



## CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE PROTEASAS FÚNGICAS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO APARTIR DE UNA CEPA AISLADA DE QUESO PHILADELPHIA®

Jorge Carrillo, Marisol Salazar, Ricardo Hernández, Sergio Huerta & Arely Prado, Av. San Rafael Atlxco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa 09340, México, D.F., Tel: 58046555 ó 58044999, Fax: 58044712, Mail: lapb@xanum.uam.mx

*Palabras Clave.* proteasas, cinética, FMS

**Introducción.** La producción de enzimas es una industria que a finales del siglo XX generó ganancias de alrededor de 1600 millones de dólares al año, de los cuales el 60% es debido a la venta de proteasas<sup>(1)</sup> Industrialmente las enzimas más utilizadas son: amilasas, carbohidrolasas, lipasas y proteasas<sup>(2)</sup> Las proteasas se pueden obtener de fuentes como plantas, animales y microorganismos (m.o.), estas últimas son producidas por fermentación en medio sólido (FMS) o en medio líquido (FML). Se utilizan en la industria de alimentos, detergentes, textil, carnes, piel, entre otras.<sup>(2)</sup> Las bacterias del género *Bacillus sp* y cepas fúngicas como *Aspergillus sp.*<sup>(3)</sup>, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.*, son las más utilizadas para la producción de proteasas. Los m.o. que se utilicen en la producción de enzimas deben ser "GRAS", es decir, que hayan demostrado seguridad e inocuidad para el consumo humano y animal. El sustrato natural de donde se aísla un m.o. influye directamente en su metabolismo de tal manera que si aislamos de un medio donde predominen lípidos, almidones ó proteínas, el m.o seguramente producirá lipasas, amilasas ó proteasas. De igual manera la temperatura tiene un efecto sobre el metabolismo del m.o. así como en la actividad de sus metabolitos (enzimas).

El presente trabajo tiene como objetivo la caracterización de la cinética de producción de proteasas fúngicas por FMS que pudieran tener actividad a bajas temperaturas

**Metodología.** La cepa se cultivo en agar papa dextrosa (PDA) a 30°C por 8 días. La cinética de producción de proteasas por FMS se realizó usando harina de pescado como sustrato y espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte. La humedad se ajusto a 50 % con solución salina (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.05g/L., KCl 0.05g/L) a pH 7.0. Se inoculó con una concentración de 2x10<sup>7</sup> esporas/g de materia seca. Se incubó a 30°C, tomando muestras a 0, 12, 24, 36 y 48 h. Se obtuvo el extracto crudo enzimático por compresión, se determinó la actividad proteolítica por el método de Kunitz y la proteína liberada por la acción de la enzima se determino por el método de Bradford<sup>(3)</sup> (Bio-Rad). Una unidad enzimática (UI) se definió como los de péptidos liberados por minuto, equivalentes a Albúmina Serica Bovina (BSA). El crecimiento radial se caracterizó en los medios de Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Dextrosa Sabouraud (SDA), Agar Extracto de Malta (AEM) y Agar Czapek Dox (ACD). Se inocularon 2 µL de suspensión de esporas (≈486x10<sup>3</sup> esporas) al centro de la placa y se incubó a 4, 15 y 30°C, midiendo el crecimiento radial cada 24h por 14 días, observándose el efecto de la temperatura y el medio de cultivo en el crecimiento de la cepa.

**Resultados.** En la Figura 1 se observa que a 36 h de cultivo se obtiene la mayor actividad enzimática (11.30 UI/mL), otros trabajos reportan la mayor actividad proteolítica a 24 h utilizando *Bacillus sp.* JB-99<sup>(2)</sup> y usando cepas fúngicas la mayor actividad proteolítica se ha medido a tiempos mucho mayores, por ejemplo, en trabajos con *Aspergillus fumigatus* la mejor actividad se reporta a 6 días<sup>(3)</sup>.

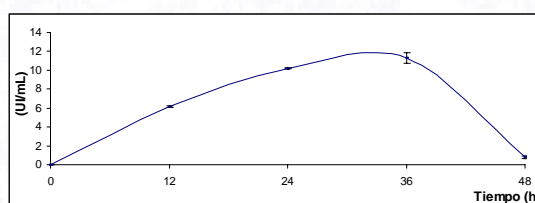


Figura 1 Cinética de producción de proteasas fúngicas por FMS a 30 °C

La cepa presentó un mejor crecimiento radial en SDA (3.35 cm), seguida PDA (2.7cm), AEM (2.65cm) y ACD (2.60cm) respectivamente. Se observó que a 15°C se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento radial ( $\mu=0.3142 \text{ h}^{-1}$ ), lo que podría indicar que se trata de una cepa psicrófila, sin embargo son necesarios estudios de confirmación. La morfología colonial y al microscopio del micelio y esporas sugieren que se trata de una cepa de *Penicillium sp.*, sin embargo, esto se deberá confirmar mediante la identificación molecular de la cepa.



Figura 2 Morfología colonial (a) y al microscopio (b) de la cepa fúngica aisladas de queso Philadelphia®.

**Conclusiones.** La cepa fúngica presentó mayor producción de proteasas a las 36 h de cultivo en FMS a 30 °C y presentó la mayor velocidad de crecimiento radial a 15 °C. La morfología colonial y las observaciones al microscopio sugieren que se trata de un *Penicillium sp.* En futuros estudios se verá el efecto de la temperatura y el pH en la producción de proteasas por FMS.

### Bibliografía.

- 1.- 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
- 2.- Johnvesly B., B. R. Maunjunath. 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.
- 3.- Wang S.L., Chen Y.H., Wang C.L., Yen Y.H. 2005. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and microbial technology*. 36: 660-665.