

Criterios de selección de cepas fúngicas para la producción de proteasas termoestables por cultivo en medio sólido

Lilia A. Prado Barragan¹, Armando Ordaz Hernández², Eric Ortega Sanchez², Ricardo Hernández Martínez²

Biotecnología¹, Ingeniería en Biotecnología²

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa¹, Universidad Politécnica de Tlaxcala²

México D. F.¹, Tlaxcala, Tlax.²; México

lapb@xanum.uam.mx, [armando.hernandez, eric.ortega, ricardo.hernandez]@uptlax.edu.mx

Abstract— In this work was evaluate the correlation of the index power (IP) measured on plate with proteolytic activity in solid state culture (SSC), also enzymatic extract was characterized evaluating the effect of temperature, pH, presence of ions and inhibitors on proteolytic activity. For this research, two fungal strains of the genera *Rhizopus* 2.7 and 2.2 aB and *Aspergillus* 36 aIV were used. Results show high correlation between IP and proteolytic activity in SSC and propose to use the parameter k (proteolytic loss rate) as a criterion for strains selection with capability of protease production. Strains 2.2 aB and 36 aIV showed the best values of k and its proteolytic extracts show better catalysis at 50 ° C and proteolytic extract produced by 36 aIV showed a second peak of maximum proteolytic activity suggesting the presence of a heat-activated protease

Keyword—protease, fungi, solid state culture, thermostable, proteolytic loss rate.

Resumen— En el presente trabajo se evaluó la correlación del índice de potencia (IP) medido en placa con la actividad proteolítica en cultivo en medio sólido (CMS), además se caracterizó el extracto enzimático evaluando el efecto de temperatura, pH, presencia de iones e inhibidores sobre la actividad proteolítica. Para el trabajo se utilizaron 2 cepas fúngicas del género *Rhizopus* 2.2 aB y 2.7 aB y una cepa de *Aspergillus* 36 aIV. Los resultados muestran una alta correlación entre IP y la actividad proteolítica en CMS y se propone utilizar el parámetro k (tasa de decaimiento proteolítica) como criterio para la selección de cepas productoras de proteasas. Las Cepas 2.2aBy 36 aIV presentaron los mejores valores de k y sus extractos proteolíticos muestran mejor catálisis a 50°C, la 36 aIV mostró un segundo pico de máxima actividad proteolítica sugiriendo la presencia de una proteasa termo-activa.

Palabras claves—proteasa, hongo, cultivo en medio sólido, termoestable, tasa de decaimiento proteolítico.

I. INTRODUCCIÓN

Las proteasas son un grupo de enzimas que hidrolizan las proteínas a péptidos o aminoácidos libres (Shankar, S., Rao, M., and Laxman, R. S, 2011). Actualmente, representan el 60% del mercado mundial de venta de enzimas y son de gran importancia por sus aplicaciones en la industria de los detergentes, alimentos, encurtido de pieles y farmacéutica. Este tipo de enzimas se pueden obtener de diversas fuentes tales como animales, plantas y microorganismos, principalmente bacterias y hongos (Kranthi V.S., D. Muralidhar Rao and P. Jaganmohan, 2012). Las proteasas microbianas son consideradas como las más importantes, ya que, se producen en mayor cantidad en tiempos de cultivo más cortos comparado con las fuentes animales y de plantas (Shankar, S., Rao, M., and Laxman, R. S, 2011).

En la actualidad, las proteasas microbianas se producen principalmente por cultivo en medio líquido (CML), sin embargo, el sistema del cultivo en medio sólido (CMS) ha generado gran interés por las múltiples ventajas de proceso que exhibe respecto al CML. El CMS se caracteriza por el crecimiento de

los microorganismos, principalmente hongos, sobre una matriz sólida inerte u orgánica cuyo contenido de humedad no supera su capacidad de retención de agua. Una de las principales ventajas del CMS es el uso de residuos agroindustriales de bajo costo como soporte-sustrato para el crecimiento microbiano y la producción de proteasas (Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., Limam F., 2009). Los microorganismos más utilizados para la producción de proteasas son principalmente hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y. and Srinophakun P., 2009) debido a su capacidad para secretar grandes cantidades de proteasas extracelulares en el medio de cultivo y por el rápido crecimiento e invasividad sobre los sustratos agroindustriales, de los cuales, los más utilizados han sido el salvado de trigo, harina de pescado, harina de soya, entre otros (Hernández R. *et al.*, 2011).

Algunos aspectos importantes a considerar en el CMS para la producción de proteasas son la selección del microorganismo y tipo de sustrato (Pandey A., 2003). Al respecto, la mayoría de los estudios han realizado la selección de cepas por métodos cualitativos basados en el diámetro o intensidad del halo de hidrólisis formado en placas de agar-proteína, sin embargo, estos métodos ofrecen poca o nula reproducibilidad en los sistemas de producción por CMS o CML. Existen pocos esfuerzos para mejorar los métodos de selección de cepas y los que existen sólo se basan en la cuantificación de proteasas por unidad de biomasa (Nygren, C. M., Edqvist, J., Elfstrand, M., Heller, G., and Taylor, A. F., 2007). En este sentido, existe la necesidad de establecer nuevos métodos de selección de hongos basados en criterios cuantitativos con la finalidad de obtener reproducibilidad en sistemas reales de producción de proteasas como lo es el sistema de CMS.

En el presente estudio se tratan de establecer criterios de selección cuantitativos para llevar a cabo la preselección de hongos termotolerantes de manera rápida y sencilla, y que los resultados obtenidos sean reproducibles en cultivo sólido para garantizar el éxito en la producción de proteasas termoestables.

II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A. *Microorganismos y conservación*

Se utilizaron las cepas fúngicas género *Rhizopus* 2.2 aB y 2.7 aB que fueron aisladas de la pasta de copra y la cepa de *Aspergillus* 36 aIV que fue aislada del bagazo de caña. Todas las cepas pertenecen a la colección del Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad de Guadalajara. Las cepas se propagaron en tubos inclinados con agar papa dextrosa (APD) a 45°C por 7 días y, posteriormente, se conservaron por liofilización en leche descremada al 10% (p/v). La viabilidad de las cepas se corroboró periódicamente al resembrarlas sobre medio APD fresco.

Determinación de la actividad proteolítica sobre agar- leche descremada en cultivos superficiales

Las cepas fueron sembradas por picadura en el centro de varias placas que contenían agar-leche descremada (ALD) (Nygren, C. M., Edqvist, J., Elfstrand, M., Heller, G., and Taylor, A. F., 2007) y, a continuación, las placas fueron incubadas invertidas a 45°C. El diámetro de las colonias (DC) y el diámetro halo de hidrólisis (DHH) se registraron cada 12 h por 3 días sobre la superficie de las placas para determinar el índice de potencia (IP), el cual es el cociente entre HH y DC de las colonias.

Cultivo en medio sólido

- **Inóculo.** Las cepas fueron sembradas por estría en tubos inclinados conteniendo APD y después de 7 días de cultivo a 45 °C fueron resembradas por suspensión en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 30 mL de APD e incubadas a 45 °C por 7 días. Las esporas producidas se

cosecharon con una solución de Tween 80 al 0.01% (v/v) y la suspensión obtenida se utilizó como inóculo para la producción de proteasas por CMS.

- **Cultivo.** El CMS fue realizado en columnas de vidrio empacadas (Fig. 1) (Saucedo-Castañeda, G., Losane, K., and Navarro, J., 1992) con 13 g de mezcla de fermentación (Espuma de poliuretano (EDP) / Harina de pescado (HP)) en una relación 70/30 (p/p). La humedad de la mezcla de fermentación se ajustó al 50% con una solución que contenía (g/L): 1.0 de KH_2PO_4 , 0.5 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 de KCl en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7. Asimismo, la concentración de esporas se ajustó a una concentración de 2×10^7 esporas por cada g de materia seca (Tunga, R., Shrivastava, B., and Banerjee, R., 2003). Las columnas empacadas se incubaron a 45°C por 72 h con un flujo de aire de 40 mL/min. El extracto proteolítico se obtuvo realizando primero la extracción de las enzimas con agua destilada y, después centrifugando la suspensión obtenida a $10,000 \times g$ por 15 min a 4°C . El extracto proteolítico (EP) se mantuvo en congelación hasta su uso.

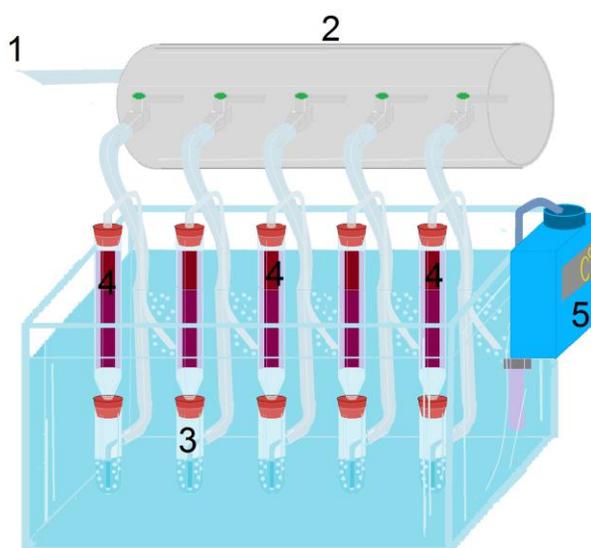


Fig. 1. Método de CMS. 1: aire, 2: control de flujo de aire, 3: humidificador, 4: columna empacada, 5: control temperatura

- **Actividad proteolítica.** La actividad proteolítica (AP) se determinó por el método descrito por Johnvesly, B., Manjunath, B. R., y Naik, G. R. (2002). El ensayo consistió en la incubación a 50°C por 15 min de una mezcla de reacción con 0.95 mL de de caseína al 1% (p/v) en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7) y 0.05 mL de extracto enzimático. La reacción se detuvo adicionando 1.5 mL de ácido tricloroacético al 5% (p/v) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción fue centrifugada a $10,000 \times g$ por 15 min y filtrada a través de papel filtro Whatman No. 1. La absorbancia del filtrado se determinó a 280 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de péptidos liberados equivalentes a 1 μg de tirosina por minuto bajo las condiciones del ensayo. Para poder determinar las unidades enzimáticas se utilizó una curva estándar de tirosina.

Efecto del pH sobre la actividad proteolítica

Con la finalidad de evaluar el efecto del pH sobre la actividad proteolítica se realizaron ensayos utilizando caseína al 1% con valores de pH de 6 a 10. El pH deseado se obtuvo con las siguientes soluciones amortiguadoras: pH 6 y 7 con fosfatos 50 mM, pH 8 y 9 con TRIS-HCl 50 mM y pH 10 con glicina-NaOH (De Azeredo, L. A., De Lima, M. B., Coelho, R. R., and Freire, D. M., 2004).

Efecto de la temperatura sobre la actividad

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se determinó variando la temperatura de incubación de la mezcla de reacción enzima-sustrato con incrementos de 10 °C (ver ensayo enzimático) en un rango de temperatura de 30 a 80°C.

Efecto de la temperatura sobre la estabilidad

Una vez determinadas las condiciones de pH y temperatura idóneas para la actividad enzimática se procedió a determinar la estabilidad térmica de los extractos proteolíticos. El ensayo consistió en preincubar los extractos enzimáticos en ausencia del sustrato a diferentes temperaturas (50-80°C) durante una hora, posterior a la incubación se midió la actividad proteolítica por el método descrito anteriormente y utilizando una muestra sin tratamiento térmico (blanco positivo) se midió la actividad residual después del tratamiento a cada temperatura (Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S. y Chen, S. T., 2000).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Índice de potencia (IP)

En la Fig. 2 se muestran los DHH y DC en placa, los cuales se usaron para calcular el índice de potencia se calculó de la siguiente manera:

$$IP = DHH/DC$$

Donde: DHH es el diámetro del halo de hidrólisis y DC es el diámetro de la colonia. En la figura 3 se puede notar una disminución lineal del IP respecto al tiempo para las tres cepas, es decir, el IP se puede representar con el siguiente modelo:

$$IP = kt + b$$

En donde k es la tasa de decaimiento proteolítica (h^{-1}) y representa el porcentaje de cambio en la actividad proteolítica por unidad de tiempo. Por ejemplo, la cepa 36 alV tiene una $k = -0.064 h^{-1}$ lo cual implica una disminución de la actividad proteolítica del 6% /h (Tabla I), entonces, para la selección de cepas fúngicas productoras de proteasas es deseable, que en cultivo en placa muestren valores de k cercanos a 0.

Respecto a los valores de IP, se puede observar en la Fig. 3 que el IP siempre es mayor a 1, es decir el DHH es mayor al DC, lo cual sugiere que la excreción de enzimas proteolíticas se lleva a cabo principalmente por las puntas hifales. Por otro lado, los valores del IP más altos se encuentran en las primeras 36 h del cultivo, lo cual es un indicador de la intensa producción de proteasas ya que en el medio de cultivo, la única fuente de nitrógeno es la proteína de la leche, este fenómeno se complementa con el bajo crecimiento celular (DC). El tiempo en el que se observa el mayor valor de IP sugiere el tiempo en el que el cultivo tiene mayor actividad proteolítica, los valores del IP sugieren la magnitud de la actividad enzimática pero, se desconoce si es extrapolable al CMS.

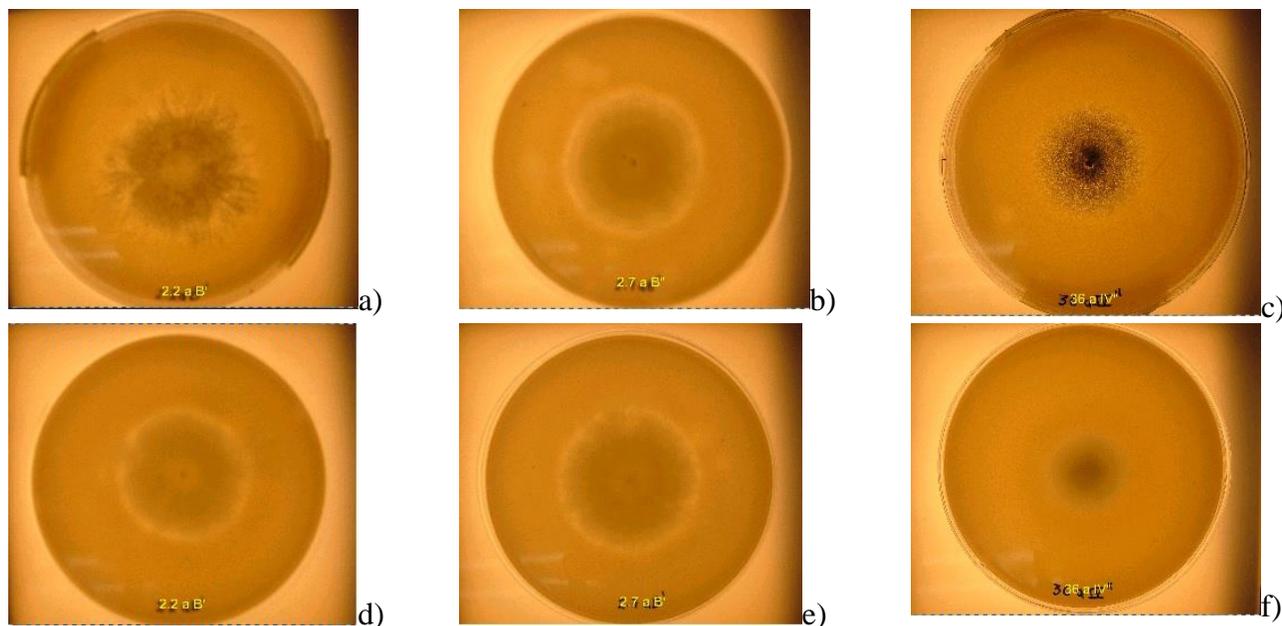


Fig. 2. Placas de ALD. a), c), d) DC cepa 2.2 aB, 2.7 aB y 36 aIV b), d), f) DHH cepa 2.7 aB, 2.2 aB y 36 aIV

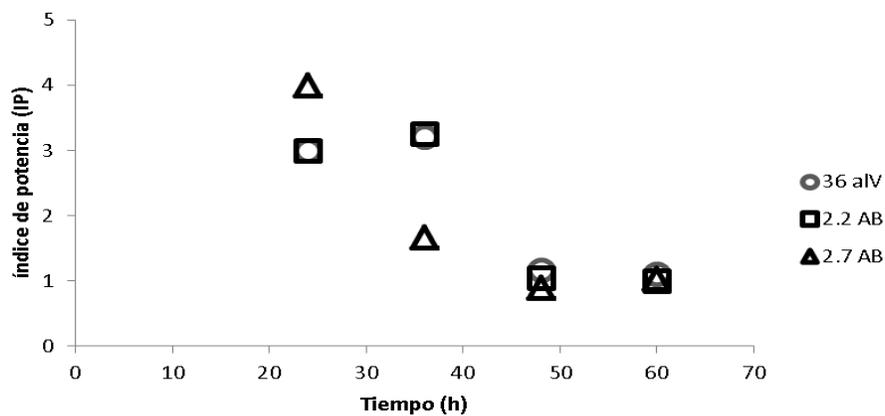


Fig. 3. Cínctica del índice de potencia de tres cepas fúngicas crecidas con medio ALD

Tabla I. Tasa de decaimiento, a partir de las regresiones lineales de las cinéticas del IP.

Cepa	K	r ²
36 aIV	-0.065	0.76
2.2 AB	-0.068	0.76
2.7 AB	-0.081	0.75

B. Producción de proteasas en cultivo en medio sólido

Las cepas de *Rhizopus* 2.2 aB y 2.7 aB, así como la de *Aspergillus* 36 aIV se cultivaron en CMS sobre harina de pescado con la finalidad de evaluar la producción máxima de proteasas y corroborar la reproducibilidad de la selección de cepas en cultivos superficiales. La máxima producción de proteasas se obtuvo con la cepa de *Rhizopus* 2.2 aB y de *Aspergillus* 36 aIV a las 36 h de cultivo, alcanzando valores de actividad proteolítica cercanos a 270 U/mL (Fig. 4). Es importante resaltar que, las cepas mencionadas exhibieron los valores de IP mayores en cultivos superficiales en comparación con la cepa 2.7 aB, la cual produjo los niveles más bajos de actividad proteolítica en CMS en un tiempo de 48 h. Estos resultados indican que la selección de cepas termotolerantes en cultivo superficial basada en los criterios sugeridos es reproducible en CMS. Los valores de actividad proteolítica alcanzados por las cepas es considerable y comparable a lo obtenido por otras cepas fúngicas de uso industrial (Kranthi V.S., Muralidhar Rao D. y P. Jaganmohan 2012). Los títulos alcanzados por las cepas evaluadas indican que son convenientes para la producción de proteasas con la finalidad de aplicarlas en la industria de los alimentos, específicamente, para la elaboración de queso.

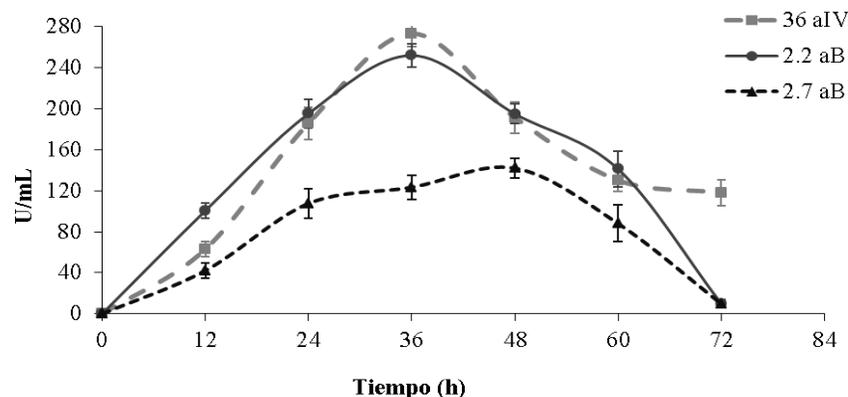


Fig. 4. Cinética de producción de proteasas en CMS

Las cepas con los mejores valores de IP y tasa de decaimiento proteolítica fueron utilizadas para la producción de proteasas en CMS utilizando harina de pescado. Los valores de IP que se determinaron en cultivos superficiales se representaron contra los obtenidos para la producción de proteasas en CMS. En la Fig. 5 se puede apreciar que ambas variables presentan una buena correlación lineal ($r^2=0.977$). En este sentido, se encontró que las cepas termotolerantes (36 aIV y 2.2 aB) que exhibieron en cultivo superficial los valores de IP más elevados fueron las más convenientes para la producción de proteasas en CMS sobre harina de pescado. En concordancia a lo mencionado, la cepa 2.7 aB presentó los valores de IP y de producción de enzimas más bajos en cultivo superficial y CMS, respectivamente. Los resultados indican que los criterios de selección IP y k son cruciales para la selección de cepas termotolerantes en cultivos superficiales y su extrapolación en un sistema de cultivo similar como lo es el CMS, donde se utilizan sustratos agroindustriales para el crecimiento fúngico y producción de enzimas. En muchos trabajos de investigación es usual la selección de cepas mesófilas en cultivos superficiales con base en la magnitud del IP (Camila Florencio, Sonia Couri, and Cristiane Sánchez Farinas 2012) o únicamente en análisis cualitativos considerando el diámetro del halo de hidrólisis (Arvinder K., Manjeet Kaur., Manohar L.S. and Zabeer A., 2012), sin embargo, infieren que los resultados serán reproducibles en sistemas de cultivo en medio líquido o medio sólido (Jacob, N., Niladevi, K. N., Anisha, G. S., & Prema, P. 2008). Existen pocos trabajos de investigación que se interesen en reproducir los resultados de selección en placa en CMS (Florencio, C., Couri, S., & Farinas, C. S. 2012). Los resultados mostrados en el presente trabajo dan información contundente sobre los

critérios relevantes a tomar en cuenta en la selección de cepas termotolerantes para su posterior aplicación en sistemas de cultivo similares.

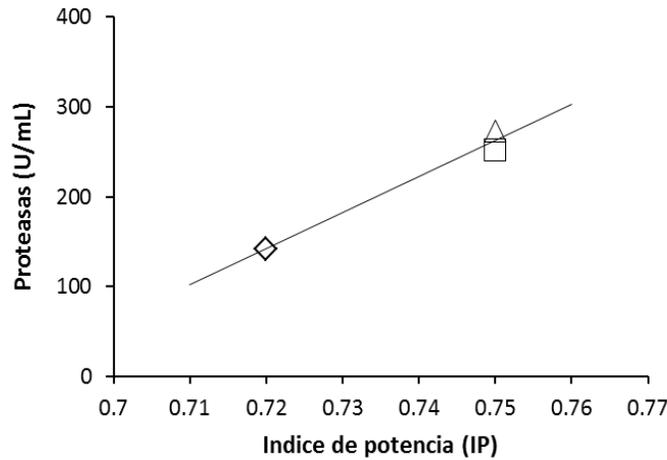


Fig. 5. Relación entre la AP y el IP obtenido en ALD. (◇) 2.7 aB, (Δ) 36 aIV, (□) 2.2 aB; (—) Modelo lineal ($r^2=0.977$)

C. Efecto del pH sobre la actividad de los extractos

En la Fig. 6 se puede observar que la catálisis enzimática para los extractos producidos por la cepa 2.2 aB y 36 aIV presentan la mejor actividad catalítica a pH 9 y 7 respectivamente. En la tabla II se puede observar que los valores de pH a los cuales tienen su mejor catálisis los extractos proteolíticos producidos por algunos microorganismos son muy diversos (variando de 5 a 11), por lo cual este resultado es útil únicamente para poder clasificar al extracto proteolítico como neutro. Sin embargo, es importante indicar que el pH óptimo de actividad presentado por el extracto producido por la cepa 36 aIV es similar al presentado por *A. oryzae* (TABLA II), dicho extracto fue producido en el mismo sistema con el mismo sustrato.

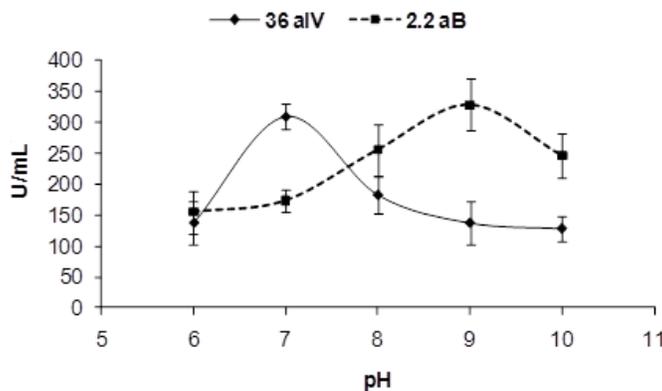


Fig. 6. Relación entre la AP y el IP a. (◇) 2.7 aB, (Δ) 36 aIV, (□) 2.2 aB; (—) Modelo lineal ($r^2=0.977$)

D. Efecto de la temperatura sobre la actividad de los extractos

Respecto al efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica en la Fig. 7 se puede observar que ambos extractos proteolíticos muestran su mejor catálisis a 50°C sin embargo, el extracto proteolítico producido por la cepa 36 aIV exhibió un segundo máximo de actividad a 70°C debido a la probable existencia de más de dos proteasas en el extracto proteolítico. En cuanto a la temperatura óptima (50°C) de actividad presentada por ambos extractos es importante señalar que fue la misma a la obtenida por García-Gómez, M. J., Huerta-Ochoa, S., Loera-Corral, O. and Prado-Barragán, L. A. (2009) en el cual el extracto proteolítico fue producido utilizando también harina de pescado como sustrato. Por otro lado, el segundo pico de máxima actividad presentado a 70°C por el extracto de la cepa 36 aIV muestra la posibilidad de la presencia de una proteasa termo-activa.

En la Fig. 7 se puede observar que para la cepa 2.2 aB la actividad aumenta hasta llegar a su máxima a 50°C y a temperaturas posteriores disminuye su actividad hasta llegar a 50 U/mL a 80°C. Por otro lado, el extracto producido por la cepa 36 aIV aumenta la actividad hasta llegar a 50°C disminuyendo un 5% a 60°C y en contraste con el extracto producido por la cepa 2.2 aB la actividad sube a 138 U/mL a 70°C y posterior a esta temperatura la actividad disminuye. En la TABLA II se puede observar que la temperatura óptima de los extractos producidos por ambas cepas en este trabajo es igual al de las proteasas producidas por otras cepas fúngicas la cuales presentan su mejor actividad a la misma temperatura. Por otra parte, la temperatura óptima presentada por los extractos producidos por la cepas 2.2 aB y 36 aIV supera la temperatura óptima presentada por algunas proteasas producidas por cepas fúngicas tal es el caso de *Aspergillus fumigatus Fresenius* (45°C), *Aspergillus niger* (30 y 45°C) y *Penicillium* sp (45°C) (tabla II).

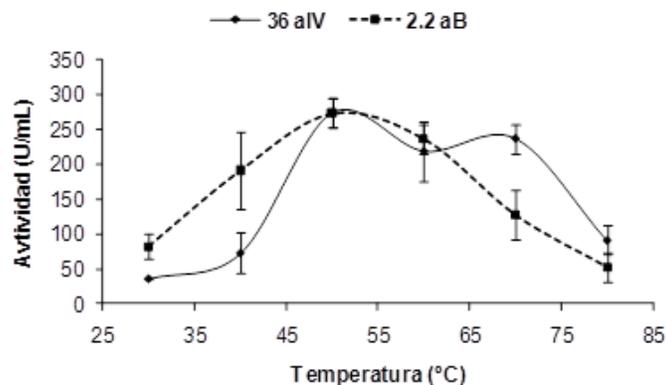


Fig. 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de extractos proteolíticos producidos en CMS

E. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad termica de los extractos

Los resultados de la tabla III muestran que el extracto enzimático producido por la cepa 2.2 aB 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 36a IV que tiene una vida media de 1.78, 1.08, 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.

Tabla I. Extractos proteolíticos producidos por diferentes cepas fúngicas

Microorganismo	pH de actividad	Temperatura de actividad (°C)	Estabilidad térmica	Referencia
<i>Aspergillus fumigatus Fresenius*</i>	9	45	Conserva 90 % de actividad a 70°C por 1.5 h	Santos, R. M., Firmino, A. A., De Sa, C. M., and Felix, C. R., 1996
<i>Aspergillus oryzae*</i>	8	50	$t_{1/2}(50^{\circ}\text{C}) = 0.41 \text{ h}$	García-Gómez, M. J., Huerta-Ochoa, S., Loera-Corral, O. and Prado-Barragán, L. A., 2009
<i>Aspergillus niger</i>	8	30	-	Dubey, R. Adhikary, J. Kumar and N. Sinha 2010
<i>Aspergillus niger</i>	7	45°C	Estable de 30 a 60°C por 1 hora	Ahmed, I., Zia, M. A., Iftikhar, T., & Iqbal, H. M. 2011
<i>Aspergillus niger</i> II	4	50°C	A 50°C 5 min	Siala, R., Frikha, F., Mhamdi, S., Nasri, M., & Kamoun, A. S 2012
<i>Penicillium sp.*</i>	6.5	45	-	Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., and Soccol, C. R., 2003
<i>Beauveria sp</i> MTCC 5184	9	50	Menos del 15% de actividad a 40°C después de 1 hora	Shankar, S., Rao, M., & Laxman, R. S. 2011
2.2 aB*	9	50	$t_{1/2}(50^{\circ}\text{C}) = 0.74 \text{ h}$; $t_{1/2}(60^{\circ}\text{C}) = 0.5 \text{ h}$	Este trabajo
36 aIV*	7	50	$t_{1/2}(50^{\circ}\text{C}) = 0.8 \text{ h}$; $t_{1/2}(60^{\circ}\text{C}) = 0.33 \text{ h}$	Este trabajo

*Producidos en CMS

En la tabla III se puede observar que ambos extractos (2.2 aB y 36 aIV) presentan una estabilidad superior en todos los casos que se presentan en la tabla II excepto cuando se compara con el extracto producido por *Aspergillus fumigatus fresenius*. Esta evaluación permite determinar que el método de selección de cepas productoras de proteasas termoestables que incluye análisis gráfico es adecuado para la selección de cepas productoras de proteasas termoestables.

F. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica

Para identificar la naturaleza de las proteasas se determinó la actividad proteolítica en presencia de tres inhibidores de proteasas. En la Fig. 8 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 ésto que la mayor parte de la actividad puede deberse a la presencia de una cisteín proteasa. Por otro lado, también 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 con el PMSF (Rayda Siala, Fakher Frikha, Samiha Mhamdi, Moncef Nasri, and Alya Sellami Kamoun 2012)

Tabla II. Cinética de inactivación térmica de extractos proteolíticos a distintas temperaturas

CEPA	36 a IV		2.2 a B	
TEMPERATURA (°C)	k_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	k_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
30	0.0065	2.6	0.0039	2.96
40	0.0116	1.00	0.0108	1.07
50	0.0145	0.80	0.0157	0.74
60	0.0347	0.33	0.0231	0.50
70	0.0408	0.28	0.0348	0.33
80	0.0578	0.20	0.0732	0.16

k_d : constante de inactivación térmica de primer orden; $t_{1/2}$: tiempo de vida media obtenida de un gráficos logarítmicos (actividad residual relativa vs tiempo de incubación)

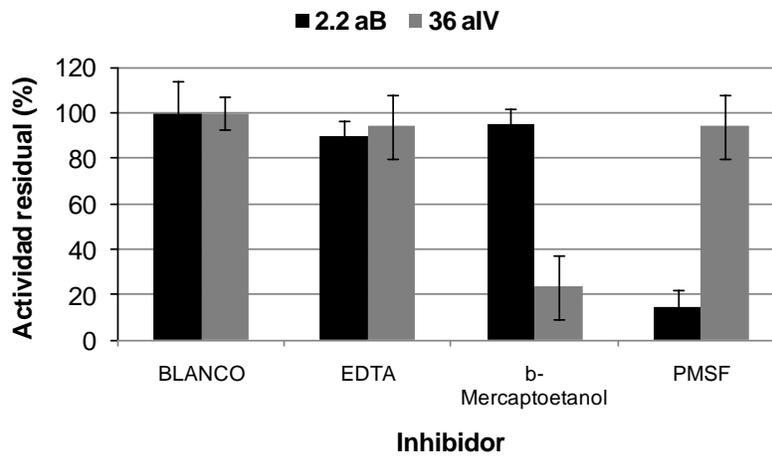


Fig. 8. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica de los extractos producidos en CMS

G. Efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad proteolítica

Con el objetivo de identificar el efecto de algunos iones metálicos sobre la actividad proteolítica se realizaron ensayos enzimáticos en presencia de estos. En Fig. 9 se puede observar que la actividad proteolítica del extracto enzimático producido por la cepa 2.2 aB (serín proteasa) se favorece en presencia de Ba²⁺, aumentando en un 21% con respecto al control. Dicho comportamiento fue observado también por De Azeredo, L. A. I., Freire, D. M. G., Soares, R. M. A., Leite, S. G. F., y Coelho, R. R. R en 2004, cuando caracterizaron el extracto producido por la cepa *Streptomyces* sp. (serín proteasa) y observaron que en presencia de Ba²⁺ 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 Ba²⁺ utilizada fue de 10 mM. Con lo que respecta a el resto de los iones se presentó un efecto negativo para la mayoría de los iones evaluados excepto para el Ca²⁺ en cual no tuvo ningún efecto sobre la actividad. Con lo que respecta a el Cu²⁺ con el cual se dio una disminución del 48% en la actividad, se presentó el mismo efecto en la proteasa producida por *Streptomyces* sp y fue explicado por la acción desnaturalizante del ión.

El extracto producido por la cepa 36 aIV presentó un comportamiento diferente; en presencia de Ba²⁺ presentó una reducción del 28% en la actividad. Para el caso del Ca²⁺ 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 aumento en un 120% su actividad en presencia de este ion (De Azeredo, L. A. I., Freire, D. M. G., Soares, R. M. A., Leite, S. G. F., y Coelho, R. R. R en 2004). 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, L. A. I., Freire, D. M. G., Soares, R. M. A., Leite, S. G. F., y Coelho, R. R. R en 2004). Para el resto de los iones al igual que el extracto producido por la cepa 2.2 aB se presentó un efecto negativo. 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 Ca²⁺ y Mg²⁺. 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.

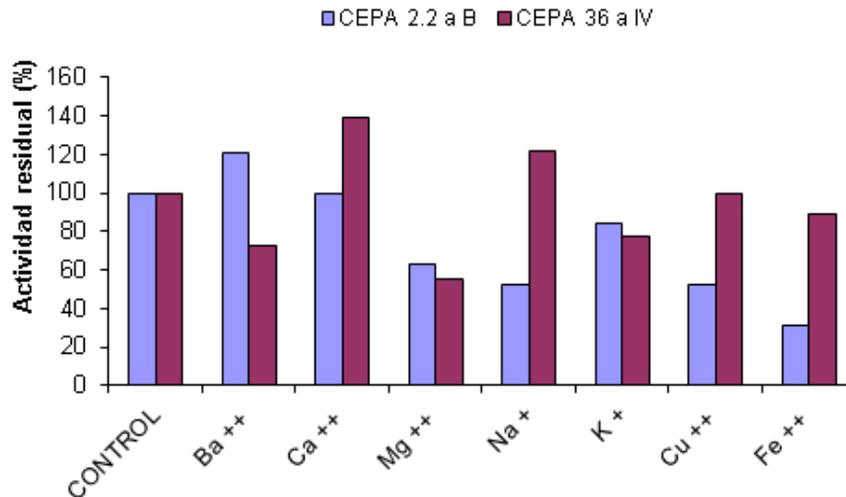


Fig. 9. Efecto de algunos iones sobre la actividad proteolítica de extractos producidos en CMS

IV. CONCLUSIÓN

Los parámetros cuantitativos DHA y DC resultaron ser convenientes para la selección de cepas termotolerantes en cultivos superficiales, de manera que, pueden ser considerados como criterios de preselección con la finalidad de obtener mayor reproducibilidad en sistemas de cultivo en medio sólido para la producción de proteasas termoestables a partir de cepas fúngicas del género *Aspergillus* y *Rhizopus*. La caracterización de los extractos proteolíticos obtenidos en CMS permitió confirmar que las proteasas producidas por las cepas *Aspergillus* y *Rhizopus* fueron termoestables.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece al CONACyT, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y a la Universidad Politécnica de Tlaxcala por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Shankar, S., Rao, M., and Laxman, R. S. (2011). Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process biochemistry*, 46(2), 579-585.
- [2] Kranthi V.S., Muralidhar D. and Jaganmohan P.(2012). Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. *International Journal of Microbiological Research*, 3 (1): 12-15.
- [3] Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., Limam F. 2009. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 36:531–537.
- [4] Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., & Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(7): 1012-1018.
- [5] Hernández-Martínez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Bergmann, C. W., Loera-Corral, O., Rojo-Domínguez, A., Huerta-Ochoa, S., & Prado-Barragán, L. A. (2011). Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry*, 46(10): 2001-2006.
- [6] Pandey A. 2003. Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 82-84.
- [7] Nygren, C. M., Edqvist, J., Elfstrand, M., Heller, G., & Taylor, A. F. (2007). Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 17, 241-248.
- [8] Saucedo-Castañeda, G., Losane, K. and Navarro, J. (1992). Potential of Using a Single Fermenter for Biomass Build-Up, Starch Hydrolysis, and Ethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol* 1992;36:47–61.
- [9] Tunga, R., Shrivastava, B., and Banerjee, R. (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*, 38(11), 1553-1558.
- [10] Johnvesly, B., Manjunath, B. R. and Naik, G. R. (2002). Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Bioresource Technology*, 82(1), 61-64.
- [11] De Azeredo, L. A., De Lima, M. B., Coelho, R. R., and Freire, D. M. (2006). A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 using feather meal and corn steep liquor. *Current microbiology*, 53(4), 335.
- [12] Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S. and Chen, S. T. (2000). Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification*, 20(2), 142-151.
- [13] Kranthi V.S., Muralidhar Rao D. and P. Jaganmohan (2012). Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. *International Journal of Microbiological Research*
- [14] Florencio, C., Couri, S., & Farinas, C. S. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme research*, 2012.
- [15] Kaur, A., Kaur, M., Samyal, M. L., & Ahmed, Z. (2012). Isolation, characterization and identification of bacterial strain producing amylase. *Journal of Microbiology & Biotechnology Research*, 2(4).
- [16] Jacob, N., Niladevi, K. N., Anisha, G. S., & Prema, P. (2008). Hydrolysis of pectin: an enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiological research*, 163(5), 538-544.
- [17] García-Gómez, M. J., Huerta-Ochoa, S., Loera-Corral, O. and Prado-Barragán, L. A. (2009). Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food chemistry*, 112(3), 604-608.
- [18] Santos, R. M., Firmino, A. A., De Sa, C. M., and Felix, C. R. (1996). Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* *Fresenius*. *Current Microbiology*, 33(6), 364-370.

- [19] Dubey, R., Adhikary, S., Kumar, J., & Sinha, N. (2010). Isolation, production, purification, assay and characterization of alkaline protease enzyme from *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Dev Microbiol Mol Biol*, 1(1), 75-94.
- [20] Ahmed, I., Zia, M. A., Iftikhar, T., & Iqbal, H. M. (2011). Characterization and detergent compatibility of purified protease produced from *Aspergillus niger* by utilizing agro wastes. *BioResources*, 6(4), 4505-4522.
- [21] Siala, R., Frikha, F., Mhamdi, S., Nasri, M., & Kamoun, A. S. (2012). Optimization of Acid Protease Production by *Aspergillus niger* II on Shrimp Peptone Using Statistical Experimental Design. *The Scientific World Journal* Volume 2012.
- [22] Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., and Soccol, C. R. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and microbial technology*, 32(2), 246-251.
- [23] Shankar, S., Rao, M., & Laxman, R. S. (2011). Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process biochemistry*, 46(2), 579-585.
- [24] De Azeredo, L. A. I., Freire, D. M. G., Soares, R. M. A., Leite, S. G. F., & Coelho, R. R. R. (2004). Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(3), 354-358.