

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS**



**Producción de la Enzima Proteasa en Cultivo en Medio Sólido y
Líquido Utilizando *Rhizopus oryzae*.**

Por:

Gladys Virginia Chávez Galindo

T E S I S

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Abril del 2006**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**Producción de la Enzima Proteasa en Cultivo en Medio Sólido y Líquido
Utilizando *Rhizopus oryzae*.**

Por:

Gladys Virginia Chávez Galindo

T E S I S

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador
como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

APROBADA.

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara.
Presidente

Mc. Heliodoro de la Garza Toledo
Sinodal

MC. Antonio Aguilera Carbó
Sinodal

Dr. Cristóbal N. Aguilar González
Sinodal

Dr. Ramón García F Castillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal.

Buenavista, Saltillo, Coah., México, Abril del 2006.



AGRADECIMIENTOS

El proyecto se realizó en las instalaciones del Laboratorio del departamento de Nutrición y Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, así como el Departamento de Investigación y Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila y una estancia de investigación en la planta piloto # 4, del Departamento de Biotecnología de la División de Biotecnología y Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa bajo la tutela de la Doctora Lilia Arely Prado Barragán.

Para efectos de la presente propuesta y bajo el esquema de colaboración de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, a continuación se detalla el nombre y clave del proyecto de investigación, registrada en la misma institución:

Desarrollo de Alimentos Funcionales y Calidad Nutricional y Procesamiento de Alimentos.

Clave: 02.03.0404.2374

De la Subdirección de Programación y Evaluación, de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.



Resumen

Las enzimas proteolíticas son ampliamente utilizadas en diferentes sectores industriales como en la elaboración de detergentes, procesos alimentarios, así como la implementación de tecnología para la remoción de contaminantes generados por industrias pecuarias, principalmente la proveniente del mar como desechos de camarón. El empleo de hongos filamentosos para la producción de proteasas empleando este tipo de residuos provee dos beneficios la generación de las enzimas y la descontaminación de los residuos, generando un valor agregado a estos. La presente investigación preliminar en su primera etapa se enfoca a determinar la mejor expresión de la actividad proteolítica evaluando pH's de 5, 7 y 9, obteniéndose que la enzima se expresa a cualquiera de los rangos empleados entre 7500 y 8500 U/L, por lo que se decidió emplear el pH neutro para la siguiente etapa. En la segunda etapa se evalúa el comportamiento del pH, la biomasa, producción de enzima en función del tiempo en cultivo en medio sólido y líquido. El pH tiende a la alcalinización hasta valores de 8.0, por la posible presencia de proteasas con acción carboxipeptidasa, en cuanto a la producción de biomasa no se obtuvieron resultados convincentes en cultivo en medio sólido por lo que se sugiere emplear otros métodos en futuras investigaciones, en cultivo en medio líquido se produjeron 34 g/L de medio de cultivo, La actividad enzimática disminuyó significativamente con respecto a la primera etapa, sin embargo los resultados son alentadores para continuar con el estudio, en cultivo en medio Líquido se obtuvieron un máximo de 790 U/L y en medio sólido 475 U/L, bajo las condiciones de ensayo empleadas, se concluye que el sistema en medio líquido fue más eficiente para la producción de la enzima proteasa y los pH's entre 5 y 9 no afectan la producción de la misma.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general	4
1.2. Objetivos específicos	4
2. REVISION DE LITERATURA	5
2.1. Generalidades	5
2.2. Enzimas	8
2.2.1. Producción de la enzima proteasa	10
2.2.2. Tipos de proteasas	12
2.2.3. Clasificación de las proteasas	13
2.2.4. Mecanismos de acción de las proteasas	14
2.3. Microorganismos usados en la producción de proteasas	15
2.4. Producción microbiana de proteasas	16
2.5. Usos de las proteasas	19
2.6. Procesos biotecnológicos	22
2.6.1. Fermentación	22
2.6.2. Fermentación continua	22
2.6.3. Fermentación discontinua	24
2.6.4. Fermentación alimentada	25
2.7. Fermentación líquida	25
2.8. Fermentación sólida	27
2.9. Diferencia entre fermentación líquida y sólida	29
2.10. Soportes utilizados en el cultivo en estado sólido	31
2.10.1. Poliuretano (PUF)	31
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	34
3.1. Materiales	34
3.2. Equipos	34
3.3. Metodología	35
3.3.1. Microorganismo	35
3.3.2. Imagen de la cepa <i>Rhizopus oryzae</i>	35
3.3.3. Medios de cultivo	36
3.3.3.1. Medio de cultivo para propagación agar papa dextrosa (PDA)	36
3.3.3.2. Medio de cultivo empleado en las cinéticas, tripticaseína y soya (TBS).	36
3.4. Etapas experimentales	36
3.4.1. Primera etapa	37
3.4.2. Condiciones del cultivo en medio líquido	37
3.4.2.1. Propagación del inóculo	37
3.4.3. Condiciones del cultivo en medio sólido	38
3.4.4. Preparación de inóculos	38
3.4.5. Conteo de esporas	39
3.5. Segunda etapa	39
3.5.1. Determinación de biomasa	39

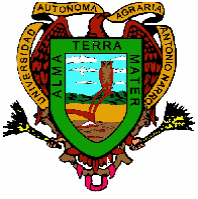
3.5.2.	Determinación de pH	39
3.5.3.	Actividad proteasa	40
3.6.	Confirmación microscópica de <i>Rhizopus oryzae</i> , tinción de azul de metileno.	41
3.7.	Determinación de la actividad de agua (Aw)	41
3.8.	Obtención del extracto proteolítico	41
3.8.1.	Ultrafiltración	
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1.	Resultados de la etapa 1.	
4.1.1.	Resultados de la evolución del pH, sobre la producción de la enzima proteasa en cultivo en medio líquido.	42
4.2.	Resultados de la Etapa 2.	
4.2.1.	Resultados del comportamiento del pH en CML y CMS en función del tiempo	45
4.2.3.	Resultados de biomasa, obtenidos en CML y CMS	46
4.2.4.	Resultados de la actividad enzimática en CML y CMS	48
5.	CONCLUSIONES	52
6.	RECOMENDACIONES	53
7.	BIBLIOGRAFIA	54

INDICE DE TABLAS

1.	Tabla X Composición del medio PDA (Agar Papa Dextrosa)	36
2.	Tabla XX Composición del medio de TSB (Trypticaseina y Soja)	36

INDICE DE GRAFICAS

1.	Efecto del pH en el cultivo en medio líquido sobre la actividad proteasa.	43
2.	Comportamiento del pH en función del tiempo en CML y CMS	46
3.	Producción de biomasa en CML y CMS	47
4.	Cinética de Producción de la enzima proteasa en cultivo en CML y CMS	49



Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

Las enzimas con capacidad de degradar parcial o totalmente a las proteínas o residuos péptidos se les denomina proteasas. Las proteasas se pueden dividir o clasificar de acuerdo al rango de pH al cual tienen su mejor actividad biológica, ya sean proteasas alcalinas, neutras o ácidas. Las proteasas intervienen en procesos específicos tales como la esporulación; la utilización de péptidos exógenos y la biosíntesis de otros subproductos. Además estas enzimas juegan un rol importante en diferentes procesos bioquímicos, aunque no han sido bien identificadas como la síntesis de proteínas, la inactivación catabólica, el crecimiento celular, la reparación del ADN (Chávez-Camarillo, 1995).

En años recientes se han realizando estudios para producir diferentes tipos de proteasa como ya se menciono ácidas, neutras y alcalinas, a través de fermentación en estado sólido, donde se emplean residuos agroindustriales con alto contenido de de material proteico tales como, plumas de aves (Ferreira et al., 2002), lana de oveja, desechos de camarón, como sustrato para producción de enzimas con actividad proteasa.

A través del tiempo se han empleado bacilos y otras bacterias gram-positivas como fuentes de enzimas industriales, sobre todo para producir proteasas (Priest, 1977).

En los últimos años, donde los estudios para producir diferentes tipos de proteasas han llevado a definir que se pueden encontrar los tres tipos de proteasas, empleando cultivos en medio sólido y líquido, usando como sustrato residuos agro-industriales. Para este propósito han usado diferentes microorganismos así como residuos agroindustriales tales como salvado de trigo, soya, bagazo y cáscaras del café, carpacho o caparazón de camarón.

El cultivo sólido es empleado de forma tradicional en los países asiáticos para producir alimentos como la salsa de soya, salsas a base de pescados de tercera categoría los cuales se someten a fermentaciones para dicho propósito también el cultivo sólido se ha usado, para producir varias enzimas, empleando cereales o salvado. Las proteasas y amilasa no son exclusivas de cepas fúngicas, también euabacterias como *Streptomyces* tienen la capacidad para producir enzimas proteolíticas.

Con frecuencia se han planteado diversas alternativas para la solución del tratado de los desechos generados principalmente por los productos procesados, entre las cuales se pueden destacar procesos físicos, químicos o biológicos, sin embargo, algunas de las alternativas tecnológicas resultan con serias desventajas de tipo económico o de eficiencia.

El proyecto en general se centra en implementar las bases para la producción de enzima con actividad proteolítica por medio de la cepa *Rhizopus oryzae* y su futura utilización en la degradación de residuos de las industrias que generan contaminantes con alta concentración de proteínas como la pesquera, dichos residuos pueden ser empleados como sustratos e

inductores de crecimiento microbiano, generando la posibilidad de obtener en un proceso simultáneo la producción de metabolitos de interés industrial, a través del desarrollo de un proceso biotecnológico rentable, económico, de fácil manejo y considerado como una tecnología limpia el cultivo en medio sólido (CMS).

La presente investigación incluye una comparación de los sistemas de cultivo en medio sólido y en medio líquido (CML) para la producción de proteasas por la cepa de *Rhizopus oryzae*, así como los estudios sobre el efecto del potencial de hidrógeno (pH) a diferentes rangos (5, 7 y 9), para determinar el mejor pH para la producción de enzimas proteolíticas, además la evaluación de los títulos de actividad proteasa en ambos sistemas de cultivo.

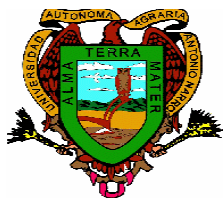
El presente documento incluye el objetivo general y específicos, también, una revisión sobre los temas relacionados con la investigación como, generalidades sobre *Rhizopus oryzae*, enzimas proteolíticas, las fermentaciones entre otros temas, también se incluye un capítulo sobre la metodología experimental, los resultados y discusiones generados en la investigación, para finalizar con las conclusiones y la bibliografía citada en el presente documento.

1.1. Objetivo General.

Comparar dos sistemas de cultivo en medio sólido y líquido para la producción de la enzima proteasa por *Rhizopus oryzae*.

2.2. Objetivos Específicos.

1. Evaluar el efecto del pH sobre la producción de proteasas en cultivo en medio sólido y líquido por *Rhizopus oryzae*, para determinar el mejor rango de pH.
2. Evaluar la actividad proteasa en los sistemas de cultivo en estado sólido y líquido por la cepa de *Rhizopus oryzae*.
3. Obtener el extracto proteolítico parcialmente purificado y caracterizado electroforéticamente.



Capítulo 2

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades.

En los últimos años ha aumentado en el mundo la generación de residuos industriales, dañando el medio ambiente y deteriorando la calidad de vida de sus habitantes. Hoy, su manejo sustentable permite comprobar que es posible incrementar la productividad y reducir drásticamente la generación de residuos o emisiones. Con ello, mejora la competitividad de las empresas y, al mismo tiempo, se obtienen beneficios económicos.

La demanda y necesidad de alimentos a nivel mundial genera una gran cantidad de residuos sólidos y líquidos de la industria procesadora de alimentos, estos desechos provocan una seria contaminación ambiental sobre todo por que algunos de ellos de origen proteico requieren de un tiempo considerable para ser degradados, generando malos olores y propiciando focos de infección provocando problemas de insalubridad y daños al medio ambiente, lo anterior es debido a la escasez de tecnología para el aprovechamiento y degradación de estos residuos. Los problemas de contaminación se aprecian en suelos y aguas por la acumulación de en lugares abiertos, sobrepasando las restricciones gubernamentales, así tenemos los casos del bagazo de caña y la pulpa de café que se tiran indiscriminadamente en las calles de los pueblos contaminando los mantos acuíferos por filtración o arrastre pluvial, en la industria pesquera también se generan una gran cantidad de residuos como son la piel, cabeza, cola, vísceras y huesos de pescados así como el carpacho o cutícula de camarón por citar algunos ejemplos.

Las alternativas empleadas para frenar o solucionar los problemas generados por los residuos de la industria de alimentos se basan principalmente en el confinamiento en tajos destinados a enterrar este material

o el empleo de técnicas químicas por hidrólisis ácida o alcalina de los mismos que resultan caros y aun más contaminantes. Más recientemente los procesos biológicos se perfilan no solo como una solución para el problema de contaminación, también proponen una fuente alterna de generación de subproductos con un valor agregado, lo que motiva a las empresas a emplear estas tecnologías que le darán una ganancia extra de los residuos generados del proceso principal. Este proyecto se centra en la utilización de residuos de la industria pesquera a través del desarrollo de un proceso biotecnológico rentable, económico, de fácil manejo y considerado como una tecnología limpia, el proceso de fermentación en medio sólido.

Los conocimientos científicos y tecnológicos generados a la fecha posibilitan el empleo de la biotecnología para emplear los residuos de la industria de alimentos como sustratos ricos en carbohidratos, proteínas y otros componentes, para la generación de metabolitos secundarios tales como ácidos orgánicos y la generación de enzimas específicas.

Uno de los principales objetivos de la biotecnología es producir metabolitos a partir de materiales biológicos. La biotecnología microbiana comprende dos fases distintas: la fermentación y la recuperación de los productos. Para el cultivo de microorganismos en condiciones óptimas, así como para la producción, por parte de los microorganismos, de los metabolitos o las enzimas deseadas, deben ser desarrollados procedimientos de fermentación como son el desarrollo de cepas mediante manipulación genética y/o la regulación del metabolismo mediante la optimización del medio de cultivo

así como el control adecuado de los factores físico-químicos que afectan al rendimiento de las fermentaciones industriales (O_2 , temperatura, pH, agitación, etc.) La recuperación del producto o “procesamiento posterior”, conlleva la extracción y purificación de los productos biológicos. La recuperación en los procesos bioquímicos difiere de la recuperación química, principalmente, en que los materiales biológicos son frecuentemente mucho más lábiles. Por lo tanto, la producción de productos metabólicos útiles a partir de microorganismos conlleva una íntima relación entre la ciencia y la tecnología; por un lado se deben desarrollar los microorganismos de interés industrial y por otro se debe asegurar que estos microorganismos puedan crecer en gran cantidad bajo aquellas condiciones que originen el mejor rendimiento posible del producto ya sea en la generación de metabolitos o enzimas de interés.

2.2. Enzimas.

Una enzima es un catalizador biológico que lleva a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades y con un elevado grado de especificidad; en su ausencia la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían. (Baduí S., 1996).

La biotecnología permite disponer de muchas enzimas que se utilizan en solución y que tienen la ventaja de su bajo costo, de no necesitar coenzimas y de servir aun en preparaciones relativamente burdas. Al parecer,

las más utilizadas son las hidrolasas (amilasas, celulasas, proteasas, glucanasas, lipasas y pectinas)

La historia reciente de las enzimas o fermentos se origina cuando se pudo llevar a cabo la fermentación de azúcares por un caldo de levaduras rotas en un mortero con arena fina y filtradas a través de un vidrio de poro pequeño que no dejaba pasar las células.

Alrededor de un 65% de las enzimas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria alimentaría, aunque es conveniente señalar que solo las proteasas alcalinas empleadas en detergentes ocupan 25% del total de esta distribución, el 10% restante corresponde a aplicaciones en las áreas farmacéutica y analítica, (García-Garibay y col., 1993).

El estudio de la proteólisis en los organismos vivos ha adquirido gran relevancia, pues la función que se le asigna ha variado notablemente desde que en 1942 Schöenheimer estableció el “concepto dinámico de los componentes celulares”, cuya concentración permanece constante como resultado del equilibrio entre la velocidad de su síntesis y la de su degradación. De acuerdo con esto se estableció el concepto de “recambio proteico”, en donde la función básica de las proteasas es degradar cierto tipo de proteínas cuando ya no son necesarias, con la reutilización de los aminoácidos resultantes para la síntesis de nuevas proteínas (Chávez-Camarillo, 1995).

Una enzima es una proteína con propiedades catalíticas debido a su poder de activación específica (Dixon y Webb, 1979). Las enzimas son

catalizadores de naturaleza proteínica que intervienen en los procesos fisiológicos llevados a cabo por organismos vivos; en la cual tienen una elevada especificidad para catalizar o activar gran número de reacciones de interés práctico; en los sistemas biológicos constituyen las bases de las complejas y variadas reacciones que caracterizan los fenómenos vitales. Es posible, por lo tanto, que la mayor parte de las estructuras proteínicas celulares esté formada por enzimas, encargadas de las diversas funciones de síntesis, degradación, oxidación, de la actividad vital de los distintos organismos.

Existe una gran especificidad enzimática por lo que es posible tratar o modificar con enzimas algunos productos alimenticios, a temperaturas moderadas sin que estos productos experimenten grandes cambios. Sin embargo, debido a la diversidad de enzimas que existen, tienen diferentes usos industriales, como lo es en la industria alimentaria; por ejemplo utilizándolos como ablandadores de carne, también son utilizados en los detergentes, en la industria del cuero, derivados lácteos, producción de bebidas, por mencionar algunos.

2.2.1. Producción de la Enzima Proteasa.

Las proteasas son un grupo de enzimas que tienen la capacidad de degradar total o parcialmente las proteínas. Estas enzimas, son responsables de múltiples funciones biológicas. Las primeras funciones adscritas a las enzimas proteolíticas, derivaron de su implicación en la digestión de las proteínas de la dieta.

Las proteasas han sido clonadas y secuenciadas en muchos microorganismos, incluyendo *Aspergillus niger* (Frederick y col. 1995), (Hanzi y col. 1993), *A. nidulans* (Katz y col. 1994), y *A. fumigatus* (Reichard y col. 1995).

En algunos casos estas enzimas han sido asociadas con reacciones de inflamaciones alérgicas, (Monod y col. 1995, Hanzi y col. 1993). Los hongos son una fuente atractiva de proteasas, que se debe al espacio limitado requerido para su cultivo y su susceptibilidad lista a la manipulación genética. El uso comercial de proteasas fúngicas, tiene como finalidad su aplicación en la industria alimenticia, farmacéutica y detergentes; y son una herramienta importante para el estudio de las estructuras de proteínas y polipéptidos (Walsh y Headon, 1994).

Existen igualmente preparaciones proteolíticas comerciales provenientes de *A. niger*, *A. orizae* y *A. saitoi*. Se han reportado igualmente proteasas de alta estabilidad térmica provenientes de *Thermus caldophilus*, *Thermoactinomyces vulgaris* (Thermitasa).

Conviene finalmente señalar que existe una mezcla de enzimas proteolíticas de *Streptomyces griseus* conocida como pronasa y que es utilizada para hidrolizar completamente una proteína, (García-Garibay y col., 1993).

En varias especies fúngicas, la producción de proteasa extracelular ocurre bajo condiciones limitantes de nitrógeno, carbono, o por limitación de

azufre pero no requiere la presencia de proteína (Cohen y col. 1975, Imshenatskii y col. 1971).

Muchas enzimas, por ejemplo las proteasas, son reprimidas por la presencia de aminoácidos o amoníaco utilizables rápidamente (represión del catabolito nitrógeno). La limitación de amoníaco en el medio de crecimiento fermentativo desreprime rápidamente la síntesis de estas enzimas, (Ward, 1989).

Sin embargo, en otras especies, las proteasas están no sólo sujeto a represión, pero deben ser inducidos a través de una proteína extracelular (Bhosale y col. 1995, Hanson y Marzluf, 1975).

La disminución de producción de proteasa en la concentración de glucosa más alta, sugiere que, por lo menos, en parte, la síntesis y secreción de proteasa producido por *A. tamarii*, es regulado a través de represión catabólica por la presencia de carbono. Se describe represión a través de glucosa, en muchas especies de microorganismos productores de proteasa (Cohen 1973, Klapper y col. 1973, Tarangano y col. 1997, Tsuchiya y Kimura, 1984).

2.2.2. Tipos de Proteasas.

Como se ha mencionado las proteasas se pueden clasificar en tres tipos, esto es en base a su pH, dichas proteasas son ácidas, neutras y alcalinas. Estas proteasas difieren ampliamente en su especificidad por el substrato,

pudiéndose emplear combinaciones de diferentes enzimas para incrementar el grado de hidrólisis de una proteína, y también difieren en factores como se menciona anteriormente como es el pH óptimo, de forma que se puedan utilizar unas u otras en un amplio rango de condiciones de operación.

Las proteasas son activas y estables en una amplia gama de pH y rango de temperatura, lo cual es conveniente para la aplicación en diferentes bioprocesos, (Anwar y Saleemuddin, 1998).

Las enzimas proteolíticas alcalinas, son probablemente las de mayor importancia comercial, siendo las más conocidas la subtilisina carlsberg de *B. licheniformis* y la *subtilisina* de *B. amyloliquefaciens*. Estas enzimas son proteasas séricas y son producidas generalmente en sistemas retroalimentados para evitar la represión por material nitrogenado y con altos niveles de aireación.

Las proteasas neutras, son empleadas en algunos procesos de la industria alimentaria y provienen generalmente de *B. subtilis*. Tanto la termolisina como la termoasa (una forma menos purificada) han sido propuestas para la síntesis de aspartamo.

2.2.3. Clasificación de las Proteasas.

Se pueden clasificar en 2 grandes grupos: peptidasas (exopeptidasas) y proteinasas (endopeptidasas). Las peptidasas actúan sobre los enlaces peptídicos de los extremos de la cadena y pueden ser aminopeptidasas o

carboxipeptidasas. Las proteinasas actúan en el interior de la cadena y se clasifican de acuerdo con la identidad del residuo catalítico primario. Así pueden ser: serin-proteinasas, cisteinil-proteinasas, aspartilproteinasas y metalo-proteinasas.

Pero en función de su medio de acción hay más exopeptidasas que endopeptidasas. Las serina-proteasas están extendidos en la naturaleza, ellos se encuentran en virus, bacterias, y eucariotes, y ellos incluyen exopeptidasas, oligopeptidasas, y omega peptidasas.

2.2.4 Mecanismos de Acción de las Proteasas.

Las enzimas proteolíticas o proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad; se usará la enzima más adecuada de acuerdo con la necesidad de transformación requerida catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos de péptidos y proteínas. Su síntesis se realiza en forma de zimógeno, de mayor peso molecular, que posteriormente es activado por proteólisis.

Las proteasas toman una posición de giro, con respecto a sus papeles fisiológicos, así como sus aplicaciones comerciales. Puesto que ellos están a favor fisiológicamente de los organismos vivientes; las proteasas se encuentran en una diversidad amplia de fuentes como: plantas (papaína, ficina y

bromelina, animales (pepsina, tripsina y quimotripsina) y microorganismos (hongos y bacterias), (North, 1982).

En general, las proteasas de origen vegetal, principalmente la bromelina, son muy activas sobre el tejido conectivo de colágeno y elastina, tienen menor preferencia por las proteínas de las fibras musculares; esta especificidad de su modo de acción es inversa para las enzimas proteolíticas microbianas.

Las enzimas microbianas, son más útiles que los derivados de las plantas o animales por la gran variedad de actividades catalíticas de que disponen y porque usualmente pueden obtenerse en cantidades abundantes, económicos, de forma regular y de calidad uniforme, ocasionalmente mediante cultivo de superficie o usualmente mediante técnicas de fermentación aeróbica de cultivos profundos. Además las enzimas microbianas, son en general más estables que los homólogos de las plantas o animales, y su proceso de producción es más fácil y seguro.

Usualmente, las células crecen sumergidas, en fermentadores bien agitados y aireados, aunque un número significativo de enzimas importantes industrialmente, se obtienen en fermentadores sólidos o semisólidos.

El volumen de ATP, es un índice potencial de producción biomasa microbiana (Karl y Holm-Hansen, 1978), y el cargo de energía, es un indicador útil del estado energético de las células (Sivori, 1986).

2.3. Microorganismos Utilizados en la Producción de Proteasas.

Los organismos productores de enzimas mas útiles y mejor conocidos son los *Aspergillus niger*, *A oryzae* y *Bacillus subtilis*. En general las enzimas fúngicas tienen un pH óptimo ácido o neutro y no son termoestables, en tanto que las enzimas bacterianas tienden a tener un pH óptimo alcalino o neutro y con frecuencia, son termoestables.

Es bien conocida la habilidad de muchas especies diferentes de *Aspergillus* para producir proteasas. Algunos estudios recientes han revelado la habilidad de *Aspergillus tamari*, un hongo filamentoso xilanolítico, que se aisló del suelo para producir proteasa alcalina en fermentación en estado sólido. (Ferreira y col. 1999).

Siempre que sea posible, es preferible emplear cepas no esporulantes y que no formen toxinas. También es una ventaja el utilizar mutantes constitutivos en el caso de células que requieran normalmente un inductor para producir una enzima particular, y mutantes resistentes a los catabolitos para que puedan emplearse glucosa y otros azúcares en el medio de cultivo sin que causen la represión de la enzima deseada.

Fukumoto, 1967, aisló una proteasa ácida de *Rhizopus chinensis*. La enzima es estable entre un valor de pH de 2.8 a 6.5, además, exhibe actividad óptima a pH 2.9 a 3.3 en el filtrado de *Rhizopus oligosporus*, se encontraron dos enzimas proteolíticas con actividad óptima a pH 3.0 y 5.5.

2.4. Producción Microbiana de Proteasas.

Las proteasas microbianas pueden ser producidas por bacterias y hongos (por ejemplo *Bacillus sp*). Por otro lado, las proteasas microbianas, son en lo general, las enzimas microbianas con aplicaciones prácticas más variadas. Uno de sus usos más conocidos, es en la formulación de los llamados detergentes biológicos, pero también es utilizado en productos fermentados. Estas se producen por fermentación sumergida aerobia convencional, que permite un mayor control de las condiciones de crecimiento que la fermentación en medio sólido. Se sabe mucho acerca de la selección de cepas de organismos y condiciones de cultivo, aunque menos sobre la regulación de la síntesis, degradación y secreción del enzima por el organismo productor.

En los últimos once años se ha estudiado la producción de una misma enzima producido por *Streptomyces rimosus*, encontrándose que los títulos de actividad son mayores en cultivo medio sólido que en cultivo sumergido. Tal es el caso de la α -amilasa (Rameshi y Lonsane, 1991; Nandakumar y col. 1996)

Se han estado realizando varios estudios para producir los diferentes tipos de proteasas a través de fermentación en estado sólido usando como sustrato residuos agro-industriales. Es interesante notar que aunque varios sustratos han sido empleado para cultivar microorganismos diferentes, el salvado del trigo ha sido la opción preferida en la mayoría de los estudios.

En Taiwán y otros países asiáticos, el proceso de elaboración del Koji (cultivo sólido) se ha usado para producir varias enzimas, creciendo en moldes

en cereales o salvado. Aunque la proteasa y amilasa son principalmente fúngicos y productos de eubacterias; la posibilidad de usar *Streptomyces* para la producción de enzimas, se ha investigado recientemente. Especies de *Streptomyces* que producen proteasas incluyen, *S. clavuligerus*, *S. griseus*, *S. moderatus*, *S. rimosus*, *S. thermoviolaceus*, y *S. thermovulgaris*. (Pokorny y col., 1979; Renko y col., 1981,1989; Chandrasekaran y Dhar, 1987; Bascaran y col.,1990, James y col., 1991; Muro y col., 1991; Yeoman y Edwards, 1994).

Otras enzimas hidrolasas de especies de *Streptomyces* estudiados incluyen aminopeptidasas por *S. fradiae*, *S. Griseus*, *S. lividans*, *S. peptidofaciens*, y *S. rimosus*. (Vitale y col., 1986; Aphale y Strohl, 1993). Quitinasa por *S. viridificans* (Gupta y col. ,1995), alfa-amilasa por *S. aureofaciens* y *S. Rimosus*. (Vukelic y col., 1992; Cheng y Yang, 1995,; Yang y Cheng, 1996), y beta-glucosidase por *Streptomyces sp.* (Ozaki y Yamada, 1991).

Las especies de *Streptomyces* se alimentan de forma heterotrófica, y ellos pueden utilizar moléculas simples y complejas como nutrientes. Sobre tres-cuartas partes de las especies de *Streptomyces* pueden producir antibióticos. Además de los antibióticos, las especies de *Streptomyces* liberan enzimas extracelulares (Gupta y col., 1995).

Malathi y Chakraborty (1991) evaluaron varias fuentes de carbono para la producción de proteasa alcalina y utilizando *Aspergillus flavus* IMI 327634; informando que el mejor sustrato para el cultivo fue el salvado de trigo. Los

estudios se llevaron a cabo para comparar la producción de proteasa alcalina en sistemas de fermentación líquida y sistemas de fermentación sólida. Un estudio de cultivo en lote para el proceso de fermentación en estado sólido, se describió para la producción de proteasa alcalina, en la que el poliuretano se usó como apoyo para soporte sólido inerte. Una proteasa alcalina termoestable fue estudiada para ser producido por nuevas cepas de *Pseudomonas sp.* en sistema de fermentación en estado sólido. Un nuevo proceso se ha desarrollado en Chennai (India), para la producción comercial de proteasas alcalinas (Clarizyme) que fue producido por *A. flavus* en fermentación en estado sólido, utilizando como sustrato salvado de trigo.

2.5. Usos de las Proteasas.

La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria, son enzimas extracelulares de origen microbiano. Las proteasas constituyen aproximadamente el 50 % del mercado de las enzimas microbianas. El empleo de una serin-proteasa alcalina obtenida a partir de *Bacillus licheniformis* en los detergentes, es la aplicación comercial dominante de las proteasas, seguida por el uso de cuajo de *Mucor miehei* en la manufactura del queso, siendo también significativa la utilización de la proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* para la modificación de la masa del pan y de las galletas, (Ward, 1989).

Las proteasas tienen una amplia aplicación, por ejemplo, permiten eliminar el gluten del trigo para producir pastas, lo que es importante ante la tendencia a una menor disponibilidad mundial de trigos pobres en gluten. Mediante el uso de proteasas, también es posible hidrolizar plasma, sangre,

ovoalbúmina, suero de leche, desperdicio de alimento para gallinas y proteínas de leguminosas. Otro uso interesante de estas enzimas es la preparación de alimentos para bebés, para prematuros y para pacientes en los periodos pre y pos-operatorio o en cuidados intensivos, para convalecientes y para personas con alteraciones gastrointestinales; para preparar estos productos se busca una hidrólisis parcial y rápida, en temperaturas bajas, de caseína, ovoalbúmina, suero lácteo o músculo que no produzca osmolaridad elevada, ni pérdida de aminoácidos, (García-Garibay y col., 1993)

La influencia de las enzimas nativas de la leche, sobre la maduración del queso ha sido puesta en evidencia para las proteasas y las lipasas; al menos dos proteasas han sido identificadas en la leche: una alcalina (plasmina) y una ácida. Ambas enzimas se encuentran asociadas a las micelas. La plasmina es termorresistente y no es totalmente inhibida por la pasterización; el pH se localiza entre 7.5 - 8. La proteasa ácida es también termorresistente, tiene un pH de 4.

El defecto de sabor amargo en el queso, es provocado por la acumulación de péptidos de bajo peso molecular y de carácter fuertemente hidrofóbico. Estas péptidos son producidos por la quimosina, las proteasas de la pared de las bacterias lácticas y, en su caso, por proteasas extracelulares de hongos, (García-Garibay y col., 1993).

No todas las proteasas con actividad específica se localizan dentro de la célula muscular; los niveles de actividad de las proteasas del músculo, son bajos si se comparan con otros tejidos, con excepción de las calpaínas. La localización de algunas catepsinas lisosomales, esta cerca del sarcolema. Entre las proteasas neutras se ha encontrado, en el músculo liso una con características similares a la tripsina. Sin embargo, esta proteinasa es muy activa en la degradación del complejo alfa-actinina, actina, miosina y troponina. A medida de que el pH del músculo decae después de la muerte, la actividad de las proteasas neutras, especialmente la de la calpaína, declina hasta que a pH = 5.5 es inactiva. Debido a que hay un aumento sostenido de la calidad de la carne durante todo el periodo de maduración, se supone que esto se debe en las etapas tardías a las catepsinas, aunque en canales estimuladas eléctricamente, la acción de estas enzimas, se inicia en etapas tempranas, (García-Garibay y col., 1993).

Se tienen identificadas varias proteasas que intervienen en procesos específicos tales como la esporulación; la maduración de proteínas; la utilización de péptido exógenos y la biosíntesis del factor alfa de levaduras. Por otro lado, existen procesos bioquímicos en los que se sabe intervienen las proteasas, aunque no han sido identificadas, tales como la síntesis de proteínas, la inactivación catabólica, el crecimiento celular, la reparación del ADN y la degradación de proteínas defectuosas (Chávez-Camarillo, 1995).

Se emplean también en la síntesis enzimática de péptidos y ésteres con actividad biológica (Lyons, 1988; Tsuru y Yoshimoto, 1990).

2.6. Procesos Biotecnológicos.

2.6.1. Fermentación

En líneas generales, un proceso típico de fermentación comienza con la formulación y esterilización del medio de cultivo, así como la esterilización del equipo a utilizar. Las células se crecen primero en un cultivo de mantenimiento (5 a 10 mL), posteriormente, en un matraz (200 a 1000 mL) y de ahí en un prefermentador (10 a 100 L) para finalmente inocular el fermentador de producción (1.000 a 100.000 L). Una vez que la fermentación se ha completado, las células se separan del cultivo líquido. Si el producto es intracelular, se rompen las células, se eliminan los restos celulares y se recupera el producto del fluido libre de restos celulares. Si el producto es extracelular, se purifica a partir del sobrenadante libre de células.

2.6.2. Fermentación Continua.

En la fermentación continua, se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de solución utilizada de los nutrientes, con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema.

En la industria de las fermentaciones el objetivo fundamental es, minimizar costos e incrementar los rendimientos y puede alcanzarse, si se desarrolla el tipo de fermentación más adecuado para cada paso en particular. Los procesos de fermentación continua, no se utilizan de forma general en la

industria, debido fundamentalmente al mayor nivel de experiencia que se tiene en el crecimiento de células en fermentación discontinua, el costo de producción de biomasa mediante cultivo continuo, es potencialmente inferior al de cultivo discontinuo. De este modo se han instalado plantas de producción, para la producción continua de proteína de origen unicelular a partir de n-alcanos, compuestos C1 y almidones.

Aunque muchas fermentaciones para la producción de metabolitos funcionan bien como procesos continuos, sólo unos pocos procesos han resultado útiles para la aplicación práctica por varias razones:

a.- Muchos métodos de laboratorio operan continuamente durante solamente 20 a 200 horas; para que sea de utilidad industrial el sistema debe ser estable durante al menos 500 a 1,000 horas.

b.- Mantener las condiciones estériles a escala industrial a lo largo de un período de tiempo es difícil.

c.- La composición de los sustratos debe ser constante a fin de obtener una producción máxima. La composición de las soluciones de nutrientes industriales son variables (líquido de maceración del maíz, peptona, etc.) lo que puede originar cambios en la fisiología de la célula y disminuir la productividad.

d.- Cuando se utilizan cepas de alto rendimiento se producen mutantes degenerados, los cuales pueden crecer en cultivo continuo más de prisa que las cepas de producción por lo que el rendimiento disminuye con el tiempo ya que cada vez son menos células las que sintetizan el producto de interés.

2.6.3. Fermentación Discontinua.

Una fermentación discontinua, puede ser considerada como un "sistema cerrado". Al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada, excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos, cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células, observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte.

En los procesos comerciales, la fermentación frecuentemente se interrumpe al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte (metabolitos secundarios).

2.6.4. Fermentación Alimentada.

En los procesos convencionales discontinuos, que acabamos de describir, todos los sustratos se añaden al principio de la fermentación. Una mejora del proceso cerrado discontinuo, es la fermentación alimentada, que se utiliza en la producción de sustancias como la penicilina. En los procesos alimentados, los sustratos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación. La formación de muchos metabolitos secundarios, está sometida a represión catabólica (efecto glucosa). Por esta razón, en el método alimentado los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden, en pequeñas concentraciones al principio de la fermentación y continúan añadiéndose a pequeñas dosis durante la fase de producción.

2.7. Fermentación Líquida.

El desarrollo de las técnicas de matraz agitado, han sido importantes por que han permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos. A su vez, el cultivo de suspensiones de células en fermentadores agitados ha evolucionado a gran escala, pues no es raro ver fermentadores con volúmenes superiores a 10 mil litros, en los cuales se producen todo tipo de compuestos derivados del metabolismo microbiano. En estos sistemas, la agitación mecánica permite aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas: Primero, dispersa el gas en burbujas mas pequeñas incrementando el área de interfase gas-liquido. Segundo, incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas de gas. Y, tercero, disminuye el grueso de la capa estacionaria del liquido, al aumentar

la turbulencia del cultivo. Además, la agitación mezcla al cultivo manteniéndolo homogéneo. Esto es particularmente importante para la dispersión de la biomasa y la transferencia de calor (Henzler y Schedel, 1991).

En resumen, la fermentación líquida (FL), cultivo en medio líquido (CML) o Fermentación sumergida (abreviada en inglés como SmF) ocurre en un medio homogéneo, que facilita el control de la fermentación. Además, los productos metabólicos y el calor se dispersan fácilmente, por lo que, no son un factor limitante para el crecimiento del microorganismo. La barrera principal de transferencia del O₂ en la fermentación líquida, es su baja solubilidad en el agua y, al hacerse mayor la capa de agua que debe cruzar, aumenta la dificultad para que llegue a la célula. Gran parte del gasto energético que debe realizarse en la FL está relacionado con la necesidad de satisfacer la demanda de oxígeno en el crecimiento de los microorganismos. Esto es muy claro en el caso de *Aspergillus niger*, que es un organismo aeróbico estricto y necesita una alta tasa de transferencia de oxígeno para mantener su crecimiento y producir muchos de los metabolitos de interés (Righelato, 1975, Salomón y col, 1995, Raimbault, 1998).

2.8. Fermentación Sólida.

La fermentación en medio sólido, consiste en el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos sin la presencia de líquido libre. Sin embargo, esto no quiere decir que este proceso se lleve a cabo en la ausencia

total de agua. Los límites superiores de humedad son de 40 a 70 % y como límite inferior 12%, ya que por debajo de este valor cesa la actividad biológica.

Bajo estas condiciones, los microorganismos que se ven favorecidos son los hongos, debido a su capacidad de crecer en medios con baja actividad de agua (Cannel y Moo-Young, 1980).

La fermentación en estado sólido, es un sistema heterogéneo complejo, ya que coexisten las fases sólidas, líquida y gaseosa (Gowthman y col., 1995).

Este sistema, se ha usado para la producción de diversos metabolitos de interés comercial: antibióticos, enzimas, alcohol, metano y ácido cítrico. Es importante elegir un sustrato adecuado para una eficiente fermentación, el cual puede suplementarse con nutrientes tales como glucosa, extracto de levadura, sales minerales y citrato de sodio entre otros (Christen y col., 1994).

Esta fermentación involucra transporte de oxígeno del aire inyectado, que llega a la superficie del microorganismo, consumo de oxígeno, generación de calor y bióxido de carbono a través de la respiración. Estos gases son transportados del interior de la fase sólida a la fase gaseosa que lo rodea. Aquí, la transferencia de oxígeno depende de la delgada capa de agua que rodea al sustrato, que es el sitio en donde se desarrollan los microorganismos; de ahí la importancia de que haya buena difusión de oxígeno en el medio (Ghidyal y col., 1992). Por tanto, la disponibilidad del oxígeno se convierte en el factor limitante del crecimiento de los microorganismos. Debido a la falta de agitación en este

medio heterogéneo, ocurren variaciones tanto en la concentración de gases como en la temperatura (Ghidyal y col., 1992).

La temperatura óptima de crecimiento de los hongos, es alrededor de 24 a 35 °C, sin embargo, por el diseño del sistema, no es posible utilizar agitación para la remoción del calor metabólico, ocasionando represión del crecimiento microbiano por deshidratación (Gutiérrez-Rojas y col., 1996).

El pH depende en gran medida del producto deseado, así que no se puede hablar de un valor óptimo, como en el caso de la humedad. El control de este factor no es posible, ya que no es un medio homogéneo.

Cuando se tiene mayor contenido de agua, puede haber contaminación bacteriana. Por otro lado, al disminuirla se controla la contaminación, evitando así la obtención de productos no deseados, pero también es un factor limitante en el crecimiento de los hongos (Roukas, 1994).

La presencia de un alto contenido de humedad, provoca que el sustrato se compacte y, por lo tanto, no haya una adecuada penetración de oxígeno (Chatterjee y col., 1996).

Los efectos que se derivan de la utilización de fermentación sólida, sobre los microorganismos son múltiples modificaciones en el transporte de azúcares, la composición de la pared celular, membrana celular y en la actividad enzimática (Grajek, 1987; Pandey, 1992).

2.9. Diferencia entre Fermentación Líquida y Sólida.

La fermentación sólida requiere de una tecnología menos sofisticada comparada con la fermentación en medio sumergido, así como menor volumen del reactor por unidad de peso del sustrato utilizado, teniendo como resultado altas concentraciones del producto de interés y un costo reducido para el tratamiento de sus efluentes, debido al reducido uso de agua (Ghidyal y col., 1992).

Respecto a la fermentación en estado sólido, existen ventajas y desventajas en relación con el proceso de fermentación en estado líquido, se dice que la primera no requiere de mucho control, es económica, con pocos gastos de energía, fácil de implementar y se obtienen altos rendimientos en la producción. Los costos se elevan en el proceso de extracción del producto final y en su purificación, ya que se requiere la aplicación de técnicas caras para reducir los volúmenes. La segunda es más costosa, ya que su control es más sofisticado, la solubilidad de O_2 en el agua es poca, lo que hace necesario el uso de equipo para la agitación y la aireación forzada, con mayor necesidad de energía, además, ocupa más espacio, debe evitarse la contaminación por hongos y levaduras mediante técnicas de esterilización de aire y de los desechos, debido a que muchos metabolitos tales como antibióticos, se producen por un crecimiento lento en medios ricos que pueden ser contaminados. Las concentraciones de reactivos y productos son bajas, los procesos de recuperación, son caros al igual que en el cultivo sólido lo que

representa un factor clave en la economía total de ambos procesos. (Aguilar, 1998).

Por otro lado, el cultivo en estado sólido parece tener ventajas teóricas sobre la fermentación en estado líquido respecto a los siguientes factores.

El bajo contenido de actividad de agua, en la fermentación en estado sólido de ventajas ecológicas para el crecimiento lento de los hongos, sobre bacterias y levaduras, reduciendo las necesidades de operaciones de esterilización.

El oxígeno, no es un factor limitante ya que es soluble en el aire, por lo que tendrá costos mas bajos de energía, comparadas con la fermentación en estado líquido.

2.10. Soportes Utilizados en Cultivo en Estado Sólido.

En los últimos años se ha difundido el uso de soportes inertes, como la amberlita IRA 900 (Christen y col., 1994; Gutiérrez-Rojas y col., 1995), el poliestireno, el uretano (Ozawa y col., 1996) y el poliuretano (Zhu y col., 1996).

Un tamaño pequeño de partícula representa mayor área de contacto, facilitando al microorganismo el acceso a los nutrientes. Por otro lado, si es muy pequeño no permitirá la aireación (Nanadakumar y col., 1996). Estudios realizados por (Nampoorthiri y Pandey, 1996) indican que la mezcla de

partículas pequeñas y grandes proporciona un buen espacio que se le dice interpartícula.

2.10.1. Poliuretano (PUF).

Se ha desarrollado un novedoso método de fermentación en estado sólido, utilizando espumas de poliuretano, como soporte inerte impregnando sobre el un medio de cultivo líquido sintético, donde se simula la composición nutricional y condiciones de cultivo, que anteriormente se llevaba a cabo en salvado de trigo. Con este sistema, la biomasa, que es un parámetro importante involucrado en la fermentación en estado sólido puede ser medio directamente, (Zhu, 1994). El poliuretano (PUF), anteriormente fue utilizado por Fujishima en 1972, para la producción enzimática por varias especies de hongos, en 1991, Kobayashi y col. usaron PUF para producir glucoamilasa, en 1994 Zhu y col., utilizaron el PUF para producir nucleasa P1 de *Penicillium citrinium*, desde entonces el PUF, ha sido utilizado más como un proceso de inmovilización celular, que como un proceso limpio de producción enzimática, para la búsqueda de diseño de reactores más eficientes, (inmovilización, detoxificación, obtención de metabolitos).

Las espumas de poliuretano son, según sus características químicas, inertes y se resisten a la abrasión, son óptimas para la utilización en fermentación sólida. Además, las espumas son polímeros, que dada su composición química, no son productos biodegradables y en consecuencia son productos que tienden a contaminar el ambiente debido a su reactividad inerte ante los microorganismos. Recientemente se han desarrollado estudios sobre

la producción de enzimas pécticas, utilizando la fermentación en medio sólido, sobre diferentes substratos: bagazo de caña de azúcar; salvado de trigo. Sin embargo, pocos estudios han sido efectuados sobre la influencia de la composición del medio, en cultivo sólido sobre soporte. La inducción de estas enzimas en cultivo sumergido, ha sido estudiada utilizando diferentes fuentes de carbono. La composición del medio de cultivo, es un factor importante ya que influye sobre la diversidad y la calidad de las enzimas. El estudio de la producción de enzimas en medio sólido con medios de cultivo sintéticos, impregnados sobre soporte inerte, permiten estudiar el comportamiento de los hongos filamentosos con relación a la composición del medio de cultivo, la influencia de la actividad de agua, la liberación de calor, así como la influencia de la transferencia de gases. La recuperación de metabolitos en estas condiciones se realiza por prensado lo que permite obtener un producto concentrado. En cultivos sólidos, en los cuales el soporte es también el sustrato, es difícil evaluar la influencia de un solo factor sobre el comportamiento de un microorganismo, ya que en gran parte, estos substratos son muy complejos y dada su composición se dificulta la determinación de los diferentes parámetros importantes en cultivos sólidos (Oriol y col., 1998).

La composición del poliuretano lo convierte en un medio ideal para el cultivo de hongos, al permitir el crecimiento del hongo sobre las trabeculas que se forman en la espuma, además el poliuretano no atrapa el agua. Por lo que no disminuye la A_w del medio de cultivo y no compite con el organismo por el agua libre. La espuma atrapa una gran cantidad de aire, lo que permite al hongo crecer en un medio rico en oxígeno.

Al no ser biodegradable no produce efectos secundarios sobre la inducción o secreción de las enzimas y permite determinar de manera adecuada la biomasa producida por el microorganismo.



Capítulo 3

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. Materiales.

El material usado fue lo básico de laboratorio (en vidrio y plástico) y se emplearon reactivos de nombre comercial..

3.2. Equipo.

- Agitador: Barnstead/Thermoline modelo-SP46925 serie: 640930801771
- Agitador Lab-line Orbit. Modelo: 3527CC6M Serie:0895-0017.
- Estufa (Felisa) Modelo: 133. Lote: 88014.
- Bio-Rad Biologic LP Modelo: 2110.
- Microscopio Olympus Modelo: CK2 ULWCD 0.30
- Microscopio Olympus Modelo: BX40F4. # 9F13838
- Autoclave Rochester 010763 Importador Infinsa.

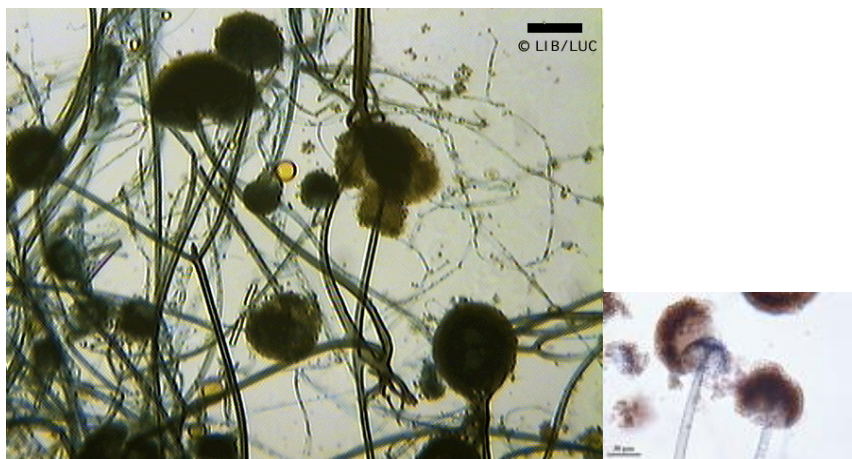
- Campana Holten Lamin Air. Tipo: HH48. # 29123.
- Espectrofotómetro Shimadzu Cat. # 204-04550-01
- Serie: 28K01725 206-18494-52.
- AquaLab Decagon[®]. Serie: 06951224
- Agitador: Covning PC-353 6H301591.
- Agitador Vortex Super- Mixer # 1290.
- Congelador 19.6 CUFT Upright Freezer.
- Baño Maria. AT 110 Heto Lab Equipment
- Potenciómetro. Conductronic pH 120.
- Horno de Microonda Kelvinator.
- Termobalanza Ohaus
- Environ-Shaker.
- Refrigerador.
- Centrífuga.

3.3. Metodología.

3.3.1 Microorganismo.

Se utilizó la cepa de *Rhizopus oryzae*, perteneciente a la colección IRD-UAM-I (Institut de Recherche pour le Developpement-Francia y Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa), caracterizada por su capacidad de producir proteasas.

3.3.2. Imagen de la Cepa *Rhizopus oryzae*.



[http://images.google.com.mx/images?q=Rhizopus+oryzae+\(&svnum=10&hl=es&lr=&st art=20&sa=N](http://images.google.com.mx/images?q=Rhizopus+oryzae+(&svnum=10&hl=es&lr=&st art=20&sa=N)

3.3.3. Medios de Cultivo.

3.3.3.1. Medio de cultivo para propagación agar papa dextrosa (PDA)

Se empleo el agar comercial distribuido por Dibico, S.A. de C.V., el medio se preparo añadiendo 39 g en agua destilada y llevado al aforo en un litro de la misma de acuerdo a los indicaciones del fabricante, los componentes del medio se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de medio PDA	
Componente	Cantidad (g/L)
Agar	15
Dextrosa	20
Infusión de papa	4

3.3.3.2. Medio de cultivo empleado en las cinéticas, tripticaseína y soya (TSB).

Se empleo el reactivo comercial agar TBS distribuido por Difco, S.A. de C.V., el medio se prepara de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se añaden 30 g en agua destilada y se afora a un litro de la misma. Los componentes del medio se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Composición del medio TSB

Componente	Cantidad (g/L)
Peptona de caseína	17.0
Peptona de soya	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato de dipotásico	2.5
Dextrosa	2.5

3.4. Etapas Experimentales.

Para la presente investigación se divide en dos etapas, las cuales se describen a continuación:

3.4.1. Primera Etapa.

Evaluar el efecto del pH en función del tiempo sobre la producción de la enzima proteasa, tanto en cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido, empleando un medio modelo de tripticaseína y soya para ambos sistemas de cultivo.

El medio de cultivo se preparará en soluciones amortiguadoras de citratos y fosfatos a pH's de 5, 7 y 9. La cinética se monitoreó cada ocho horas durante periodos de incubación de 70 y 124 horas.

3.4.2. Condiciones del Cultivo en Medio Líquido.

3.4.2.1. Propagación del Inoculo

Las esporas de *Rhizopus oryzae* se inocularon sobre 30 mL de agar papa dextrosa (PDA) contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL y

estos se incubaron a 30 °C por 5 días y las esporas producidas se cosecharon con una solución de Tween 80 al 0.01% , después 1mL de estas esporas fueron añadidas a un tubo de ensayo con 19 mL de agua destilada, posteriormente se homogenizó por un minuto y finalmente fue añadida una gota de esta solución en una cámara de Neubauer donde fueron considerados 13 cuadros de esta (4 de la esquina y 9 del centro). Las esporas se contaron en la cuadrícula de glóbulos rojos en un microscopio Olympus modelo: BX40F4. El número de esporas presentes en un mililitro se calculo de acuerdo a la siguiente ecuación :

$$\text{Esporas mL}^{-1} = (\text{promedio de esporas}) (25) (1 \times 10^4) (20)$$

El cultivo sumergido se evaluó utilizando como reactores, matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio de cultivo estéril e inoculado a un nivel 5×10^6 esporas de *Rhizopus oryzae*, por reactor. Las condiciones generales de incubación fueron: temperatura a 37 °C y agitación de 200 rpm.

3.4.3. Condiciones del Cultivo en Medio Sólido.

El cultivo en medio sólido involucra el empleo de espuma de poliuretano impregnado del medio de cultivo inoculado con esporas de *Rhizopus oryzae*, a un nivel de 2×10^7 esporas por gramo de soporte. Las camas del cultivo sólido se mantuvieron en matraces de Erlenmeyer de 250 mL con 10 gramos de material húmedo inoculado. Las condiciones generales de incubación fueron, temperatura 37 °C, humedad 70% y actividad de agua 0.99.

3.4.4. Preparación De Inóculos.

El hongo *Rhizopus oryzae* se incubó por 3 días, a 37 °C en agar papa dextrosa (PDA), Trypticaseína y soya (TSB), placas de agar caseína y agar gelatina; hasta observar su esporulación.

3.4.5. Conteo de Esporas.

La extracción de esporas, se realizó con una solución estéril de Tween 80 y con la ayuda de una mosca magnética, se desprendieron las esporas de la superficie del medio de agar papa y dextrosa (PDA) y tripticaseína y soya (TSB). Posteriormente, se hicieron diluciones de 1:20 (1 mL de esporas y 19 mL de agua destilada). Luego se colocó una gota de la dilución de esporas en la cámara de Neubauer y con la ayuda del microscopio se contaron las esporas. Y posteriormente se propagaron en Matraces de Erlenmeyer de 250 ml a 37 °C.

3.5. Segunda Etapa.

Después de seleccionar las mejores condiciones de pH para llevar a cabo el cultivo para la producción de la enzima proteasa, se realizaron cinéticas comparativas de producción, para determinar cual sistema de fermentación es el más apropiado para la producción de proteasas por *R. oryzae*.

3.5.1. Determinación de Biomasa.

El método usado para la determinar la biomasa: método gravimétrico o diferencia de peso, (AOAC, 1980).

3.5.2. Determinación de pH.

Se utilizó el método potenciométrico, AOAC, (1980). Se prepararon soluciones de búfer a diferentes pH de 5, 7 y 9; para ver el comportamiento de la enzima, en donde se determinó, que no hay gran diferencia en los estudios realizados de pH, por lo cual se decidió usar una solución buffer de 7.

3.5.3. Actividad Proteasa.

La actividad proteasa se determinó mediante la prueba de Azocoll; en la cual se colocan 10 mg de azocoll en tubos de ensaye, luego se agrega 1 ml de solución buffer de 7, mas 3 ml de agua destilada, enseguida se pone a 37 °C en baño Maria por 10 minutos, posteriormente se agrega 1 ml de solución madre (enzima), luego se vuelve a colocar 30 minutos en baño Maria, con agitación constante cada 5 minutos, mientras corre este tiempo, se pone el espectro a calentar a $\lambda = 520$ nm, después de los 30 minutos se filtra con papel del No. 41, esto con el fin de parar la reacción, finalmente del liquido filtrado se recibe en tubos de ensaye y se lee en el espectro, a 520 nm.

Para el testigo, control o blanco, se realizan los mismos procedimientos, pero la única diferencia es de que en los tubos no se les agrega la solución madre (enzima).

3.5.3.1. Definición de unidad enzimática.

Una unidad proteolítica es definida como la cantidad de enzima que produce una absorbancia de 0.1 bajo las condiciones descritas anteriormente.

3.6. Confirmación microscópica de *Rhizopus oryzae*, tinción de Azul de metileno.

Se realizaron frotis con azul de metileno, para ver las características morfológicas del hongo *Rhizopus oryzae*., observados posteriormente en el microscopio.

3.7. Determinación de la actividad de agua (Aw).

La Actividad de agua se determinó con un equipo Aqua Lab Decagon®; colocando 1 gramo de muestra en el aparato a 26 °C. La humedad se determinó en una Termobalanza Ohaus a 120 °C durante 30 minutos.

3.8. Obtención del Extracto Proteolítico.

3.8.1. Ultrafiltración.

Esta técnica se realiza con membranas de corte nominal de masa molecular y con flujo tangencial del material a filtrar. Es ayudado por una bomba que ejerce una presión dentro del sistema, lo que ayuda al material a filtrar a fluir. Se caracteriza por tener una entrada y dos salidas. Una de las salidas es para reciclar el retenido, la otra salida es para el filtrado. Para la ultrafiltración se requirió de una Bomba peristáltica, hidróxido de sodio, 0.1 N y agua desionizada.



En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos en las dos etapas de investigación así como la discusión de los mismos, la primera etapa sobre el efecto del pH en relación a los títulos de actividad enzimática con actividad proteolítica. En la segunda etapa se muestra el estudio comparativo de los sistemas de cultivo en medio líquido y medio sólido, sobre algunos parámetros como la producción de biomasa, el desarrollo del pH durante el cultivo, proteína extracelular y finalmente la actividad enzimática proteasa.

4.1 Resultados de la Etapa 1.

4.1.1. Resultados del efecto del pH, sobre la producción de la enzima proteasa en cultivo en medio líquido.

Los resultados obtenidos del efecto de pH sobre la actividad enzimática en cultivo en medio líquido se muestran en la figura 1, Los valores de pH evaluados corresponden a 5, 7 y 9, se puede observar que el comportamiento de las curvas de actividad son similares a cualquiera de los pH's evaluados. Sin embargo a un tiempo de 48 h se expresa mejor la actividad proteolítica indistintamente del pH que se emplee. Los títulos de actividad se presentaron en un rango entre las 7500 y 8500 U/L de actividad proteasa y no existen diferencias significativas entre ellos, estos resultados indican que la actividad proteolítica de *Rhizopus oryzae* es independiente del pH, bajo las condiciones de esta investigación.

La independencia de expresión de la actividad proteasa de *Rhizopus oryzae*, presenta grandes ventajas para su producción a escala industrial y comercial, así como para su aplicación en distintos rubros comerciales.

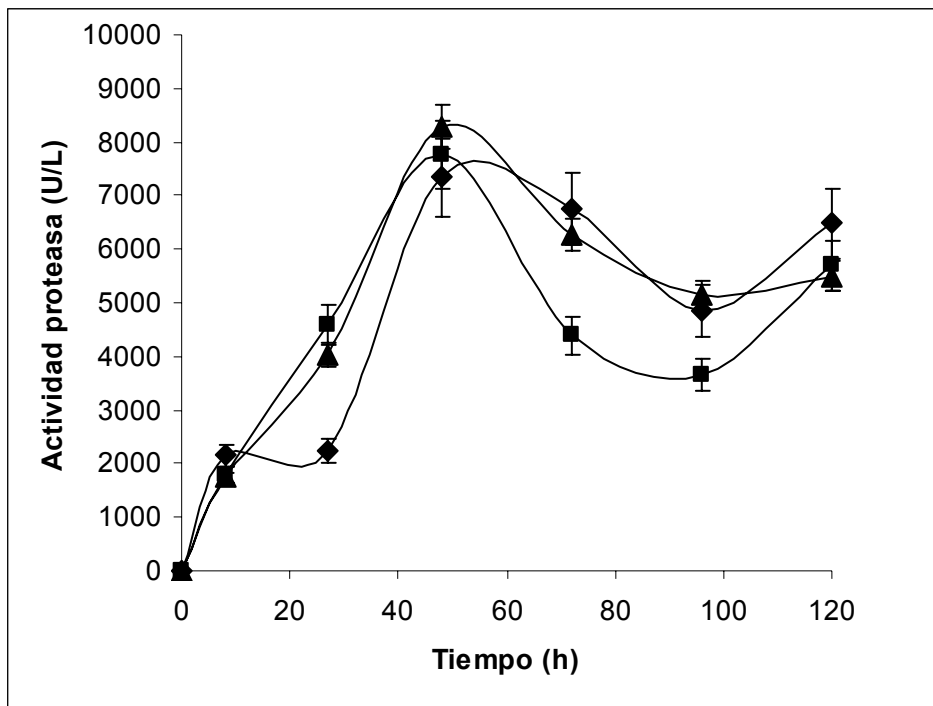


Fig. 1 Efecto del pH en el cultivo en medio líquido sobre la actividad proteasa. Rangos de pH 5(●), 7(■) y 9 (▲).

La reportes de la literatura indican que los microorganismos empleados para la producción de proteasa son sensibles a pH's menor a 5.0 sin embargo, en esta investigación los títulos de actividad a este pH fueron altos (7500 U/L) y no concuerda con lo que reporta Gandolfi-Boer y Marina-Peralta en el 2000, para la enzima proteasa de *Aspergillus tamaritii* la cual mantiene su actividad entre un pH de 6.0 a 9.0, en el reporte mencionan que a pH's ácidos cercanos a 5.0 la actividad decrece significativamente, además la máxima expresión de la actividad proteasa obtenida fue de 120,000 U/L en las primeras 30 h del cultivo, empleando glucosa y gelatina como sustrato e inductor respectivamente. Por otro lado Shang-Shyng y Jan-Yi en 1999, reportaron que la proteasa producida por *Streptomyces rimosus* es altamente sensible a los cambios de pH, además la actividad máxima proteasa se alcanzó con valores iniciales de pH de 6.7 obteniendo 20 U/g de enzima proteasa a las 200 h del cultivo.

O'Donnell y colaboradores (2001), demostraron que los resultados obtenidos por la proteasa producida por una cepa mutante de *Aspergillus niger* fue sensible a los cambios de pH (en un rango de valores ácidos, 3 a 6). Ellos reportaron que la máxima actividad proteasa (3700 U/L) se alcanzó con un pH de 3 a las 120 h.

Los resultados obtenidos en esta investigación para la actividad proteasa indican que *R. oryzae* produce hasta el doble de la actividad proteasa en comparación con los valores reportados por O'Donnell y colaboradores en 2001, además la proteasa se puede expresar en amplios rangos de pH.

Los resultados en esta muestra que a cualquiera de los pH's evaluados se obtienen títulos de actividad proteasa en rangos similares por lo que se decidió emplear el pH 7 para las pruebas de la segunda etapa de la presente investigación.

4.2. Resultados de la Etapa 2.

4.2.1. Resultados del comportamiento del pH en CML y CMS en función del tiempo.

El comportamiento de la evolución del pH en ambos sistemas de cultivo en medio líquido y sólido durante la cinética de producción de la enzima proteasa por *Rhizopus oryzae*, se aprecia que ambos sistemas de cultivo no

presentan diferencias significativas hasta las 45 horas, sin embargo, al tiempo de 45 h se incrementa hasta rangos cercanos a 8.0, disminuyendo nuevamente a rangos de 7.0 al final del cultivo. En el cultivo en medio líquido la tendencia desde las 31 h es a la alcalinización del medio llegando a alcanzar un rango de pH 8.2 al final del cultivo (Figura 2). Esto significa que en el cultivo en medio líquido, posiblemente el microorganismo produce carboxipeptidasas que generan una gran cantidad de grupos aminos que tienden a incrementar los valores de pH. En el caso de la disminución del pH posiblemente se puede relacionar con la asimilación de los grupos amino libres incrementando la fuente de carbono que tiende a neutralizar el pH del medio, o la posibilidad de un incremento en la actividad proteolítica aminopeptidasa que genera un incremento de los carboxilos libres lo que representaría una disminución en el pH por la presencia de estos en el medio.

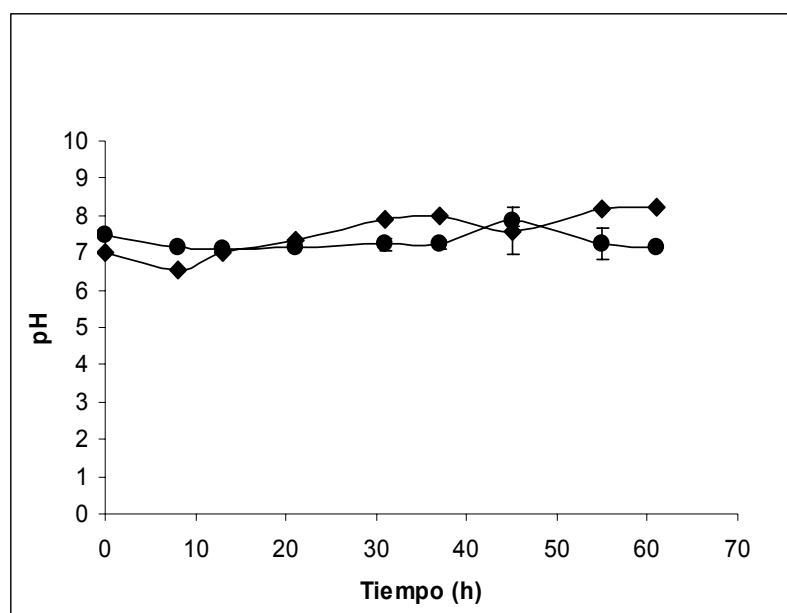


Figura 2. Comportamiento del pH en función del tiempo en CML (◆)

y CMS (•).

4.2.3. Resultados de Biomasa, Obtenidos en CML y CMS.

En la grafica 3 se presenta, el crecimiento fúngico de *R. oryzae*, fue evaluado en ambos sistemas de cultivo. Sin embargo, en cultivo en medio sólido, los métodos indirectos de estimación de la biomasa no fueron los adecuados como para reportar valores convincentes, pero fueron reportados para dejar la puerta abierta y la opción del desarrollo de una nueva técnica que permita una adecuada forma de estimar la biomasa en cultivo en medio sólido. Existen diversos reportes que indican que este parámetro ha resultado ser uno de los más conflictivos para su determinación. En este sentido, se han desarrollado métodos directos e indirectos, probablemente son más de 20 los métodos reportados, sin embargo, todos tienen serias desventajas de aplicación. Por tal motivo, se presentan tal cual los datos obtenidos en ambos sistemas de cultivo, evaluados gravimétricamente.

La figura 3 muestra la cinética de crecimiento de *R. oryzae* en cultivo en medio líquido, en un caldo de soya y tripticaseina. La fase de adaptación tuvo una duración aproximada de 12 h, alcanzando los valores máximos de producción a las 25 h, obteniendo valores de 34 g/L, disminuyendo de forma gradual a 24 y hasta 20 g/L de biomasa al final de la cinética.

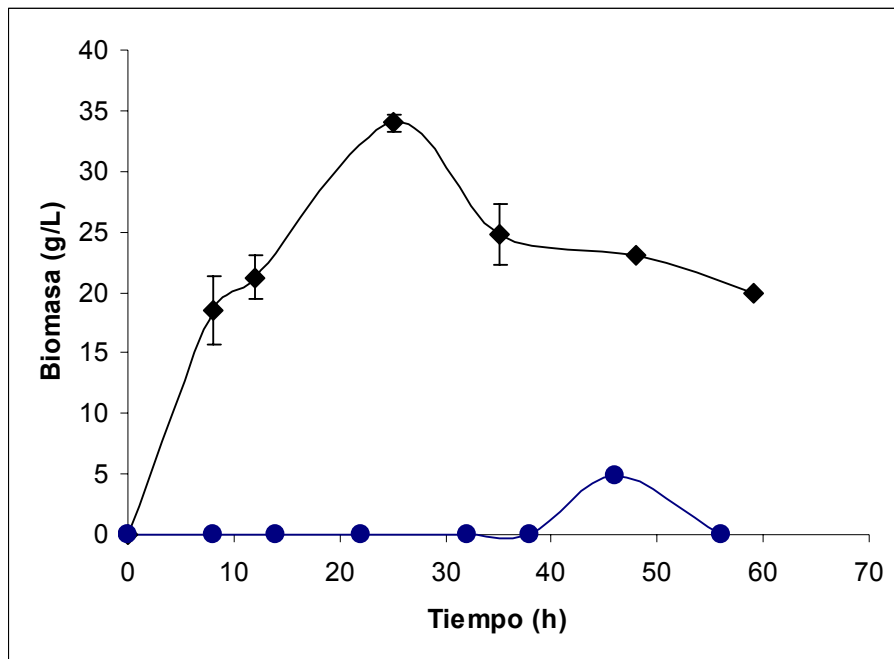


Fig. 3 Producción de biomasa de *R. oryzae* en CML (◆) y CMS (●).

El patrón de producción de biomasa en cultivo en medio líquido es superior al reportado por O'Donnell y col., (2001) quienes utilizaron *A. niger* obteniendo aproximadamente 2 g/L en un medio con pH 7 a las 46 horas, mientras que a un pH de 3 obtienen aproximadamente 5 g/L de biomasa a las 52 h.

4.2.4. Resultados de la Actividad Enzimática en CML y CMS.

Los resultados obtenidos en la cinética de producción de la enzima proteasa por el hongo *R. oryzae* en cultivo en medio líquido y sólido se presentan en la figura 4. Bajo las condiciones de ensayo, la enzima proteasa se expresó después de las 8 h iniciando con (345 U/L) en CML, siguiendo con un comportamiento ascendente hasta las 37 h (765 U/L) alcanzando su máxima

expresión de (790 U/L) a las 55 h de cultivo; mientras que en CMS a las 8 h se obtuvieron (255 U/L) aumentando hasta las 32 h (355 U/L), teniendo su máxima producción a las 56 h (475 U/L). Comparando ambos sistemas de cultivo se observa claramente que en el cultivo en medio líquido los valores obtenidos son significativamente superiores desde el inicio del cultivo comparado con el cultivo en medio sólido,

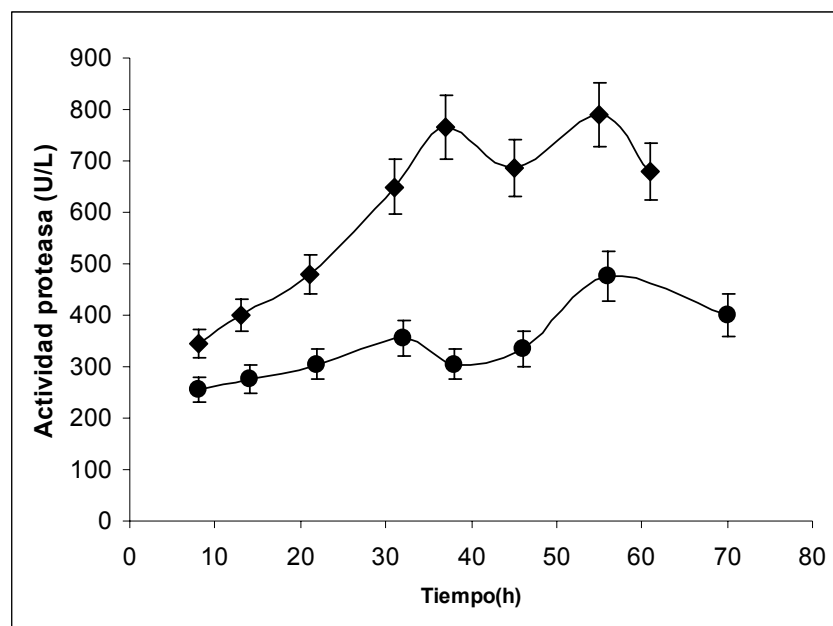


Fig. 4 Cinética de Producción de la enzima proteasa en cultivo en CML (♦) y CMS(●)

Los reportes de George y col., 1997, sobre la producción de proteasa en títulos de hasta 250,000 U/g de soporte usando la cepa de *Bacillus amyloquefaciens*. Por otra parte Tunga y col., (1998) mostraron que en cultivo en medio sólido de *R. oryzae*, la producción de proteasa fue de 310 U/g de soporte (salvado de trigo) y demostraron que al incrementar el contenido de humedad en el sistema, la producción de la enzima era mayor. Por otra parte, Shang-Shyng y Jan-Yi (1999) reportaron que a las 232 h obtuvieron 26.7 U/g de soporte (almidón) utilizando *Streptomyces rimosus* como fuente de la

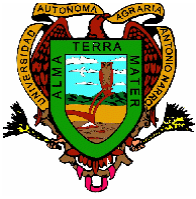
enzima. Couri y col., (2000) evaluaron la producción de proteasa de *A. niger* 3T5B8 (cepa mutante hiperproductora de pectinasa) sobre dos tipos de sustratos complementados con celobiosa, y demostraron que la producción fue mayor sobre salvado de trigo (10,380 U/L) que la obtenida en el mismo tiempo (72 h) sobre cáscaras de mango (1260 U/L).

Es importante mencionar que es complicado el tratar de tener criterios de comparación con los resultados obtenidos, ya que las variaciones entre los valores reportados anteriormente, han sido obtenidos con diferentes metodologías para ensayar la actividad proteasa, además, la forma de expresión en base a gramos de material húmedo fermentado, o seco, diferentes tipos de soporte, una gran variedad de microorganismos, representan mas obstáculos para establecer de manera correcta, criterios de comparación entre los diferentes estudios realizados.

Sin embargo, haciendo de lado dicha observación, podemos mencionar que este estudio preliminar sienta las bases de producción de enzimas proteasas en soportes inertes y es necesario llevar a cabo estudios para encontrar las mejores condiciones de producción de la enzima en este sistema de cultivo, una vez realizado este estudio, se podrán comparar los valores con aquellos reportados en la literatura, en donde se han publicado estudios de optimización de procesos de producción de proteasas en cultivo en medio sólido.

Es importante señalar la influencia que tiene el medio de cultivo, es decir, en el estudio de Gandolfi y Marina-Peralta (2000) quienes reportan en cultivo en medio líquido, 120,000 U/L usando *A. tamarii* y glucosa mas gelatina como sustratos. En ese estudio, también se utilizó caseína como fuente inductora de la actividad proteasa, sin embargo, bajo esta condición, *A. tamarii* produjo únicamente 20,000 U/L. Esto indica que al variar las fuentes inductoras de la actividad proteasa en el medio de cultivo, los valores de respuesta son claramente diferentes.

Estas diferencias serían claras en el presente estudio, ya que se evaluó el crecimiento de la cepa de *R. oryzae* sobre placas de agar con gelatina y caseína, produciendo halos de hidrólisis mayores en el primer sustrato que en el segundo (datos no publicados).



Capítulo 5

CONCLUSIONES

La investigación, en base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos; se emiten las siguientes conclusiones:

En la cinética de producción de la enzima proteasa por *R. oryzae*, para determinar el mejor pH (5, 7 y 9) no tuvo gran variación, por lo que se determina que se puede usar cualquier pH sin obtener grandes variaciones en los resultados.

La biomasa en CMS no mostró los resultados esperados por lo que es importante mencionarlo, mientras que en CML muestra resultados que van hasta los 34g/L.

El hongo *R. oryzae* arroja los mejores títulos de producción en CML a las 55 h de cultivo (790 U/L), mientras que en CMS los resultados son a las 56 h (475 U/L).

Por lo tanto se concluye que el mejor sistema de cultivo bajo las condiciones de ensayo empleadas para el hongo *R. oryzae*, es el cultivo en medio líquido usando como inductor tripticaseína y soya (TSB).



Capítulo 6

RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones se recomiendan las siguientes consideraciones:

1.- Evaluar rangos de pH menos a 5.0 para determinar la producción de enzimas con actividad proteolítica ácida.

2.- Emplear nuevas metodologías para la determinación de la biomasa producida en los cultivos, sobre todo en medio sólido, que representa una seria desventaja debido a la matriz inerte.

3.- El punto más importante es determinar las mejores condiciones de producción de las enzimas proteasas para evaluar diferentes concentraciones y condiciones en cuanto:

- a).- Fuentes de carbono y nitrógeno.
- b).- Temperatura
- c).- Agitación
- d).- Concentración de oxígeno.
- e).- cultivos alimentados.
- f).- evaluación de los soportes sólidos contaminantes.

A medida que se de el escalamiento del proceso surgirán nuevas condiciones que se tendrán que optimizar para desarrollar un proceso eficiente y rentable para la producción de proteasas.



Capítulo 7

BIBLIOGRAFIA

Aguilar, C. N. (1998). Producción de enzimas en sistemas de fermentación. Reporte interno. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, D.F.

Anwar, A. and Saleemuddin, M. (1998). Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*, **64**, 175-183.

Aphale, J. S. and W. R. Strohl. (1993). Purification and properties of an extracellular aminopeptidase from *Streptomyces lividans* 1362. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 417-424.

Badui, D. S. (1996). Química de los Alimentos. Editorial Alhambra Mexicana S. A. México D. F. pag. 139, 281, 287.

Bascaran, V., Hardisson V., and Brana A. (1990). Regulation of extracellular protease production in *Streptomyces clavuligerus*. *App. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 208-213.

Bhosale, S. H., Rao, M.B., Deshpande, V.V. and Srinivasan, M. C. (1995). Thermostability of high activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20). *Enz. Microbiol. Technol.*, **17**: 136-139

Cannel, E. y Moo-Young. (1980). "Solid-state fermentation system". *Process biochem.* **15**: 2-7.

Chandrasekaran, S. and S. C. Dhar, (1987). Multiple protease from *Streptomyces moderatus* 1. Isolation and purification of five extracellular proteases, *Arch Biochem. Biophys.* **257**: 395-401.

Chavez-Camarillo, G.M. (1995). Estudios de la X-propil dipeptidil aminopeptidasa en levaduras. Tesis doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Chatterjee, R. A. dutta, R. Banerjee y B. Bhattacharya. (1996). "Production of tannase by solid-state fermentation". *Bioprocess Eng.* **14**: 159-162.

Chen, C. W. and S. S. Yang. (1995). Amylase production of *Streptomyces rimosus* TM-55 and their 2-deoxyglucose mutants. *Chin. J. Immunol.* **28**: 109-116.

Chisten, P., E. Villegas y S. Revah. (1994). "Growth and aroma production by *Ceratocytis fiambrata* in various fermentation media". *Biotechnol. Letters.* **11**: 1183-1188.

Cohen, B. L., (1973). Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **79**: 311-320.

Cohen, B. L., Morris, J. E. and Drucker, H. (1975). Regulation of two extracellular proteases of *Neurospora crassa* by induction and by carbon-nitrogen and sulfur-metabolite repression. *Arch. Biochem. Biophys.* **169**: 324-330.

Couri, S., Costa, T. S., Saavedra, P. G. A., Pereira, F. S. and Augusto, C. C., (2000). Hidrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3TSB8. *Process Biochemistry.* **36**: 255-261.

Ferreira, G., Boer, C. G. and Peralta, R. M. (1999). Production of wylanolytic enzymes by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**: 335-339.

Frederick, G. D., Rombouts, P. and Buxton, F. P. (1995). Cloning and characterization of PEPC, a gene encoding a serine protease from *Aspergillus niger*. **125**: 57-64.

García- Garibay, M., Quintero R. R., López-Murguía, C. A. (1993). *Biología Alimentaria*, Ed. Limusa, S. A. de C. V. México, D. F. Pag., 103, 144-145, 189, 195, 229-230, 610-611.

Gandolf, B. C. and Marina, P. R. (2000). Production of extracellular protease by *Aspergillus tamarii*. *J. Basic. Microbiol.* **40**: 2, 75-81.

George, S., V. Raju, V. Subramanian & K. Jayaraman. (1997). Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. *Bioprocess Eng.* **16**: 381-382.

Ghidyal, P., M. Ramakrishna, B. Losane and N. G. Karanth. (1992). "Gaseous concentration gradients in tray type solid state fermentors effect on yields productivities". *Bioprocess Eng.* **8**: 67-72.

Gowthaman, M. K., S. M. S. R. Rao, N. P. Ghildyal & N. G. Karanth. (1995). "Estimation of *k_{la}* in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor". *Process Biochem.* **29**: 9-15.

Grajek, W. P., Gervais, H. (1987). Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Tricho derma viride*. TS in solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology.* **9**: 658-662.

Gupta, R., R. K. Saxena, P. Chaturvedi and J. S. Viridi. (1995). Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential of fungal cell wall lysis. *J. Appl. Bacteriol.* **78**: 378-383.

Gutiérrez-Rojas, M. J. Cordova, R. Auria, S. Revvah y E. Favela Torres. (1995). "Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support". *Biotech. Letters.* **17**: 219-224.

Gutierrez-Rojas, M., A. A. Hosn, R. Auria, S. Revvah y E. Favela Torres . (1996). "Heat transfer in citric acid production by solid-state fermentation". *Process Biochem.* **4**: 336-339.

Hanzi, M. Shimizu, M., Hearn, V. M. and Monod, M. (1993). A study of the alkaline proteases secreted by different *Aspergillus species*. *Mycoses.* **36**: 351-356.

Hanson, M. A. and Markuf, G. A. (1975). Control of the synthesis of a single enzyme by multiple regulatory circuits in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **72**, 1240-1244.

Henzler, H. J., Schedel, M. (1991). Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. *Bioprocess Engineering*. **7**: 123-131.

Imshenatskii, A. A., Kasatkina, I. D. and Zhelteva, E. T. (1971). Repression of protease synthesis in *Aspergillus terricola* by exogenic amino acids. *Microbiology (USSR)*, **40**, 382-386.

Karl, D. M., and O. Holm-Hansen. (1978). Methodology and measurement of adenylase energy charge ratios in environmental samples. *Marine Biol.* **48**: 185-197.

Katz, M. E., Rice, R. N. and Cheetham, B. F. (1994). Isolation and characterization of and *Aspergillus nidulans* gene encoding an alkaline protease. *Gene*. **150**. 287-292.

Klapper, B. F., Jameson, D. M. and Mayer, R. M. (1973). Factors affecting the synthesis and release of the extracellular protease of *Aspergillus oryzae* NRRL 2160. *Biochim. Biophys. Acta*. **304**. 513-519.

Lyons, T. P. (1988). "Proteinase in industry". CRC Critical reviews in Biotechnology. **8**: 99-110.

Malathi, S. and Chakraborty, R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation condition for use as a depilation agent. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 712-716.

Muro, T. T., Murakami, Y., Tominaga, T., Tokumaya and S. Okada. (1991). Purification and some properties of protease I having transfer action from *Streptomyces griseus* var. *alcalophilus*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 307-314.

Nampoorthiri, K. M. and A. Pandey. (1996). "Solid state-fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium sp.*". *Biotechnol. Letters*. **18**: 199-204.

Nanadakumar, M. P., Thakur, M. S., Raghvarao, K. S. and Ghidyal N. P. (1996). "Substrate particle size reduction by *Bacillus coagulans* in solid-state fermentation". *Process Biochem.* **18**: 121-125.

North, M. J. (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microb. Rev.* **46**: 308-340.

O'Donnell, D. L.; Wang, J.; Xu, D.; Ridway, T.; Gu, M.; Moo-Young. (2001). Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. *Biochemical Engineering Journal.* **8**: 187-193.

Oriol, E.; Schettino, B.; Viniegra-Gonzalez, G.; Raimbault, M. (1998). Solid-state culture of *Aspergillus* in support. *Journal of Fermentation Technology.* **66**: 57-62.

Ozaki, H. and K. Yamada. (1991). Isolation of *Streptomyces* sp. Producing glucose-tolerant β -glucosidases and properties of the enzymes. *Agric. Biol. Chem.***55**. 979-987.

Ozawa, S., Sato K., and Endo, Y. (1996). "Repeated batch production of alkaline protease by solid-state fermentation using urethane foam as carriers". *Processs. Biochem.* **14**: 63-68.

Pandey, A. (1992). *Process Biochem.* **27**: 109-117.

Pandey, A., P. Selvakumar, C. R. Soccol and P. Nigam. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Sci.* **77**: **149-152**.

Pokorny, M. M. Lj. Vitale, V. Turk, M. Renko, and J. Zuvanic. (1979). *Streptomyces rimosus* extracellular protease. 1. Characterization and evaluation of various crude preparations. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 81-90.

Prado, B. L. A., Huerta, O. S., Rodríguez, S. G., Saucedo, C. G. (1999). Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en biotecnología, México, D. F., Pags., 11, 223, 226, 231-235, 265-267.

Priest, F. G. (1977). "Extracellular enzyme síntesis in the genus *Bacillus*". *Bacterial., Rev.* **41**: 711-753.

Rameshi, M. V. & B. K. Lonsane. (1991). Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α - amylase production by *Bacillus licheniformes* M27. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 591-593.

Reichard, U., Monod, M. and Ruchel, R. (1995). Molecular cloning and sequencing of the gene encoding and extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **130**: 69-74.

Renko, M., M. Pokomy, Lj. Vitale, and V. Turk. (1981). *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 2. Isolation and characterization of serine alkaline proteinase. *Europe. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 166-171.

Renko, M., Lj. Vitale. M. Kokalj, and M. Pokomy. (1989). *Streptomyces rimosus* extracellular protease. 4, Trypsin-like proteinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 38-44.

Righelato, R. C. (1975). Growth kinetics of mycelial fungi. **Filamentous fungi. Vol. 1 (Industrial mycology)**. Smith, J. E., Berry, D. (Eds.) Edward Arnold, London.

Romero, G. S. J. (2001). Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en Fermentación en Medio Líquido y Fermentación Sólida. Tesis doctorado. UAM.

Roukas, T. (1994). "Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 296-301.

Sivori, E. (1986). Adenylicnucleotides and energy charge during the embryonic developmedt of *Bufo arenarum*. *Comp. Biochem. Physiol.* **85B**: 573-576.

Solomon, R. Growth of *Aspergillus*, in liquid fermentors. **Filamentous fungi. Vol 1 (Industrial mycology)**. Smith, J. E., Berry, D. (Eds) Edward Arnold. London. 1975.

Taragano, V., Sanchez, V. E. and Pilosof, A. M. R. (1997). Combined effect of water activity depression and glucose addition on pectinases and protease production by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 233-236.

Tsuru, D. y T. Yoshimoto. (1990). "Microbial proteases". *CRC Handbook of Microbiology*. **8**: 239-278.

Tunga, R., Banerjee, R., Bhattacharya, B. C. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. *Bioprocess Engineering*. **19**: 187-190.

Tsuchiya, K. and Kimura, T. (1984). Decrease of protease activity by addition of glucose to the culture of *Cephalosporium sp.* *J. Ferment. Technol.* **62**: 35-39.

Vitale, Lj., M. Renko, B. Lenarcic, V. Turk, and M. Pokomy. (1986). *Streptomyces rimosus* extracellular protease. 3. Isolation and characterization of leucine aminopeptidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 449-455.

Vukelic, B. A., Ritonja, M. Renko, M. Pokomy and Li, Vitale. (1992). Extracellular α -amylase from *Streptomyces rimosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 202-204.

Walsh, G. and Headon, D. (1994). Polymer-degrading enzymes. In: Protein Biotechnology. John Wiley & Sons, NY. Pp. 327-333.

Ward, O. P. (1989). Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia. S. A. Zaragoza, España. pag. 39, 233.

Yang, S. S. and C. W. Cheng. (1996). Production, purification and characterization of α -amylase by *Streptomyces rimosus*. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.* **35**: 649-654.

Yang, S. S. and J. Y. Wang. (1999). Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid-state cultivation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **40**: 259-265.

Yeoman, K. H. and C. Edwards. (1994). Protease production by *Streptomyces thermovulgaris* grown on rapemeal-derived media. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 264-270.

Zhu, Y.W., Smits J. P., Knol, W. and Bol, J.(1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as insert carrier. **Biotechnology Letters.** 16 (6): 643-648.

Zhu, Y., Knol, W., Smits, J.P. and Bol. J. (1996). "Médium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrium* in solid-state fermentation using polyurethane foam as insert carrier". *Process Biochem.* 18: 108-112.