

# SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS PRODUCTORAS DE PROTEASAS.

María-de-Jesús García-Gómez, Sergio Huerta-Ochoa, Octavio Loera-Corral y Arely Prado-Barragán  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Departamento de Biotecnología  
San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina, Delg. Iztapalapa, D.F. Tel 58 04 65 55, Fax 58 04 65 54  
e-mail: lapb@xanum.uam.mx

*Palabras clave: Aspergillus, proteasas, hidrólisis proteolítica.*

**Introducción.** Las enzimas proteolíticas representan aproximadamente el 60% de las enzimas industriales comercializadas mundialmente. Uno de los métodos empleados para la obtención industrial de enzimas proteolíticas es la fermentación en medio sólido (1). En los últimos años el principal interés de los procesos de fermentación comercial ha sido encontrar o crear cepas microbianas sobreproductoras de productos industriales. Sin embargo, el desarrollo exitoso de cepas mejoradas requiere del conocimiento de la fisiología, de las rutas de control y regulación así como del diseño de procedimientos para examinar e identificar a éstas cepas como productoras de un metabolito o enzima de interés. En general, una enzima puede ser detectada visualmente por la ausencia o presencia de cierta actividad enzimática sobre placas que contengan un medio de cultivo con un reactivo selectivo, un colorante o un organismo indicador (2).

El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas fúngicas que presentaran actividad proteolítica expresada mediante el método rápido de visualización de halos de hidrólisis en dos medios de cultivo compuestos por diferentes sustratos y su posterior fermentación en medio sólido.

**Metodología.** Se realizó una comparación de cepas de *A. niger* 2088, *A. niger* ANH15, *A. oryzae* 2095, *A. niger* DAR2, *A. niger* C28B25 y *A. niger* AD96-4. Las cepas fueron propagadas en placas de agar papa-dextrosa e incubadas (5 d, 30°C). Las esporas fueron cosechadas (Tween 80 al 0.1%) e inoculadas en placas de agar-harina de pescado y agar-leche descremada (20 g/l) por picadura al centro de la caja de Petri (3). Las cajas fueron inoculadas (30°C, 72 h) y observadas cada 24 h para visualizar la formación de halos de hidrólisis. Finalmente, las cepas que presentaron halos de hidrólisis fueron sometidas a fermentaciones en columnas (harina de pescado y espuma de poliuretano 70:30 p/p, pH inicial 6,  $2 \times 10^7$  esporas/g materia seca, 30°C y flujo de aire de 40cc/min) y se determinó la actividad proteolítica a pH 7 de los extractos a las 36 horas (4).

**Resultados y discusión.** Las cepas DAR2, C28B25 y AD96-4 no mostraron crecimiento ni formación de halo de hidrólisis sobre las placas de agar-leche descremada, mientras que con las cepas 2088, ANH15 y 2095 (Tabla 1) se observaron halos translúcidos que manifiestan la presencia de enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar la caseína del medio de cultivo (3). Por otro lado, en el medio de agar-harina de pescado todas las cepas presentaron crecimiento observándose más abundante para las cepas AD96-4 y 2095, y muy escaso para las cepas DAR2 y

C28B25. Además, en este medio de cultivo no se visualizó para ninguna de las cepas la producción de enzimas proteolíticas (ausencia de halos de hidrólisis) durante todo el periodo de incubación, esto pudo deberse a que la harina de pescado contiene péptidos pequeños y aminoácidos libres por lo que los microorganismos no necesitan secretar las proteasas para obtener C o N.

Tabla 1. Índice de potencia ( $D_i/D_c$ ) en placas de agar-leche descremada a las 56h de incubación

Cepa	Diámetro cepa	Diámetro halo	Índice potencia
2095	1.1cm	2.1 cm	1.9
2088	1.9 cm	2.9 cm	1.5
ANH15	2.2 cm	3.2 cm	1.4

La actividad proteolítica de los extractos obtenidos a partir de la fermentación (Tabla 2) confirmaron que la cepa que produce mayor actividad proteolítica es la 2095, lo cual concuerda con lo obtenido en las placas de agar-leche descremada (Índice de potencia, Tabla 1).

Tabla 2. Actividad proteolítica de extractos fúngicos a las 36h de fermentación

Cepa	U/ ml extracto
2095	20.08
2088	0.50
ANH15	0.00

**Conclusiones.** Las cepas ANH15, 2088 y 2095 mostraron producción de enzimas proteolíticas mediante la formación de halos translúcidos sobre placas de agar-leche descremada, presentando la mayor actividad proteolítica la cepa 2095 tanto en las placas como en fermentación sólida. Éste método ayuda a analizar rápidamente un conjunto de cepas que producen extractos proteolíticos cuyos resultados son reproducibles en fermentación sólida.

**Agradecimientos.** CONACyT (becaria 133291) y Dr. Ernesto Favela Torres por sus comentarios.

## Bibliografía.

- Rao, M, Tankesale, A, Ghatge, M y Deshpande, V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol and Mol Biol Reviews*. 62 (3): 597-635.
- Parekh, S, Vinci, V, Strobel, R. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation process. *Appl Microbiol Biotechnol* vol 54: 287-301.
- Herrera, O. (2003). Obtención y selección de cepas de *Aspergillus niger* sobreproductoras de fitasa. *Tesis para obtener el grado de maestro en biotecnología*. UAM. Distrito Federal, 64-68.
- Ichishima, E. (1970). Acid proteinases. En: *Methods in Enzymology*. Academic Press, U.S.A. 397-406.