que en esta etapa la actividad enzimática se determinó a 45°C , pH 7 y con un tiempo de reacción de 15 minutos .

En la Figura No. 8.2.1 se muestra el perfil de la actividad enzimática con respecto al tiempo de cultivo. Se observa que para los extractos producidos por las cepas 36 aIV y 2.2 aB la máxima actividad se presenta a las 36 horas (325.7 y 343.8 UI/mL de extracto, respectivamente), mientras que para el extracto producido por la cepa 2.7 aB la máxima actividad se presentó a las 48 horas de fermentación (181 UI/mL

de extracto). Para determinar las diferencias entre los extractos producidos por las cepas, se realizó un análisis estadístico (Ver anexo B) y se determinó que para los extractos producidos por las cepas 36 aIV y 2.2 aB no existe diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en la actividad proteolítica, siendo menor dicha actividad en la cepa 2.7 aB.

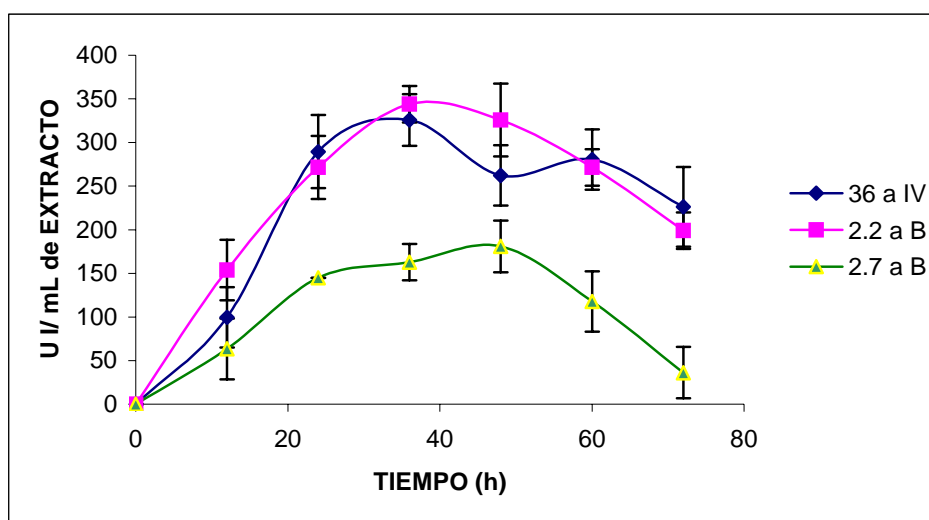


Figura 8.2.1 Perfil de la actividad enzimática de los extractos proteolíticos producidos por las cepas 36 aIV, 2.2 aB y 2.7 aB.

Se han reportado proteasas producidas por *Bacillus* sp. JB-99 en fermentación líquida, en donde se alcanza la máxima actividad (12780 UI/ mL) a las 24 horas de incubación (Johnvesly y Naik, 2001). Por otro lado, estudios con *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 indican que se alcanza la máxima actividad proteolítica (3000 U/ mL) a las 120 horas de fermentación, utilizando harina de soya como sustrato (Mabrouk y col., 1999). Los valores de actividad proteolítica de las cepas 36 aIV, 2.2 aB y 2.7 aB se pueden comparar con los de *Bacillus* sp. JB-99 y *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, aun cuando se obtuvieron por procesos distintos (FMS y FML respectivamente). Las actividades de las tres cepas estudiadas en este trabajo

son inferiores en ambos casos, aunque es importante señalar que en este trabajo las condiciones de producción de la enzima no fueron optimizadas. Ellouz y col. (2001), utilizando harina de pescado como inductor y trabajando con la cepa *Bacillus subtilis* reportaron una actividad máxima de 412 U/mL; dichos valores son similares a los de las cepas 2.2 aB y 36 aIV (325.7 y 343.8 UI/ mL de extracto, respectivamente).

8.3 Determinación de las condiciones óptimas del extracto proteolítico

8.3.1 Tiempo de reacción

Para definir el tiempo de reacción conveniente para la determinación de la actividad proteolítica de los extractos, se cuantificó la proteína liberada a diferentes tiempos de reacción. En la Figura No. 8.3.1.1 se observa la parte de la curva que mejor se ajusta a una línea recta, determinándose con esto que el tiempo óptimo de reacción para el extracto enzimático producido por la cepa 36 aIV y el sustrato (caseína) es también de tres minutos.

Para el caso del extracto producido por la cepa 2.2 aB en la Figura No. 8.3.1.2 se puede observar que el tiempo óptimo de reacción entre el extracto enzimático y el sustrato es de tres minutos.

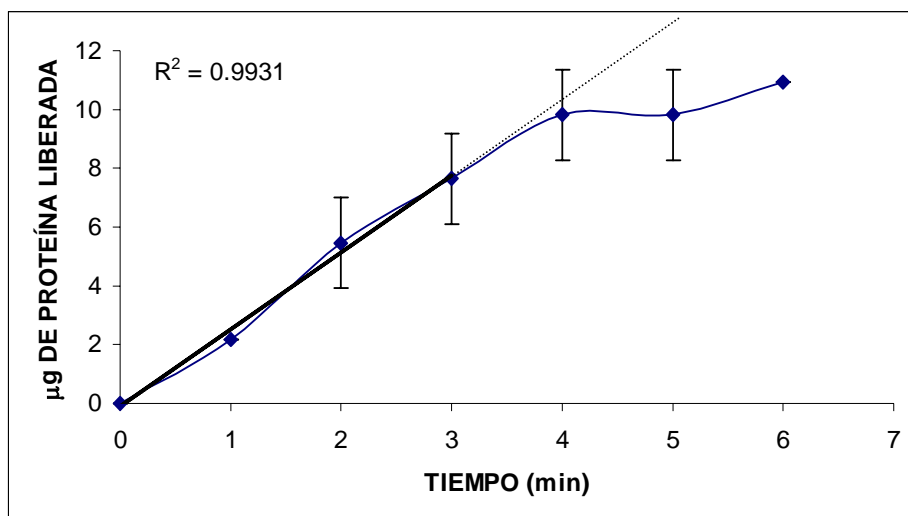


Figura No. 8.3.1.1 Determinación del tiempo de reacción para el extracto producido por la cepa 36 aIV.

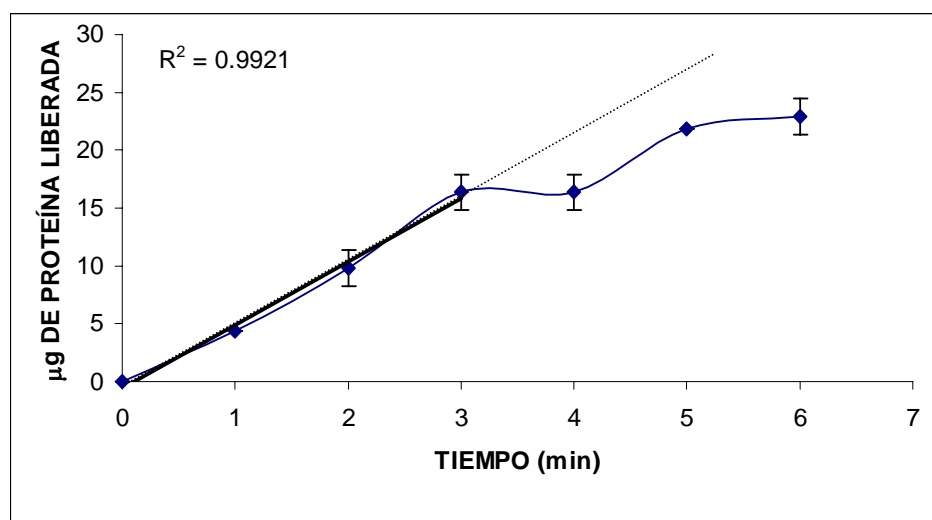


Figura No. 8.3.1.2 Determinación del tiempo de reacción para el extracto producido por la cepa 2.2 aB.

8.3.2 Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica

Una vez estimado el tiempo óptimo de reacción, se procedió a caracterizar los extractos enzimáticos en cuanto a su temperatura óptima. Para el caso del extracto producido por la cepa 36 aIV se determinó que la temperatura más adecuada para llevar a cabo la reacción es de 50°C; a temperaturas mayores a ésta, la actividad proteolítica disminuye de 1357 a 452 U/mL (un 66% de pérdida) (Figura No. 8.3.2.1). Por otro lado, para el extracto producido por la cepa 2.2 aB se determinó que la temperatura más adecuada para llevar a cabo la reacción es también de 50°C. Sin embargo, en contraste con el extracto producido por la cepa 36 aIV, a temperaturas mayores la actividad proteolítica sólo disminuyó de 1357 a 1176 U/ mL (un 14% de pérdida) (Figura No. 8.3.2.2). Estos resultados nos indican que el extracto producido por la cepa 2.2 aB puede tener mayor estabilidad térmica que el extracto producido por la cepa 36 a IV.

8.3.3 Efecto del pH en la actividad proteolítica

Una vez determinado el tiempo y temperatura óptimos de reacción, se procedió a determinar el pH óptimo de actividad. En la Figura No. 8.3.3.1 se puede observar que el pH óptimo de reacción para el extracto proteolítico producido por la cepa 36 aIV es de 7, lo que indica que puede ser clasificada como una proteasa neutra (Rao y col., 1998). Por otro lado, se determinó que el pH óptimo de reacción para el extracto proteolítico producido por la cepa 2.2 aB es de 9 (Figura No. 8.3.3.2), con lo cual puede ser clasificada como una proteasa alcalina (Rao y col., 1998). El pH óptimo es

un parámetro que tiene gran relevancia para determinar el uso de la enzima, en este caso la proteasa producida por la cepa 2.2 aB tiene gran importancia ya que las proteasas alcalinas ocupan el 25% del mercado mundial de comercialización de enzimas (Rao y col., 1998).

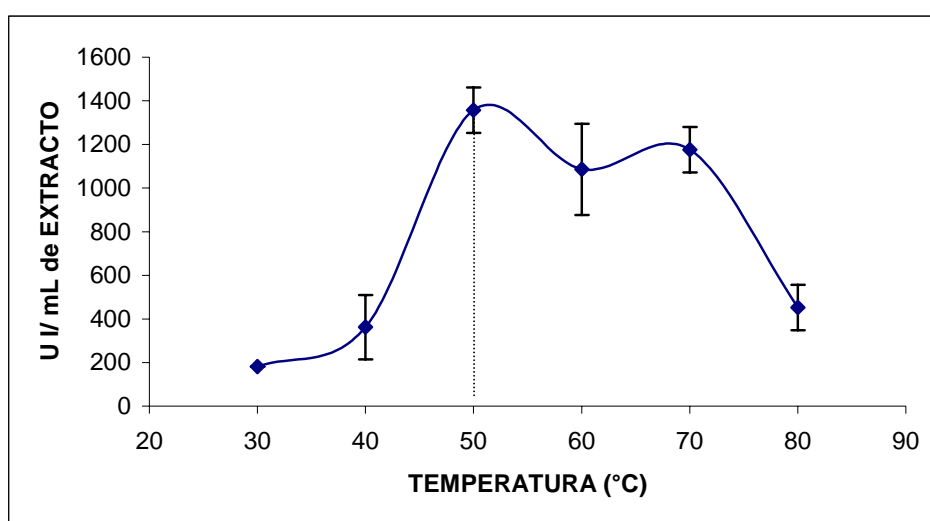


Figura No. 8.3.2.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto producido por la cepa 36 aIV.

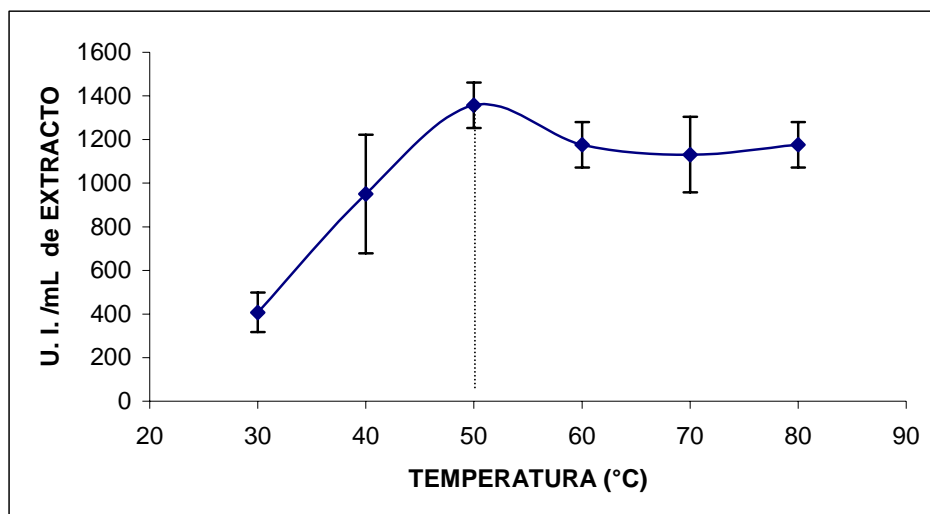


Figura No. 8.3.2.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto producido por la cepa 2.2 aB.

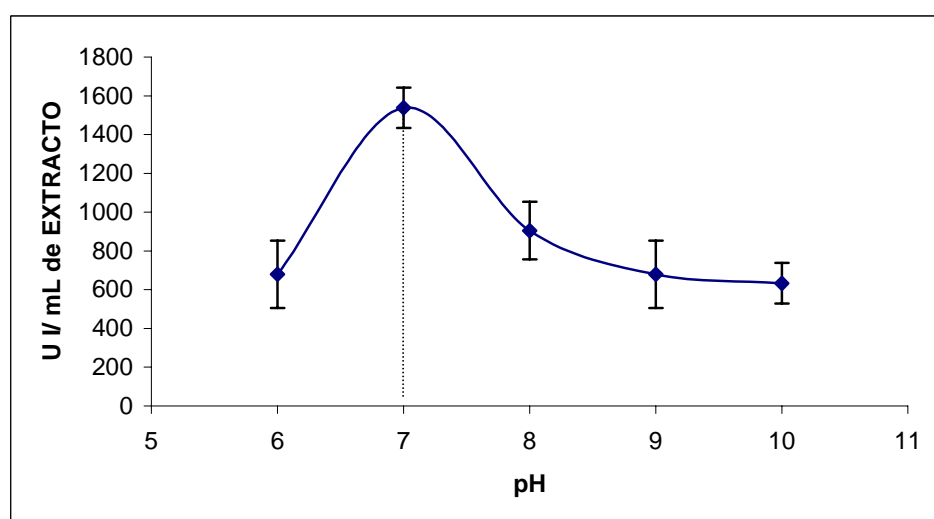


Figura No. 8.3.3.1 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del extracto producido por la cepa 36 aIV.

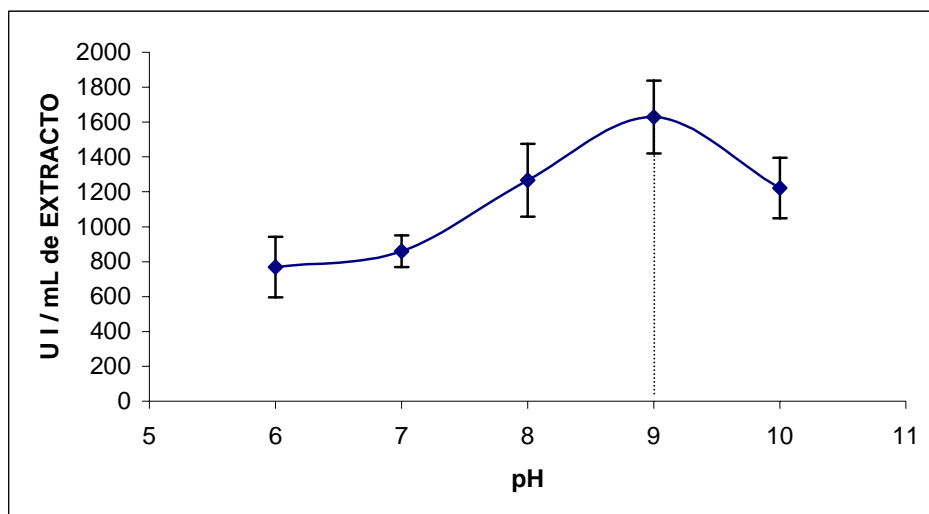


Figura No. 8.3.3.2 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del extracto producido por la cepa 2.2 aB.

8.4 Determinación de la estabilidad térmica del extracto

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la determinación de la actividad proteolítica (tiempo de reacción, pH y temperatura), se evaluó la estabilidad térmica de los extractos. En la Figura No. 8.4.1 se observa que el extracto proteolítico producido por la cepa 36 aIV conserva el 70, 65 y 53% de actividad a 30, 40 y 50°C, respectivamente durante una hora; sin embargo, a 60, 70 y 80°C sólo se conserva el 18,18 y 7% de la actividad proteolítica, respectivamente. En la Figura No. 8.4.2 se puede observar que el extracto producido durante la cepa 2.2 a B conserva el 90 y 73% de actividad proteolítica a 30 y 40°C respectivamente por una hora, mientras que a 50 y 60°C hay una reducción de actividad del 60% y a 70 y 80°C hay una pérdida considerable de actividad manteniendo el 18 y 7 %, respectivamente.

Debido a que la termoestabilidad es un factor determinante en la selección de la cepa productora de proteasas se efectuó un análisis que permitió comparar la termoestabilidad de los extractos producidos entre las cepas 36 aIV y 2.2 aB.

Los resultados de la Tabla No. 8.4.1 muestran que el extracto enzimático producido por la cepa 2.2 a B presenta una vida media de 2.96, 1.07, 0.74, 0.5, 0.33 y 0.16 horas a 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C. Por otro lado el extracto producido por la cepa 36 a IV que tiene una vida media de 1.78, 1,0.8, 0.33, 0.28 y 0.20 horas a 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C. Los resultados obtenidos nos indican que el extracto producido por la cepa 2.2 aB tiene tiempos de vida media mayores que el producido por la cepa 36 aIV a 30,40,60 y 70°C, mientras que a 50 y 80°C el tiempo de vida media del extracto producido por la cepa 36 a IV es ligeramente mayor al producido por la cepa 2.2 a B 0.8,0.2 frente a 0.74, 0.16 horas, respectivamente.

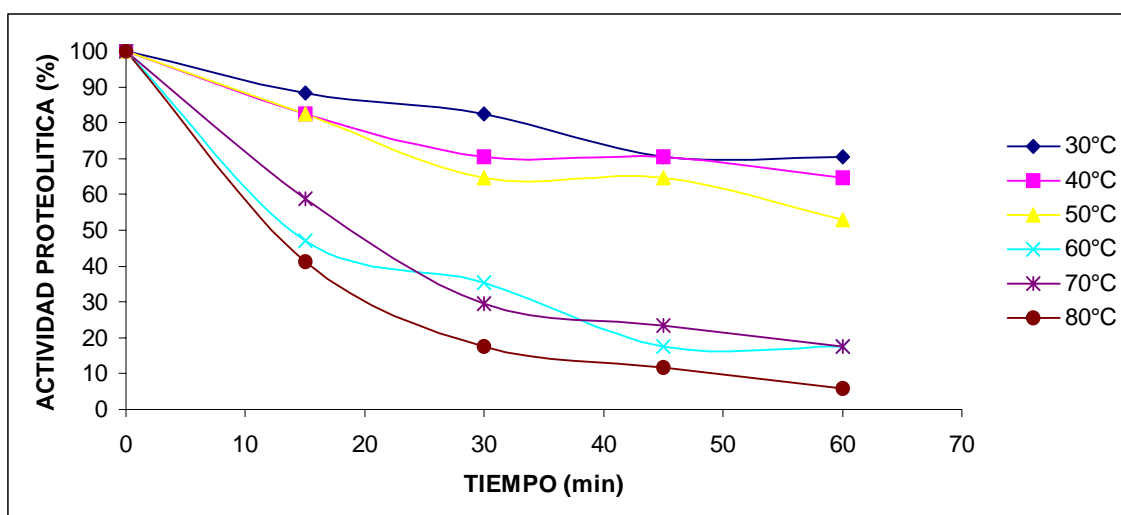


Figura 8.4.1 Estabilidad térmica a diferentes temperaturas, presentada por el extracto proteolítico producido por la cepa 36 aIV.

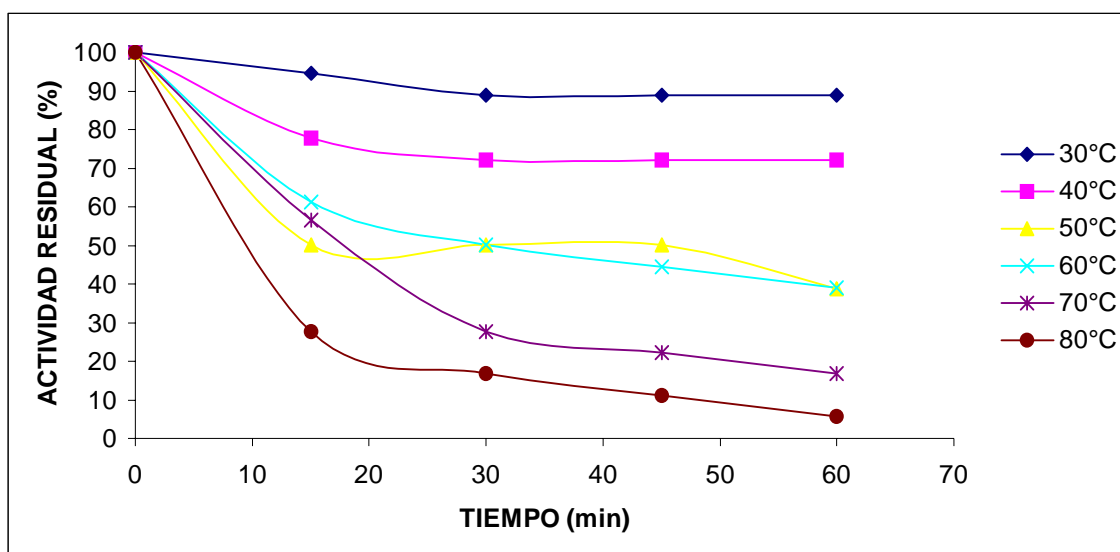


Figura 8.4.2. Estabilidad térmica a diferentes temperaturas, presentado por el extracto proteolítico producido por la cepa 2.2 aB.

Estudios de termoestabilidad de proteasas reportan los siguientes tiempos de vida media: la proteasa alcalina producida por *Bacillus* sp. GX6638 presenta un tiempo de vida media de 0.38 h a 60°C, la producida por *Bacillus subtilis* ATCC 14416 de 0.16 h a 60°C, la producida por *Bacillus brevis* de 7 h a 60°C (Banerjee y col., 1999) y la proteasa producida por *Streptomyces* sp. presenta un tiempo de vida media de 0.45 h a 55°C (De Azeredo y col., 2004). Realizando una comparación, basada en tiempos de vida media a 60°C, se puede observar que el extracto producido por la cepa 2.2 aB es superior en todos los casos excepto cuando se compara con el extracto producido por *Bacillus brevis*, mientras que el extracto producido por la cepa 36 aIV tiene un tiempo de vida media solo superior al del producido por *Bacillus* sp. GX6638.

Por otro lado, realizando una comparación del porcentaje de actividad residual (a los 60 minutos) que presentan los extractos proteolíticos se observa que el extracto producido por *Streptomyces* sp. conserva alrededor del 90% de actividad a 30 y 40°C, mientras que los extractos producidos por las cepas 2.2 aB y 36 aIV conservan alrededor del 80% de su actividad a dichas temperaturas.

Tabla 8.4.1 Constantes de inactivación a diferentes temperaturas para los extractos proteolíticos producidos por las cepas 36 aIV y 2.2 aB.

| Cepa | 36 aIV | | 2.2 aB | | |
|------|--------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|
| | T (°C) | k_d (min ⁻¹) | $t_{1/2}$ (h) | K_d (min ⁻¹) | $t_{1/2}$ (h) |
| 30 | | 0.0065 | 1.78 | 0.0039 | 2.96 |
| 40 | | 0.0116 | 1 | 0.0108 | 1.07 |
| 50 | | 0.0145 | 0.8 | 0.0157 | 0.74 |
| 60 | | 0.0347 | 0.33 | 0.0231 | 0.5 |
| 70 | | 0.0408 | 0.28 | 0.0348 | 0.33 |
| 80 | | 0.0578 | 0.20 | 0.0597 | 0.16 |

8.5 Estudios de inhibición

Para identificar la naturaleza de las proteasas se determinó la actividad proteolítica en presencia de tres inhibidores de proteasas. En la Figura No. 8.5.1 se observa que el extracto producido por la cepa 36 aIV no se ve afectado por el inhibidor de metaloproteasas (EDTA), ni con el inhibidor de aspartil proteasas (PMSF). En contraste, existe una inhibición con el β -mercaptoetanol, determinándose con esto que la mayor parte de la actividad puede deberse a la presencia de una cisteín proteasa. En la Figura No. 8.5.2 se observa que para el extracto proteolítico producido por la cepa 2.2 aB no existe un efecto inhibitor del EDTA, β -

mercaptoetanol, encontrándose por el contrario, una inhibición marcada con el PMSF. Esto indica que la mayor parte de la actividad puede deberse a la presencia de una serín proteasa, siendo éste un caso similar al encontrado para la proteasa secretada por *Aspergillus parasiticus* durante una fermentación en medio sólido (Tunga y col., 2003).

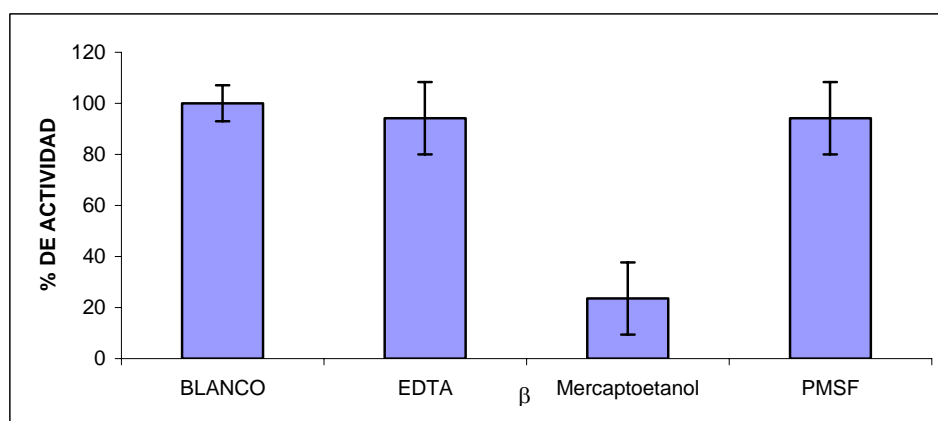


Figura 8.5.1 Efecto de los inhibidores EDTA, β -mercaptoetanol y PMSF sobre la actividad proteolítica de la cepa 36 aIV. Los inhibidores fueron evaluados a una concentración final de 1 mM (Sookheo y col., 2000).

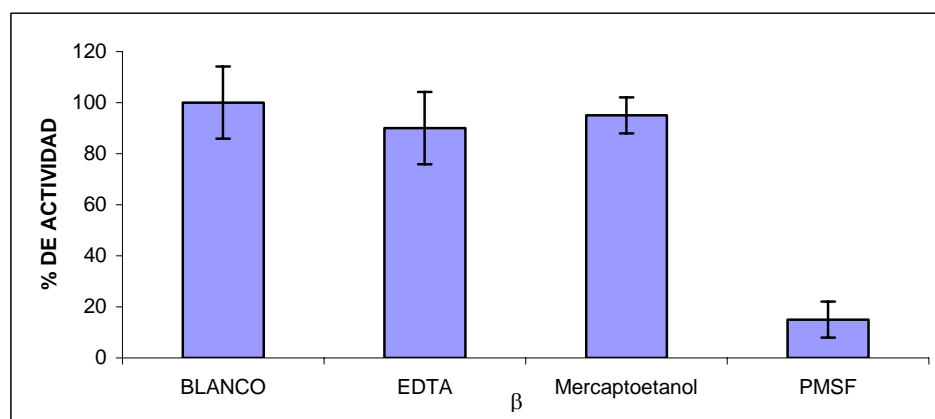


Figura 8.5.2 Efecto de los inhibidores EDTA, β -mercaptoetanol y PMSF sobre la actividad proteolítica de la cepa 2.2 aB. Los inhibidores fueron evaluados a una concentración final de 1 mM (Sookheo y col., 2000).

8.6 Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad proteolítica

Se adicionaron diversos iones metálicos para observar el efecto que tienen sobre la actividad proteolítica. En la Figura No. 8.6.1 se observa que la actividad proteolítica del extracto enzimático producido por la cepa 2.2 aB (serín proteasa) se favorece en presencia de Ba^{2+} , aumentando en un 21% con respecto a la actividad medida sin la adición del ion. Dicho comportamiento también fue observado por De Azeredo y col. (2004) cuando caracterizaron el extracto producido por la cepa *Streptomyces* sp. (serín proteasa) y observaron que en presencia de Ba^{2+} la actividad del extracto aumentó cerca de un 90%. Es importante señalar que en este trabajo experimental se evaluaron los iones a una concentración final de 5m M y que en el caso del extracto producido por *Streptomyces* sp. la concentración de Ba^{2+} utilizada fue de 10 mM.

El extracto producido por la cepa 36 aIV presentó un comportamiento diferente a los mencionados anteriormente; en este, caso el extracto en presencia de Ba^{2+} presentó una reducción del 28% en la actividad. Para el caso del Ca^{2+} el extracto producido por la cepa 36 a IV (cisteín proteasa) presentó un aumento del 40% en la actividad. Otra proteasa que presenta el mismo comportamiento es la producida por *Streptomyces* sp. (serín proteasa), la cual aumentó en un 120% su actividad en presencia de Ca^{2+} . Por lo que respecta al extracto producido por la cepa 2.2 aB no presentó ningún efecto sobre la actividad, y se mantuvo al 100%. Este comportamiento también fue observado por Tunga y col. (2003) cuando

caracterizaron el extracto producido por la cepa *Aspergillus parasiticus* (serín proteasa), para el cual no tuvo ningún efecto la presencia de Ca^{2+} . Otro ión que presento un efecto positivo sobre el extracto producido por la cepa 36 aIV fue el Na^+ , con el cual tuvo un aumento del 22% en la actividad residual. Este caso es similar al que se presentó con la proteasa producida por *Streptomyces* sp., la cual aumentó su actividad un 25% (De Azeredo y col., 2004). A parte un ión que tuvo un efecto negativo en la actividad del extracto de la cepa 2.2 aB fue el Cu^{2+} con el cual se dió una disminución del 48% en la actividad. Este mismo efecto se presentó en la proteasa producida por *Streptomyces* sp y fue explicado por la acción desnaturalizante del ión. En el caso del extracto producido por la cepa 36 aIV, no se presentó ningún efecto (al igual que ocurrió con la proteasa producida por *Aspergillus parasiticus*). En el caso de los iones Mg^{2+} , K^+ y Fe^{2+} en ambos extractos se presento un efecto negativo (44, 22 y 11%, respectivamente). En el caso de los iones que tienen un efecto positivo sobre el extracto enzimático, esta acción puede deberse a la estabilización de la proteína debido a la interacción de los iones con la enzima, manteniéndose en su estado nativo más estable. Un ejemplo de este tipo de iones son el Ca^{2+} y Mg^{2+} . Sin embargo existen iones que aumentan la solubilidad de la enzima y con ello se pierde la forma nativa, desdoblándose y perdiendo con ello actividad debido a la solubilización (Creighton, 1993)

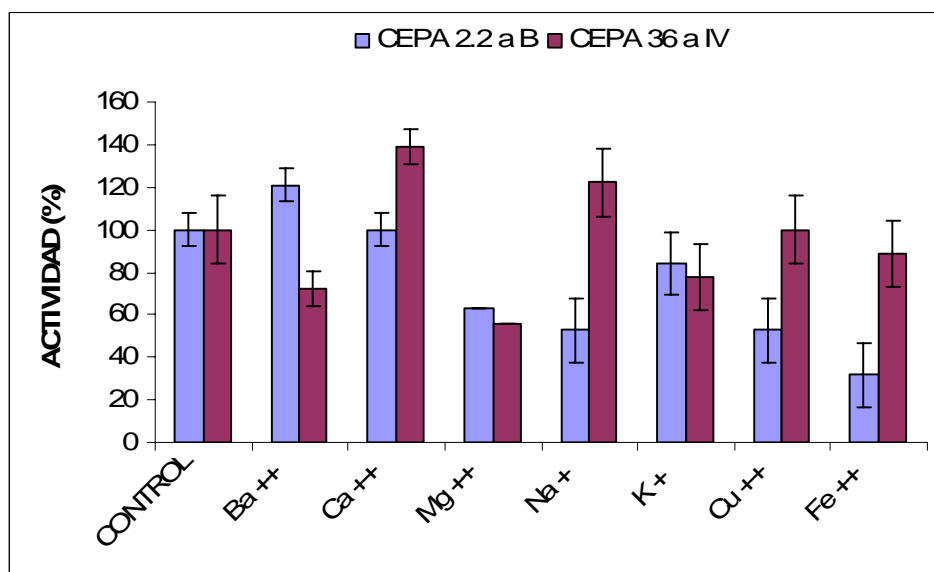


Figura No. 8.6.1 Efecto de los iones Ba²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Ba²⁺, Fe²⁺ sobre la actividad proteolítica. Los iones fueron evaluados a una concentración final de 5 mM (Tunga y col., 2003).

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

9 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten formular las siguientes conclusiones:

El análisis de termoestabilidad de los extractos producidos por las cepas analizadas demostró que las cepas que producen extractos proteolíticos con mayor termoestabilidad son la 2.2 aB y 36 aIV, por lo que fueron las cepas seleccionadas para la producción de proteasas.

Derivado de la caracterización de los extractos proteolíticos crudos, se concluye que la mayor actividad del extracto producido por la cepa 36 aIV puede deberse a la presencia de una cisteín proteasa neutra, mientras que en el caso del producido por la cepa 2.2 aB puede deberse a la presencia de una serín proteasa alcalina.

Al analizar el efecto que tienen los iones metálicos sobre la actividad proteolítica se concluye que para el extracto producido por la cepa 36 aIV los iones Ca^{2+} y Na^{+} pueden ser utilizados para aumentar la estabilidad de la enzima, mientras que la estabilidad del extracto producido por la cepa 2.2 aB puede aumentarse en presencia de Ba^{2+} .

CAPÍTULO 10

RECOMENDACIONES

10 RECOMENDACIONES

En estudios a futuro se recomienda optimizar las condiciones de producción de la enzima, ya que con ello se puede tener una actividad proteolítica mayor.

Se recomienda la caracterización molecular y modificación de las proteasas para poder seleccionar nuevas aplicaciones y tener altos niveles de expresión de la enzima. Determinando la especificidad de éstas se puede encontrar una aplicación y definir características que no son conocidas.

Sería de gran relevancia evaluar la estabilidad de la enzima en solventes orgánicos y condiciones extremas de pH para poder establecer condiciones y definir aplicaciones que en la actualidad han sido muy poco estudiadas.

CAPÍTULO 11

BIBLIOGRAFÍA BIBLIOGRAFÍA

11 BIBLIOGRAFÍA

1. **Aguilar G. C. N.** 2000. Inducción y represión de la Síntesis de Tanasas de *Aspergillus niger* Aa-20 en Cultivo en Medios Líquido y Sólido. Doctorado en biotecnología.pp. 38-40.
2. **Aguilar G. C. N., J. C. Contreras, R. Rodríguez, L. A. Prado y O. Loera.** 2004. Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. Food Science Biotechnology. **13**: 109-113.
3. **Aikat K. y B. C. Bhattacharyya.** 2001. protease production in solid state fermentation whit liquid medium recycling in a stacked plate reactor and in a packed bed reactor by a local strain of *Rhizopus oryzae*. Process Biochemistry. **36**: 1059-1068.
4. **Alane B. V., M. N. L. Meirelles., A. López., S. D. G. Petinate., A. A. Chaia y M. H. Branquniha.** 1996. Detection of extracellular proteases from

- microorganisms on agar plates. Mem Ins. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. **9**: 755-760.
5. **Banerjee U. C., R. K. Sani, W. Azmi y R. Soni.** 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. Process Biochemistry. **35**: 213-219.
 6. **Becker P.** 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus sp. IHI-91* in olive oil. Application in Microbiol and Biotechnology. **48**: 184-190.
 7. **Berka, R. M., M. W. Rey, K. M. Brown, T. Buyun y A. V. Klost.** 1998. Molecular characterization and expression of phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Application Environment Microbiology. **64**:4423-4427.
 8. **Bisswanger H.** 2002. Enzyme kinetics principles and methods. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (Alemania). **2**: 139-143.
 9. **Córdova J, S. Russos, J . Baratti, J. Nungaray y O. Loera.** 2003. Identification of Mexican thermophilic and thermotolerant fungal isolates. Micología Aplicada Internacional. **15 (2)**: 37- 44.
 10. **Creighton E. T.** 1993. Proteins structures and molecular properties. European Molecular Biology Laboratory Heidelberg, Germany. **7**: 293-296.
 11. **Dahot M. U.** 1994. Purification and some properties of alkaline protease from *Penicillium expansum*. Journal of Islamic Academy of Sciences. **7/2**: 1-7.
 12. **Demijaran D., V. Morris, F. Cassidy.** 2001. Enzymes from extremophiles. Current Opinion Chemical. **5**: 144-150.

- 13. De Azeredo L. A. I., D. M. G. Freire, R. M. A. Soares, S. G. F. Leite y R. R. R. Coelho.** 2004. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces sp.* Isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*. **34**: 354-358.
- 14. Ellouz Y., A. Bayouhd, S. Kammouun, N. Gharsallah y M. Nasri.** 2001. Production of protease by *Bacillus subtilis* grow on sardinelle heads and viscera flour. *Biorresource Technology*. **80**: 49-51.
- 15. Fennema, R. y M. J. Danson.** (1993). Química de los alimentos. Editorial Acribia. España. pp-418-421.
- 16. Germano S., A. Pandey, C. A. Osaku, S. N. Rocha y C. R. Soccol.** 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillun sp* produced by solid state fermentation. *Enzyme and Microbiol Technology*. **32**: 246-251.
- 17. Haki G. D. y S. K. Rakshit.** 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes. A Review *Biorresource Technology*. **89**: 17-34.
- 18. Haq I. U. y H. Mukhtar.** 2004. Biosynthesis of proteases by *Rhizopus* IHS 13 in low cost medium by solid state fermentation. *Journal of Basic Microbiology*. **44**:280-287
- 19. Herrera O.** 2003. Obtención y selección de cepas de *Aspergillus niger* sobreproductoras de Fitasa. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- 20. Hüge-Gensen B. y D. R. Jensen.** 1987. Partial purification and characterization and free and immobilizes lipases from *Mucor miehei*. *Lipids*. **24**: 781-785

- 21. Ifrig I. H. y Z. B. Ogel.** 2002. Production of neutral and alkaline extracellular proteases by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*, grown on microcrystalline cellulose. *Biotechnology Letters*. **24**: 1107-1110.
- 22. Iksary L. y D. A. Mitchell.** 1994. Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **10**: 320-324.
- 23. Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática.** Anuario 2005.
- 24. Jensen B., P. Nebelong, J. Olsen y M. Reeslev.** 2002. Enzyme production in continuous cultivation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnology Letters*. **24**: 41-45.
- 25. Johnvesly B. y G. R. Naik.** 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemical defined medium. *Process Biochemistry*. **37**: 139-144.
- 26. Johnvesly B., B. R. Manjunath. G. R. Naik.** 2002. Pigeon pea waste as novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Bioresource Technology*. **82**: 61-64.
- 27. Lehninger, L. A.** (1991). *Bioquímica* 2a edición. Editorial Omega. Barcelona España. pp. 199-201.
- 28. Lasa I. y J. Berenguer.** 1993. Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbiology*. **9** (2): 77-89.

- 29. Mabrouk S. S., A. M. Hashem, N. M. A. El-Shayeb, A. M. S. Ismail y A. Fattah.** 1999. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*. **69**: 155-159.
- 30. Maheshwari R, Girish B., y K. B. Mahalingeshwara.** 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**: 461-488.
- 31. Malathi S. y R. Chakraborty.** 1991. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid substrate fermentation conditions for use as depilation agent. *Applied and Environmental Microbiology*. **24**: 55-59.
- 32. Marc A. Bj., Scott B. y C. J. Nelson.** 2002. Characterization of proteolytic activity of proteases. *Biotechnology Letters*. **24**: 191-195.
- 33. Mateos D. J. C.** 2005. Nouveaux outils pour la biocatalyse: criblage, purification et caracterization de Lipases issues de champignons thermophiles. Pour l' obtention du grade de Docteur. UNIVERSITÉ DE LA MEDITERRANEE-AIX MARSEILLE II.
- 34. Mitchell D. A., M. Berobic y N. Krieger.** 2000. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. **68**:65-69.
- 35. Oseas M. A. y M. A. Zezzi.** 2006. Mechanization of the Bradford reaction for the spectrophotometric determination of total proteins. *Analytical Biochemistry*. **351**: 155-157.
- 36. Pandey A.**2003. Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. **13**: 82-84.

- 37. Prado Barragán L. A.** (2000). Curso de laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. México.
- 38. Prankasham R. S., Ch. S. Rao, R. S. Rao. A y P. N. Sarma.** 2005. Alkaline protease production by an Isolated *Bacillus circulans* under solid-state fermentation using agroindustrial waste: process parameters optimization. *Biotechnology Progress*. **21**: 1380-1388.
- 39. 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.
- 40. Rao M. B., M. T. Aparna, S. G. Monhini y V. V. Deshpande.** 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62**: 597-635.
- 41. Sandhya C., A. Sumantha, G. Szakacs y A. Pandey.** 2005. Comparative Evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*. **40**: 2689-2694.
- 42. Saucedo C. G., B. K. Lonsane, J. M. Navarro, S. Rusos y L. Raimbault** 1992. Potential of using fermenter for biomass build-up, starch hydrolysis and ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **36**: 47-61.
- 43. Segel I. H.** 1968. *Biochemical Calculations*. John Wiley & Sons, Inc. New York. Pp. 273-277.
- 44. Seong CH-N., J. S. Jo, S. K. Choi, S W. Kim, S. J. Kim, O. H. Lee, J. M. Han y J. C. Yoo.** 2004. Production, purification and characterization of a novel

- thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*.
Biotechnology Letters. **26**: 907-909.
- 45. Sookkheo B., S. Sinchaikul y S. Phutrakul.** 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothersophilus* TLS33. Protein Expression and Purification. **20**: 142-151.
- 46. Sunita K., Y.-S. Park, T.-K. Oh y J.-K.-Lee.** 1999. Synthesis of alkaline protease by catabolite repression-resistant *Thermoactinomyces* sp. E79 mutant. Biotechnology Letters. **21**: 155-158.
- 47. Tsuchiya K., H. Sacashita, J. Nakamura y T. Kimura.** 1991. Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. Agriculture Biology Chemistry. **55**: 3125-3127.
- 48. Tunga R., B. Shrivastava y R. Banerjee.** 2003. Purification and characterization of a proteases from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. Process Biochemistry. **38**: 1553-1558.
- 49. Van den Burg Bertus.** 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. Current Opinion in Microbiology. **6**: 213-218.
- 50. Vieille C. y J. G. Zeikus.** 2001. Hypertemophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **65**: 1-43.
- 51. Wang R., R. C. S. Law y C. Webb.** 2005a. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. Process Biochemistry. **40** : 217-227.

- 52. Wang S.-L., Y. H. Chen, CH.-L- Wang, Y. H. Yen y M. K. Chern.** 2005b. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*. **36**: 660-665.
- 53. Whitaker J. R.** 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker.
- 54. Yano J. K. y T. L. Poulos.** New Understandings of Thermostable and Peozostable enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*. **14**: 360-365.

Contenido

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 2 |
| 2 | REVISIÓN BIBLIOGRAFICA | 7 |
| 2.1 | Definición de enzima..... | 7 |
| 2.2 | Clasificación de las enzimas | 7 |
| 2.2.1 | <i>Proteasas</i> | 8 |
| 2.2.1.1 | <i>Clasificación de las proteasas</i> | 9 |
| 2.2.1.1.1 | Tipo de reacción que catalizan | 9 |
| 2.2.1.1.2 | Naturaleza del sitio catalítico | 11 |
| 2.2.1.1.3 | pH óptimo de actividad | 13 |
| 2.3 | Fuentes de enzimas..... | 15 |
| 2.3.1 | <i>Fuentes de proteasas</i> | 15 |
| 2.3.1.1 | <i>Proteasas de origen animal</i> | 16 |
| 2.3.1.2 | <i>Proteasas de origen vegetal</i> | 16 |
| 2.3.1.3 | <i>Proteasas microbianas</i> | 16 |
| 2.3.1.3.1 | <i>Proteasas fúngicas</i> | 17 |
| 2.4 | Microorganismos termófilos | 17 |
| 2.5 | Condiciones que afectan las reacciones enzimáticas | 21 |
| 2.5.1 | <i>Efecto del pH</i> | 21 |
| 2.5.2 | <i>Efecto de la temperatura</i> | 22 |
| 2.6 | Importancia de las enzimas termoestables | 25 |
| 2.7 | Importancia de las enzimas en la industria | 26 |
| 2.8 | Métodos de producción de enzimas..... | 27 |
| 2.8.1 | <i>Fermentación en medio sólido</i> | 29 |
| 3 | 3 ANTECEDENTES | 35 |
| 3 | 3 ANTECEDENTES | 36 |
| 4 | JUSTIFICACIÓN | 40 |
| 5 | HIPÓTESIS | 43 |
| 6 | OBJETIVOS | 45 |
| 6.1 | Objetivo general | 45 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6.2 | Objetivos particulares..... | 45 |
| 7 | MATERIALES Y MÉTODOS | 47 |
| 7.1 | Microorganismos utilizados..... | 47 |
| 7.2 | Preselección de cepas productoras de proteasas | 48 |
| 7.2.1 | <i>Medios de cultivo</i> | 48 |
| 7.2.1.1 | <i>Agar papa dextrosa</i> | 48 |
| 7.2.1.2 | <i>Agar leche descremada.....</i> | 48 |
| 7.2.2 | <i>Crecimiento a 45°C.....</i> | 49 |
| 7.2.3 | <i>Producción de proteasas en placas de agar leche descremada.....</i> | 49 |
| 7.3 | Selección de cepas productoras de proteasas | 50 |
| 7.3.1 | <i>Preparación del sustrato.....</i> | 50 |
| 7.3.2 | <i>Preparación del soporte.....</i> | 50 |
| 7.3.3 | <i>Preparación del inóculo</i> | 50 |
| 7.3.4 | <i>Cultivo en medio sólido.....</i> | 51 |
| 7.3.4.1 | <i>Obtención del extracto proteolítico</i> | 51 |
| 7.3.5 | <i>Determinación de actividad proteolítica</i> | 52 |
| 7.3.5.1 | <i>Muestra.....</i> | 52 |
| 7.3.5.2 | <i>Testigo.....</i> | 53 |
| 7.3.6 | <i>Determinación de proteína.....</i> | 53 |
| 7.3.6.1 | <i>Preparación de soluciones.....</i> | 54 |
| 7.4 | Determinación de las condiciones óptimas de actividad del extracto proteolítico | 54 |
| 7.4.1 | <i>Tiempo de reacción</i> | 54 |
| 7.4.2 | <i>Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica</i> | 54 |
| 7.4.3 | <i>Efecto del pH en la actividad proteolítica</i> | 55 |
| 7.5 | Determinación de la estabilidad térmica del extracto..... | 55 |
| 7.6 | Estudios de inhibición | 56 |
| 7.7 | Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad proteolítica | 56 |
| 8 | 8 RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 58 |
| 8 | 8 RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 59 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 8.1 | Preselección de cepas productoras de proteasas | 59 |
| 8.1.1 | <i>Crecimiento a 45°C</i> | 59 |
| 8.1.2 | <i>Producción de proteasas en placas de agar leche descremada</i> | 59 |
| 8.2 | Selección de cepas productoras de proteasas | 63 |
| 8.2.1 | <i>Cultivo en medio sólido</i> | 63 |
| 8.3 | Determinación de las condiciones óptimas del extracto proteolítico | 65 |
| 8.3.1 | <i>Tiempo de reacción</i> | 65 |
| 8.3.2 | <i>Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica</i> | 67 |
| 8.3.3 | <i>Efecto del pH en la actividad proteolítica</i> | 67 |
| 8.4 | Determinación de la estabilidad térmica del extracto | 70 |
| 8.5 | Estudios de inhibición | 73 |
| 8.6 | Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad proteolítica | 75 |
| 9 | CONCLUSIONES | 79 |
| 10 | RECOMENDACIONES | 81 |
| 11 | BIBLIOGRAFÍA | 83 |

ANEXOS

ANEXO A

Composición de la leche descremada

| COMPOSICIÓN DE LA LECHE SVELTY (g/100g): | |
|---|--------|
| Proteínas | 34.3 |
| Hidratos de Carbono | 52.2 |
| Grasas | 1.2 |
| Sodio | 470 mg |

Composición de la harina de pescado

| COMPOSICIÓN DE LA HARINA DE PESCADO (ANÁLISIS ELEMENTAL CHN) | |
|---|------------------|
| Compuesto | Contenido en (%) |
| Carbono C | 40.08 |
| Hidrógeno H | 6.12 |
| Nitrógeno N ₂ | 8.71 |

Curva patrón de proteína

Se construyó una curva patrón con Tirosina partiendo de una solución de 1 mg /mL.

La curva patrón se elabora en base a la siguiente Tabla:

Curva Patrón de Tirosina

| NO. DE TUBO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Concentración de tirosina (mg/mL) | 1.00 | 0.80 | 0.60 | 0.40 | 0.20 | 0.00 |
| Solución de tirosina (mL) | 1.00 | 0.80 | 0.60 | 0.40 | 0.20 | 0.00 |
| Agua destilada (mL) | 0.00 | 0.20 | 0.40 | 0.60 | 0.80 | 1.00 |

Se graficaron los datos de la absorbancia obtenida con respecto a la concentración de Tirosina correspondiente y se realizó un ajuste de datos por regresión lineal como se muestra en la figura A1.

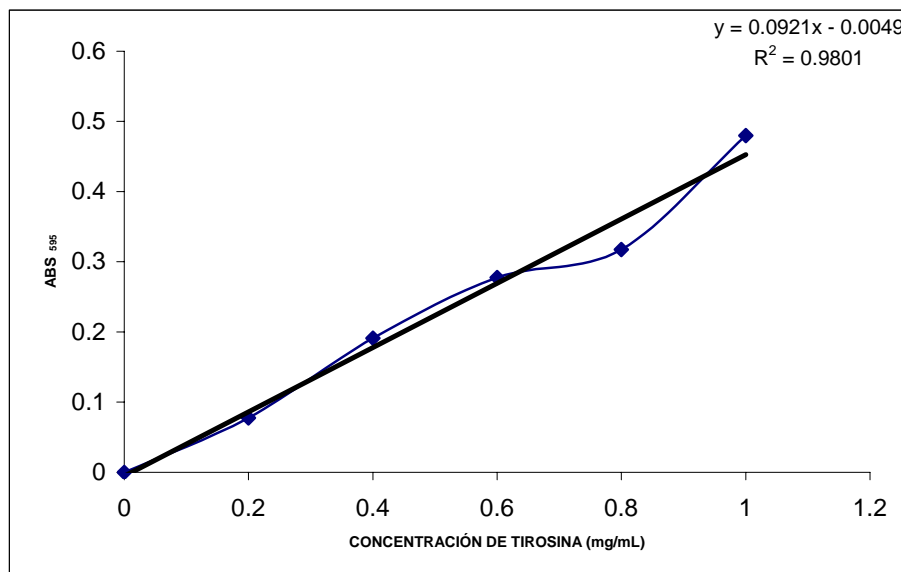


Figura A1. Curva patrón de Tirosina.

ANEXO B

Análisis de varianza y comparación múltiple de la cinética de producción de los extractos proteolíticos producidos por las cepas 2.2 a B, 2.7 aB y 36 aIV.

ANÁLISIS DE VARIANZA

| ANALYSIS OF VARIANCE TABLE | | | | | | |
|----------------------------|----|----------------|-------------|---------|------------|--------------------|
| Source Term | DF | Sum of Squares | Mean Square | F-Ratio | Prob Level | Power (Alpha=0.05) |
| A: C6 | 2 | 8959.788 | 4479.894 | 22.63 | 0.000085* | 0.999786 |
| B: C7 | 6 | 4454.918 | 742.4864 | | | |
| AB | 12 | 2375.434 | 197.9528 | | | |
| S | 0 | 2.960888E-12 | | | | |
| Total (Adjusted) | 20 | 15790.14 | | | | |
| Total | 21 | | | | | |

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Alpha=0.050 Error Term=AB DF=12 MSE=197.9528 Critical Value=3.77295

| Group | Count | Mean | Different From Groups |
|---------|-------|----------|-----------------------|
| 2.7 a B | 7 | 0.022 | 36 a IV, 2.2 a B |
| 36 a IV | 7 | 42.62857 | 2.7 a B |
| 2.2 a B | 7 | 44.95714 | 2.7 a B |

ANEXO C

Tiempo de reacción

| CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA CEPA 36 aIV | | | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|---------------------|-------------|--------------|------------|--------------|----------|---------------------|
| TIEMPO (MIN) | ABS ₅₉₅ | ABS' ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | [P]' (mg/mL) | [P] (µg/m) | [P]' (µg/mL) | PROMEDIO | DESVIACIÓN ESTÁNDAR |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0.002 | 0.002 | 0.015 | 0.015 | 15.50 | 15.50 | 15.50 | 0 |
| 2 | 0.004 | 0.003 | 0.020 | 0.018 | 19.86 | 17.68 | 18.77 | 1.54 |
| 3 | 0.004 | 0.005 | 0.020 | 0.022 | 19.86 | 22.05 | 20.96 | 1.54 |
| 4 | 0.005 | 0.006 | 0.022 | 0.024 | 22.05 | 24.23 | 23.14 | 1.54 |
| 5 | 0.009 | 0.01 | 0.031 | 0.033 | 30.78 | 32.96 | 31.87 | 1.54 |
| 6 | 0.016 | 0.016 | 0.046 | 0.046 | 46.06 | 46.06 | 46.06 | 0 |

[P]: Concentración de proteína

La [P] se calculó interpolando con la siguiente ecuación de la recta que corresponde a la curva patrón:

$$y = 0.4581x - 0.0051$$

Donde:

y : la ABS a 595 nm

x: La concentración de proteína [P] en mg/mL

| TESTIGOS CEPA 36 aIV | | | |
|----------------------|--------------------|-------------|------------|
| TIEMPO (MIN) | ABS ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | [P] (µg/m) |
| 0 | 0 | 0.0000 | 0 |
| 1 | 0.001 | 0.0133 | 13.32 |
| 2 | 0.001 | 0.0133 | 13.32 |
| 3 | 0.001 | 0.0133 | 13.32 |
| 4 | 0.001 | 0.0133 | 13.32 |
| 5 | 0.005 | 0.0220 | 22.05 |
| 6 | 0.011 | 0.0351 | 35.15 |

| CEPA 36 aIV | |
|--------------|------------------------------------|
| TIEMPO (MIN) | [P] (µg/mL) – [P] (µg/mL) TESTIGOS |
| 0 | 0 |
| 1 | 2.18 |
| 2 | 5.46 |
| 3 | 7.64 |
| 4 | 9.82 |
| 5 | 9.82 |
| 6 | 10.91 |

| CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (MG/ML) 2.2 aB | | | | | | | | |
|--|--------------------|---------------------|-------------|--------------|------------|--------------|----------|---------------------|
| TIEMPO (MIN) | ABS ₅₉₅ | ABS' ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | [P]' (mg/mL) | [P] (µg/m) | [P]' (µg/mL) | PROMEDIO | DESVIACIÓN ESTÁNDAR |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0.003 | 0.003 | 0.0177 | 0.0177 | 17.7 | 17.7 | 17.68 | 0 |
| 2 | 0.005 | 0.006 | 0.0220 | 0.0242 | 22.0 | 24.2 | 23.14 | 1.54 |
| 3 | 0.014 | 0.013 | 0.0417 | 0.0395 | 41.7 | 39.5 | 40.60 | 1.54 |
| 4 | 0.016 | 0.017 | 0.0461 | 0.0482 | 46.1 | 48.2 | 47.15 | 1.54 |
| 5 | 0.031 | 0.031 | 0.0788 | 0.0788 | 78.8 | 78.8 | 78.80 | 0 |
| 6 | 0.033 | 0.032 | 0.0832 | 0.0810 | 83.2 | 81.0 | 82.08 | 1.54 |

[P]: Concentración de proteína

La [P] se calculó interpolando con la siguiente ecuación de la recta que corresponde a la curva patrón de BSA:

$$y = 0.0921x - 0.0049$$

Donde:

y : ABS a 595 nm

x: Concentración de proteína [P] en mg/mL

| TESTIGOS CEPA 2.2 aB | | | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|
| TIEMPO (MIN) | ABS₅₉₅ | [P] (mg/mL) | [P] (μg/m) |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0.001 | 0.013 | 13.32 |
| 2 | 0.001 | 0.013 | 13.32 |
| 3 | 0.006 | 0.024 | 24.23 |
| 4 | 0.009 | 0.031 | 30.78 |
| 5 | 0.021 | 0.057 | 56.97 |
| 6 | 0.022 | 0.059 | 59.16 |

| CEPA 2.2 aB | |
|---------------------|---|
| TIEMPO (MIN) | [P] (μg/mL) – [P] (μg/mL) TESTIGOS |
| 0 | 0 |
| 1 | 4.37 |
| 2 | 9.82 |
| 3 | 16.37 |
| 4 | 16.37 |
| 5 | 21.83 |
| 6 | 22.92 |

ANEXO D

Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica

| TEMPERATURA (°C) | CEPA 36 aIV | | CEPA 36 aIV' | | CEPA 36 aIV | | CEPA 36 aIV' | |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) |
| 30 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.075 | 0.075 | 0.075 | 0.075 |
| 40 | 0.007 | 0.006 | 0.005 | 0.006 | 0.129 | 0.118 | 0.107 | 0.118 |
| 50 | 0.012 | 0.013 | 0.012 | 0.013 | 0.183 | 0.194 | 0.183 | 0.194 |
| 60 | 0.027 | 0.025 | 0.027 | 0.025 | 0.346 | 0.325 | 0.346 | 0.325 |
| 70 | 0.017 | 0.016 | 0.017 | 0.016 | 0.238 | 0.227 | 0.238 | 0.227 |
| 80 | 0.022 | 0.023 | 0.022 | 0.023 | 0.292 | 0.303 | 0.292 | 0.303 |

[P]: Concentración de proteína

La [P] se calculó interpolando con la siguiente ecuación de la recta que corresponde a la curva patrón:

$$y = 0.0921x - 0.0049$$

Donde:

Donde:

y : ABS a 595 nm

x: Concentración de proteína [P] en mg/mL

| TEMPERATURA (°C) | CEPA 36 A IV | | CEPA 36 A IV' | |
|------------------|--------------|--------|---------------|--------|
| | UI | UI | UI | UI |
| 30 | 62.43 | 62.43 | 62.43 | 62.43 |
| 40 | 107.67 | 98.62 | 89.58 | 98.62 |
| 50 | 152.91 | 161.96 | 152.91 | 161.96 |
| 60 | 288.64 | 270.54 | 288.64 | 270.54 |
| 70 | 198.15 | 189.11 | 198.15 | 189.11 |
| 80 | 243.39 | 252.44 | 243.39 | 252.44 |

Nota: El volumen final de reacción fue de 2.5 mL

| TEMPERATURA (°C) | CEPA 36 aIV | | CEPA 36 aIV' | |
|------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| | UI / mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO |
| 30 | 1248.6 | 1248.6 | 1248.6 | 1248.6 |
| 40 | 2153.5 | 1972.5 | 1791.5 | 1972.5 |
| 50 | 3058.3 | 3239.2 | 3058.3 | 3239.2 |
| 60 | 5772.7 | 5410.8 | 5772.7 | 5410.8 |
| 70 | 3963.1 | 3782.1 | 3963.1 | 3782.1 |
| 80 | 4867.9 | 5048.9 | 4867.9 | 5048.9 |

| TEMPERATURA (°C) | PROMEDIO CEPA 36 aIV | DESVIACIÓN ESTÁNDAR |
|------------------|----------------------|---------------------|
| 30 | 1248.6 | 0.0 |
| 40 | 1972.5 | 147.8 |
| 50 | 3148.8 | 104.5 |
| 60 | 5591.7 | 209.0 |
| 70 | 3872.6 | 104.5 |
| 80 | 4958.4 | 104.5 |

UI = μg de Tirosina liberados / min.

Nota: El ensayo se llevó a cabo durante 3 minutos y la cantidad de extracto proteolítico empleado en el ensayo fue de 50 μL .

| TESTIGOS CEPA 36 aIV | | | | |
|----------------------|--------------------|-------------|-------|--------------------|
| Temperatura (°C) | ABS ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | UI | U I/mL DE EXTRACTO |
| 30 | 0.001 | 0.06 | 53.4 | 1067.7 |
| 40 | 0.004 | 0.10 | 80.5 | 1610.6 |
| 50 | 0.005 | 0.11 | 89.6 | 1791.5 |
| 60 | 0.02 | 0.27 | 225.3 | 4506.0 |
| 70 | 0.01 | 0.16 | 134.8 | 2696.3 |
| 80 | 0.02 | 0.27 | 225.3 | 4506.0 |

| CEPA 36 aIV | |
|------------------|---|
| Temperatura (°C) | UI / mL de EXTRACTO – UI / mL de EXTRACTO (TESTIGO) |
| 30 | 181.0 |
| 40 | 361.9 |
| 50 | 1357.2 |
| 60 | 1085.8 |
| 70 | 1176.3 |
| 80 | 452.4 |

| TEMPERATURA (°C) | CEPA 2.2 aB | | CEPA 2.2 aB' | | CEPA 2.2 aB | | CEPA 2.2 aB' | |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) |
| 30 | 0.007 | 0.006 | 0.006 | 0.006 | 0.129 | 0.118 | 0.118 | 0.118 |
| 40 | 0.008 | 0.008 | 0.011 | 0.01 | 0.140 | 0.140 | 0.173 | 0.162 |
| 50 | 0.011 | 0.012 | 0.011 | 0.012 | 0.173 | 0.183 | 0.173 | 0.183 |
| 60 | 0.026 | 0.027 | 0.027 | 0.026 | 0.336 | 0.346 | 0.346 | 0.336 |
| 70 | 0.021 | 0.021 | 0.02 | 0.019 | 0.281 | 0.281 | 0.270 | 0.260 |
| 80 | 0.024 | 0.023 | 0.024 | 0.023 | 0.314 | 0.303 | 0.314 | 0.303 |

[P]: Concentración de proteína

La [P] se calculó interpolando con la siguiente ecuación de la recta que corresponde a la curva patrón:

$$y = 0.0921x - 0.0049$$

Donde:

Donde:

y : ABS a 595 nm

x: Concentración de proteína [P] en mg/mL

| TEMPERATURA (°C) | CEPA 2.2 aB | | CEPA 2.2 aB' | |
|------------------|-------------|--------|--------------|--------|
| | UI | UI | UI | UI |
| 30 | 107.67 | 98.62 | 98.62 | 98.62 |
| 40 | 116.72 | 116.72 | 143.87 | 134.82 |
| 50 | 143.87 | 152.91 | 143.87 | 152.91 |
| 60 | 279.59 | 288.64 | 288.64 | 279.59 |
| 70 | 234.35 | 234.35 | 225.30 | 216.25 |
| 80 | 261.49 | 252.44 | 261.49 | 252.44 |

Nota: El volumen final de reacción fue de 2.5 mL

| TEMPERATURA (°C) | CEPA 2.2 aB | | CEPA 2.2 aB' | |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO |
| 30 | 2153.46 | 1972.49 | 1972.49 | 1972.49 |
| 40 | 2334.42 | 2334.42 | 2877.31 | 2696.34 |
| 50 | 2877.31 | 3058.27 | 2877.31 | 3058.27 |
| 60 | 5591.75 | 5772.71 | 5772.71 | 5591.75 |
| 70 | 4686.93 | 4686.93 | 4505.97 | 4325.01 |
| 80 | 5229.82 | 5048.86 | 5229.82 | 5048.86 |

| TEMPERATURA (°C) | PROMEDIO CEPA 2.2 aB | DESVIACIÓN ESTANDAR |
|------------------|----------------------|---------------------|
| 30 | 2017.73 | 90.48 |
| 40 | 2560.62 | 271.44 |
| 50 | 2967.79 | 104.48 |
| 60 | 5682.23 | 104.48 |
| 70 | 4551.21 | 173.26 |
| 80 | 5139.34 | 104.48 |

UI = μg de Tirosina liberados / min.

Nota: El ensayo se llevó a cabo durante 3 minutos y la cantidad de extracto proteolítico empleado en el ensayo fue de 50 μL .

| TESTIGO CEPA 2.2 aB | | | | |
|---------------------|--------------------|-------------|--------|--------------------|
| Temperatura (°C) | ABS ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | UI | U I/mL DE EXTRACTO |
| 30 | 0.004 | 0.10 | 80.53 | 1610.57 |
| 40 | 0.004 | 0.10 | 80.53 | 1610.57 |
| 50 | 0.004 | 0.10 | 80.53 | 1610.57 |
| 60 | 0.02 | 0.27 | 225.30 | 4505.97 |
| 70 | 0.014 | 0.21 | 171.01 | 3420.20 |
| 80 | 0.017 | 0.24 | 198.15 | 3963.08 |

| CEPA 2.2 aB | |
|-------------------------|--|
| Temperatura (°C) | UI/mL de EXTRACTO – UI/mL de EXTRACTO (TESTIGO) |
| 30 | 407.2 |
| 40 | 950.1 |
| 50 | 1357.2 |
| 60 | 1176.3 |
| 70 | 1131.0 |
| 80 | 1176.3 |

Anexo E

Efecto del pH sobre la actividad proteolítica

| PH | CEPA 36 aIV | | CEPA 36 aIV' | | CEPA 36 aIV | | CEPA 36 aIV' | |
|----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) |
| 6 | 0.015 | 0.013 | 0.014 | 0.013 | 0.216 | 0.194 | 0.205 | 0.194 |
| 7 | 0.022 | 0.023 | 0.023 | 0.022 | 0.292 | 0.303 | 0.303 | 0.292 |
| 8 | 0.03 | 0.029 | 0.028 | 0.029 | 0.379 | 0.368 | 0.357 | 0.368 |
| 9 | 0.022 | 0.022 | 0.024 | 0.023 | 0.292 | 0.292 | 0.314 | 0.303 |
| 10 | 0.019 | 0.019 | 0.02 | 0.02 | 0.260 | 0.260 | 0.270 | 0.270 |

[P]: Concentración de proteína

La [P] se calculó interpolando con la siguiente ecuación de la recta que corresponde a la curva patrón:

$$y = 0.0921x - 0.0049$$

Donde:

Donde:

y : ABS a 595 nm

x: Concentración de proteína [P] en mg/mL

| PH | CEPA 36 aIV | | CEPA 36 aIV' | |
|----|-------------|--------|--------------|--------|
| | UI | UI | UI | UI |
| 6 | 180.06 | 161.96 | 171.01 | 161.96 |
| 7 | 243.39 | 252.44 | 252.44 | 243.39 |
| 8 | 315.78 | 306.73 | 297.68 | 306.73 |
| 9 | 243.39 | 243.39 | 261.49 | 252.44 |
| 10 | 216.25 | 216.25 | 225.30 | 225.30 |

Nota: El volumen final de reacción fue de 2.5 mL

| PH | CEPA 36 aIV | | CEPA 36 aIV' | |
|----|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | UI / mL EXTRACTO | UI / mL EXTRACTO | UI / mL EXTRACTO | UI / mL EXTRACTO |
| 6 | 3601.2 | 3239.2 | 3420.2 | 3239.2 |
| 7 | 4867.9 | 5048.9 | 5048.9 | 4867.9 |
| 8 | 6315.6 | 6134.6 | 5953.7 | 6134.6 |
| 9 | 4867.9 | 4867.9 | 5229.8 | 5048.9 |
| 10 | 4325.0 | 4325.0 | 4506.0 | 4506.0 |

| PH | PROMEDIO 36 aIV | DESVIACIÓN ESTÁNDAR |
|----|-----------------|---------------------|
| 6 | 3375.0 | 173.3 |
| 7 | 4958.4 | 104.5 |
| 8 | 6134.6 | 147.8 |
| 9 | 5003.6 | 173.3 |
| 10 | 4415.5 | 104.5 |

UI = μg de Tirosina liberados/min.

Nota: El ensayo se llevó a cabo durante 3 minutos y la cantidad de extracto proteolítico empleado en el ensayo fue de 50 μL .

| TESTIGO CEPA 36 aIV | | | | |
|---------------------|--------------------|-------------|--------|---------------------|
| pH | ABS ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | UI | UI / mL DE EXTRACTO |
| 6 | 0.01 | 0.162 | 134.82 | 2696.3 |
| 7 | 0.014 | 0.205 | 171.01 | 3420.2 |
| 8 | 0.024 | 0.314 | 261.49 | 5229.8 |
| 9 | 0.019 | 0.260 | 216.25 | 4325.0 |
| 10 | 0.016 | 0.227 | 189.11 | 3782.1 |

| CEPA 36 aIV | |
|-------------|---|
| pH | UI/mL de EXTRACTO – UI/mL de EXTRACTO (TESTIGO) |
| 6 | 678.61 |
| 7 | 1538.2 |
| 8 | 904.8 |
| 9 | 678.6 |
| 10 | 633.4 |

| PH | CEPA 2.2 aB | | CEPA 2.2 aB' | | CEPA 2.2 aB | | CEPA 2.2 aB' | |
|----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | ABS ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) |
| 6 | 0.015 | 0.015 | 0.013 | 0.014 | 0.216 | 0.216 | 0.194 | 0.205 |
| 7 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.019 | 0.270 | 0.270 | 0.270 | 0.260 |
| 8 | 0.023 | 0.025 | 0.025 | 0.023 | 0.303 | 0.325 | 0.325 | 0.303 |
| 9 | 0.011 | 0.013 | 0.013 | 0.011 | 0.173 | 0.194 | 0.194 | 0.173 |
| 10 | 0.016 | 0.018 | 0.017 | 0.016 | 0.227 | 0.249 | 0.238 | 0.227 |

[P]: Concentración de proteína

La [P] se calculó interpolando con la siguiente ecuación de la recta que corresponde a la curva patrón:

$$y = 0.0921x - 0.0049$$

Donde:

Donde:

y : ABS a 595 nm

x: Concentración de proteína [P] en mg/mL

| PH | CEPA 2.2 aB | | CEPA 2.2 aB' | |
|----|-------------|--------|--------------|--------|
| | UI | UI | UI | UI |
| 6 | 180.06 | 180.06 | 161.96 | 171.01 |
| 7 | 225.30 | 225.30 | 225.30 | 216.25 |
| 8 | 252.44 | 270.54 | 270.54 | 252.44 |
| 9 | 143.87 | 161.96 | 161.96 | 143.87 |
| 10 | 189.11 | 207.20 | 198.15 | 189.11 |

Nota: El volumen final de reacción fue de 2.5 mL

| PH | CEPA 2.2 aB | | CEPA 2.2 aB' | |
|----|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO |
| 6 | 3601.16 | 3601.16 | 3239.23 | 3420.20 |
| 7 | 4505.97 | 4505.97 | 4505.97 | 4325.01 |
| 8 | 5048.86 | 5410.79 | 5410.79 | 5048.86 |
| 9 | 2877.31 | 3239.23 | 3239.23 | 2877.31 |
| 10 | 3782.12 | 4144.05 | 3963.08 | 3782.12 |

| PH | CEPA 2.2 aB | CEPA 2.2 aB' |
|----|-------------|--------------|
| 6 | 3465.44 | 173.26 |
| 7 | 4460.73 | 90.48 |
| 8 | 5229.82 | 208.96 |
| 9 | 3058.27 | 208.96 |
| 10 | 3917.84 | 173.26 |

UI = μg de Tirosina liberados/min.

Nota: El ensayo se llevó a cabo durante 3 minutos y la cantidad de extracto proteolítico empleado en el ensayo fue de 50 μL .

| TESTIGO CEPA 36 aIV | | | | |
|---------------------|--------------------|-------------|--------|--------------------|
| pH | ABS ₅₉₅ | [P] (mg/mL) | UI | U I/mL DE EXTRACTO |
| 6 | 0.01 | 0.16 | 134.82 | 2696.34 |
| 7 | 0.015 | 0.22 | 180.06 | 3601.16 |
| 8 | 0.017 | 0.24 | 198.15 | 3963.08 |
| 9 | 0.003 | 0.09 | 71.48 | 1429.61 |
| 10 | 0.01 | 0.16 | 134.82 | 2696.34 |

| CEPA 36 aIV | |
|--------------------|--|
| pH | UI/mL de EXTRACTO – UI/mL de EXTRACTO (TESTIGO) |
| 6 | 769.1 |
| 7 | 859.6 |
| 8 | 1266.7 |
| 9 | 1628.7 |
| 10 | 1221.5 |

Anexo F

Termoestabilidad de los extractos proteolíticos

| CEPA 36 aIV A 30°C | | | | |
|-------------------------------|--|----------------|------|--------|
| TIEMPO DE PREINCUBACIÓN(min.) | U I/mL EXTRACTO - U I/mL de EXTRACTO (TESTIGO) | % DE ACTIVIDAD | A/A0 | LnA/A0 |
| 0 | 1538.18 | 100 | 1 | 0 |
| 15 | 1357.22 | 88.24 | 0.9 | -0.125 |
| 30 | 1266.74 | 82.35 | 0.8 | -0.194 |
| 45 | 1085.78 | 70.59 | 0.7 | -0.348 |
| 60 | 1085.78 | 70.59 | 0.7 | -0.348 |

$$Y = -0.0065X - 0.0094$$

Donde:

Y: LnA/A0

X: Tiempo

Pendiente (m): kd

| CEPA 36 aIV A 40°C | | | | |
|-------------------------------|--|----------------|------|--------|
| TIEMPO DE PREINCUBACIÓN(min.) | UI/mL EXTRACTO - UI/mL de EXTRACTO (TESTIGO) | % DE ACTIVIDAD | A/A0 | LnA/A0 |
| 0 | 1538.18 | 100 | 1 | 0 |
| 15 | 1266.74 | 82.4 | 0.82 | -0.19 |
| 30 | 1085.78 | 70.6 | 0.71 | -0.35 |
| 45 | 1085.78 | 70.6 | 0.71 | -0.35 |
| 60 | 995.29 | 64.7 | 0.65 | -0.44 |

$$Y = -0.0116X - 0.0067$$

| CEPA 36 aIV A 50°C | | | | |
|-------------------------------|--|----------------|-------|--------|
| TIEMPO DE PREINCUBACIÓN(min.) | U. I. / mL EXTRACTO - U. I. / mL de EXTRACTO (TESTIGO) | % DE ACTIVIDAD | A/A0 | LnA/A0 |
| 0 | 1538.18 | 100 | 1 | 0 |
| 15 | 1266.74 | 82.4 | 0.824 | -0.194 |
| 30 | 995.29 | 64.7 | 0.647 | -0.435 |
| 45 | 995.29 | 64.7 | 0.647 | -0.435 |
| 60 | 814.33 | 52.9 | 0.529 | -0.636 |

| Y= -0.0145X+0.0078CEPA 36 aIV A 60°C | | | | |
|--------------------------------------|--|----------------|------|--------|
| TIEMPO DE PREINCUBACIÓN(min.) | UI/mL EXTRACTO - UI/mL de EXTRACTO (TESTIGO) | % DE ACTIVIDAD | A/A0 | LnA/A0 |
| 0 | 1538.18 | 100 | 1 | 0 |
| 15 | 723.85 | 47.1 | 0.47 | -0.75 |
| 30 | 542.89 | 35.3 | 0.35 | -1.04 |
| 45 | 271.44 | 17.6 | 0.18 | -1.73 |
| 60 | 271.44 | 17.6 | 0.18 | -1.73 |

$$Y = -0.0347X - 0.0777$$

| CEPA 36 aIV A 70°C | | | | |
|-------------------------------|--|----------------|------|--------|
| TIEMPO DE PREINCUBACIÓN(min.) | UI/mL EXTRACTO - UI/mL de EXTRACTO (TESTIGO) | % DE ACTIVIDAD | A/A0 | LnA/A0 |
| 0 | 1538.18 | 100 | 1 | 0 |
| 15 | 904.81 | 58.82 | 0.59 | -0.53 |
| 30 | 452.41 | 29.41 | 0.29 | -1.22 |
| 45 | 361.93 | 23.53 | 0.24 | -1.45 |
| 60 | 271.44 | 17.65 | 0.18 | -1.73 |

$$Y = -0.0408X - 0.0271$$

| CEPA 36 aIV A 80°C | | | | |
|-------------------------------|--|----------------|------|--------|
| TIEMPO DE PREINCUBACIÓN(min.) | UI/mL EXTRACTO - UI/mL de EXTRACTO (TESTIGO) | % DE ACTIVIDAD | A/A0 | LnA/A0 |
| 0 | 1538.18 | 100.0 | 1 | 0 |
| 15 | 633.37 | 41.2 | 0.41 | -0.89 |
| 30 | 271.44 | 17.6 | 0.18 | -1.73 |
| 45 | 180.96 | 11.8 | 0.12 | -2.14 |
| 60 | 90.48 | 5.9 | 0.06 | -2.83 |

$$Y = -0.0578X - 0.0067$$

| CEPA 2.2 aB A 30°C | | | | |
|-------------------------------|---|----------------|-------|--------|
| TIEMPO DE PREINCUBACIÓN(min.) | UI/mL EXTRACTO - UI/ mL de EXTRACTO (TESTIGO) | % DE ACTIVIDAD | A/A0 | LnA/A0 |
| 0 | 1628.66 | 100 | 1 | 0 |
| 15 | 1538.18 | 94.4 | 0.944 | -0.057 |
| 30 | 1447.70 | 88.9 | 0.889 | -0.118 |
| 45 | 1447.70 | 88.9 | 0.889 | -0.118 |
| 60 | 1447.70 | 88.9 | 0.889 | -0.118 |

$$Y = -0.0039X - 0.0006$$

| CEPA 2.2 aB A 40°C | | | | |
|-------------------------------|--|----------------|--------|---------|
| TIEMPO DE PREINCUBACIÓN(min.) | UI/ mL EXTRACTO - UI/ mL de EXTRACTO (TESTIGO) | % DE ACTIVIDAD | A/A0 | LnA/A0 |
| 0 | 1628.66 | 100 | 1 | 0 |
| 15 | 1266.74 | 77.78 | 0.7778 | -0.2513 |
| 30 | 1176.26 | 72.22 | 0.7222 | -0.3254 |
| 45 | 1176.26 | 72.22 | 0.7222 | -0.3254 |
| 60 | 1176.26 | 72.22 | 0.7222 | -0.3254 |

$$Y = -0.0108X - 0.0295$$

| CEPA 2.2 aB A 50°C | | | | |
|-------------------------------|--|----------------|------|--------|
| TIEMPO DE PREINCUBACIÓN(min.) | UI/mL EXTRACTO - UI/mL de EXTRACTO (TESTIGO) | % DE ACTIVIDAD | A/A0 | LnA/A0 |
| 0 | 1628.66 | 100 | 1 | 0 |
| 15 | 814.33 | 50 | 0.50 | -0.69 |
| 30 | 814.33 | 50 | 0.50 | -0.69 |
| 45 | 814.33 | 50 | 0.50 | -0.69 |
| 60 | 633.37 | 38.9 | 0.39 | -0.94 |

$$Y = -0.0157X - 0.0736$$

| CEPA 2.2 aB A 60°C | | | | |
|-------------------------------|--|----------------|------|--------|
| TIEMPO DE PREINCUBACIÓN(min.) | UI/mL EXTRACTO - UI/mL de EXTRACTO (TESTIGO) | % DE ACTIVIDAD | A/A0 | LnA/A0 |
| 0 | 1628.66 | 100 | 1 | 0 |
| 15 | 995.29 | 61.11 | 0.61 | -0.49 |
| 30 | 814.33 | 50.00 | 0.50 | -0.69 |
| 45 | 723.85 | 44.44 | 0.44 | -0.81 |
| 60 | 633.37 | 38.89 | 0.39 | -0.94 |

$$Y = -0.0231X - 0.0486$$

ANEXO G

Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad proteolítica

| CEPA 36 aIV | | | | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) |
|------------------|--------|----------|----------|-------------|-------------|-------------|
| ION | ABS595 | ABS595 ' | ABS595 T | M | M | T |
| Control | 0.03 | 0.032 | 0.022 | 0.379 | 0.401 | 0.292 |
| Ba ⁺⁺ | 0.049 | 0.048 | 0.042 | 0.585 | 0.574 | 0.509 |
| Ca ⁺⁺ | 0.013 | 0.014 | 0.001 | 0.194 | 0.205 | 0.064 |
| Mg ⁺⁺ | 0.02 | 0.02 | 0.015 | 0.270 | 0.270 | 0.216 |
| Na ⁺⁺ | 0.029 | 0.027 | 0.017 | 0.368 | 0.346 | 0.238 |
| K ⁺⁺ | 0.031 | 0.029 | 0.023 | 0.390 | 0.368 | 0.303 |
| Cu ⁺⁺ | 0.039 | 0.037 | 0.029 | 0.477 | 0.455 | 0.368 |
| Fe ⁺⁺ | 0.051 | 0.049 | 0.042 | 0.607 | 0.585 | 0.509 |

M: Muestra

T: Testigo

| CEPA 36 aIV | | | |
|------------------|-------|-------|--------|
| ION | UI | UI | UI (T) |
| Control | 315.8 | 333.9 | 243.4 |
| Ba ⁺⁺ | 487.7 | 478.6 | 424.4 |
| Ca ⁺⁺ | 162.0 | 171.0 | 53.4 |
| Mg ⁺⁺ | 225.3 | 225.3 | 180.1 |
| Na ⁺⁺ | 306.7 | 288.6 | 198.2 |
| K ⁺⁺ | 324.8 | 306.7 | 252.4 |
| Cu ⁺⁺ | 397.2 | 379.1 | 306.7 |
| Fe ⁺⁺ | 505.8 | 487.7 | 424.4 |

UI = μg de Tirosina liberados/min.

| CEPA 36 aIV | | | | | |
|------------------|----------------|----------------|--------------------|----------|------------|
| ION | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO (T) | PROMEDIO | DESV. EST. |
| Control | 6315.60 | 6677.52 | 4867.90 | 6496.56 | 255.92 |
| Ba ⁺⁺ | 9753.89 | 9572.93 | 8487.15 | 9663.41 | 127.96 |
| Ca ⁺⁺ | 3239.23 | 3420.20 | 1067.68 | 3329.71 | 127.96 |
| Mg ⁺⁺ | 4505.97 | 4505.97 | 3601.16 | 4505.97 | 0.00 |
| Na ⁺⁺ | 6134.64 | 5772.71 | 3963.08 | 5953.67 | 255.92 |
| K ⁺⁺ | 6496.56 | 6134.64 | 5048.86 | 6315.60 | 255.92 |
| Cu ⁺⁺ | 7944.26 | 7582.34 | 6134.64 | 7763.30 | 255.92 |
| Fe ⁺⁺ | 10115.82 | 9753.89 | 8487.15 | 9934.85 | 255.92 |

| CEPA 36 aIV | | |
|------------------|--------------|--|
| ION | DESV EST (%) | UI/mL EXTRACTO - UI/mL de EXTRACTO (T) |
| Control | 15.7 | 1628.66 |
| Ba ⁺⁺ | 7.9 | 1176.26 |
| Ca ⁺⁺ | 7.9 | 2262.03 |
| Mg ⁺⁺ | 0.0 | 904.81 |
| Na ⁺⁺ | 15.7 | 1990.59 |
| K ⁺⁺ | 15.7 | 1266.74 |
| Cu ⁺⁺ | 15.7 | 1628.66 |
| Fe ⁺⁺ | 15.7 | 1447.70 |

Nota: El ensayo se llevó a cabo durante 3 minutos y la cantidad de extracto proteolítico empleado en el ensayo fue de 50 µL, con un volumen final de reacción de 2.5 mL.

| CEPA 36 aIV | |
|------------------|----------------|
| ION | % DE ACTIVIDAD |
| Control | 100 |
| Ba ⁺⁺ | 72.2 |
| Ca ⁺⁺ | 138.9 |
| Mg ⁺⁺ | 55.6 |
| Na ⁺⁺ | 122.2 |
| K ⁺⁺ | 77.8 |
| Cu ⁺⁺ | 100 |
| Fe ⁺⁺ | 88.9 |

| CEPA 2.2 aB | | | | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) | [P] (mg/mL) |
|------------------|--------|----------|----------|-------------|-------------|-------------|
| ION | ABS595 | ABS595 ' | ABS595 T | M | M | T |
| Control | 0.071 | 0.072 | 0.062 | 0.824 | 0.835 | 0.726 |
| Ba ⁺⁺ | 0.07 | 0.071 | 0.059 | 0.813 | 0.824 | 0.694 |
| Ca ⁺⁺ | 0.016 | 0.015 | 0.006 | 0.227 | 0.216 | 0.118 |
| Mg ⁺⁺ | 0.016 | 0.016 | 0.01 | 0.227 | 0.227 | 0.162 |
| Na ⁺⁺ | 0.028 | 0.026 | 0.022 | 0.357 | 0.336 | 0.292 |
| K ⁺⁺ | 0.03 | 0.032 | 0.023 | 0.379 | 0.401 | 0.303 |
| Cu ⁺⁺ | 0.077 | 0.075 | 0.071 | 0.889 | 0.868 | 0.824 |
| Fe ⁺⁺ | 0.058 | 0.056 | 0.054 | 0.683 | 0.661 | 0.640 |

M: Muestra

T: Testigo

| CEPA 2.2 aB | | | |
|------------------|-------|-------|--------|
| ION | UI | UI | UI (T) |
| Control | 686.8 | 695.8 | 605.3 |
| Ba ⁺⁺ | 677.7 | 686.8 | 578.2 |
| Ca ⁺⁺ | 189.1 | 180.1 | 98.6 |
| Mg ⁺⁺ | 189.1 | 189.1 | 134.8 |
| Na ⁺⁺ | 297.7 | 279.6 | 243.4 |
| K ⁺⁺ | 315.8 | 333.9 | 252.4 |
| Cu ⁺⁺ | 741.0 | 722.9 | 686.8 |
| Fe ⁺⁺ | 569.1 | 551.0 | 532.9 |

| CEPA 2.2 aB | | | | | |
|------------------|----------------|----------------|--------------------|----------|------------|
| ION | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO (T) | PROMEDIO | DESV. EST. |
| Control | 13735.1 | 13916.0 | 12106.4 | 13825.6 | 127.96 |
| Ba ⁺⁺ | 13554.1 | 13735.1 | 11563.5 | 13644.6 | 127.96 |
| Ca ⁺⁺ | 3782.1 | 3601.2 | 1972.5 | 3691.6 | 127.96 |
| Mg ⁺⁺ | 3782.1 | 3782.1 | 2696.3 | 3782.1 | 0.00 |
| Na ⁺⁺ | 5953.7 | 5591.7 | 4867.9 | 5772.7 | 255.92 |
| K ⁺⁺ | 6315.6 | 6677.5 | 5048.9 | 6496.6 | 255.92 |
| Cu ⁺⁺ | 14820.8 | 14458.9 | 13735.1 | 14639.9 | 255.92 |
| Fe ⁺⁺ | 11382.6 | 11020.6 | 10658.7 | 11201.6 | 255.92 |

| CEPA 2.2 aB | | |
|--------------------|---------------------|---|
| ION | DESV EST (%) | UI/mL EXTRACTO - UI/mL de EXTRACTO (T) |
| Control | 7.4 | 1719.1 |
| Ba ⁺⁺ | 7.4 | 2081.1 |
| Ca ⁺⁺ | 7.4 | 1719.1 |
| Mg ⁺⁺ | 0.0 | 1085.8 |
| Na ⁺⁺ | 14.9 | 904.8 |
| K ⁺⁺ | 14.9 | 1447.7 |
| Cu ⁺⁺ | 14.9 | 904.8 |
| Fe ⁺⁺ | 14.9 | 542.9 |

Nota: El ensayo se llevó a cabo durante 3 minutos y la cantidad de extracto proteolítico empleado en el ensayo fue de 50 µL, con un volumen final de reacción de 2.5 mL.

| CEPA 2.2 aB | |
|--------------------|-----------------------|
| ION | % DE ACTIVIDAD |
| Control | 100.0 |
| Ba ⁺⁺ | 121.1 |
| Ca ⁺⁺ | 100.0 |
| Mg ⁺⁺ | 63.2 |
| Na ⁺⁺ | 52.6 |
| K ⁺⁺ | 84.2 |
| Cu ⁺⁺ | 52.6 |
| Fe ⁺⁺ | 31.6 |

ANEXO H

Estudios de inhibición

| CEPA 36 aIV | | | | | | |
|--------------------------|--------|----------|----------|-------|-------|-------|
| INHIBIDOR | ABS595 | ABS595 ' | ABS595 T | M | M | T |
| BLANCO | 0.023 | 0.022 | 0.014 | 0.303 | 0.292 | 0.205 |
| EDTA | 0.013 | 0.011 | 0.004 | 0.194 | 0.173 | 0.097 |
| β - Mercaptoetanol | 0.015 | 0.017 | 0.014 | 0.216 | 0.238 | 0.205 |
| PMSF | 0.02 | 0.018 | 0.011 | 0.270 | 0.249 | 0.173 |

M: Muestra

T: Testigo

| CEPA 36 aIV | | | |
|--------------------------|--------|--------|----------|
| INHIBIDOR | U. I | U. I | U. I (T) |
| BLANCO | 252.44 | 243.39 | 171.01 |
| EDTA | 161.96 | 143.87 | 80.53 |
| β - Mercaptoetanol | 180.06 | 198.15 | 171.01 |
| PMSF | 225.30 | 207.20 | 143.87 |

U I = μ g de Tirosina liberados/min.

| CEPA 36 aIV | | | | | |
|--------------------------|-----------------|----------------|--------------------|----------|------------|
| INHIBIDOR | UI/ mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO (T) | PROMEDIO | DESV. EST. |
| BLANCO | 5048.9 | 4867.9 | 3420.2 | 4958.4 | 128.0 |
| EDTA | 3239.2 | 2877.3 | 1610.6 | 3058.3 | 255.9 |
| β - Mercaptoetanol | 3601.2 | 3963.1 | 3420.2 | 3782.1 | 255.9 |
| PMSF | 4506.0 | 4144.0 | 2877.3 | 4325.0 | 255.9 |

| CEPA 36 aIV | |
|--------------|--|
| DESV EST (%) | UI/mL EXTRACTO - UI/mL de EXTRACTO (T) |
| 7.1 | 1538.2 |
| 14.1 | 1447.7 |
| 14.1 | 361.9 |
| 14.1 | 1447.7 |

Nota: El ensayo se llevó a cabo durante 3 minutos y la cantidad de extracto proteolítico empleado en el ensayo fue de 50 μ L, con un volumen final de reacción de 2.5 mL.

| CEPA 36 aIV | |
|--------------------------|----------------|
| INHIBIDOR | % DE ACTIVIDAD |
| BLANCO | 100.0 |
| EDTA | 94.1 |
| β - Mercaptoetanol | 23.5 |
| PMSF | 94.1 |

| CEPA 2.2 aB | | | | | | |
|--------------------------|--------|---------|----------|------|------|------|
| INHIBIDOR | ABS595 | ABS595' | ABS595 T | M | M | T |
| BLANCO | 0.071 | 0.073 | 0.062 | 0.82 | 0.85 | 0.73 |
| EDTA | 0.082 | 0.08 | 0.072 | 0.94 | 0.92 | 0.83 |
| β - Mercaptoetanol | 0.022 | 0.021 | 0.012 | 0.29 | 0.28 | 0.18 |
| PMSF | 0.02 | 0.021 | 0.019 | 0.27 | 0.28 | 0.26 |

| CEPA 2.2 aB | | | |
|--------------------------|--------|--------|--------|
| INHIBIDOR | UI | UI | UI (T) |
| BLANCO | 686.75 | 704.85 | 605.32 |
| EDTA | 786.28 | 768.19 | 695.80 |
| β - Mercaptoetanol | 243.39 | 234.35 | 152.91 |
| PMSF | 225.30 | 234.35 | 216.25 |

| CEPA 2.2 aB | | | | | |
|--------------------------|----------------|----------------|--------------------|----------|------------|
| INHIBIDOR | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO | UI/mL EXTRACTO (T) | PROMEDIO | DESV. EST. |
| BLANCO | 13735.1 | 14097.0 | 12106.4 | 13916.0 | 255.9 |
| EDTA | 15725.7 | 15363.7 | 13916.0 | 15544.7 | 255.9 |
| β - Mercaptoetanol | 4867.9 | 4686.9 | 3058.3 | 4777.4 | 128.0 |
| PMSF | 4506.0 | 4686.9 | 4325.0 | 4596.5 | 128.0 |

| CEPA 2.2 aB | |
|--------------|--|
| DESV EST (%) | UI/mL EXTRACTO - UI/mL de EXTRACTO (T) |
| 14.1 | 1809.6 |
| 14.1 | 1628.7 |
| 7.1 | 1719.1 |
| 7.1 | 271.4 |

| CEPA 2.2 aB | |
|--------------------------|----------------|
| INHIBIDOR | % DE ACTIVIDAD |
| BLANCO | 100 |
| EDTA | 90 |
| β - Mercaptoetanol | 95 |
| PMSF | 15 |

| | |
|---|------|
| ANEXO A | I |
| Composición de la leche descremada | I |
| Composición de la harina de pescado | I |
| Curva patrón de proteína | I |
| ANEXO B | III |
| Análisis de varianza y comparación múltiple de la cinética de producción de los extractos proteolíticos producidos por las cepas 2.2 a B, 2.7 aB y 36 aIV. | III |
| ANEXO C | IV |
| Tiempo de reacción | IV |
| ANEXO D | VII |
| Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica | VII |
| Anexo E | XII |
| Efecto del pH sobre la actividad proteolítica | XII |
| Anexo F | XVII |
| <i>Termoestabilidad de los extractos proteolíticos</i> | XVII |
| ANEXO G | XX |
| <i>Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad proteolítica</i> | XX |
| ANEXO H | XXIV |
| <i>Estudios de inhibición</i> | XXIV |

