



Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

Las proteasas son un grupo de enzimas que tienen la capacidad de degradar total o parcialmente las proteínas. Se tienen identificadas varias proteasas, que intervienen en procesos específicos tales como la esporulación; la utilización de péptidos exógenos y la biosíntesis del factor alfa de levaduras. También, intervienen en diferentes procesos bioquímicos, aunque no han sido identificadas, como la síntesis de proteínas, la inactivación catabólica, el crecimiento celular, la reparación del ADN (Chávez-Camarillo, 1995).

En recientes años, se han estado realizando varios estudios para producir diferentes tipos de proteasas (ácida, neutra y alcalina) 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 cultivo sólido se ha usado, para producir varias enzimas, llevando a cabo el proceso en moldes con cereales o salvado. Aunque la proteasa y amilasa son principalmente fúngicos y productos de bacterias; la posibilidad de usar *Streptomyces* para la producción de enzimas, se ha investigado recientemente. 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).

Frecuentemente se han planteado diversas alternativas de solución para tratar 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. 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.

El desarrollo de este trabajo, incluyó la evaluación de la producción de la enzima proteasa bacteriana, por *Streptomyces sp.*, tanto en cultivo líquido como en cultivo sólido; preliminarmente se establecieron condiciones de ensayo de pH's de 5, 7 y 9, para ver el pH óptimo de la enzima a la cual tiene mejor adaptabilidad; para la evaluación de los títulos de actividad proteasa tanto en cultivo líquido como en sólido se utilizó pH de 7, debido a que en el ensayo no hubo gran diferencia de la cinética de producción y porque las mejores condiciones de *Streptomyces sp.* se lleva a pH neutro.

La descripción de este documento, inicia con el planteamiento del objetivo general y los objetivos específicos; posteriormente se presenta la revisión de literatura en donde se mencionan aspectos generales sobre la producción de proteasas y algunos aspectos de procesos biotecnológicos. En el apartado de materiales y métodos, se detalla la metodología utilizada, para los análisis realizados; después se muestran y se discuten los resultados obtenidos, seguida de una conclusión y recomendaciones; finalmente se indica la literatura citada.



Capítulo 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar la producción de la enzima proteasa bacteriana por *Streptomyces sp.* en sistemas de cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las condiciones de pH, para la producción de la enzima proteasa por *Streptomyces sp.*
2. Evaluar los títulos de producción de proteasas en cultivo en medio líquido, empleando una cepa bacteriana productora de proteasas: *Streptomyces sp.*
3. Evaluar los títulos de producción de proteasas en cultivo en medio sólido, empleando una cepa bacteriana productora de proteasas: *Streptomyces sp.*



Capítulo 3

REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 GENERALIDADES

Debido a la gran diversidad y cantidad de productos comestibles que se procesan y consumen actualmente, en nuestra sociedad moderna se genera una gran cantidad de desechos, que son fuente de contaminación ecológica, provocando problemas severos de salubridad y daño al medio ambiente, por la falta de tecnología para tratar estos residuos. La contaminación incluye tanto el suelo, como mantos acuíferos e incluso el aire. Esto se debe a que dichos residuos no pueden ser biodegradados en su totalidad, o dicho proceso resulta muy lento. Ejemplo de ello, son las grandes cantidades de bagazo y cáscaras en la industria de jugos y bebidas, toneladas de pulpa de café en la industria cafetalera, cascarillas de la industria de los cereales y la gran cantidad de desechos de la industria pesquera, por citar algunos pocos casos (Prado y col; 1999) .

Frecuentemente se han planteado diversas alternativas de solución para tratar 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. Este proyecto en general 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 avances científicos generados al momento, permiten ofrecer una alternativa biotecnológica para aprovechar los residuos y desechos agroindustriales, dándoles un valor agregado y reduciendo eficientemente su potencial como contaminantes ambientales. Dichos residuos pueden ser empleados como sustratos e inductores del crecimiento microbiano, generando la posibilidad de obtener en un proceso simultáneo, la producción de metabolitos de interés industrial.

El objetivo de la biotecnología es obtener productos metabólicos útiles 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, etc.) La recuperación del producto o “procesamiento posterior”, permite 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 permite 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.

3.2 ENZIMAS

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 y lipasas). La historia reciente de las enzimas o fermentos se originó cuando Eduard Buchner, en 1897, 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 (Prado y col., 1999).

Alrededor de un 65% de las enzimas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria alimentaria, 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). 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, donde intervienen en procesos bioquímicos. Las enzimas, participan en diversas funciones de síntesis, degradación, oxidación y otras, que son parte de la actividad vital de los distintos organismos.

Debido a la gran especificidad enzimática 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 (Prado y col; 1999).

3.3 PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA PROTEASA

Dentro de las enzimas se tienen a las proteasas, que 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 los 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 las industrias de alimentos, 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. oryzae* 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).

Algunas 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).

3.3.1 PRODUCCION 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 mas variadas. Uno de sus usos mas 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 (Priest, 1977).

Se han usado bacilos y otras bacterias gram-positivas históricamente como fuentes de enzimas industriales, sobre todo para producir proteasas (Priest, 1977).

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

En años recientes, se han realizado varios estudios para producir diferentes tipos de proteasas (ácida, neutra y alcalina) a través de fermentación en estado sólido usando como sustrato residuos agro-industriales. Es interesante notar que aunque varios sustratos han sido empleados 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 Koji (cultivo sólido) se ha usado para producir varias enzimas, llevando a cabo el proceso en moldes con 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 y 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, estas 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, 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 soporte sólido inerte (Ozawa, 1996). En otra investigación nuevas cepas de bacterias fueron estudiadas para producir proteasa alcalina termoestable, en un sistema de fermentación en estado sólido (Chakraborty, 1993). Un proceso nuevo se ha desarrollado en Chennai (India), para la producción comercial de proteasas alcalinas (Clarizyme) que fue producido por *Aspergillus flavus* en fermentación en estado sólido, utilizando como sustrato salvado de trigo (Pandey y col; 1999).

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.

3.3.2 TIPOS DE PROTEASAS.

Las proteasas se pueden clasificar en tres tipos, esto es en base a su pH, dichas proteasas son ácidas, neutras y alcalinas. Estas difieren ampliamente en su especificidad por el substrato, pudiéndose emplear combinaciones de diferentes enzimas proteolíticas para incrementar el grado de hidrólisis de una proteína. Como se mencionó anteriormente, 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 mas 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 (García-Garibay y col., 1993).

3.3.3 CLASIFICACION 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-proteinasa, cisteinil-proteinasa, aspartilproteinasa y metalo-proteinasa.

Pero en función de su medio de acción hay más exopeptidasas que endopeptidasas. Las serina-proteinasa están extendidos en la naturaleza, ellos se encuentran en virus, bacterias, y eucariotes, e incluyen exopeptidasas, oligopeptidasas, y omega peptidasas (Rawlings y Barrett, 1993).

3.3.4 MECANISMOS DE ACCION DE LAS PROTEASAS

Las enzimas proteolíticas, 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.

Estas enzimas proteolíticas o proteasas comerciales, actúan con diferentes grados de intensidad y de selectividad; en general, las proteasas de origen vegetal, hidrolizan las uniones que contienen aminoácidos básicos, leucina o glicina.

Las proteasas toman una posición de giro, con respecto a sus papeles fisiológicos, así como sus aplicaciones comerciales. 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, y 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.

3.3.5 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 tamarii*, un hongo filamentoso, 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 esporulante 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.

Microorganismos utilizados en la producción de proteasas.

Género	Especie
<i>Streptomyces</i>	<i>thermoviolaceus</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>peptidofaciens</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>hermovulgaris</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>clavuligerus</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>moderatus</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>viridificans</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>rimosus</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>fradiae</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>nidulans</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>saitoi.</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>tamarii</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>
<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>
<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>sp</i>
<i>Thermoactinomyces</i>	<i>vulgaris</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>
<i>Rhizopus</i>	<i>chinensis</i>
<i>Rhizopus</i>	<i>oligosporus</i>

3.3.6 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 hidrolizar 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 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. Estos 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 utilización de péptidos exógenos y la biosíntesis del factor alfa de levaduras. También, intervienen en procesos

bioquímicos, aunque no han sido identificadas, como la síntesis de proteínas, la inactivación catabólica, el crecimiento celular, la reparación de ADN (Chávez-Camarillo, 1995).

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

3.4 PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

3.4.1 FERMENTACIÓN

El término fermentación o cultivo se usan de manera general para referirse a los procesos biotecnológicos. 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 1,000 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.

3.4.2 CULTIVO CONTÍNUO

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 extrae simultáneamente del sistema.

El objetivo fundamental de la industria de las fermentaciones, es minimizar costos e incrementar los rendimientos. Este objetivo puede alcanzarse, si se desarrolla el tipo de fermentación más adecuado para cada caso en particular. Si bien 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 largo 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.

3.4.3 CULTIVO DISCONTÍNUO

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).

3.4.4 PROCESO DE CULTIVO ALIMENTADO

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.

3.4.5 CULTIVO LÍQUIDO

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 el 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) o Fermentación sumergida (abreviada en ingles 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, Solomón y col, 1995, Raimbault, 1998).

3.4.6 CULTIVO SÓLIDO

La fermentación o cultivo 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 (Canel y Moo-Young, 1980).

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

Cuándo 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).

3.4.7 DIFERENCIA ENTRE CULTIVO LÍQUIDO Y SÓLIDO

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 mas costosa, ya que su control es mas sofisticado, la solubilidad de O₂ 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 mas 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.

3.5 SOPORTES UTILIZADOS EN LA FERMETACIONCIÓN 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 ínter-partícula.

3.6 POLIURETANO (PUF).

Un novedoso método de fermentación en estado sólido, se ha desarrollado utilizando espumas de poliuretano, como soporte inerte impregnando sobre 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 medido directamente (Zhu, 1994).

En 1994 Zhu y col., utilizaron el PUF para producir nucleasa P1 de *Penicillium citrinum*, desde entonces el PUF, ha sido utilizado mas como un proceso de inmovilización celular, que como un proceso limpio de producción enzimática, para la búsqueda de diseño de reactores mas eficientes, (inmovilización, detoxificación, obtención de metabolitos).

Puesto que las espumas de poliuretano son, según sus características químicas, inertes y se resisten a la abrasión, son optimas 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 sustratos 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 (Romero, 2001).



Capítulo 4

MATERIALES Y METODOS

4.1 MATERIALES.

Se emplearon materiales de vidrio y plástico de uso común de laboratorio y reactivos de nombres comerciales.

4.2 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.

4.3 METODOLOGÍA

4.3.1 MICROORGANISMO

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

4.3.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para la presente investigación se propusieron dos etapas, las cuales consisten en lo siguiente:

4.4 ETAPA 1:

Evaluar el efecto del pH sobre la producción de la enzima proteasa, en fermentación líquida, utilizando un medio modelo de Trypticaseína y soya.

El medio de cultivo se preparó, en soluciones amortiguadoras de citratos y fosfatos a pH's de 5, 7 y 9. La cinética se llevó a un tiempo de 124 horas y se determinó la producción de enzima cada ocho horas.

4.4.1 COMPOSICION QUÍMICA DEL MEDIO DE CULTIVO (gr/L)

Peptona de caseína.....	17.0
Peptona de soya.....	3.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Fosfato Dipotásico.....	2.5
Dextrosa.....	2.5

pH final 7.3 ± 0.2

4.4.2 PREPARACIÓN DE INÓCULOS

La bacteria de *Streptomyces sp.* se incubó por 3 días, a 37°C en agar papa dextrosa (PDA), Tripticaseína y soya (TSB), placas de agar caseína y agar gelatina; hasta observar su esporulación.

4.4.3 CONTEO Y PROPAGACIÓN 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.

4.4.4 CONDICIONES DEL CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO.

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 *Streptomyces sp.* por reactor. Las condiciones generales de incubación fueron: Temperatura, 37°C y agitación a 200 rpm.

4.5 SEGUNDA ETAPA:

Después de seleccionar las mejores condiciones de cultivo para la producción de la enzima proteasa, se realizaron cinéticas comparativas de producción de la enzima. Y se prepararon los medios de cultivo como en los puntos 4.4.4 y 4.5.1, para la fermentación líquida y sólida respectivamente.

4.5.1 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 *Streptomyces sp.* 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 de: temperatura 37°C , humedad 70% y actividad de agua 0.99.

4.5.2 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

La biomasa se determinó por método gravimétrico o diferencia de peso, (AOAC, 1980).

4.5.3 DETERMINACIÓN DE PH

Para la determinación de pH, se utilizó el método potenciométrico, AOAC, (1980).

4.5.4 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

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 pH 7, y 3 ml de agua destilada, enseguida se incuba a 37 °C en baño maría por 10 minutos, posteriormente se agrega 1 ml del extracto enzimático luego se vuelve a incubar 30 minutos en baño maría, con agitación constante cada 5 minutos, previamente se prepara el espectrofotómetro a $\lambda = 520$ nm, después de los 30 minutos se separa en papel filtro # 41, esto con el fin de parar la reacción, finalmente el líquido filtrado se recibe en tubos de ensaye y se lee en el espectrofotómetro.

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 del extracto enzimático.

UNIDAD ENZIMÁTICA

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



Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la investigación. Inicialmente se describen y discuten los resultados obtenidos en la primera etapa experimental, relacionada con el efecto del pH sobre la producción de la enzima proteasa, posteriormente se muestran los resultados obtenidos en ambos sistemas de cultivo.

5.1 RESULTADOS DEL EFECTO DEL pH, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA PROTEASA.

En la Figura 1, se presentan los resultados del efecto del pH sobre la actividad proteasa en cultivo en medio líquido. Tres valores de pH fueron evaluados (5, 7 y 9), se aprecia que durante las primeras 48 horas, el desarrollo es muy similar a los tres valores de pH mencionados, manteniéndose un incremento de tipo exponencial; posterior a este tiempo se observan ligeras variaciones en cuanto a la actividad enzimática, obteniéndose a pH de 9 la máxima actividad proteolítica; sin embargo, dichas variaciones son mínimas a los tres valores de pH y no son significativamente diferentes, esto muestra que la cepa de *Streptomyces sp.* es capaz de producir proteasa extracelular en cultivo

líquido a cualquiera de los pH's evaluados en rangos que van desde lo ligeramente ácido, neutro y alcalino.

Este comportamiento es muy atractivo porque su uso no estaría restringido a ciertos valores tal como lo están muchas enzimas comerciales.

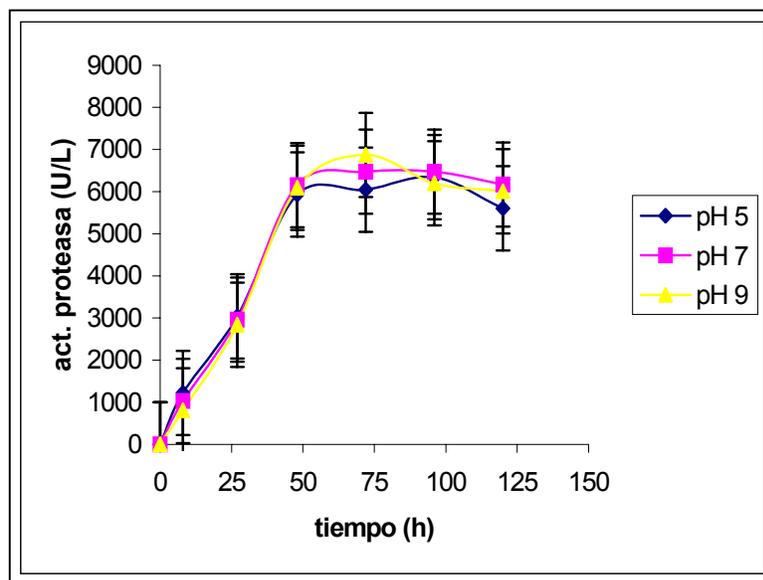


Fig. 1 Efecto del pH en cultivo líquido sobre la actividad proteasa.

El valor máximo de expresión de actividad proteasa fue obtenido a pH 9 siendo de 6,870 U/L en un tiempo de 72 h. Shang-Shyng y Jan-Yi (1999) reportaron que la proteasa producida por *Streptomyces rimosus* es altamente sensible a los cambios de pH, sin embargo, ellos reportan que por cada mililitro de cultivo soporta 0.4 U de enzima proteasa, estos valores se alcanzaron a pH inicial de 6.7 y reporta un máximo de actividad (20 U/g de almidón) a las 200 h del cultivo.

Comparando la unidades obtenidas por mililitro de cultivo, en esta investigación, se obtiene 17.5 veces mas proteasa, utilizando la cepa de *Streptomyces sp.* con la que se obtienen 7 U/ml encontraste con lo reportado por Shang-Shyng y Jan-Yi (1999).

Gandolfi-Boer y Marina-Peralta, (2000) reportaron que la proteasa de *A. tamarii* mantiene su actividad a pH entre de 6 a 9, sin embargo, a pH ligeramente ácidos (cercanos a 5) la actividad decrece significativamente, además la máxima expresión de la actividad proteasa (120 U/ml) se alcanzó durante las primeras 30 h del cultivo, usando como sustrato glucosa y gelatina como inductor. Los resultados obtenidos por O'Donnell y col., (2001) demostraron que la proteasa producida por una cepa mutante de *Aspergillus niger* fue sensible a los cambios de pH (en un rango de valores de ácidos a ligeramente ácidos, 3 a 6). Ellos reportaron que la máxima actividad proteasa (3700 U/L o 3.7 U/ml) se alcanzó con un pH de 3 a las 120 h.

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

De acuerdo a los resultados obtenidos en este experimento se decidió utilizar el pH de 7 para la siguiente etapa de la investigación debido a que las mejores condiciones de crecimiento de microorganismo se llevan a pH neutro.

5.2. RESULTADOS DE LA EVOLUCION DE pH EN CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO.

La Figura 2, presenta los resultados de la evaluación del pH en el cultivo líquido durante la cinética de producción de la enzima proteasa por *Streptomyces* sp. Los resultados demuestran que durante el cultivo no hubo cambios drásticos de pH, ya que éstos permanecieron en un rango entre 6 y 6.8, durante las 70 horas de fermentación, presentado una disminución del mismo a las 14 horas y restableciéndose a las 32 horas, manteniéndose constante durante todo el periodo restante de la fermentación.

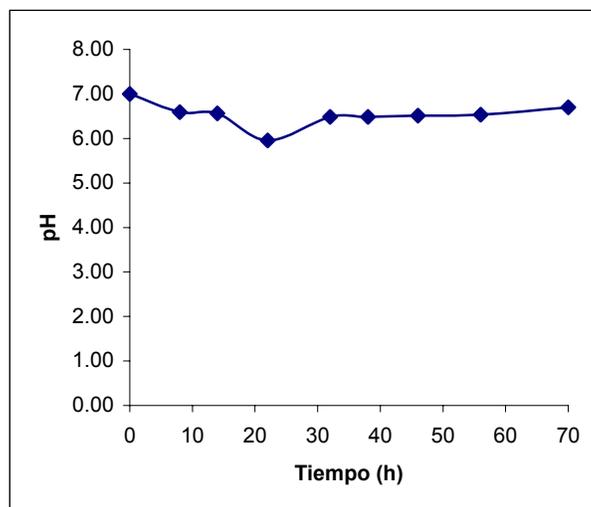


Fig. 2. Evolución del pH en cultivo en medio líquido contra el tiempo.

5.3 RESULTADOS DE LA EVOLUCION DE pH, EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO.

La Figura 3, presenta los resultados obtenidos para la evolución de pH en cultivo en medio sólido durante la cinética de producción de proteasa por *Streptomyces sp.* Los resultados demostraron que en este sistema de cultivo, el valor de pH se mantiene entre 7 y 8.5, aproximadamente, manifestándose un incremento a las 32 horas de fermentación y teniendo un ligero descenso hasta las 70 horas.

Al comparar los valores de la evolución del pH en ambos sistemas de cultivo, es claro observar que en cultivo en medio sólido los valores son superiores a los del cultivo en medio líquido, sin embargo, en ambos sistemas de cultivo, los valores de pH se mantuvieron en rangos donde la actividad proteolítica se mantiene constante, tal como se observó en la Figura 1.

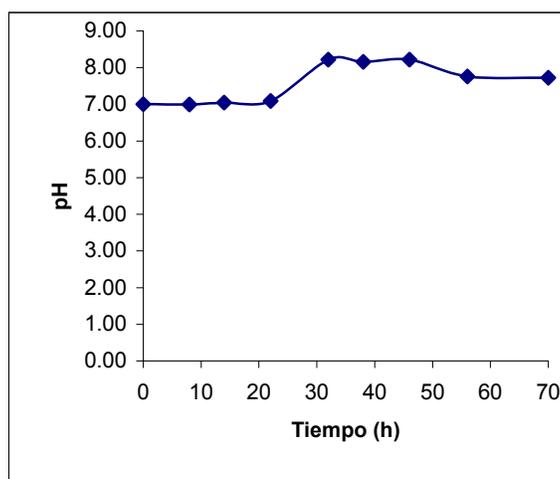


Fig. 3 Evolución del pH en cultivo en medio sólido contra el tiempo.

5.4 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO, A pH 7.

Los resultados obtenidos en la cinética de producción de la enzima proteasa por la bacteria *Streptomyces sp.* en cultivo en medio líquido se presentan en la Figura 4. Bajo las condiciones de ensayo, la enzima proteasa se expresó a partir de las primeras 8 h del cultivo, sin modificaciones en los niveles de expresión (600 U/L) durante todo el cultivo.

Es importante mencionar que *Streptomyces sp.* expresó la actividad proteasa hasta 2.5 veces más alta en cultivo en medio sólido que en cultivo en medio líquido. (ver Figura 5). Estos resultados concuerdan con el patrón obtenido por George y col., (1997) y por Shang-Shyng y Jan-Yi (1999), quienes demostraron que la actividad proteasa es mayor en cultivo sólido que en cultivo líquido. De forma similar con ambos reportes, en este estudio se evidenció que los tiempos de producción de la enzima proteasa es menor en cultivo líquido que en cultivo en medio sólido.

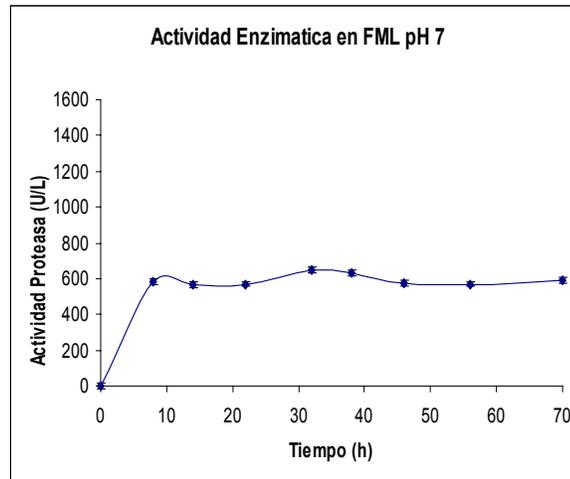


Fig. 4 Producción de proteasa en cultivo en medio líquido.

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. tamaritii* 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. tamaritii* 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 se apreciaron en el presente estudio, ya que la primera propagación de *Streptomyces sp.* se realizó sobre placas de agar con gelatina y con caseína, produciendo halos de hidrólisis mayores en el primer sustrato que en el segundo (datos no publicados).

Las Figuras 4 y 5 muestran la evolución de la cinética, siendo mejor la producción de la enzima proteasa en cultivo sólido a las 48 horas del periodo de incubación, posteriormente comienza su declinación; sin embargo en el cultivo sumergido su producción inicia a las 8 horas con 600 U/L, pero permaneciendo constante durante las 70 horas de fermentación.

Es importante señalar que bajo estas condiciones preliminares de estudio no se puede explicar de manera completa, porque los resultados presentados en las figuras 1 y 4 no concuerdan, ya que en esta última, fueron 10 veces menores que aquellos reportadas en la Figura 1. Es importante que en los estudios subsecuentes, se demuestre que la producción de la proteasa de *Streptomyces sp.* sea reproducible.

5.5 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO, A pH 7.

Los resultados obtenidos en la cinética de producción de la enzima proteasa por la bacteria *Streptomyces sp.* en cultivo en medio sólido se presentan en la Figura 5. Bajo las condiciones de ensayo, la enzima proteasa se expresó a partir de las primeras 20 h del cultivo, alcanzando su máxima expresión (1,500 U/L) a las 46 h de cultivo.

Es importante mencionar que en este cultivo, *Streptomyces sp.* produjo la enzima a una velocidad de 55 U/Lh, este valor fue obtenido de calcular el valor de la pendiente de la regresión lineal entre la actividad enzimática y el tiempo de cultivo, durante el periodo de producción (22 hasta las 46 h), (ver Figura 5.1)

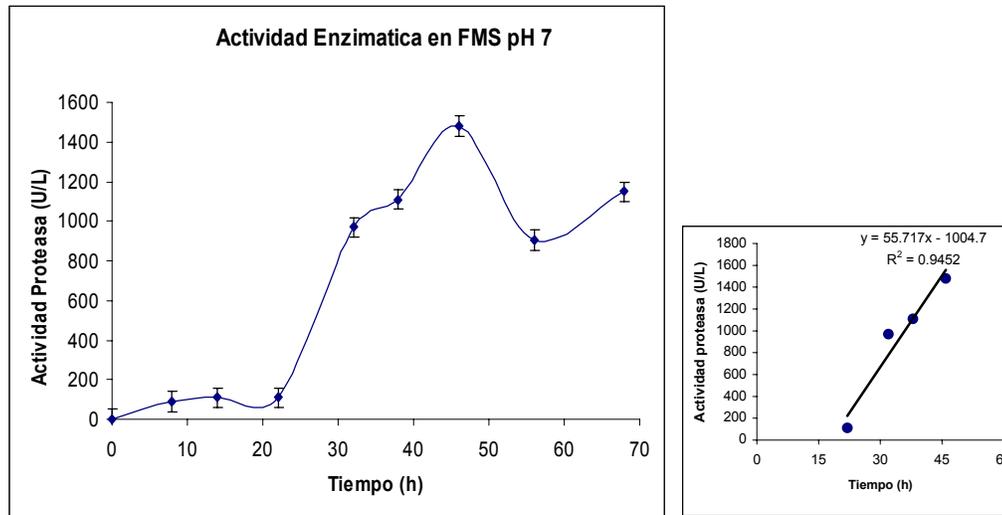


Fig. 5 Producción de proteasa en cultivo en medio sólido

Fig. 5.1 Velocidad de producción de la enzima (22-46 h de cultivo)

George y col., 1997, reportaron la producción de proteasa en títulos de hasta 250,000 U/g de soporte usando la cepa de *Bacillus amyloquefaciens*. Tunga y col., en 1998, reportaron que en cultivo en medio sólido *Rhizopus oryzae*, (produjo 310 U/g de proteasa usando como 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 resulta bastante complicado el tratar de tener criterios de comparación de los resultados obtenidos, ya que las variaciones entre los valores obtenidos en los reportes mencionados, han sido obtenidos con diferentes metodologías para ensayar la actividad proteasa, además, la forma de expresión en base a gramos de material húmedo fermentado, seco o en su caso, un soporte inerte; representan mas obstáculos para establecer de manera correcta, criterios de comparación entre los diferentes estudios.

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.

5.6 RESULTADOS DE BIOMASA, OBTENIDOS EN CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO.

En el presente estudio, el crecimiento bacteriano de *Streptomyces sp.* fue evaluado en ambos sistemas de cultivo. Sin embargo, en cultivo en medio sólido, los métodos indirectos de estimación de la biomasa no fueron lo suficientemente reproducibles como para reportar los valores obtenidos, teniéndose que omitir hasta en tanto no se haya desarrollado una 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 mas de 20 los métodos reportados, sin embargo, todos tienen serias desventajas de aplicación. Por tal motivo, en el presente documento solo se reportan los valores de la estimación de la biomasa en cultivo líquido, el cual se evaluó gravimétricamente.

La Figura 6, presenta la cinética de crecimiento de *Streptomyces sp.* en cultivo en medio líquido, en un caldo de soya y tripticaseína. La fase de adaptación tuvo una duración aproximada de 8 horas, tiempo en el cual se alcanzan los valores máximos de producción, obteniendo valores de 11 g / L, permaneciendo hasta las 22 horas, enseguida comienza a disminuir; al llegar a las 60 horas esta tiende a mantenerse ligeramente su producción de biomasa.

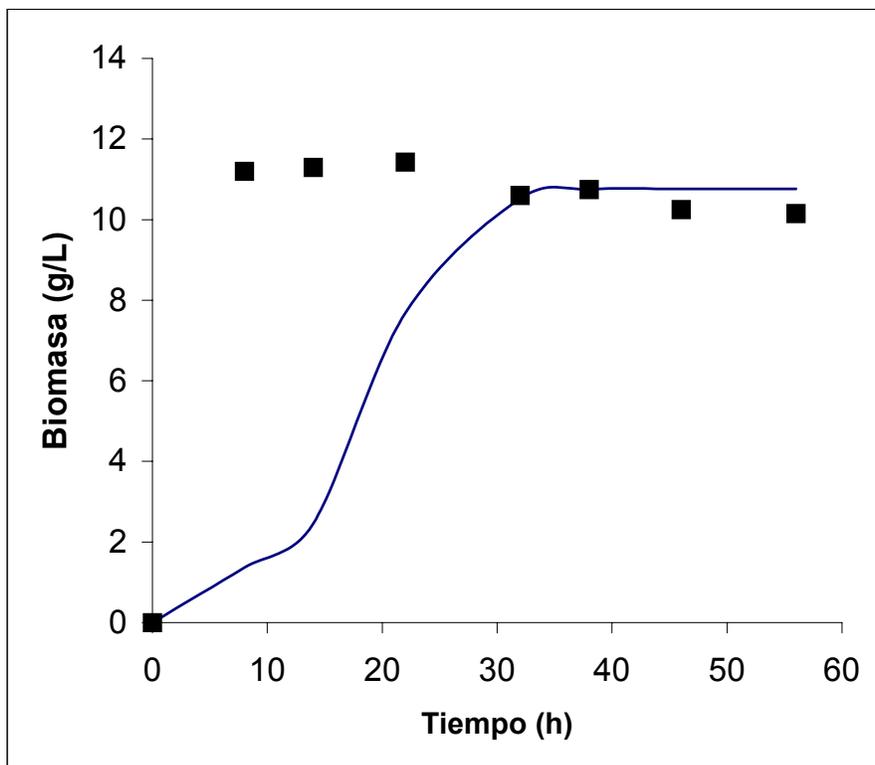


Fig. 6 Producción de biomasa de *Streptomyces sp* en cultivo en medio líquido. La línea sólida representa los valores calculados con la ecuación logística de crecimiento microbiano y los cuadros son los valores experimentales

El patrón de producción de biomasa en cultivo en medio líquido obtenido, inicia a las primeras 8 horas de incubación, con 11 U/L, y permaneciendo constante durante todo el periodo; estos resultados son 5 veces mayores comparados con lo reportado por O'Donnell y col., (2001), en donde utilizaron *A. niger* obteniendo aproximadamente 2 g/L en un medio con pH 7 a las 46 horas, mientras que aun pH de 3 obtienen aproximadamente 5 g/L de biomasa a las 52 h. Romero, (2001); obtuvo 11.3 g/L, a las 72 horas de cultivo, usando 50 g/L de

sacarosa como sustrato; mientras que al utilizar 100 g/L de sacarosa, obtiene 13 g/L de biomasa en 60 horas de cultivo. Estos resultados tampoco concuerdan con los obtenidos en esta investigación, aunque son similares en cuanto a la cantidad de biomasa producida, difieren en cuanto al tiempo de producción, las dos referencias antes mencionadas reportan 46 y 60 horas respectivamente contra 8 horas en la presente investigación.



CONCLUSIONES

En el presente estudio de investigación, en base a los objetivos planteados y los resultados obtenidos, se emiten las siguientes conclusiones.

La proteasa bacteriana producida en el ensayo preliminar de pH (5, 7 y 9), los títulos de producción no tuvieron variación significativa, por lo cual el microorganismo es capaz de adaptarse a cualquiera de los pH's evaluados.

La cepa de *Streptomyces sp.* excretó los mayores títulos de producción en cultivo en medio sólido a las 48 horas con 1500 U/L; sin embargo en cultivo en medio líquido inició a las 8 horas y permaneció constante con 600 U/L aprox.

Se concluye que el mejor sistema de producción de la enzima bacteriana extracelular, en función del tiempo se obtiene en cultivo en medio líquido, utilizando la cepa de *Streptomyces sp.*, usando como inductor tripticaseína y soya (TSB) en esta investigación.

Este trabajo de investigación sienta las bases para producir la enzima proteasa bacteriana, utilizando como soporte inerte el poliuretano.



Capítulo 7

RECOMENDACIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, podemos hacer mención de algunas recomendaciones que pueden ayudar a resolver algunas controversias generadas en este trabajo realizado.

Se recomienda hacer un estudio detallado, de los factores que afectan la disminución de la producción enzimática en la segunda etapa de producción.

Realizar cinéticas del consumo de sustratos; llevar a cabo la purificación de la enzima y determinar el peso molecular de la misma.



Capítulo 8

BIBLIOGRAFIA

Aguilar, C. N. 1998. Producción de enzimas en sistemas de fermentación. Reporte interno. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico, 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* 1326. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 417-424.

Basgaran, V., V. Hardisson, and A. Brana. 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.

Chávez-Camarillo, G.M. 1995. Estudios de la X-prolil 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. Microbiol. Immunol.* **28**: 109-116.

Christen, 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* 3T5B8. *Process Biochemistry.* **36**: 255-261.

Dixon, M., E.C. Web. 1979. *Enzymes*, Longam, London, 3rd ed., pp. 1-6, 874-900.

Ferreira, G., Boer, C. G. And Peralta, R. M., 199. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamaritii* in solid-state fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.*, **173**, 335-339.

Frederick, G. D., Rombouts, P. and Buxton, F. P., 1993. Cloning and characterization of PEPC, a gene encoding a serine protease from *Aspergillus niger*. *Gene*, **125**, 57-64.

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

Gandolfi, B. C. and Marina, P. R. 2000. Production of extracellular proteases by *Aspergillus tamaritii*. J. Basic. Microbiol. **40**; 2, 75-81.

George, S., V. Raju, V. Subramanian & K. Jayaraman. 1007. Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. *Bioprocess Eng.* **16**: 381-382.

Ghildyal, P., M. Ramakrishna, B. Losane y 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 y 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 *Trichoderma 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. Córdova, R. Auria, S. Revah y E. Favela Torres. 1995. "Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support". *Biotechnol. Letters.* **17**: 219-224.

Gutiérrez-Rojas, M., A.A. Hosn, R. Auria, S. Revah 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.

Hanzon, M. A. and Marzluf, 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 adenylate 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 an *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. "Proteinases 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 conditions for use as a depilation agent. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 712-716.

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

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

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

North, M. J., 1982. Comparattive biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microb. Rev.*, **46**, 308-340.

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

Romero, G. S. J. 2001. Production de Invertasa por *Aspergillus niger* en Fermentación en Medio Líquido y Fermentación Sólida. Tesis de Doctorado. UAM.

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

Oriol, E., Schettino, B., Viniegra-González, G., Rimbault, 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., K. Sato. y Y. Endo. 1996. "Repeated batch production of alkaline protease by solid-state fermentation using urethane foam as carriers". *Process Biochem.* **14:**63-68.

Pandey, A., *Process Biochem.*, 1992, **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 proteases. 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., Pág., 11,223, 226, 231-235, 265-267.

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

Rimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 1 (3) in **Electronic Journal of Biotechnology.** www.ejb.org

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. Pokorny, Lj. Vitale, and V. Turk. 1981. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 2. Isolation and characterization of serine alkaline proteinase. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **11**: 166-171.

Renko, M., Lj. Vitale. M. Kokalj, and M. Pokorny, 1989. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 4, Trypsin-like proteinase. Appl. Microbiol. Botechnol. **31**: 38-44.

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

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

Sivori, E. 1986. Adenylic nucleotides and energy charge during the embryonic development of *Bufo arenarum*. Comp. Biochem. Physiol. **85B**: 573-576.

Solomon, R. Growth of *Aspergillus*, in liquid fermentors. En **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., R. Banerjee., B. C. Bhattacharyya. 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. Pokorny. 1986. *Streptomyces rimosus* extracellular proteases. 3. Isolation and characterization of leucine aminopeptidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 449-455

Vukelic, B., A. Ritonja, M. Renko, M. Pokorny, and Lj. 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, *Biología de la Fermentación*, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España, Pág., 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 cultivations. *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., J. P. Smits, W. Knol, J. Bol. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. **Biotechnology Letters.** 16 (6): 643-648.

Zhu, Y., W. Knol, J.P. Smits y J. Bol. 1996. "Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier". *Process Biochem.* **18**: 108-112.