



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

Carlo R. Luna, 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:5532445797, [Mail:lapb@xanum.uam.mx](mailto:Mail:lapb@xanum.uam.mx)

*Palabras Clave: proteasas, harina de soya, pH, temperatura*

**Introducción:** Las proteasas representan el 60% del total de las enzimas del mercado. Tienen amplia aplicación en la industria de alimentos, farmacia, detergentes, industria textil, peletería, entre muchas otras (1). Se encuentran ampliamente en la naturaleza; sin embargo las proteasas de origen microbiano representan una fuente importante de proteasas a nivel industrial debido a su rápida producción (1) (2). Las proteasas presentan actividad en un amplio rango de pH y temperatura; así como también poseen alta especificidad por diferentes sustratos (2). Recientemente se ha preferido el uso de cepas de hongos y levaduras para la producción de proteasas, debido a que estas son fácilmente cultivables en FMS, además de que generalmente producen enzimas extracelulares lo que facilita el proceso de recuperación (1) (2).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto combinado de pH y temperatura en la producción de enzimas proteolíticas con harina de soya (HS) por *Y. lipolytica* utilizando el método de superficie de respuesta (MSR).

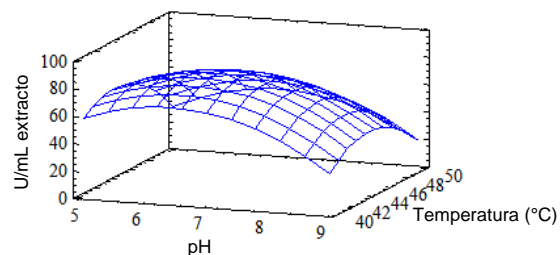
**Metodología:** La cepa (*Y. lipolytica*) se cultivó en agar papa dextrosa (PDA) a 45°C por 8 días. La FMS se llevó a cabo en columnas de vidrio (6cm alto x 3.5cm diámetro) empacadas con una mezcla de (HS) como sustrato y agrolita como soporte a una relación 30/70 (p/p) al 50% de humedad. Se inoculó con una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas/g de materia seca, el pH inicial se ajustó a 5, 7 ó 9 y la temperatura de incubación 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 y 0.01 g/L de  $\text{FeSO}_4$ ). El extracto enzimático se recuperó con 10mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, se agitó (30min, 4°C) y se filtró. Se determinó la actividad proteolítica por el método de Kunitz (1947) (3) modificado. En este trabajo las unidades enzimáticas (U) están definidas como  $\mu\text{g}$  de tirosina liberados por min. Los valores óptimos de pH y temperatura para obtener la máxima producción de proteasas se obtuvo por el MSR.

**Resultados:** En la Tabla 1 se observa que la mayor actividad proteolítica se obtuvo cuando las condiciones de cultivo fueron pH 7 y T= 45°C a las 24h de incubación. Esto se explica debido a que la mayoría de las levaduras tienen una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48°C además de que tienen afinidad por medios ligeramente ácidos con un pH entre 4.5 y 6.5.

**Tabla 1.** Máxima actividad proteolítica obtenida.

pH	Temperatura °C	Tiempo (h)	Actividad Max. (U/mL extracto)
5	40	24	90.35
7	45	24	105.26
9	45	24	55.7

Una vez encontradas las mejores condiciones de cultivo, se realizó el MSR para determinar los valores de pH y temperatura que optimizan la variable de respuesta (Fig. 1).



**Fig.1.** Superficie de respuesta del efecto combinado de pH y temperatura en la producción de proteasas.

A través del MSR representado por el modelo matemático,  $Y = -1653.44 + 62.3312A + 69.9581B - 6.04854A^2 + 0.38375AB - 0.827467B^2$ , ecuación predictiva donde (Y=Actividad proteolítica), se obtuvo que a pH de 6.5 y 43.7 °C son los valores óptimos para obtener la máxima producción de proteasas obteniéndose un valor teórico de 82.1 U/mL extracto. Dicho valor está por debajo del valor experimental obtenido debido a que el modelo no es ajustado y sólo explica el 33.5% de la variabilidad en la producción de proteasas.

**Conclusión:** Se obtuvo una máxima producción de proteasas por *Y. lipolytica* a las 24h a pH 7 y 45°C. Sin embargo el valor práctico obtenido es mayor que el predicho por el modelo. Se recomienda realizar nuevos modelos que predigan mejor la variabilidad en producción de proteasas.

### Bibliografía:

1. Rao M. B., Aparna M. T., Monhini S. G. y. Deshpande V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 597-635.
2. Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. y Pandey A. (2005). Comparative Evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 40: 2689-2694.
3. Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen Physiol*. 30: 244-25.