



## EFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS A PARTIR DE HARINA DE PESCADO POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Alma R. López, Ricardo Hernández, Sergio Huerta, Héctor Escalona & Arely Prado\*, Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco No.186 Col. Vicentina. Iztapalapa 09340. México. D.F. Tel:5804-4999, Email:lapb@xanum.uam.mx

*Palabras Clave: pH, temperatura, FMS.*

**Introducción:** El 60% de la venta total de enzimas en el mercado mundial corresponde a las proteasas. Su importancia se debe al gran campo de aplicación en alimentos (bebidas, panificaciones, ablandamiento de carne, etc.), aplicaciones farmacéuticas, en la industria de detergentes, entre otros (1). Se ha incrementado el interés por los hongos filamentosos debido a que son fácilmente cultivados en fermentación en medio sólido (FMS) ya que crecen en medios con bajo contenido de humedad y producen enzimas extracelulares por lo que el proceso de recuperación es más sencillo con amplio rango de pH (2). El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del pH y la temperatura en la producción de enzimas proteolíticas por *Yarrowia lipolytica* a partir de harina de pescado.

**Metodología:** La cepa (*Y.lipolytica*) se cultivó en agar papa dextrosa (PDA) a 45°C por 8 días. La FMS se llevó a cabo en columnas de vidrio empacadas con una mezcla de harina de pescado (HP) como sustrato y agrolita (A) como soporte a una relación 30/70 (p/p) al 50% de humedad. Se inoculó a una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas/g de materia seca, el pH se ajustó a 5, 7 ó 9 y la temperatura se mantuvo a 40, 45 ó 50°C dependiendo de la condición a estudiar. La humedad se ajustó con solución amortiguadora que incluyó el inóculo y elementos trazas (1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g/L de KCl, 0.01 g/L de  $\text{FeSO}_4$ ). El extracto enzimático se recuperó adicionando 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , por agitación (30 min) y filtración (Whatman 1). Se determinó la actividad proteolítica por el Método Kunitz (1947). La Unidad Enzimática se definió como los  $\mu\text{g}$  de tirosina liberados por minuto. Se obtuvo la combinación de valores de pH y temperatura que proporcionan la mayor producción de proteasas por Método de Superficie de Respuesta (MSR) empleando el programa Statgraphics Plus Versión 4.

**Resultados:** Se obtuvo la máxima producción de proteasas (9.53 UI por g de HP) con una actividad de 39 UI/mL de extracto a pH 7 y 45°C a las 12 h de fermentación. Se ha reportado máxima producción de proteasas a 30°C a las 72 h por *Aspergillus oryzae* y *R. microsporus* NRRL 3671 por g de sustrato fermentado respectivamente a pH 7(3,4); por lo que la cepa estudiada representa una reducción de 60 h en el proceso, lo cual repercute positivamente en el costo de producción. Mediante un análisis estadístico se obtuvo una superficie de respuesta (Fig.1) representada por un modelo

matemático,  $Y = -719.918 + 46.725A + 25.2383B - 4.12917A^2 + 0.255 AB - 0.294667B^2$  (A=pH y B=Temperatura) donde  $A^2$  tiene mayor significancia. Este modelo matemático sólo explica el 57.9% de la variabilidad en la producción de proteasas indicando que el pH tiene mayor efecto en la respuesta. El MSR predice que a pH de 7.0 y 45.9°C se obtendría la máxima producción de proteasas cuyo valor teórico es de 24.41 UI/mL de extracto con un rendimiento de 6.03 UI por g de HP dicho valor es menor (63%) que el valor práctico obtenido; por lo que existen variables que influyen en la producción de proteasas que no se están considerando en el modelo.

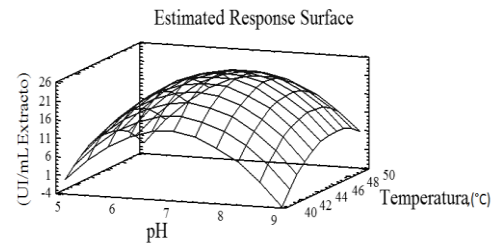


Fig.1. Superficie de respuesta para la producción de proteasas.

**Conclusión:** Para maximizar la producción de proteasas por *Yarrowia lipolytica* se tiene que trabajar a pH 7.07 y 45.9°C de acuerdo al método de superficie de respuesta (MSR). Sin embargo el valor práctico obtenido es mayor que el predicho por el modelo, por lo que se sugiere explorar el efecto del pH para obtener un modelo que se ajuste mejor a los datos.

### Bibliografía:

1. Aguilar Cristóbal N., Gutiérrez Sánchez G. Prado Barragán L. A., Rodríguez Herrera R., Martínez Hernández J. L., Contreras Esquivel J. (2008). Perspectives of solid state fermentation for production of Food enzymes. *America Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4(4): 354-366.
2. Villena Gretty K., Gutiérrez Correa M. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Rev. Peru. Biol.* 10(i):78-87.
3. Sumantha A. Deepal P. Sandhya C. Szakacs G. Socol C.R. Pandey A. (2006). Rice Bran as a Substrate for Proteolytic Enzyme Production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 49, n. 5: pp.843-851.
4. Sandhya C., Sumantha A. Szakacs G. Pandey A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. Vol. 40, Issue 8, pp. 2689-2694.