



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA PRODUCCION DE UNA PROTEASA DE
Aspergillus niger CON ACTIVIDAD COAGULANTE EN FERMENTACIÓN EN
ESTADO SÓLIDO Y FERMENTACIÓN SUMERGIDA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Teresa Andrade Rosas



MÉXICO, D.F.

2013

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Ortiz Jiménez Marco Antonio**

VOCAL: **Profesor: Camacho Cruz Alejandro**

SECRETARIO: **Profesor: Chávez Castillo Adán**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Camacho de la Rosa Norma Angélica**

2do. SUPLENTE: **Profesor: Ruiz Villafán Beatriz**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM

Dr. Adán Chávez Castillo

Asesor

Teresa Andrade Rosas

Sustentante

Índice.

Resumen.....	1
Lista de abreviaturas.....	3
Introducción.....	4
Objetivo general.....	5
Objetivos particulares.....	5
Hipótesis.....	5
I. Marco Teórico.....	6
II. Diseño Experimental.....	17
III. Resultados y Discusión.....	28
IV. Conclusiones.....	52
Prospectivas.....	53
Bibliografía.....	54
Apéndices.....	59

Resumen.

Los hongos son organismos eucariontes y heterótrofos que se encuentran en la naturaleza formando estructuras unicelulares como las levaduras, y otras estructuras más complejas como los hongos filamentosos. *Aspergillus niger* es un hongo filamentosos capaz de secretar una gran variedad de enzimas necesarias para degradar los nutrientes disponibles en su medio ambiente natural. Este hongo ha sido muy relevante en la producción a nivel industrial de diversos productos de gran importancia económica como el ácido cítrico y la glucoamilasa, por mencionar algunos. Un grupo muy importante de enzimas producidas a nivel industrial por el género *Aspergillus*, es el grupo de las proteasas, ya que ocupan cerca del 65% del mercado global de enzimas que se utilizan en la industria farmacéutica y de alimentos. Debido a la gran demanda de tales enzimas, en los últimos años se ha empleado la Fermentación en Estado Sólido (FES) como una alternativa viable para producirlas, ya que existen evidencias de que en éste tipo de fermentación hay una mayor producción de enzimas fúngicas en comparación con la Fermentación sumergida (Fsm).

El interés de este proyecto se centró en dos cepas de *Aspergillus niger*, la cepa 18 que secreta aproximadamente un 6.5% de una proteasa activa, capaz de coagular la leche, y a partir de dicha cepa, se produjo mediante mutagénesis con luz UV, una cepa denominada cepa 54, la cual produce una mayor concentración de proteasa total, pero con menor porcentaje de proteasa activa (5.9%) en relación a la cepa 18. Bajo esta premisa, se decidió probar la FES como una alternativa para aumentar la producción de proteasa activa, para ello se eligieron los sustratos más adecuados, el método de extracción, de concentración y posteriormente se comparó la capacidad de producción de proteasa activa tanto en FES como en Fsm, para lo cual se determinó la concentración total de proteasa producida mediante densitometría y la concentración de enzima activa mediante una prueba de coagulación en placa. Los resultados muestran que la cepa 54 produce 18.7% mas proteasa activa cuando es cultivada en FES; ya que se obtuvo 5.9% de proteasa activa al cultivar la cepa 54 en Fsm, comparado con el 24.6% de

proteasa activa producida por la cepa 54 en FES. En relación a la cepa 18, la cepa 54 produjo 22.41% más proteasa activa cuando ambas fueron cultivadas en FES, esto como resultado del mejoramiento genético de la cepa 54. Adicionalmente, en una prueba para evaluar la capacidad proteolítica del medio de cultivo proveniente de cada una de las condiciones evaluadas, se observó que es menor la hidrólisis de una proteína estándar (renina de estómago de ternero) en medios de cultivo provenientes de FES, comparada con la hidrólisis que se observó a partir de los medios de cultivo provenientes de Fsm.

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que la FES es una alternativa viable para producir la proteasa de interés en su forma activa a nivel piloto, y posteriormente a nivel industrial, empleando cepas de *A. niger* productoras de proteasas mejoradas genéticamente.

Abreviaturas utilizadas

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
DDG	Por sus siglas en inglés Dried Distillers Grain Grano seco de destilerías
GRAS	Por sus siglas en inglés Generally Regarded As Safe Generalmente Reconocidos como Seguro
FES	Fermentación en Estado Sólido
Fsm	Fermentación sumergida
FES-18	Fermentación en Estado Sólido-cepa 18
FES-54	Fermentación en Estado Sólido-cepa 54
Fsm-18	Fermentación sumergida-cepa 18
Fsm-54	Fermentación sumergida-cepa 54
MN	Por sus siglas en inglés Minimal Nutrients Medio Mínimo
mg	Miligramos
ng	Nanogramos
ml	Mililitros
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Por sus siglas en inglés Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (dodecil sulfato de sodio)
N-PAGE	Por sus siglas en inglés Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en condiciones nativas

Introducción.

Aspergillus niger es un hongo filamentoso que ha sido ampliamente utilizado en la industria de la fermentación por su gran capacidad para secretar una gran variedad de metabolitos y enzimas (amilasas, proteasas, etc.), además de presentar un metabolismo que le permite desarrollarse en diversos sustratos y bajo diferentes condiciones medioambientales (Sandhya *et al.*, 2005; Vishwanatha *et al.*, 2010). Las proteasas producidas por *A. niger* son utilizadas en una gran variedad de procesos, por ejemplo en la industria alimentaria para la elaboración de queso y clarificación de cerveza, en otras industrias como aditivo en polvos detergentes y textiles, por mencionar algunas. Las proteasas pueden encontrarse en plantas, animales y microorganismos, sin embargo son estos últimos la principal fuente de proteasas debido a su amplia diversidad bioquímica y susceptibilidad a manipulación genética.

A nivel industrial, la producción de enzimas a partir de microorganismos se realiza principalmente por fermentación sumergida (Fsm) aunque existe otro sistema de fermentación denominado Fermentación en Estado Sólido (FES). La FES ha llamado la atención de diversos grupos de investigación en los últimos 20 años y ha ganado la credibilidad entre algunas corporaciones industriales debido a las ventajas que posee en comparación con la Fsm. Algunas de estas ventajas son que es un método sencillo y de bajo costo, además de que permite la obtención de mayores cantidades de producto final (Pandey 2003, Singhanía *et al.*, 2009).

Por lo antes mencionado, la finalidad del presente trabajo fue probar la eficacia de FES en comparación a Fsm como una alternativa para la producción de una proteasa con actividad coagulante de interés industrial a partir de dos cepas de *Aspergillus niger*.

Objetivo general.

Comparar la producción y actividad de una proteasa de interés industrial producida por dos cepas de *Aspergillus niger* (cepa 18 y cepa 54) empleando Fermentación en Estado Sólido y Fermentación sumergida.

Objetivos particulares.

- Elegir el o los mejores sustratos para llevar a cabo la Fermentación en Estado Sólido con la cepa 18 y la cepa 54 de *A.niger* productoras de la proteasa de interés.
- Evaluar si la mezcla de diferentes sustratos aumenta la producción de la proteasa.
- Seleccionar las mejores condiciones de extracción para la enzima de interés.
- Cuantificar y comparar la producción total de proteasa en Fermentación en Estado Sólido y en Fermentación sumergida.
- Cuantificar y comparar la cantidad de proteasa activa producida tanto en Fermentación en Estado Sólido como en Fermentación sumergida entre la cepa 18 y la cepa 54.

Hipótesis.

Se ha comprobado que dos cepas de *A. niger* (cepa 18 y cepa 54) son capaces de secretar bajas concentraciones de una proteasa capaz de coagular la leche al ser cultivadas en Fermentación sumergida, puede entonces la Fermentación en Estado Sólido ser una alternativa para la producción de esta proteasa con un mayor rendimiento y actividad.

I. Marco teórico.

Hongos filamentosos.

Los hongos son organismos eucariontes constituidos por células que poseen organelos y un núcleo rodeado por membrana, son heterótrofos, ya que no pueden realizar fotosíntesis por carecer de clorofila y, por lo tanto, deben utilizar fuentes de carbono a partir de compuestos orgánicos. Estos microorganismos se nutren por absorción; es decir, sólo son capaces de incorporar nutrientes simples y solubles. Se caracterizan por ser inmóviles, presentan una pared celular rígida que en la mayoría de los casos está compuesta principalmente de quitina. Son ubicuos de ambientes terrestres, agua dulce y en ambientes marinos se les encuentra muy poco (Webster *et al.*, 2007).

Los hongos filamentosos están constituidos por un conjunto de filamentos llamados hifas, cuyo conjunto constituye el micelio. La hifa es un tubo de pared celular que contiene masa citoplasmática y muchos núcleos, pueden poseer septos a intervalos regulares o carecer de ellos. Cuando un hongo presenta hifas no septadas se dice que su micelio es cenocítico. En los hongos con hifas septadas, la existencia de un fino poro en cada septo y de corrientes citoplasmáticas permite la circulación del citoplasma y, en algunos casos de los núcleos a lo largo de la hifa (Tortora, 2007).

El micelio según su función se diferencia en micelio vegetativo y micelio aéreo o de reproducción. El micelio vegetativo está constituido por las hifas que crecen dentro y sobre el sustrato que contiene los nutrientes. Las hifas crecen por extensión apical o de las puntas y se multiplican por ramificación. En los extremos de estas células es donde se lleva a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la secreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de sustratos complejos. En cambio el micelio aéreo o de reproducción está constituido por estructuras aéreas llamadas esporas o conidias que se originan a partir del micelio vegetativo y, como su nombre lo

indica, cumple funciones relacionadas con la reproducción y multiplicación (Romero, 2001).

Los hongos filamentosos han sido ampliamente utilizados en la industria de la fermentación para la producción de ácidos orgánicos (ácido cítrico) antibióticos (penicilina), esteroides, vitaminas y enzimas (amilasas y proteasas). Además estos son atractivos para dicha producción por su habilidad para usar sustratos baratos derivados de plantas o fuentes orgánicas para la fermentación, y especialmente por su habilidad para secretar una amplia variedad de enzimas y en una gran cantidad al medio (Talabardón, 2005).

Aspergillus niger.

Aspergillus niger es un miembro de la familia de los *Aspergillus*, es un hongo filamentoso y se encuentra dentro de la clasificación del reino *Chytridiomycota* siendo éste el género más abundante (Bonifaz, 2010). Se caracteriza por presentar micelio septado, hialino, esporas asexuales llamadas conidios las cuales se encuentran en una estructura llamada conidióforo que al llegar a la madurez adquiere la forma de un aspensor, el cual origina el nombre del género. *A. niger* secreta una gran cantidad y variedad de enzimas que necesita para degradar los nutrientes disponibles. Presenta un metabolismo notablemente versátil, lo que le da la facultad de crecer en un amplio rango de sustratos bajo diferentes condiciones medio ambientales. (Pel *et al.*, 2007). Es causante de una serie de enfermedades denominadas aspergilosis junto con *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* y que resultan en reacciones de tipo alérgico o, para el caso de personas con deficiencias inmunitarias verdaderas infecciones, pues generalmente el sistema inmunitario puede combatir la invasión por *Aspergillus*.

Pocos microorganismos comparados con *Aspergillus niger* tienen la habilidad de producir una amplia variedad de metabolitos y enzimas. Este hongo es la principal fuente de ácido cítrico utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica, y

muchas enzimas comerciales incluyendo glucoamilasa que es utilizada ampliamente en la industria para la fabricación de alcohol (biocombustible) (Cullen, 2007). Ha sido utilizado como modelo de estudio en diversas áreas incluyendo la secreción de enzimas en eucariontes, mecanismos moleculares críticos para el desarrollo de los procesos de fermentación y mecanismos que involucran el control de la morfología fúngica (Baker, 2006).

Definición y clasificación de enzimas.

Se denominan catalizadores a las sustancias capaces de acelerar una reacción química sin experimentar alteraciones permanentes. En las células vivas los catalizadores biológicos son las enzimas. Como compuestos catalizadores, cada enzima actúa sobre una sustancia específica denominada sustrato y cataliza exclusivamente una reacción. Las enzimas por lo general consisten en proteínas globulares de gran tamaño. Poseen una conformación tridimensional característica y una configuración superficial específica como consecuencia de sus estructuras primaria, secundaria y terciaria. Muchas enzimas intracelulares se encuentran en las formas activa e inactiva. La velocidad con la que una enzima pasa de una de estas formas a la opuesta depende del medio celular. (Tortora, 2007)

Los nombres de las enzimas usualmente termina con el sufijo –asa. Las enzimas se pueden clasificar en seis clases según el tipo de reacción química que catalicen. Las enzimas clasificadas dentro de cada uno de estos seis grupos principales se denominan según el tipo más específico de reacciones que catalicen, como se puede observar en la Tabla 1. (Nelson, 2000).

Clase	Tipo de reacción química que cataliza	Ejemplos
Oxidorreductasas	Oxidación y reducción, con ganancia o pérdida de oxígeno e hidrógeno	Citocromo oxidasa, lactato deshidrogenasa
Transferasas	Transferencia de grupos funcionales, como grupos amino, acetilo o fosfato	Acetato cinasa, alanina desaminasa
Hidrolasas	Hidrólisis.	Lipasa, sacarasa
Liasas	Eliminación de grupos de átomos sin hidrólisis	Oxalato descarboxilasa, isocitrato liasa
Isomerasas	Reordenamiento de los átomos en el interior de una molécula	Glucosa fosfato isomerasa, alanina racemasa
Ligasas	Unión de dos moléculas(por lo general con energía derivada de la escisión del ATP)	Acetil-CoA sintetasa, DNA ligasa

Tabla 1. Clasificación de las enzimas según el tipo de reacción química que catalizan.

Proteasas.

Las proteasas pertenecen al grupo de las hidrolasas. Catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo ácido de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua. Estas enzimas son fisiológicamente necesarias para la existencia de los organismos, encontrándose en una amplia diversidad de fuentes como plantas, animales y microorganismos (Rao *et al.*, 1998).

Las proteasas de origen microbiano son preferidas sobre las de origen vegetal y animal ya que se elaboran en grandes cantidades y a un bajo costo. Respecto a los procesos de obtención de enzimas, el fermentativo tiene una serie de ventajas sobre el de extracción de tejidos animales y vegetales; entre esas ventajas, se pueden mencionar:

- La alta velocidad de síntesis.
- El elevado rendimiento de conversión del sustrato.

- El proceso de fermentación no es estacional.
- No requiere grandes extensiones de terreno (Hernández *et al.*, 2003).

Las proteasas son activas en un amplio rango de pH (pH 2 a 13) y exhiben una buena especificidad por su sustrato. Se han clasificado en proteasas ácidas, neutras y básicas en base al rango de pH en el que tienen una actividad óptima. Las proteasas ácidas tienen una actividad entre pH 2 y 6. Las proteasas neutras tienen actividad a valores de pH cercano a la neutralidad y en condiciones ácidas su actividad disminuye. Las proteasas alcalinas tienen una actividad en un rango de pH 8 a 13 (Rao *et al.*, 1998; Sandhya *et al.*, 2005).

Proteínas de origen fúngico.

La producción de proteínas, ya sea homólogas o heterólogas en hongos filamentosos es usualmente muy eficiente y los niveles de producción alcanzados son de gramos por litro, en especies de *Aspergillus* y *Trichoderma* se ha reportado que pueden secretar más de 20 g/l de proteínas homologas en procesos de fermentación, como por ejemplo la celulasa o la glucoamilasa (Gouka *et al.*, 1997). Se sabe que hoy en día las especies de *Aspergillus* dominan la lista de organismos para la producción comercial de enzimas. Especies de éste genero se conocen por su excepcional habilidad para secretar una gran cantidad de enzimas homólogas; por ejemplo *Aspergillus oryzae* produce un proteasa neutra en FES y Fsm (Sandya *et al.*, 2005). En el caso de *Aspergillus niger* también se ha reportado la producción en FES de enzimas hidrolíticas como la xilanasas (Kavya *et al.*, 2009) y las pectinasas en FES y Fsm (Solís *et al.*, 1993). Muchos de estos productos han sido **generalmente reconocidos como seguro (GRAS)**, que es una característica importante para su empleo a nivel industrial (Pel *et al.*, 2007).

Una interesante alternativa para la producción de enzimas puede ser el uso de condiciones de cultivo como la FES, la cual ha demostrado un mejoramiento en la producción de una amplia gama de enzimas de cepas fúngicas. Además se ha

encontrado que diferentes condiciones de cultivo pueden modificar la expresión de ciertos genes afectando el fenotipo, crecimiento y producción de enzimas (Téllez *et al.*, 2006; Braaksma *et al.*, 2009).

Proteasas con actividad coagulante.

Las proteasas ocupan una posición central a nivel industrial, ocupando cerca del 60 % del mercado global de enzimas. Estas son utilizadas extensamente en la industria de detergentes, pieles, farmacéutica, cosmética y alimentaria. En la industria de alimentos el uso de las proteasas se incluye en la elaboración del queso, cerveza y la producción de hidrolizados de proteína. (Aguilar *et al.*, 2008)

El aumento en la demanda de proteasas para la producción de quesos, junto con la escasez mundial en la producción de cuajo de ternera, han hecho necesaria la búsqueda de alternativas para la sustitución del cuajo, y entre ellas esta la producción de enzimas de origen microbiano para la coagulación de la leche. La industria del queso tiene una gran demanda de proteasas ácidas que ayudan a la coagulación de la leche, aparte de jugar un rol importante en el desarrollo del sabor y textura. Aproximadamente cerca del 33 % de enzimas microbianas fúngicas han remplazando la renina (cuajo) de origen animal para coagular leche. Algunas proteasas fúngicas que se han propuesto para sustituir a la de origen animal incluyen las de *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Mucor baciliformis*, *Penicillium oxalatum* y *Endothia parasítica* (Vishwanatha *et al.*, 2010).

Fermentación.

El concepto microbiológico de fermentación, se define como aquel proceso en que los microorganismos producen metabolitos o biomasa, a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de los sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas por los microorganismos. Durante estas reacciones se producen compuestos útiles para el hombre y es

común hablar de fermentaciones para referirse, en el ámbito industrial, a los procesos microbiológicos de producción de tales compuestos (Hernández 2003).

El proceso de fermentación se conoce desde hace mucho tiempo; sin embargo cada día se estudian nuevas técnicas para mejorarlo; ya sea mediante el mejoramiento del microorganismo o la selección de los medios de producción óptimos, así como el control de los diversos parámetros para determinar el crecimiento y producción del microorganismo. Se conocen dos tipos de fermentación como son: (1) Fermentación sumergida (Fsm) tanto en suspensión como con células inmovilizadas y (2) Fermentación en Estado Sólido (FES). La primera involucra aquellos procesos con los agentes biológicos inmersos en la fase acuosa; y la fermentación sumergida con células inmovilizadas es semejante a la anterior, excepto que los agentes biológicos están unidos a un soporte insoluble en agua. Con respecto a la FES, ésta emplea materiales insolubles en agua y con poca agua en el sistema de fermentación (García *et al.*, 1993).

Fermentación en Estado Sólido.

La FES ha sido definida como el proceso de fermentación que involucra una matriz sólida y se lleva a cabo en ausencia o casi ausencia de agua libre; sin embargo el sustrato posee suficiente humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo (Singhania *et al.*, 2009).

La FES es un proceso conocido desde tiempos ancestrales. Los hongos filamentosos son el grupo más importante de microorganismos utilizados en FES debido a su fisiología y propiedades bioquímicas. El ejemplo típico es la fermentación del arroz por *Aspergillus oryzae* que se utiliza para elaborar el koji y *Penicillium roquefortii* para la producción de queso. En China la FES ha sido utilizada desde hace mucho tiempo para producir alimentos fermentados. Entre 1900 y 1920 comenzó a desarrollarse la producción de enzimas fúngicas, para 1940 y 1950 hubo un gran desarrollo de industria de la FES para la producción de

penicilina. En Japón es usada industrialmente para la producción de enzimas y en Brasil se llevan a cabo proyectos relacionados con productos agrícolas tropicales desde 1986 (Rodríguez *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006).

La FES es un método de cultivo alternativo que ha ganado la atención y credibilidad de investigadores y algunas corporaciones industriales en los pasados 20 años (Barrios, 2012). Además de otras muchas aplicaciones, los sistemas de FES moderna tienen un historial exitoso en aplicaciones para la producción de enzimas microbianas, metabolitos y compuestos bio-activos. Esto ha generado interés en la FES porque la cantidad de proteínas (incluidas enzimas) secretadas por hongos filamentosos en este sistema es mayor y frecuentemente excede a la cantidad obtenida en Fsm (Viniegra *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2005).

Aspectos generales de la FES.

Existen varios aspectos importantes que deben ser considerados para el desarrollo de cualquier proceso en FES: la selección del microorganismo y sustrato adecuados, optimización de los parámetros del proceso, recuperación y purificación del producto. (Pandey, 2003; Singhanía *et al.*, 2009)

Sólo los hongos filamentosos y algunas levaduras han demostrado ser aptos para ser empleados en procesos de FES, por su baja demanda de agua y habilidad para crecer en diversas condiciones medioambientales; sin embargo se ha demostrado que los cultivos de bacterias pueden ser manipulados y manejados para realizar cultivos en FES. (Pandey, 2003)

La selección de un sustrato adecuado es otro aspecto importante en FES. Se distinguen dos clases de cultivos sólidos: el primero se refiere al material sólido que puede ser insoluble, actuando como soporte físico y fuente de nutrientes; o que puede aportar sólo algunos nutrientes. El material sólido puede ser un sustrato natural, por ejemplo los residuos de cultivos agrícolas o residuos

agroindustriales Debido a su doble función, este tipo de sustrato puede denominarse también sustrato-soporte. En la segunda clase se consideran los cultivos en los que el soporte es un sólido nutricionalmente inerte que actúa únicamente como lugar de anclaje del microorganismo y que, para el cultivo, se embebe en una solución nutritiva. En relación a la elección del sustrato, se puede hacer en base a dos consideraciones: que sea un sustrato específico para obtener un producto con valor agregado o mejores características, por ejemplo termo estabilidad y que se obtenga un producto específico a partir de un sustrato o mezcla de sustratos (Rodríguez *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2007).

Otra cuestión relevante puede ser la selección de parámetros en el proceso y la optimización: esto incluye parámetros bioquímicos y fisicoquímicos como el tamaño de partícula, humedad inicial, temperatura de incubación, agitación y aireación, edad y tamaño del inóculo, suplementación de nutrientes como nitrógeno, fósforo y elementos traza, inclusive la adición de fuentes de carbono y nutrientes, extracción del producto final y purificación (Pandey, 2003).

Ventajas de la FES.

La FES presenta una serie de ventajas de carácter general frente a otros procesos de fermentación, como la Fsm (Pastrana 1996; Viniegra *et al.*, 2003; Hölker *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2008).

- El medio de cultivo es simple. Algunos sustratos pueden ser utilizados directamente o el medio sólido puede ser enriquecido con nutrientes.
- El producto de interés se encuentra concentrado, lo que facilita su purificación. Necesidades reducidas de solventes para la extracción del producto. Además se ha observado que las enzimas producidas son estables a un rango de pH y temperatura mayor.
- Rendimientos comparables, e incluso superiores a los obtenidos en Fsm.
- Baja demanda de esterilidad.

- Ambiente similar al de los hábitats naturales de los microorganismos utilizados; mejorando el desempeño del microorganismo cultivado.
- Mezcla de microorganismos en el cultivo; sinergismo para el desempeño metabólico.
- Mayor simplicidad en el diseño de los fermentadores y de los sistemas de control, bajos volúmenes del equipamiento y por lo tanto disminución general de costos.
- Bajos requerimientos energéticos. A menudo no es necesario esterilizar, airear ni agitar.
- Utilización de fuentes de carbono que de otra manera no se podrían utilizar.
- La cantidad de desechos es mínima comparada con la Fsm.
- Baja represión catabólica. Hay diferencias en los niveles de expresión genética, dependiendo del proceso de fermentación empleada.
- En FES la degradación del producto de interés es ocho veces menor que en Fsm (Hölker *et al.*, 2004).

Entre los inconvenientes inherentes al proceso deben mencionarse:

- El uso de los microorganismos está limitado a aquellos que crecen en niveles reducidos de humedad. En este caso los hongos son los más empleados, seguidos por las levaduras y finalmente las bacterias.
- Necesidad frecuente de pre-tratamiento de los sustratos (molienda, hidrólisis parciales).
- Ausencia de métodos para determinar o monitorear el crecimiento.
- La determinación de parámetros como la humedad, pH, temperatura, transferencia de oxígeno, constituye un problema debido a la falta de dispositivos que usualmente se asocian con la Fsm.
- Dificultad para la agitación en aquellos procedimientos que así lo requieran.
- Aunque el escalamiento de dicho proceso ha sido estudiado, el éxito de este no siempre ha sido posible.

Se sabe que diferencias en las condiciones de cultivo entre la FES y la Fsm puede alterar la expresión de varios genes, su crecimiento, desarrollo y producción de enzimas y otros metabolitos como micotoxinas (Iwashita 2002)

FES en México.

En México existe una compañía llamada ALLTECH S.A de C.V., es una empresa que se dedica a producir alternativas naturales para la alimentación y producción animal que comenzó su historia en México desde 1986. Actualmente, México es su segundo mercado más grande de América Latina. Con dos plantas de producción en Ciudad Serdán, Puebla; ALLTECH México es la única empresa del continente americano en producir enzimas con tecnología de FES. El producto que tiene en el mercado es Allzyme SSF® que es una sinergia de siete enzimas producidas por FES que mejora la digestibilidad del alimento y puede utilizarse en aves y cerdos. (Pagina web 1). Es una empresa que además se ha involucrado en el diseño de fermentadores y condiciones de escalamiento (Pandey *et al.*, 2000).

II. Diseño experimental.

El interés que se tiene en la cepa 18 de *Aspergillus niger* es por su capacidad de secretar una proteasa de interés industrial, capaz de coagular la leche. Por este motivo se decidió probar la Fermentación en Estado Sólido (FES) como alternativa para la producción y actividad de esta proteasa. Adicionalmente, en el laboratorio se produjo una cepa mutante, mediante radiación UV, a partir de la cepa 18, con el objetivo de obtener una cepa sobreproductora de proteasa en Fermentación sumergida (Fsm), esta cepa fue denominada cepa 54.

El proyecto se realizó en dos etapas:

1. Selección de los sustratos más adecuados para producir la proteasa de interés empleando la cepa 18 y 54 en FES, y encontrar las mejores condiciones de extracción y concentración de dicha proteasa.
2. Evaluación comparativa de la producción total de proteasa y proteasa activa entre la cepa 18 y 54 en FES y Fsm.

Microorganismos y conservación.

Se utilizó una cepa silvestre de *Aspergillus niger* (cepa 18) y una cepa mutante obtenida mediante tratamiento con radiación ultravioleta (cepa 54), las cuales fueron conservadas en tubos de Agar Papa Dextrosa (PDA) inclinado a 4°C y resembradas cada 2 meses.

Para la obtención de esporas se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de PDA, fueron inoculados con la cepa correspondiente de *A. niger* y se incubaron durante 5 a 7 días a 30°C. Las esporas fueron cosechadas agregando de 15-20 ml de Tween 20 al 0.1%(v/v), agitadas vigorosamente y filtradas para separarlas del micelio y restos de agar (Apéndice II), el filtrado se

centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados adicionales con agua destilada estéril y finalmente el pellet se resuspendió en glicerol al 20% y las esporas se almacenaron a -70°C hasta su uso posterior.

Conteo de esporas.

Se diluyó la suspensión de esporas (10^{-3}) y se realizó el conteo en una cámara de Neubauer, en la cual se colocaron 10 μ l de suspensión de esporas.

Para determinar el número de esporas por mililitro se contaron las esporas contenidas en 5 cuadros grandes de la cámara de Neubauer dentro de la zona roja (Figura 1), se obtuvo el promedio del conteo* y se sustituyó en la siguiente fórmula. Se realizó lo mismo para ambos cuadrantes de la cámara.

$$\text{Número de esporas/ml} = (\text{promedio}^*) (25) (10^4) (Fd)$$

Donde:

Promedio: media aritmética del número de esporas en los cuadrantes.

25: Número de cuadrantes en los que se realizó el conteo.

10^4 : factor de volumen de la cámara de Neubauer

Fd: Factor de dilución de las esporas.

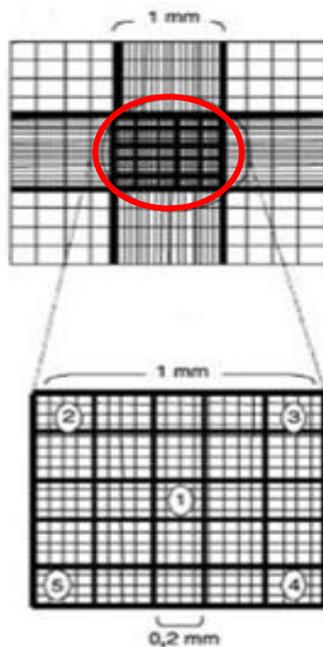


Figura 1. Vista del cuadrante central de la cámara de Neubauer con los 5 cuadros seleccionados para el conteo de las esporas dentro de la zona roja.

Fermentación en Estado Sólido (FES).

Dentro de la primera etapa del proyecto se hizo una selección de los mejores sustratos para la producción de la proteasa de interés con la cepa 18 en Fermentación en Estado Sólido (FES). Se probaron dos clases de sustratos: asimilables y nutricionalmente inertes.

Preparación del pre-inóculo.

En la FES es importante considerar la edad y tamaño del inóculo (Pandey 2003). Para los sustratos nutricionalmente asimilables se realizó un pre-inóculo de 24 horas en medio líquido en 50 ml de medio MN pH 5.5 con una concentración de esporas de 1×10^7 esporas/gramo de sustrato en un matraz Erlenmeyer de 250 ml incubado a 29°C a 250 rpm (Sivaramakrishnan *et al.*, 2007). Para los sustratos

nutricionalmente inertes la concentración de esporas fue de 2×10^7 esporas/gramo incubado bajo las mismas condiciones (Aranda *et al.*, 2006, Treviño *et al.*, 2007).

Sustratos asimilables.

La Fermentación en Estado Sólido se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 10 gramos de sustrato previamente esterilizado. Los sustratos asimilables empleados fueron: sorgo, sema, harina de trigo, níjer, DDG (Dried Distillers Grain), palenquitina, maíz, celulosa, cáscara de naranja, alberjón, avena, almidón de maíz, salvado de trigo, garbanzo, pectina y trigo molido. A cada matraz se agregaron 15 ml del inóculo lo cual da como resultado un porcentaje de humedad del 60%, la cual se recomienda para el crecimiento de hongos microscópicos en Fermentación en Estado Sólido (Díaz *et al.*, 2007)

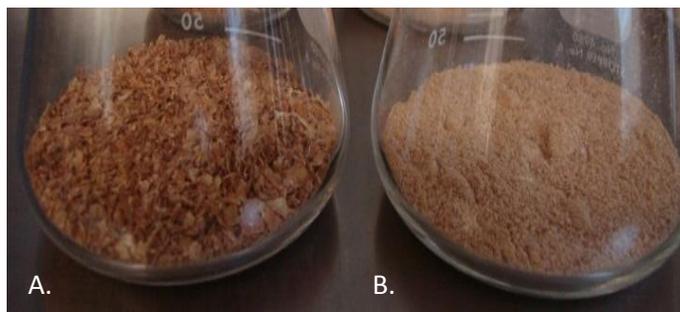


Figura 2. Ejemplo de dos sustratos asimilables empleados para Fermentación en Estado Sólido. A. Salvado de trigo molido. B. Salvado de trigo.

Sustratos inertes.

Como sustratos inertes se probaron dos tipos de poliuretano de diferente densidad: 23 kg/m^3 y 17 kg/m^3 ; guata y gasa. El poliuretano se cortó en cubos de aproximadamente 5 mm^3 . La gasa se cortó en círculos de aproximadamente 5 cm de diámetro que cubrieran la base interior del matraz. Los cuatro sustratos se lavaron 3 veces únicamente con agua caliente, se enjuagaron con agua destilada,

se escurrieron y se secaron a 70°C durante 24 horas. Posteriormente se pesó 1 gramo de cada sustrato y se mezcló con 25 ml de inóculo dentro de cada uno de los matraces Erlenmeyer de 250 ml (Romero 2001; Treviño *et al.*, 2007).

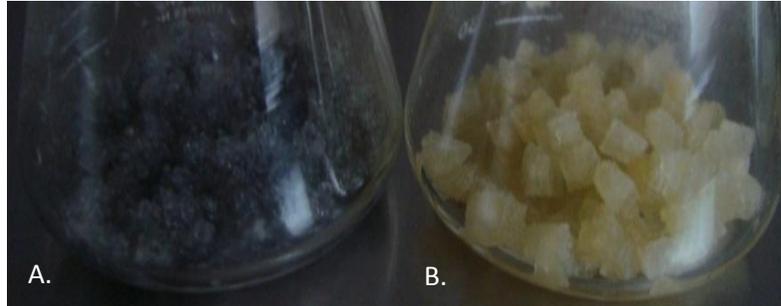


Figura 3. Ejemplo de dos sustratos inertes para la Fermentación en Estado Sólido. Muestra de poliuretano listo para inocular. A: densidad 17 kg/m³. B: densidad 23 kg/m³.

Durante el tiempo que duró la fermentación (120 horas), se tomó una muestra cada 24 horas y se almacenaron a 4°C para su posterior análisis. Los sustratos fueron mezclados por lo menos tres veces al día agitando manualmente el matraz procurando que el sustrato en el que no había crecimiento quedara más expuesto a la oxigenación.

Extracción de enzima y concentración.

Al término de la fermentación, se realizó la extracción de la proteasa de interés, adicionando 1 ml de amortiguador de Acetato de Sodio pH 5.5 (Anexo I) por cada 2 g de sustrato, se homogenizó y se incubó a 29°C a 10 rpm durante 30 minutos (Bando *et al.*, 2011). La proteasa se extrajo mediante una prensa francesa, el sobrenadante fue centrifugado durante 5 minutos a 13000 rpm y se filtro por gravedad vaciando la mezcla sobre un embudo de 75 mm de diámetro que contenía papel filtro Whatman 3MM Chr. Después el filtrado se concentró aproximadamente 10 veces con acetona (Rosemberg 1996) (Anexo II) y se refrigeró a 4°C para el posterior análisis de las muestras.

Para optimizar las condiciones de extracción se utilizaron diferentes solventes; Tween 80 (0.1%), Tween 80 (0.01%), agua destilada y Buffer de acetatos pH 5.5, dos diferentes temperaturas de extracción 4 y 29°C. También se modificó la velocidad de agitación (150, 180 y 5 rpm) y dos diferentes tiempos de extracción 30 y 60 minutos (Díaz *et al.*, 2007).

Fermentación Sumergida (Fsm).

La Fsm se realizó en matraces Erlenmeyer de 150 ml con 25 ml de medio MN pH 5.5 empleando un inóculo de 24 horas a 29°C y a 250 rpm con una concentración inicial de esporas de 1×10^8 esporas/ml. Se tomaron 1.5 ml de este cultivo y se adicionaron al matraz con medio MN, descrito anteriormente. Las muestras se tomaron cada 24 horas y se conservaron a 4°C para su posterior análisis.

Cuantificación del crecimiento y pH del medio de cultivo.

El crecimiento se determinó en base al peso seco, para lo cual se colocaron círculos de papel filtro Whatman No. 1 (55 mm) a peso constante en una mufla a 75 °C durante 24 horas. Posteriormente se filtraron las muestras con un equipo Millipore y se volvieron a poner las muestras a peso constante a 75°C durante 24 horas. Determinando la cantidad de biomasa en cada muestra por diferencia de peso.

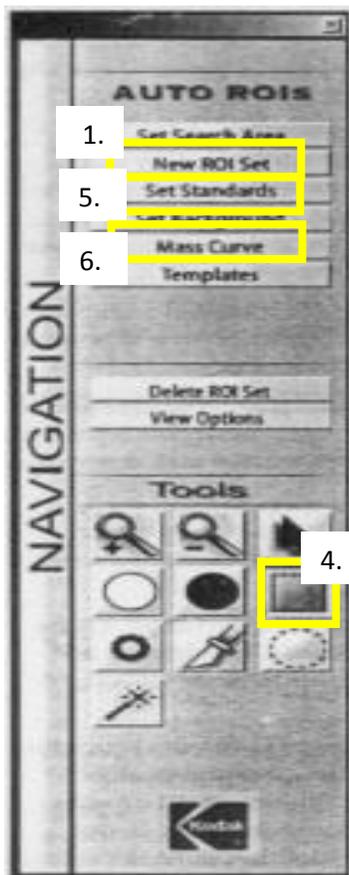
Para la medición del pH en la Fsm se realizó directamente con el sobrenadante. En el caso de la FES después de haber hecho la extracción con el amortiguador de acetato de sodio pH 5.5 y la prensa francesa se midió el pH a lo obtenido de dicho proceso.

Detección de la proteasa mediante Western-Blot.

Se tomó una alícuota de 15 µl de cada muestra y se adicionaron 5 µl de buffer de carga 4x (Apéndice I), se mezcló y se hirvió durante 5min. Se colocaron 15 µl de cada muestra por carril en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% (Laemmli 1970) a un voltaje de 120 V durante 120 minutos en buffer de electroforesis (Apéndice I). Posteriormente se llevó a cabo la electrotransferencia (Towbin *et al.*, 1979) en una celda de transferencia de electroforesis (Mini Trans-Blot, Biorad-170-3930) a 60 V por 90 minutos empleando una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF-Inmobilon-P, Millipore) previamente activada, sumergiéndola en metanol durante 30 segundos. Enseguida la membrana se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente agitando ligeramente con el anticuerpo primario en una dilución final de 1:3000 en solución amortiguadora de fosfato (PBS) (Apéndice I), Tween 20 al 0.05% y leche descremada al 3% (Difco). La membrana se lavó tres veces con solución PBS y se incubó con el anticuerpo secundario a una dilución final de 1:10000 bajo las condiciones descritas. Finalmente se reveló con una solución de Diaminobencidina al 0.05% (Sigma No. 6136) y Cloruro de níquel (0.02%) en PBS con peróxido de hidrógeno (1µl/ml). Se utilizó un control positivo de renina de estómago de ternero (Sigma R4877).

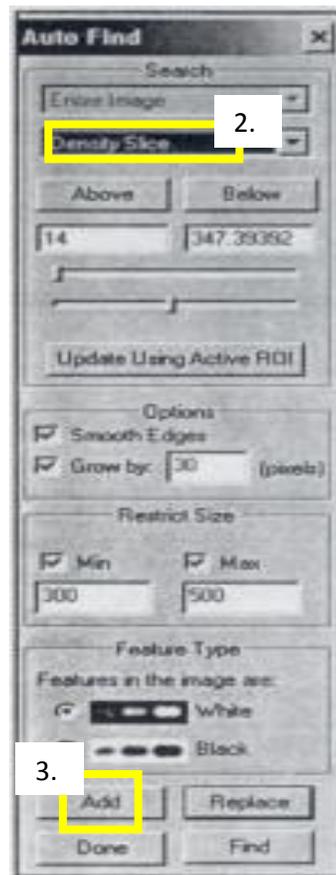
Cuantificación de la proteasas de interés mediante Densitometría.

Para estimar la cantidad de proteasa presente en la muestra se empleó un método de cuantificación acoplado a un transluminador (GEL LOGIC 200 Imaging System) y el programa KODAK Molecular Imaging Software Version 4.0 (1998-2005) Capítulos 7-1 a 7-3. La metodología se describe a continuación:



La imagen se registra y se modifica en el apartado Imagen Display.

1. Posteriormente en la ventana de NAVIGATION seleccionar **New ROI Set** (Regiones de interés).



2. Seleccionar **Density Slice**. En este apartado se puede modificar si se quiere ver la banda en fondo blanco o negro.
3. Seleccionar **Add** para regresar al panel de navegación donde se encuentra la imagen.

4. Seleccionar el área a cuantificar utilizando alguna de las herramientas (Tools). El rectángulo ROI es utilizado cuando se analizan bandas.
5. Terminada la selección de las áreas que se quieran cuantificar, seleccionar el apartado **Set standards** para tener los valores en densidad neta y densidad media. En este apartado aparecen automáticamente los valores de las áreas seleccionadas en pixeles.
6. Se puede utilizar el apartado de **MassCurve** para obtener una curva estándar.

Figura 4. Metodología para la cuantificación de la proteasa por densitometría con el transluminador (GEL LOGIC 200 ImagingSystemy el Software Molecular Imaging KODAK. Versión 4.0

Los valores de concentración de proteasa se calcularon a partir de una curva estándar a partir de un stock de renina de estómago de ternero (Apéndice III).

Determinación de la actividad de la proteasa de interés mediante Caseograma.

El término caseograma hace referencia a un tipo de zimograma que es diseñado para la detección de proteasas ácidas, la actividad enzimática es detectada en un gel de empalme que contiene leche descremada (Till *et al.*, 2001). En el caseograma se utilizan condiciones suaves y sin detergentes o agentes reductores para evitar la pérdida de actividad de la enzima; es decir las muestras deben analizarse en electroforesis bajo condiciones nativas.

Para llevar a cabo el ensayo de caseograma, se tomó una alícuota de 15 μ l de muestra y se adicionaron 5 μ l de amortiguador nativo de carga 4X. Se colocaron por carril 15 μ l de cada una de las muestras en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones Nativas (N-PAGE), el cual se corrió a 60 Volts durante 30 minutos a 6 °C y después a 150 volts hasta que el frente de corrimiento llego al final del gel. Posteriormente el gel se incubó en HCl 0.1 M a 37°C y después en Acetato de Sodio pH 5.3 dos veces durante 15 minutos a temperatura ambiente (las incubaciones deben hacerse sin agitación). Para preparar el gel de empalme de 1.5 mm de espesor se empleó agarosa al 1%, leche descremada reconstituída al 1% (a partir de un stock al 10%), CaCl₂ al 0.05% y acetato de sodio 125 mM, pH 5.3. Es importante que la leche se mezcle bien para obtener un gel homogéneo, y para ello se preparó primero la agarosa en acetato de sodio y después se agregó la leche reconstituida con el CaCl₂. El gel de electroforesis se colocó sobre una placa de vidrio, se cubrió con el gel de empalme, posteriormente se incubó en una cámara húmeda a 37°C, primero durante 3 horas para las primeras observaciones y después hasta las 20 horas para la observación final.

Caseograma en placa.

Se tomaron 2 μ l de cada muestra y se colocaron directamente sobre la placa dejándola en incubación a 37°C durante 15 minutos para hacer las primeras observaciones de los halos de coagulación. Para esta prueba se utilizó la misma solución que para el gel de empalme del caseograma, agregando aproximadamente 15 ml de dicha solución en una caja Petri, se dejaron gelificar y se conservaron a 4°C hasta su uso posterior.

Cuantificación de la actividad de la proteasa. Prueba de turbidez de la leche en placa.

La actividad de la proteasa fue medida por un método de microtitulación de la turbidez de la leche contra una muestra estándar de quimosina de ternero (Dunn-Coleman *et al.*, 1991). En este caso se utilizó un stock de proteasa comercial de ternero con una concentración inicial de 0.66 μ g/ μ l.

La prueba se realizó en una microplaca de 96 pozos, donde se adicionó una alícuota de 25 μ l del sobrenadante a cada pozo y 150 μ l de sustrato (Leche descremada 10g/l, CaCl₂ 4.5 g/l y acetato de sodio 3 g/l, pH 6.0) se mezclaron bien las muestras, se tapó la microplaca, se incubó a 37°C durante 15 minutos y midió la absorbancia a 620 nm utilizando un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC con la aplicación SkanIt Software 2.5.1). Los valores de actividad de la proteasa fueron calculados a partir de una curva estándar (Apéndice IV).

Prueba de actividad proteolítica del medio de cultivo.

Se mezclaron 27 μ l de cada muestra con 3 μ l del stock de proteasa (0.165 μ g/ μ l) en un tubo eppendorf y se incubaron a 29° C durante 48 y 120 horas. Se utilizó agua destilada en lugar de sobrenadante como control negativo. Se tomaron 2 μ l

pasado el tiempo de incubación para realizar la prueba directa del caseograma en placa dejándola incubar durante aproximadamente 15-60 minutos a 37°C para poder observar el halo de coagulación, si es que este se presentaba; en caso de que no hubiera halo de coagulación significa que en presencia del sobrenadante hay degradación de la proteína de interés, lo cual se refleja en la ausencia de actividad de la proteasa.

III. Resultados y discusión.

Selección de los sustratos más adecuados para la producción de la proteasa de interés empleando FES con la cepa 18 de *Aspergillus niger*.

Se realizó la FES con la cepa 18 utilizando dos diferentes sustratos: asimilables y nutricionalmente inertes con la finalidad de seleccionar en cual de ellos había una mayor expresión de la proteasa de interés. La fermentación se llevó a cabo en medio MN a 29°C. Se tomaron muestras cada 24 horas, se centrifugaron a 13 500 rpm y el sobrenadante fue conservado a -4°C. Posteriormente fueron analizadas por electroforesis en geles SDS-PAGE y Western-blot para conocer el perfil de expresión de la proteasa.

Se detectó una proteína con un peso molecular de aproximadamente 78 KDa a las 48 horas como se observa en el carril 3 cuando se empleó trigo molido a las 48 horas como sustrato y en los carriles 6 y 7 respectivamente cuando se empleó DDG a las 48 y 72 horas (Figura 5.). También se obtuvo señal con salvado de trigo a las 48 horas y de los sustratos nutricionalmente inertes con el poliuretano a las 48 y 72 horas de fermentación, en este caso la señal que se observó fue menos intensa. La figura no se muestra.

Los sustratos con los que se decidió continuar el estudio fueron DDG y trigo molido, ya que en los ensayos realizados se observó una señal más intensa que indicaba una mayor producción de proteasa. Se ha reportado que para la producción de proteasas ácidas y otras enzimas como amilasas, se usa salvado de trigo o sus derivados para expresarlas y producirlas en FES (Sivaramakrishnan *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2000). En el caso de DDG se observaron señales comparativamente más intensas a las 48 y 72 horas de cultivo, que se debe a una mayor producción de la proteasa en los ensayos de expresión.

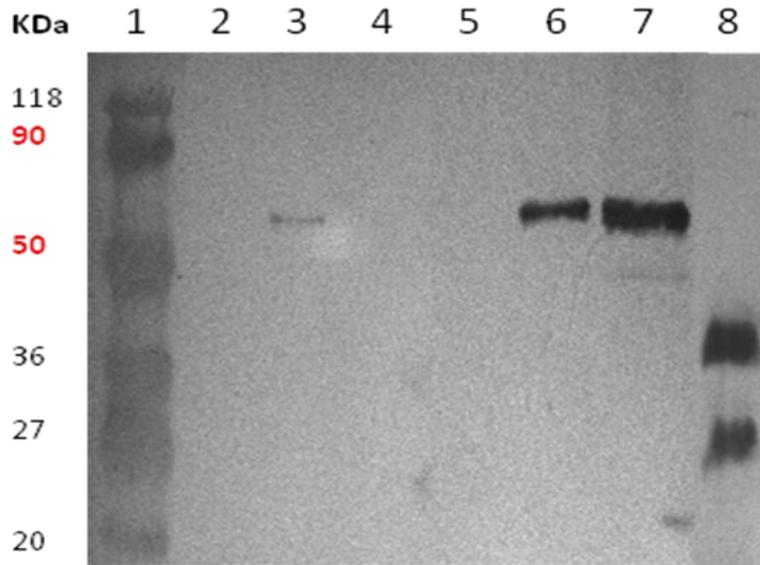


Figura 5. Western Blot mostrando la Cinética de expresión de la proteasa de *A. niger* (cepa 18) cultivada en sustratos asimilables en Fermentación en Estado Sólido con medio MN. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Trigo molido (24 horas). Carril 3: Trigo molido (48 horas). Carril 4: Trigo molido (72 horas). Carril 5: DDG (24 horas). Carril 6: DDG (48 horas). Carril 7: DDG (72 horas). Carril 8: Renina de estómago de ternera. Se indican las horas de cultivo en cada caso.

Empleo de FES con la cepa 18 cultivada en medio de cultivo MN o agua.

Se sabe que muchos de los sustratos aparte de ser soporte para el crecimiento son fuente de nutrientes (Ooijkaas *et al.*, 2000). A partir de los mejores sustratos (DDG, trigo molido y salvado de trigo). Se realizó una fermentación con la cepa 18 utilizando MN como medio nutritivo y otra fermentación utilizando agua, con la finalidad de observar la aportación que tiene el sustrato por sí mismo para lograr que la proteasa se exprese.

Las muestras de la fermentación fueron analizadas por Western-blot (Figura 6.). Se observó que con DDG-MN se expresa la proteasa de interés a las 48 y 72 horas que se muestra en el carril 2 y 3 respectivamente, pero además, dicho sustrato es capaz de aportar los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo y expresión de la proteasa ya que al cultivarlo únicamente con agua (DDG-Agua) a las 48 y 72 horas se observó expresión de la proteasa en el

carril 4 y 5, respectivamente; donde además apareció una banda de menor peso molecular que puede deberse a la degradación de la proteasa. Con respecto al trigo molido-MN se observó señal a las 48 y 72 horas (carriles 6 y 7, respectivamente), en cambio con trigo molido-agua no se observó expresión de la proteasa de interés en el carril 8 y 9. Con salvado de trigo se observó una respuesta muy similar a la obtenida con el trigo molido tanto con medio MN y agua. La figura no se muestra.

En base a los resultados anteriores, se decidió utilizar el medio MN que aportara los nutrientes necesarios y permitiera el crecimiento del hongo y expresión de la proteasa para continuar con el estudio, ya que por lo menos con el trigo molido y el salvado de trigo en ausencia de éste medio no hay producción de la proteasa de interés.

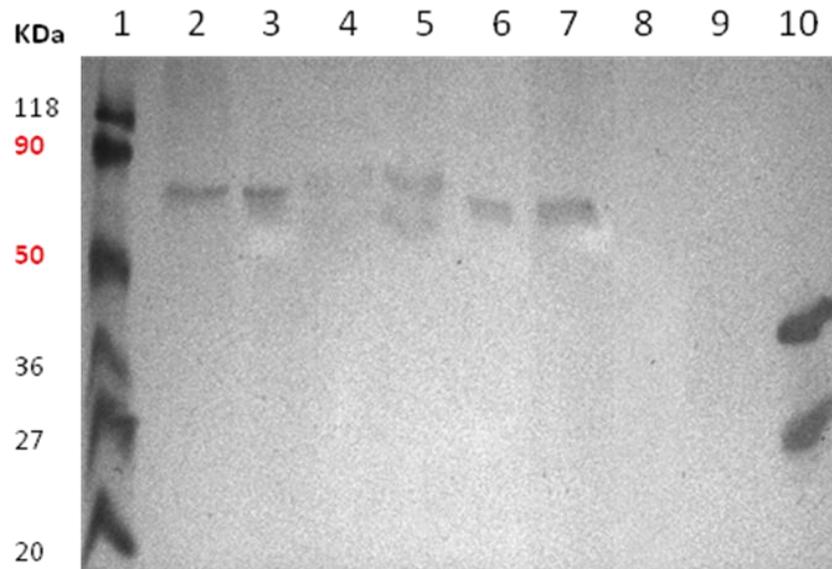


Figura 6. **Ensayo de expresión de la proteasa de *A. niger* (cepa 18) en Fermentación en Estado Sólido cultivada en DDG o trigo molido en presencia de medio MN o agua.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: DDG-MN 48 (horas). Carril 3: DDG-MN (72 horas). Carril 4: DDG-Agua (48 horas). Carril 5: DDG-Agua (72 horas). Carril 6: Trigo molido-MN (48 horas). Carril 7: Trigo molido-MN (72 horas). Carril 8: Trigo molido-agua (48 horas). Carril 9: Trigo molido-Agua (72 horas). Carril 10: Renina de estómago de ternera. Se indican las horas de cultivo en cada caso.

Evaluación de la mezcla de sustratos en FES para producir la proteasa de interés a partir de la cepa 18 de *A. niger*.

No existen muchos reportes en los que se mencione una mezcla de sustratos para la producción de enzimas en hongos, pero en el caso de la producción de lipasa de *Aspergillus niger* se observó un incremento en la producción y actividad a las 72 horas de cultivo al utilizar salvado de trigo y torta de maní al 36.0 % comparada con sólo la utilización del salvado de trigo (Mala *et al.*, 2007). Para producir α -amilasa en *Aspergillus oryzae* var. *brunneus*se optimizaron las condiciones de cultivo utilizando una mezcla de salvado de trigo y granos de sésamo que incrementaron los niveles de ésta enzima en un 65% (Sivaramakrishnan *et al.*, 2007).

En este estudio se realizó una fermentación utilizando una mezcla de los mejores sustratos en los que se obtuvo una mayor expresión de la proteasa de interés. La mezcla se preparó en una proporción 1:1 (Shaligram *et al.*, 2009) estas fueron: DDG-trigo molido, DDG-salvado de trigo y trigo molido- salvado de trigo, utilizando medio MN y cultivando a 29°C. Las muestras de la fermentación fueron analizadas por Western-blot (Figura 7.). Se observó que con DDG-trigo molido a las 48 y 72 horas en los carriles 2 y 3 muestran una señal más intensa comparada con la mezcla DDG-salvado de trigo en los carriles 4 y 5, con respecto a la mezcla trigo molido-salvado de trigo se observó únicamente señal a las 72 horas en el carril 7. Se decidió entonces emplear la mezcla DDG- trigo molido con medio MN para continuar con el estudio de la producción de la proteasa de interés.

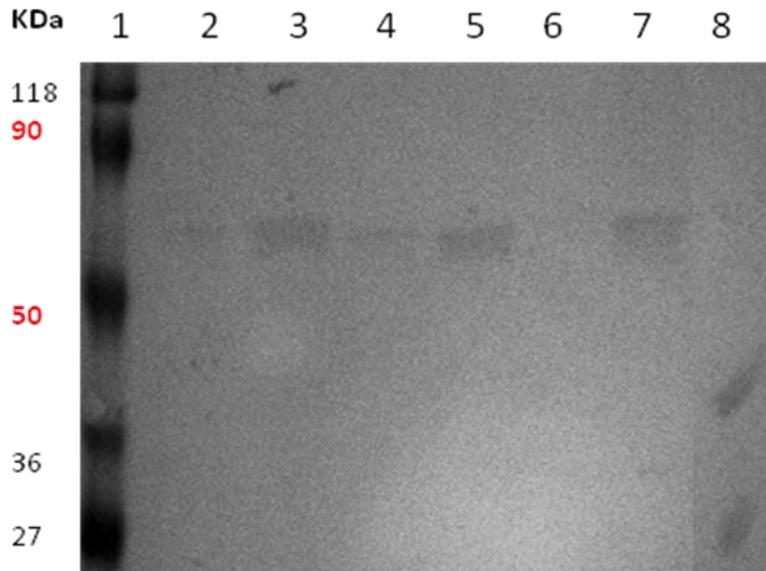


Figura 7. **Ensayo de expresión de la proteasa de *A. niger* (cepa 18) en Fermentación en Estado Sólido empleado diferentes mezclas de sustratos en medio MN.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: DDG-Trigo molido (48 horas). Carril 3: DDG-Trigo molido (72 horas). Carril 4: DDG-Salvado de trigo (48 horas). Carril 5: DDG-Salvado de trigo (72 horas). Carril 6: Trigo molido- Salvado de trigo (48 horas). Carril 7: Trigo molido-Salvado de trigo (72 horas). Carril 8: Renina de estómago de ternera. Se indican las horas de cultivo en cada caso.

Optimización del método de extracción de la proteasa.

Muchas variables pueden afectar el rendimiento de proteína obtenido durante la extracción: tipo de solvente, temperatura, tiempo de extracción, etcétera. La optimización de dichas condiciones, puede convertirse en un punto relevante para mejorar e incrementar la eficiencia de todo el proceso de fermentación (Díaz *et al.*, 2007).

Se evaluaron las condiciones de extracción de la proteasa de interés esperando obtener un aumento en el rendimiento de la misma, para ello se realizó la FES con la cepa 18 utilizando una mezcla de sustratos (DDG-trigo molido) en medio MN a 29°C. Se modificaron algunas condiciones en el proceso de extracción como la utilización de diferentes solventes; Tween 80 (0.1%), Tween 80 (0.01%), agua destilada y amortiguador de acetato de sodio pH 5.5, dos diferentes temperaturas de extracción 4 y 29 °C, la velocidad de agitación 150, 180 y 5 rpm y

dos diferentes tiempos de extracción 30 y 60 minutos. Posteriormente la extracción se realizó en una prensa francesa, el sobrenadante fue centrifugado durante 5 minutos a 13 000 rpm y filtrado por gravedad.

Al modificar la temperatura de extracción, tiempo de extracción y velocidad de agitación no se observaron cambios significativos en cuanto a la cantidad de enzima obtenida ya que la señal obtenida en Western-blot fue prácticamente la misma. En cambio cuando se evaluaron los solventes para la extracción, el más adecuado fue el amortiguador de acetato de sodio pH 5.5 ya que se observó señal a las 48 y 72 horas en los carriles 3 y 4; con el Tween 80 (0.1%) únicamente se observó señal a las 48 horas en el carril 6 (Figura 8.). Para obtener la mayor cantidad de enzima sin residuos de la mezcla de sustratos la extracción por prensado fue la más adecuada seguida de la filtración por gravedad con papel filtro.

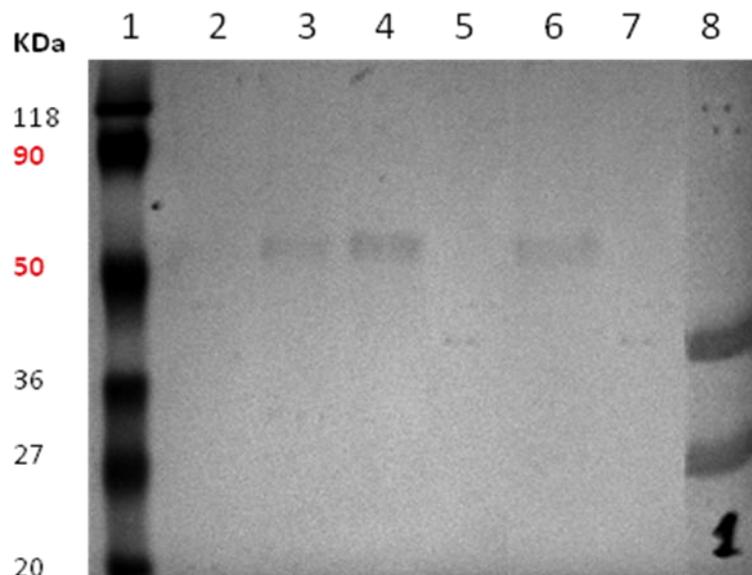


Figura 8. Optimización del método de extracción utilizando diferentes solventes para la extracción cuando la cepa 18 se cultivó en Fermentación en Estado Sólido con en DDG-Trigo molido y medio MN. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Amortiguador de acetato de sodio pH 5.5 (24 horas). Carril 3: Amortiguador de acetato de sodio pH 5.5 (48 horas). Carril 4: Amortiguador de acetato de sodio pH 5.5 (72 horas). Carril 5: Tween 80 (0.1%) (24 horas). Carril 6: Tween 80 (0.1%) (48 horas). Carril 7: Tween 80 (0.1%) (72 horas). Carril 8: Renina de estómago de ternera. Se indican las horas de cultivo en cada caso.

Cabe mencionar que en un principio los reactivos que se utilizaron eran grado analítico, pero debido a la intención que se tiene de explotar a la cepa con fines industriales, los reactivos que se emplearon posteriormente se sustituyeron por reactivos grado industrial, esto posiblemente influyó en la producción de la enzima, lo cual se ve reflejado en la intensidad de las señales que se observaron en los Western-Blot.

Optimización del método para concentrar la proteasa de interés.

La concentración de las muestras en un principio se realizaba utilizando SpeedVac Concentrator Savant ISS110 (ThermoScientific) que concentra eliminando únicamente agua, las muestras se obtenían con remanentes de los mismos sustratos como aceites o grasas y sales junto con la muestra, lo cual afectaba el desplazamiento de las muestras en los geles SDS-PAGE, dificultando su análisis; por tal razón se evaluó un método alternativo de concentración empleando acetona en frío (Apéndice II)(Rosenberg 1996) permitiendo con esto la obtención de una muestra más pura y un corrimiento más homogéneo de las muestras en SDS-PAGE; ya que con este método se concentran proteínas totales eliminando otras impurezas del propio sustrato y sales contenidas en el medio de cultivo.

Selección de sustratos para la FES con la cepa 54 de *Aspergillus niger*.

Se monitoreó la producción de la proteasa con la cepa 54 probando 15 sustratos nutricionalmente asimilables con el fin de encontrar en cual de éstos se obtenía la mayor expresión de la proteasa de interés. La fermentación se llevó a cabo en medio MN a 29°C. Se tomaron muestras cada 24 horas, se centrifugó y el sobrenadante fue conservado a -4°C, posteriormente las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles SDS-PAGE y Western-blot.

Con los sustratos evaluados se encontró que la cepa 54 es capaz de producir la proteasa en varios de los sustratos empleados, destacando 4 de ellos: harina de trigo, salvado de trigo, trigo molido y sema cuya señal fue más intensa entre las 48 y 72 horas. El resultado con sema no se muestra. En el caso de salvado de trigo se observó una señal más intensa comparada con los demás sustratos a las 48 horas en el carril 4 (Figura 9.).

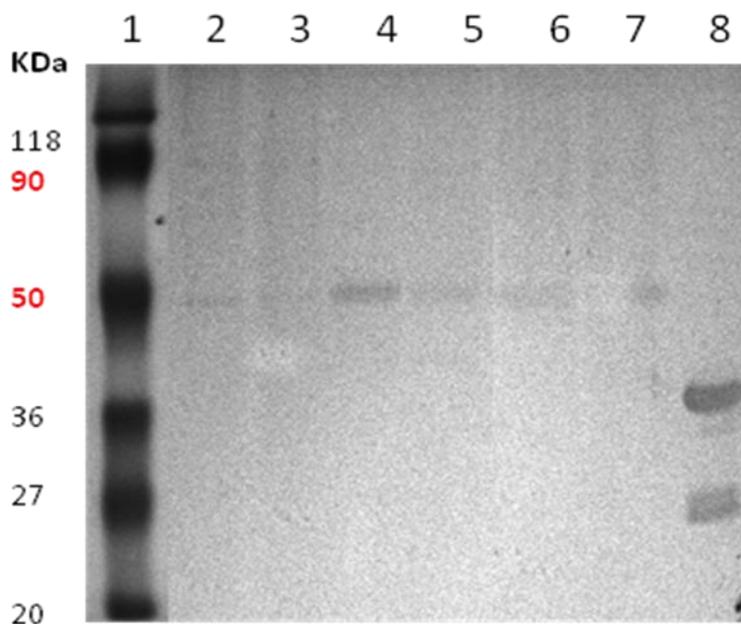


Figura 9. **Expresión de la proteasa en Fermentación en Estado Sólido con la cepa 54 en diferentes sustratos con medio MN a 29 °C.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Sorgo (48 horas). Carril 3: Sorgo (72 horas). Carril 4: Salvado de trigo (48 horas). Carril 5: Salvado de trigo (72 horas). Carril 6: Trigo molido (48 horas). Carril 7: Trigo molido (72 horas). Carril 8: Renina de estómago de ternero. Se indican las horas de cultivo en cada caso.

Evaluación de la mezcla de sustratos en FES para producir la proteasa de interés a partir de la cepa 54 de *Aspergillus niger*.

Con el fin de obtener un aumento en la producción de la proteasa con la cepa 54 en FES se realizó la mezcla con los mejores sustratos en una proporción 1:1, tal como se hizo con la cepa 18. Los sustratos empleados fueron: salvado de trigo-

salvado de trigo molido, salvado de trigo-sema, salvado de trigo molido-sema. No se continuó trabajando con harina de trigo ya que la extracción de la proteasa a partir de éste sustrato resultaba muy contaminada con los residuos propios de la harina de trigo. Aunque se había observado que la cepa 54 en FES tiene la capacidad de utilizar varios sustratos para producir la proteasa de interés, la mezcla de éstos no produjo un incremento en la expresión de la proteasa, ya que en las tres mezclas realizadas, la señal fue prácticamente la misma que la obtenida sólo con salvado de trigo por lo que se decidió continuar el estudio utilizando como sustrato únicamente salvado de trigo.

Con los experimentos realizados hasta ese momento con la finalidad de producir la proteasa de interés en FES, se encontró que para la cepa 18 la mezcla DDG-trigo molido y para la cepa 54 el salvado de trigo, ambos con medio MN, eran los mejores sustratos para lograr una mayor expresión de la proteasa de interés y que el mejor método de extracción era utilizando amortiguador de acetato de sodio pH 5.5 seguido de una extracción por prensado y finalmente concentrando las muestras con acetona. Se realizó entonces la FES y la Fsm con la cepa 18 en DDG-trigo molido y la cepa 54 en salvado de trigo empleando medio MN a 29 °C durante 120 horas por duplicado. Se tomaron muestras cada 24 horas para determinar el crecimiento mediante peso seco y con el sobrenadante se midió el pH en cada etapa del crecimiento, así como la expresión de la proteasa (Western-blot). Se determinó la concentración de la proteasa por densitometría y la concentración de enzima activa mediante una prueba de coagulación en placa, además de la realización de la prueba de actividad proteolítica del medio de cultivo.

Evaluación del Crecimiento y efecto del pH en FES y Fsm con la cepa 18 y 54.

Efecto del pH. En FES se observó que ambas cepas acidifican el medio de cultivo en las primeras 24 horas, esto debido a la producción de ácidos orgánicos producto de la glucólisis; ya que es en este tiempo donde se consume la mayor cantidad de almidón, posteriormente el pH aumenta y esto debido a la utilización de fuentes de nitrógeno principalmente de origen proteico. Respecto a la Fsm se observaron mayores fluctuaciones en los valores de pH tanto de la cepa 18 como 54 a lo largo de la fermentación en relación a lo obtenido en la FES, disminuyendo en las primeras 24-48 horas hasta un pH promedio de 4.5 y aumentando posteriormente hasta un promedio de 7.5 al final de la fermentación (Figura 10.).

Crecimiento. En Fsm se observó un crecimiento exponencial en las primeras 24 horas, tanto para la cepa 18 como para la cepa 54, seguido por una fase estacionaria que permanece hasta el final de la fermentación (Figura 11.).

En el caso de la FES, aunque se intentó medir crecimiento por peso seco no se obtuvieron resultados reproducibles. Se sabe que monitorear el crecimiento en FES representa una de las dificultades que posee ese sistema de fermentación ya que no se tienen técnicas y dispositivos adecuados como los que se tienen con la Fsm (Rodríguez *et al.*, 2005; Pastrana L. 1996).

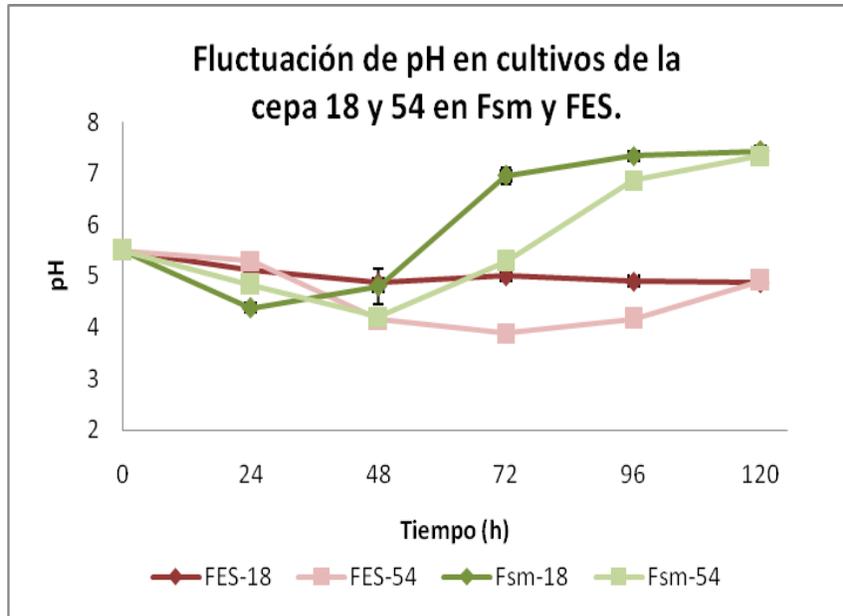


Figura 10. Perfil del cambio de pH en Fermentación en Estado Sólido (FES) y Fermentación sumergida (Fsm) cultivadas en medio MN a 29°C. Fermentación en Estado Sólido con la cepa 18 (FES-18) y 54 (FES-54) y Fermentación sumergida con la cepa 18 (FEL-18) y la cepa 54 (FEL-54).

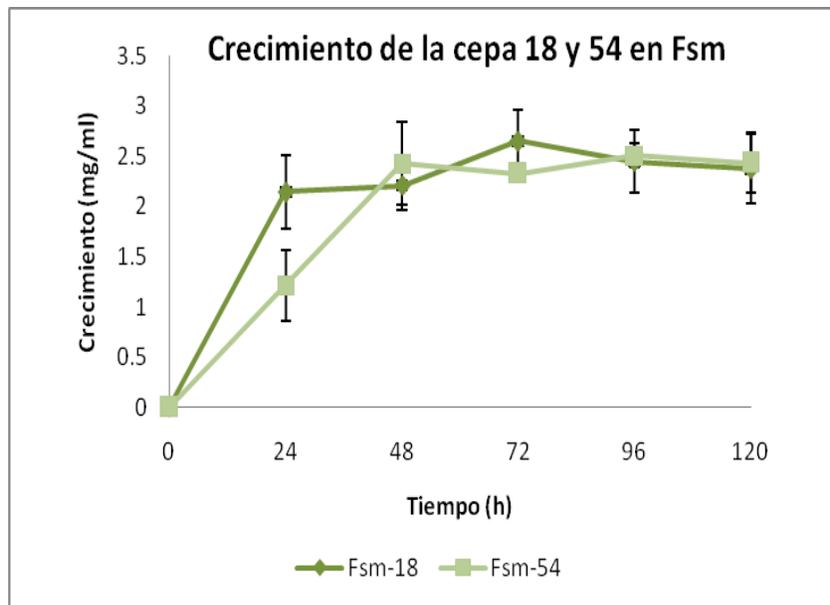


Figura 11. Perfil de crecimiento en Fermentación sumergida (Fsm) en medio MN a 250 rpm y 29°C. Fermentación sumergida empleando la cepa 18 (Fms-18) y la cepa 54 (Fms-54).

Expresión de la proteasa en FES y Fsm con la cepa 18 y la cepa 54.

Las muestras de la cepa 18 y 54 en FES y Fsm fueron analizadas por electroforesis en geles SDS-PAGE y Western-blot para analizar el perfil de expresión de la proteasa. En el caso de la FES con la cepa 18 (FES-18) la expresión de la proteasa se observa a partir de las 24 horas en el carril 2 y hasta casi las 120 horas en el carril 6, en el caso de las 72 y 96 horas (carriles 4 y 5, respectivamente) se observó una banda doble, lo cual posiblemente se deba a la degradación de la proteasa (Figura 12.). Con la cepa 54 en FES (FES-54) se detectó la presencia de la proteasa a las 24 y 48 horas y una banda muy clara a las 72 horas, (carriles 2, 3 y 4 respectivamente), posteriormente la señal desaparece (Figura 13). En este caso la expresión de la proteasa de interés pudo verse limitada por la fuente de nutrientes u otras proteasas que posiblemente degradaron a la proteasa de interés.

En el caso de la Fsm con la cepa 18 (Fms-18) (Figura 14.) se detectó la expresión de la proteasa a las 48 horas de cultivo (carril 3) y entre las 72 y 120 horas (carriles 4,5 y 6, respectivamente); se observó una degradación de la enzima que coincide con el aumento en el pH = 7.5, donde otras proteasas son activas, provocando la degradación de la proteasa de interés. Se sabe que proteasas neutras son más activas a un pH = 7 (Rao *et al.*, 1998; Sandhya *et al.*, 2005). Con la cepa 54 en Fsm (Fsm-54) la expresión de la proteasa no se detecta sino hasta después de las 96 horas. A las 96 y 120 horas de cultivo (carriles 5 y 6) se observa expresión de la enzima y degradación parcial de la misma (Figura 15.).

Se han identificado aproximadamente 200 genes en *A.niger* que están involucrados en la degradación proteolítica. Con la cepa 18 y 54 en Fsm se observó en el análisis con Western-blot una degradación de la enzima de interés posiblemente por el aumento en el pH a lo largo de la fermentación. Además la degradación de enzimas es aproximadamente ocho veces mayor en Fsm que en FES (Hölker *et al.*, 2004).

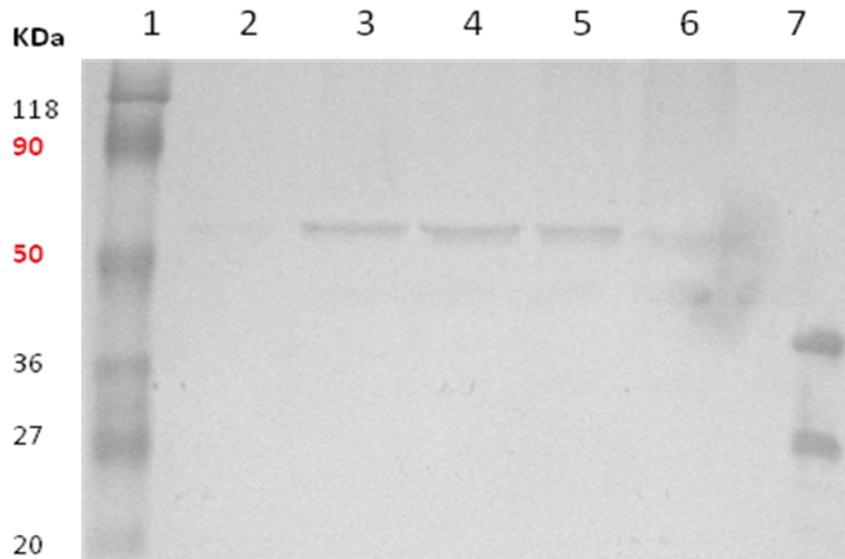


Figura 12. **Expresión de la proteasa en Fermentación en Estado Sólido con la cepa 18 en DDG-trigo molido y medio MN a 29°C (FES-18).** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: FES-18 (24 horas). Carril 3: FES-18 (48 horas). Carril 4: FES-18 (72 horas). Carril 5: FES-18 (96 horas). Carril 6: FES-18 (120 horas). Carril 7: Renina de estómago de ternera. Se muestran entre paréntesis las horas de cultivo en cada caso.

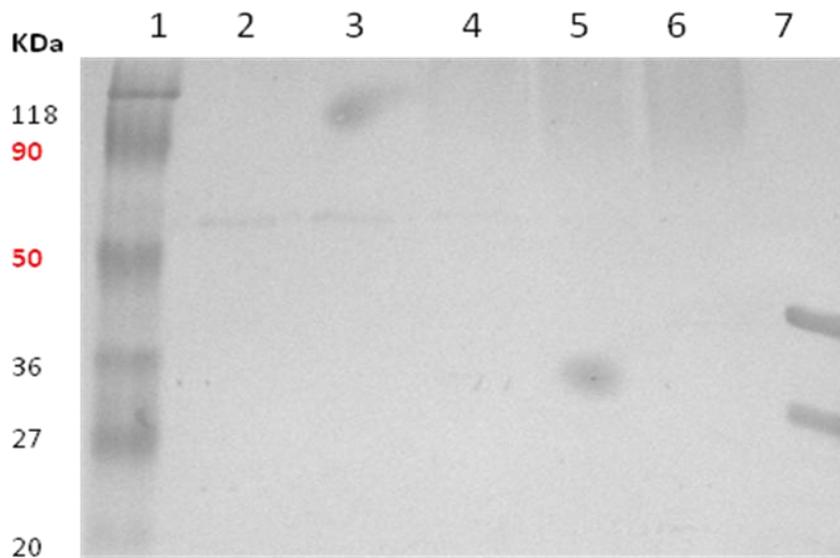


Figura 13. **Expresión de la proteasa en Fermentación en Estado Sólido con la cepa 54 en salvado de trigo y medio MN a 29°C (FES-54).** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: FES-54 (24 horas). Carril 3: FES-54 (48 horas). Carril 4: FES-54 (72 horas). Carril 5: FES-54 (96 horas). Carril 6: FES-54 (120 horas). Carril 7: Renina de estómago de ternera. Se muestran entre paréntesis las horas de cultivo en cada caso.

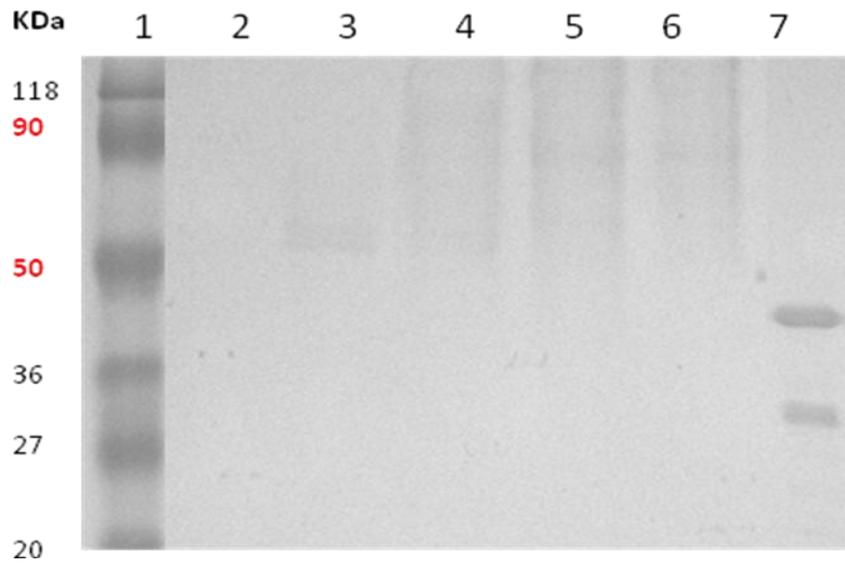


Figura 14. **Expresión de la proteasa en Fermentación sumergida con la cepa 18 en medio MN a 29°C y 250 rpm (Fsm-18).** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Fsm-18 (24 horas). Carril 3: Fsm-18 (48 horas). Carril 4: Fsm-18 (72 horas). Carril 5: Fsm-18 (96 horas). Carril 6: Fsm-18 (120 horas). Carril 7: Renina de estómago de ternera. Se muestran entre paréntesis las horas de cultivo en cada caso.

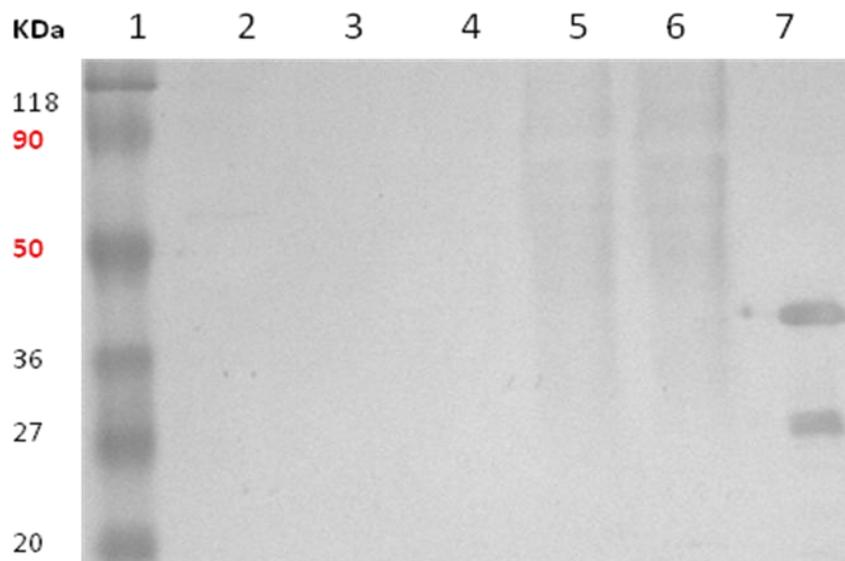


Figura 15. **Expresión de la proteasa en Fermentación sumergida con la cepa 54 en medio MN a 29°C Y 250 rpm (Fsm-54).** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Fsm-54 (24 horas). Carril 3: Fsm-54 (48 horas). Carril 4: Fsm-54 (72 horas). Carril 5: Fsm-54 (96 horas). Carril 6: Fsm-54 (120 horas). Carril 7: Renina de estómago de ternera. Se muestran entre paréntesis las horas de cultivo en cada caso.

Cuantificación de la proteasa de interés mediante densitometría.

Una de las ventajas que presenta la FES con respecto a la Fsm, es que los títulos de enzima obtenida son mayores. En una evaluación realizada para la producción de una proteasa neutra en FES, se produjo 3.5 veces más enzima en FES que en Fsm (Sandhya *et al.*, 2005).

A partir de los Western-blot se realizó un análisis cuantitativo mediante densitometría para determinar la concentración de proteasa producida. Se realizó una curva estándar y a partir de ésta se obtuvo la concentración de la proteasa producida por la cepa 18 y 54 en FES y Fsm (Apéndice III).

En la Figura 16 puede observarse que en FES la mayor producción de la proteasa de interés se obtuvo con la cepa 18 (20.1 mg/l) a las 72 horas, en el caso de la cepa 54 la concentración fue de 7.9 mg/l a las 24 horas, la disminución gradual en la concentración de la proteasa posiblemente se debe a la presencia de enzimas que degradaron a la proteasa de interés. En el caso de la Fsm con la cepa 18, se observó la mayor producción (7.3 g/l) a las 48 horas y con la cepa 54 fue de 7.6 g/l a las 96 horas. Comparando la producción de proteasa entre ambos sistemas, se observó una diferencia que favorece a la FES con la cepa 18, donde se produce 64% más proteasa que en Fsm. Con respecto a la cepa 54 donde se produjo 4% más en FES que en Fsm.

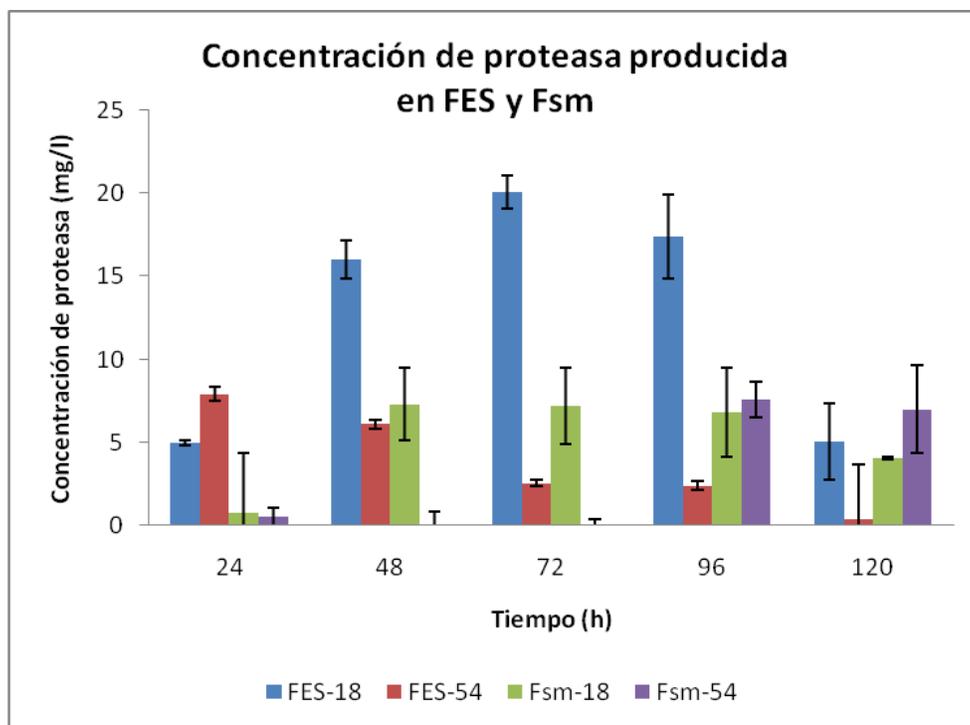


Figura 16. **Determinación Densitométrica de la concentración de la proteasa producida en FES y Fsm en medio MN a 29°C.** Producción de proteasa en Fermentación en Estado Sólido con la cepa 18 (FES-18) y cepa 54 (FES-54) y Fermentación sumergida con la cepa 18 (Fsm-18) y cepa 54 (Fsm-54). Las desviaciones estándar se determinaron a partir de 2 repeticiones experimentales.

Caseograma. Prueba directa de la actividad de la proteasa producida por la cepa 18 y la cepa 54 en FES y Fsm.

En un caseograma sobre placa se realizó una prueba directa de la actividad de la proteasa, ya que ésta tiene la capacidad de coagular la leche. Para dicha prueba, la intensidad del halo está directamente relacionada con la actividad proteolítica (Till *et al.*, 2001). Se analizaron las muestras de la fermentación de la cepa 18 y 54 en FES y Fsm colocando 2µl de muestra directamente en la placa con el gel de agarosa y leche descremada al 10% para caseograma y se incubaron durante 40 minutos a 37°C.

En la Figura 17 se observa que en las muestras de la fermentación los halos más intensos se observaron en FES con la cepa 54 a las 48 y 72 horas (indicado por

una flecha), en el caso de la cepa 18 hubo una respuesta similar sólo que estos fueron menos intensos. Para la Fsm se observó una señal a partir de las 48 horas que comenzó a disminuir a las 96 horas tanto para la cepa 18 como para la 54. Aunque se observó una mayor concentración de proteasa producida con la cepa 18 en FES esto no se vio reflejando en una mayor actividad, en este caso las señales más intensas fueron con la cepa 54, esto como resultado del mejoramiento genético para la producción de la proteasa, además de que la actividad se vio favorecida por las condiciones prevalentes en FES ya que la proteasa de interés tiene un pH óptimo ácido que fue en el que se mantuvo la FES a lo largo de la fermentación.

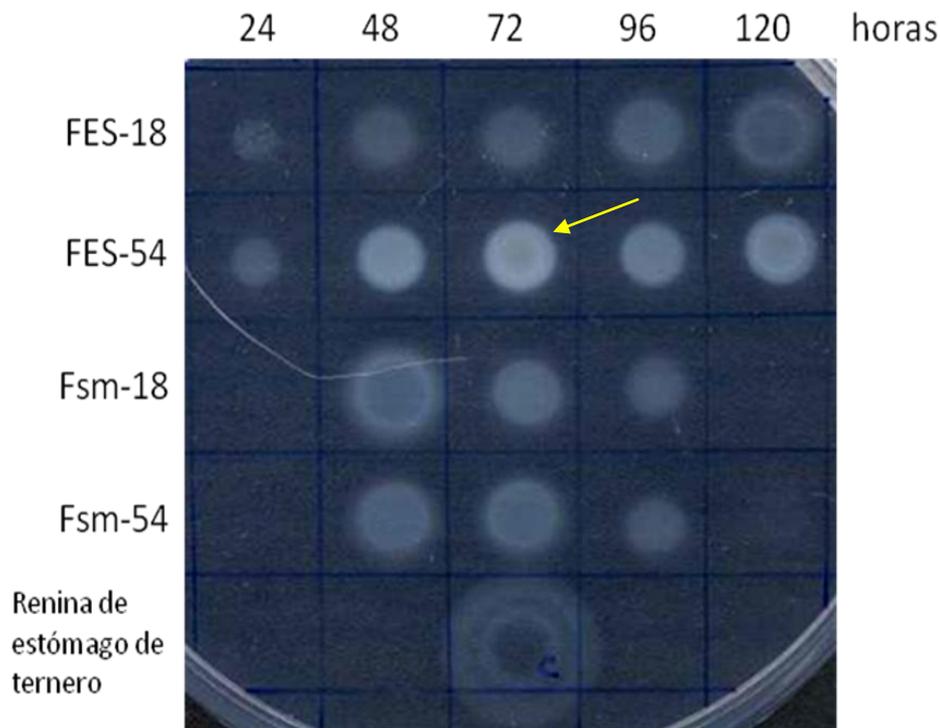


Figura 17. Prueba directa de la actividad coagulante de la proteasa en caseograma en placa con muestras de la FES y Fsm. Fermentación en Estado Sólido cepa 18 y 54 (FES-18 y FES-54) y Fermentación sumergida con la cepa 18 y 54 (Fsm-18 y Fsm-54). Se señala con una flecha el halo más intenso (mayor actividad).

Determinación de la concentración de proteasa activa mediante la prueba de turbidez de leche en placa.

Para la determinación de proteasa activa se realizó una curva estándar a partir de un stock de renina de estómago de ternero ($0.66 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) con una concentración de entre $0.1\text{-}0.8 \text{ mg/l}$ y a partir de ésta y por interpolación de los valores de absorbancia, se obtuvo la concentración de enzima activa (Apéndice IV). Las muestras se analizaron en una microplaca de 96 pozos donde se agregó sobrenadante de cada una de las muestras de los diferentes tiempos de fermentación con el sustrato (leche descremada), se incubó a 37°C durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 620 nm .

Como se muestra en la Figura 18 en FES la mayor concentración de enzima activa (1.95 mg/l) se obtuvo con la cepa 54 a las 72 horas, con la cepa 18 la mayor concentración de enzima activa fue de 0.44 mg/l a las 96 horas. Con respecto a la Fsm la mayor concentración de enzima activa se obtuvo con la cepa 54 (0.45 mg/l) a las 48 horas y con la cepa 18 (0.48 mg/l) a las 48 horas. Se sabe que algunas proteasas ácidas se sintetizan como pre-pro-proteasas (inactivas) y que a pH ácido se lleva a cabo una autoproteólisis que la convierte en la enzima activa. (Dunn-Coleman et al., 1991).

En el caso de la FES durante prácticamente toda la fermentación el pH se mantuvo ácido y esto posiblemente favoreció la actividad de la proteasa, ya que con la cepa 54 al cultivarla en FES se obtuvo 18.7% más proteasa activa que al ser cultivada en Fsm. En el caso de la cepa 18, la cepa 54 produjo 22.41% más proteasa activa cuando ambas fueron cultivadas en FES. Con estos resultados podemos decir que aunque se produjo la enzima, esto no significa que sea completamente activa, en este caso aunque la cepa 54 tuvo una menor producción de enzima total comparada con la cepa 18 en FES, la enzima producida por la cepa 54 fue más activa.

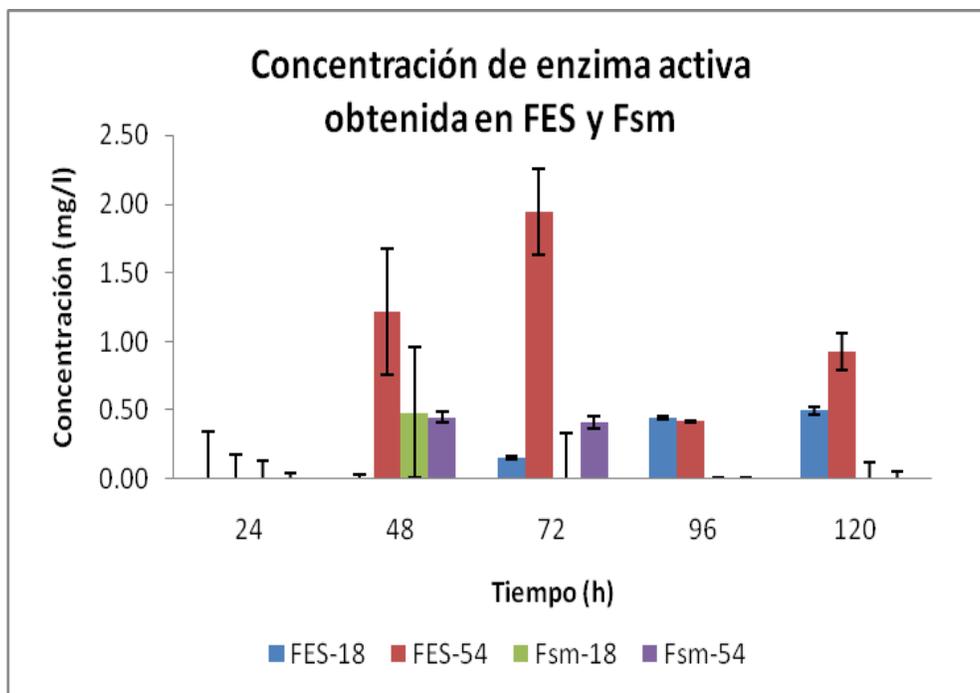


Figura 18. **Determinación de la concentración de enzima activa mediante la prueba de turbidez de leche en placa.** Concentración de proteasa activa en Fermentación en Estado Sólido con la cepa 18 (FES-18) y la cepa 54 (FES-54) y Fermentación sumergida con la cepa 18 (Fsm-18) y la cepa 54 (Fsm-54). Las desviaciones estándar se determinaron a partir de 2 repeticiones experimentales.

Determinación de la actividad de la proteasa de interés mediante Caseograma a partir de geles nativos.

Para la prueba del caseograma las muestras se corrieron en un gel en condiciones nativas (N-PAGE) y posteriormente se colocó un gel de empalme dejándolo incubar en una cámara húmeda a 37°C. La prueba del caseograma se realizó con las muestras de la cepa 18 y 54 tanto en FES como Fsm.

En FES con la cepa 18 (Figura 19.) se observó actividad en el caseograma a partir de las 24 horas, la cual aumentó conforme transcurrió la fermentación, la mayor actividad se observó a las 120 horas (carril 5), esto puede deberse al pH ácido en el que se encontraba la enzima y que favorecieron la autocatálisis de la proteasas.

En el caso de la cepa 54 en FES (Figura 20.) la actividad se observa a partir de las 24 horas en el carril 1 y ésta se mantiene durante las 72, 96 y 120 horas (carriles 3,4 y 5, respectivamente en la parte superior). Esto coincide con la actividad que se observó con la prueba directa en placa donde la señal más intensa se encontró a las 72 horas y con la cuantificación que se realizó en microplaca.

Con respecto a la Fsm con la cepa 18 se observó la mayor actividad a las 48 horas (carril 2) (Figura 21). La señal disminuyó conforme transcurrió el tiempo de fermentación, probablemente por la degradación de la proteasa de interés. Incluso en los caseogramas se observa una diferencia en la migración de la proteasa entre las muestra de la FES y la Fsm ya que en esta última las señales de actividad aparecen más abajo, esto posiblemente por la diferencia en el procesamiento de la enzima que se da en las diferentes condiciones.

Respecto a la cepa 54 en Fsm (Figura 22) se observó actividad a partir de las 48 horas de fermentación aunque esta fue muy poca y no se observa claramente en el caseograma. Al igual que con la cepa 18, la actividad se observó en las primeras horas de fermentación; que más adelante se ve disminuída probablemente por la presencia de otras proteasas que son más activas a pH básico y degradan a la enzima de interés.

En los caseogramas realizados, se observaron variaciones en cuanto al corrimiento a lo largo del gel, ya que en condiciones nativas la proteína no corre de la misma forma que en un gel en condiciones desnaturalizante. Además la actividad que se observa varió entre la FES y la Fsm para las 2 cepas de prueba, una de las razones probables pueden ser las diferentes condiciones de pH que prevalecieron en ambos sistemas.

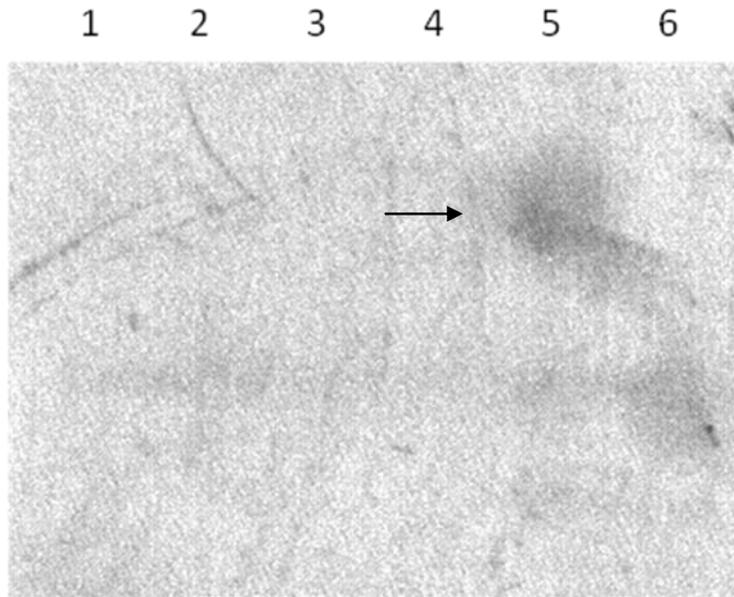


Figura 19. **Caseograma. Actividad de la proteasa en Fermentación en Estado Sólido con la cepa 18 crecida en DDG-trigo molido y medio MN a 29°C (FES-18).** Carril 1: FES-18 (24 horas). Carril 2: FES-18 (48 horas). Carril 3: FES-18 (72 horas). Carril 4: FES-18 (96 horas). Carril 5: FES-18 (120 horas). Carril 6: Renina de estómago de ternero. Se muestran entre paréntesis las horas de cultivo en cada caso.

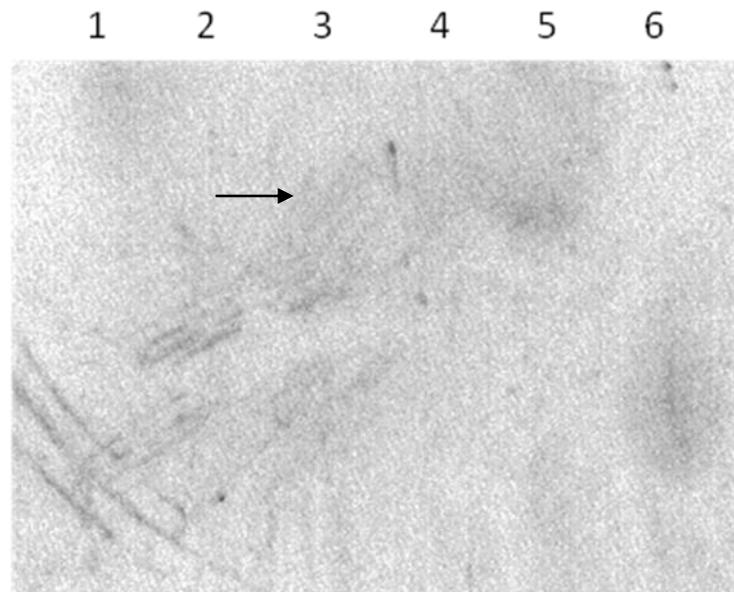


Figura 20. **Caseograma. Actividad de la proteasa en Fermentación en Estado Sólido con la cepa 54 crecida en salvado de trigo y medio MN a 29°C (FES-54).** Carril 1: FES-54 (24 horas). Carril 2: FES-54 (48 horas). Carril 3: FES-54 (72 horas). Carril 4: FES-54 (96 horas). Carril 5: FES-54 (120 horas). Carril 6: Renina de estómago de ternero. Se muestra entre paréntesis el tiempo de cultivo en cada caso.

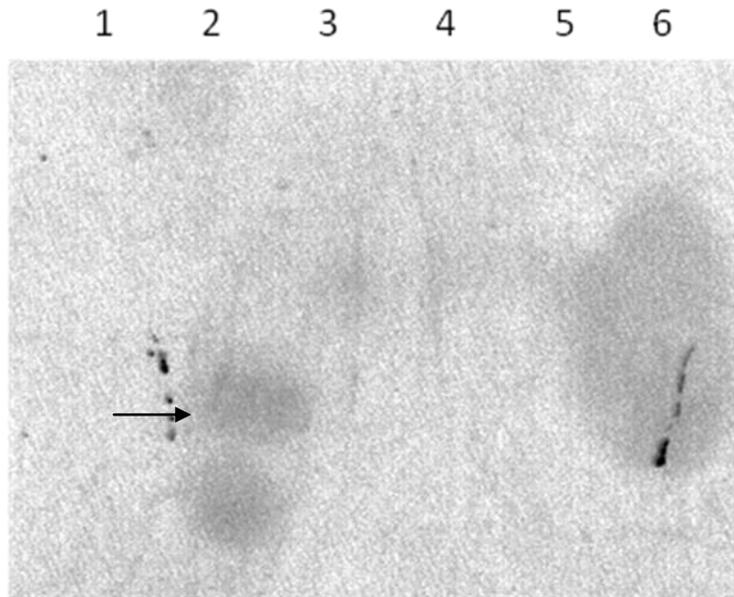


Figura 21. **Caseograma. Actividad de la proteasa en Fermentación sumergida con la cepa 18 en medio MN a 29°C y 250 rpm (Fsm-18).** Carril 1: Fsm-18 (24 horas). Carril 2: Fsm-18 (48 horas). Carril 3: Fsm-18 (72 horas). Carril 4: Fsm-18 (96 horas). Carril 5: Fsm-18 (120 horas). Carril 6: Renina de estómago de ternero. Se muestra entre paréntesis el tiempo de cultivo en cada caso. Se muestran entre paréntesis las horas de cultivo en cada caso.

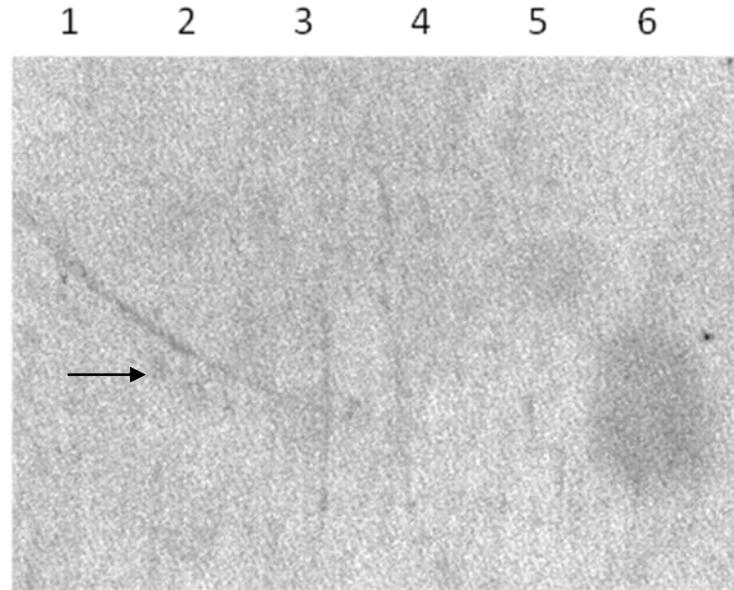


Figura 22. **Caseograma. Actividad de la proteasa en Fermentación sumergida con la cepa 54 en medio MN a 29°C y 250 rpm (Fsm-54).** Carril 1: Fsm-54 (24 horas). Carril 2: Fsm-54 (48 horas). Carril 3: Fsm-54 (72 horas). Carril 4: Fsm-54 (96 horas). Carril 5: Fsm-54 (120 horas). Carril 6: Renina de estómago de ternero. Se muestra entre paréntesis el tiempo de cultivo en cada caso. Se muestran entre paréntesis las horas de cultivo en cada caso.

Prueba de actividad proteolítica del medio de cultivo.

El experimento se diseñó con la finalidad de observar la estabilidad que tiene una proteasa control (renina de estómago de ternero) en presencia del medio de cultivo, ya que está comprobado que el género *Aspergillus* secreta diversas enzimas que pueden degradar la proteasa de interés, sobre todo en Fsm (Braaksma *et al.*, 2009).

Se analizaron las muestras de la fermentación de la cepa 18 y 54 en FES y Fsm mezclando 27 μ l de sobrenadante obtenidos a los diferentes tiempos de fermentación con 3 μ l del stock de renina de estómago de ternero (0.165 μ g/ μ l). Las muestras se incubaron durante 48 horas a 29 °C y se colocaron directamente en la placa con el gel de agarosa y leche descremada al 10% y se dejaron incubando a 37°C durante 15 minutos.

La renina que se incubó en presencia de los sobrenadantes de las cepas 18 y 54 en FES (Figura 23.) muestran un halo de actividad desde las 24 hasta las 120 horas; en el caso de la Fsm con la cepa 18, la actividad de la renina es nula a partir de las 72 horas y a partir de las 96 horas con la cepa 54; lo cual indica que la hidrólisis de la renina por proteasas presentes en el medio de cultivo sólo se presenta cuando las cepas se cultivan en Fsm y que esta degradación es más rápida en sobrenadantes de la cepa 18.

En base a las evidencias anteriores, cabe la posibilidad de que las proteasas presentes en el medio de cultivo generadas durante Fsm, afectan la estabilidad y actividad de la proteasa de interés, ya que éstas proteasas son capaces de degradarla, las cuales podrían aumentar su actividad en el pH básico que se genera en las fases tardías de crecimiento durante Fsm.

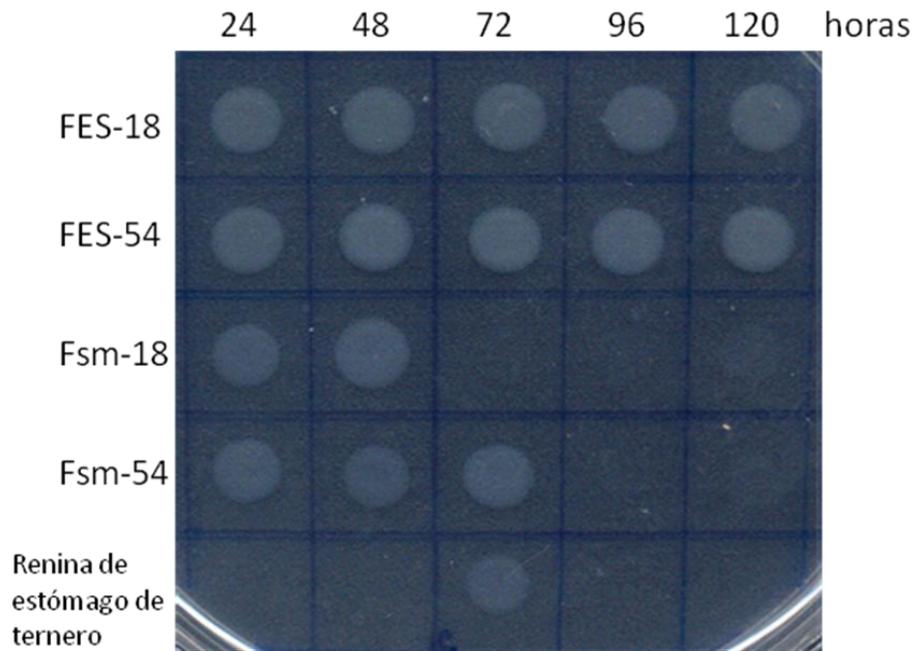


Figura 23. Prueba directa del caseograma en placa. Estabilidad de la renina de estómago a las 48 horas de incubación. Fermentación en Estado Sólido cepa 18 y 54 (FES-18 y FES-54). Fermentación sumergida cepa 18 y 54 (Fsm-18 y Fsm-54).

IV. Conclusiones.

- Los sustratos más adecuados para la producción de la proteasa de interés es la mezcla DDG:trigo molido en una proporción 1:1 para la cepa 18 y solamente salvado de trigo para la cepa 54.
- El mejor método de extracción para la enzima producida a partir de FES es empleando amortiguado de acetato de sodio pH 5.5 seguido de una extracción por prensado.
- Los resultados de cuantificación total de proteasa muestran que la cepa 18 produce 64% (20.1 mg/l) más proteasa en FES que en Fsm (7.3 mg/l) y la cepa 54 produce 4% (7.9 mg/l) más proteasa en FES que en Fsm (7.6 mg/l).
- La mayor concentración de enzima activa se obtuvo con la cepa 54 en FES que fue de 18.7% (1.95 mg/l), comparada a la producida en Fsm (0.45 mg/l) y aunque la producción de proteasa total de la cepa 18 fue mayor en FES, la cepa 54 bajo las mismas condiciones produjo 22.41% más proteasa activa.
- La degradación de renina de estómago de ternero es prácticamente nula cuando se encuentra en presencia de sobrenadantes producto de FES.

En base a los resultados obtenidos producto de la evaluación comparativa realizada en éste proyecto para la producción de una proteasa con actividad coagulante de *Aspergillus niger* en Fermentación en Estado Sólido y Fermentación sumergida, estamos en posibilidad de proponer que la Fermentación en Estado Sólido podría ser una alternativa viable para la producción de la proteasa a mayor escala.

Prospectivas.

- Continuar con el mejoramiento genético de la cepa 54 de *Aspergillus niger*.
- Optimizar las condiciones de cultivo y extracción en FES para la cepa 54, con la finalidad de obtener una mayor producción de proteasa activa.
- Diseñar una FES a mayor escala.

Bibliografía.

- Aguilar Cristobal Noé, Gutierrez Sánchez Gerardo, Prado Barragán Lilia A, Rodríguez Herrera Raul, Martínez Hernandez José L and Contreras Esquivel Juan. C. (2008). **Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes.** American Journal of Biotechnology 4 (4): 354-366
- Aranda Cuitlahuac, Robledo Armando, Loera Octavio, Contreras Esquivel Juan Carlos, Rodríguez Raúl and Aguilar Cristóbal Noé. (2006). **Fungal Invertase Expression in Solid State Fermentation.** Food Technology. Biotechnolology 44(2):229-233
- Baker Scott E. (2006). **Aspergillus niger genomics: Past, present and into the future.** Medical Mycology. 44:17-21.
- Bando Hiroki, Hisada Hiromo, Ishida Hiroki, Hata Yoji, Kataura Yoshio and Kondo Akihiko. (2011). **Isolation of novel promoter for efficient protein expression by Aspergillus oryzae in solid-state culture.** Appl Microbiol Biotechnol 92 (3):561-569.
- Bonifaz Trujillo J.Alexandro.(2010). **Micología medica básica.** 3^{era} Edición. Mc Graw Hill. Pag 7
- Braaksma Machtelt, Smilde Age K, van der Werf Mariët and Punt Peter J. (2009). **The effect environmental conditions on extracellular protease activity in controlled fermentations of Aspergillus niger.** Microbiology 155: 3430-3439.
- Cullen Dan. (2007). **The genome of an industrial workhorse.** Nature Biotechnology 25 (2):189-190.
- Díaz Ana B, Caro Ildfonso, de Ory Ignacio and Blandino Ana (2007). **Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace.** Enzyme and Microbial Technology. 41: 302-306.

- Dunn-Coleman Nigel S, Bloebaum Peggy, Berka Randy M, Bodie Elizabeth, Robinson Nancy, Armstrong Gale, Ward Michael, Przetak Melinda, Carter Gina L, LaCost Regina, Wilson Lori J, Kodama Katherine H, Baliu Enrique F, Bower Ben, Lamsa Michael and Heinsohn Henry. (1991). **Commercial Levels of Chymosin Production by *Aspergillus***. *Biotechnology*. 9: 976-981.
- García Garay Mariano, Quintero Ramírez Rodolfo, López-Munguía Agustín. **Biotecnología Alimentaria**. Editorial LIMUSA. Pag: 502-503
- Gouka R.J, Punt P.J, Van den Hondel C.A.M.J.J. (1997). **Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects**. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 1-11.
- Hernández Alicia, Alfaro Ileana y Arrieta Ileana. (2003). **Microbiología Industrial**. 1^{era} edición. Editorial EUNED. Pag: 206-207.
- Hölker U, Höfer M and Lenz J. (2004). **Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi**. *Applied Microbiology Biotechnology* 64: 175-186.
- Iwashita Kazuhiro. (2002). **Recent Studies of Protein Secretion by Filamentous Fungi**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94 (6): 530-535.
- Kavya Venkatesh and Padmavathi Tallapragada. (2009). **Optimization of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation**. *Polish Journal of Microbiology*. 58(2): 125-130)
- Laemmli, U.K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*. 227: 680-685.
- Mala John Geraldine Sandala, Edwinoliver Nesamony Gnanadhas and Kamini Numbi Ramudu. (2007). **Mixed substrates solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594**. *Journal of General and Applied Microbiology*. 53:247-253.
- Nagai Masaru, Ozawa Akira, Katsuragi Tohoru and Takuo Sakai. (2000). **Purification and Characterization of Acid-stable Protopectinase Produced by**

***Aspergillus awamori* in Solid-state Fermentation.** Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 64 (7): 1337-1344.

- Nelson Davil L and Cox Michael M. (2000). **Lehninger. Principios de Bioquímica.** 3^{era} Edición. Ediciones Omega S.A. Pag: 243-246.
- Ooijkaas Lydia P, Weber Frans J, Buitelaar Reinetta M, Tramper Johannes and Rinzema Arjen. (2000). **Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems.** Cell Press.18:356-360.
- Pandey AshoK. (2003). **Solid-state Fermentation.** Biochemical Engineering Journal 13: 81-84.
- Pandey Ashok, Soccol Carlos R and Mitchel David. (2000). **New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products.** Procces Biochemistry 35: 1153-1169.
- Pastrana L. (1996). **Fundamentos de la Fermentación en Estado Sólido y Aplicación a la Industria Alimentaria.** Ciencia y Tecnología Alimentaria 1 (3): 4-12.
- Pel Herman J. et al. (2007). **Genome sequencing and analysis of the versatile cll factory *Aspergillus niger* CBS 513.88.** Nature Biotechnology 25(2):221-231.
- Rodríguez Couto S and Sanromán A. (2005). **Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production.** Biochemical Engineering Journal 22: 211-219.
- Rao Mala B, Tanksale Aparna M, Ghatge Mohini S and Deshpande Vasanti V. (1998). **Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases.** Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(3): 597-635.
- Rodríguez Couto S and Sanromán A. (2006). **Application of solid-state fermentation to food industry. Review.** Journal of Food Engineering 76: 291-302.

- Rómero Gómez Sergio de Jesús. (2001). **Producción de Invertasa por *Aspergillus niger* en Fermentación Líquida y Fermentación Sólida.** Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas. UAM.
- Rosenberg Ian M. (1996). **Protein Analysis and Purification.** Benchtop Techniques. Birkhäuser. Pag 131.
- Sandhya Chandran, Sumantha Alagarsamy, Szakacs George and Pandey Ashok. (2005). **Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid –state fermentation.** Process Biochemistry. 40: 2689-2694.
- Shaligram Nikhil S, Singh Sudheer Kumar, Singhal Rekha S, Szakacs George and Pandey Ashok. (2009). **Effect of Precultural and Nutritional Parameters on Compactin Production by Solid-State Fermentation.** Journal of Microbiology and Biotechnology 19 (7): 690-697.
- Singhanía Reeta Rani, Anil Kumar Patel, Carlos R. Soccol and Pandey Ashok. (2009) **Recent advances in solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, 44: 13-18.
- Sivaramakrishnan Swetha, Gangadharan Dhanya, Nampoothiri Kesavan Madhavan, Soccol Carlos Ricardo and Pandey Ashok. (2007). **Alpha Amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation.** Journal of Scientific & Industrial Research. 66: 621-626.
- Solís Pereira Sara, Favela Torres Ernesto, Viniegra González Gustavo, Gutiérrez Rojas Mariano. (1993). **Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation.** Applied Microbiology Biotechnology 39: 36-41
- Talabardón Mylene and Yang Shang-Tian. (2005). **Production of GFP and Glucoamylase by Recombinant *Aspergillus niger*: Effects of Fermentation Conditions of Fungal Morphology and Protein Secretion.** Biotechnology Progress. 21:1389-1400

- Téllez Jurado A, Aranda-Cuenca A, González Becerra A.E, Viniegra González G and Loera O. (2006). **Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations.** Enzyme and Microbial Technology 38: 665-669.
- Till Olaf, Bauman Eckehard and Linss Werner. (2001). **Zymography with Caseogram Prints: Quantification of Pepsinogen.** Analytical Biochemistry 292: 22-25.
- Tortora Gerard J, Funke Berdell R and Case Christine L. Case. (2007). **Introducción a la microbiología.** 9^a Edición. Medica Panamericana. Pag: 116-117.
- Towbin Harry, Staehelin Theophil and Gordon Julian (1979). **Electrophoretic transfer of protein polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.** Biochemistry. 76 (9): 4350-4354
- Treviño Lucia, Contreras Esquivel Juan C, Rodríguez Herrera Raúl and Aguilar Cristóbal Noé. (2007). **Effects of polyurethane matrices of fungal tannase and gallic acid production under solid state cultura.** Journal of Zhejiang University Science B. 8 (10): 771-776.
- Viniegra-González Gustavo, Favela-Torres Ernesto, Aguilar Cristobal Noe, Romero-Gomez Sergio de Jesus, Díaz-Godínez Gerardo and Augur Christopher. (2003). **Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems.** Biochemical Engineering Journal 13:157-167.
- Vishwanatha K. S, Appu Rao A.G and Singh S.A. (2010). **Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters.** J. Ind Microbiol Biotechnol 37:129-138.
- Webster John and Weber Roland. (2007). **Introduction to Fungi.** Cambridge. University Press. Pag: 1-5.

Páginas web consultadas.

1. <http://www.alltechmexico.net/>
<http://www.alltechmexico.net/nuestroproductos/allzymessf.html> junio 20,2012

Apéndices.

Apéndice I.

Medios de cultivo y soluciones.

Agar Papa Dextrosa (PDA)	g/l
Infusión de Papa	4.0
Dextrosa	20.0
Ajustar a pH 5.6±0.2	

Medio Mínimo sólido (MN)	%
Almidón	1
Licor de maíz	0.1
Elementos traza 1000X	0.1
Sales 25X	4
Agar	1.5
Ajustar a pH 5.5	

Medio Mínimo (MN)	%
Almidón	1
Licor de maíz	0.1
Elementos Traza	0.2
Sales 25X	4
Ajustar a pH 5.5	

Sales 25X	gramos
NaNO ₃	37.50
KCl	3.25
KH ₂ PO ₄	9.50
Disolver en agua hasta un volumen de 250 ml.	

Elementos traza 1000X	g
Zn SO ₄ · 7H ₂ O	2.2
H ₃ BO ₃	1.1
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.17
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.16
NaMoO ₄ · H ₂ O	0.15
Na ₂ EDTA	5.0

Disolver en 80 ml de agua destilada. Añadir los compuestos en orden (ignorar precipitados y cambios de color), hervir, enfriar a 60°C y ajustar el pH a 6.5 con KOH concentrado. Enfriar a temperatura ambiente y ajustar a 100 ml con agua destilada.

Amortiguador de Transferencia	
Glicina	200 mM
Tris	25 mM
Metanol	10%

Amortiguador de Acetato de Sodio (Extracción de proteínas)	
Acetato de sodio	10 mM
NaCl	0.5%
Ajustar pH 5.5	

Amortiguador de Fosfato Salino(PBS)	
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	10 mM
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2 mM
NaCl	137mM
Ajustar a pH 7.0	

Amortiguador de electroforesis	
SDS-PAGE	
Tris	1.25 mM
Glicina	125 mM
SDS	0.5 %

Amortiguador de carga	%
4X N-PAGE	
Tris HCl pH 6.8	0.05
Glicerol	10
Azul de bromofenol	0.05

Amortiguador de carga	%
4X SDS-PAGE	
Tris HCl pH 6.8	0.05
Glicerol	10
SDS	2
2-β-mercaptoetanol	5
Azul de bromofenol	0.05

Amortiguador de electroforesis	
N-PAGE	
Tris	1.25 mM
Glicina	125 mM

Apéndice II.

Trampas para esporas.

Las trampas para recuperar las esporas a partir del medio PDA se realizaron con fibra sintética para filtros de acuario (polialómero) en tubos falcón de 15 ml. El tubo se corto por la parte inferior y se introdujo un poco de la fibra para atrapar en ella micelio y restos de agar. No debe de estar muy comprimida puesto que no permitiría el paso de la solución de Tween 20 al 0.1%(v/v) con las esporas recolectadas. Finalmente las trampas deben esterilizarse.

Concentración de enzimas con acetona.

La precipitación de proteínas con acetona es una técnica utilizada para concentrar proteínas a partir de soluciones diluídas. (Rosemberg 1996).

Materiales:

- Acetona a -20°C
- Microtubos de 1 ml

Metodología:

1. Adicionar 9 volúmenes de acetona fría (-20°C) a la solución de proteínas.
Mezclar e incubar a -20°C por 10 minutos.
2. Colectar la proteína precipitada centrifugándola por 5 minutos a 12 000 g.
3. Decantar la acetona y dejar secar el pellet de proteína a temperatura ambiente.
4. Disolver la proteína en agua Milli Q.

Las muestras se pueden utilizar directamente para análisis SDS-PAGE o conservar a 4°C.

Apéndice III.

Cuantificación de proteasa por Densitometría.

A partir de un stock de renina de estómago de ternero con una concentración de 0.66 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se hicieron diluciones para la realización de la curva estándar con una concentración entre 4.1- 24.7 mg de proteasa/l, estas fueron corridas en un gel SDS-PAGE y posteriormente se realizó un Western-blot. Por el método de densitometría se obtuvo el valor en pixeles de cada señal y se relacionó con la concentración de la dilución correspondiente.

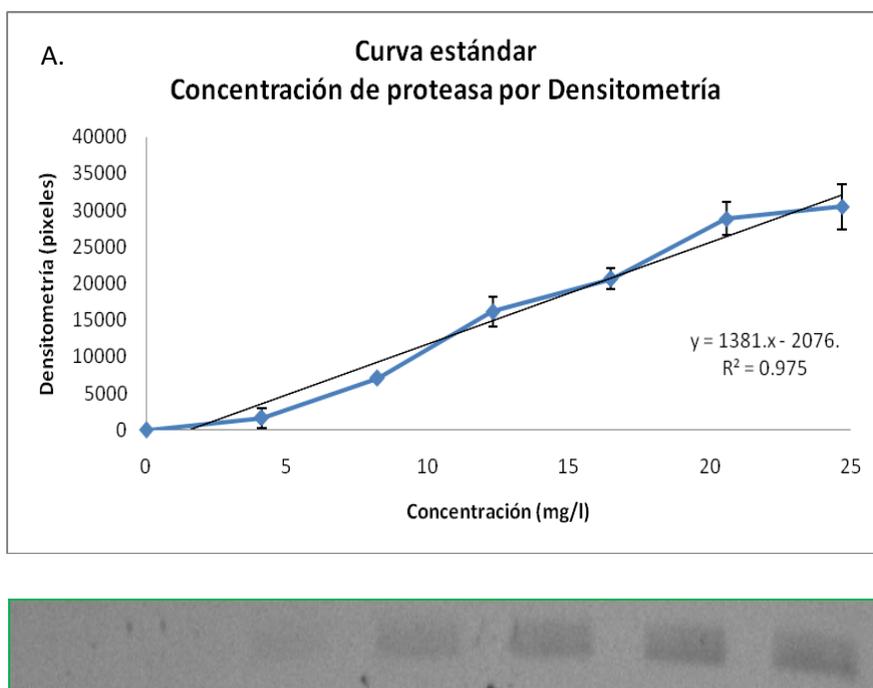


Figura 24. A. Curva estándar para la cuantificación de proteasa por densitometría. B. Western-blot con diluciones de renina de estómago de ternero que se utilizó para la curva estándar.

Apéndice IV.

Cuantificación de proteasa activa por prueba de turbidez de la leche en placa.

Para la prueba de microtitulación de la turbidez de la leche en microplaca se utilizó un stock de renina de estómago de ternero (0.66 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a partir del cual se realizaron diluciones y se midió la absorbancia de cada dilución. La prueba se realizó en una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia a 620 nm utilizando un lector de microplacas. Los valores de actividad de la proteasa se calcularon a partir de una curva estándar (0.1-0.8 ng de proteasa/ μl) (Dunn-Coleman *et al.*, 1991).

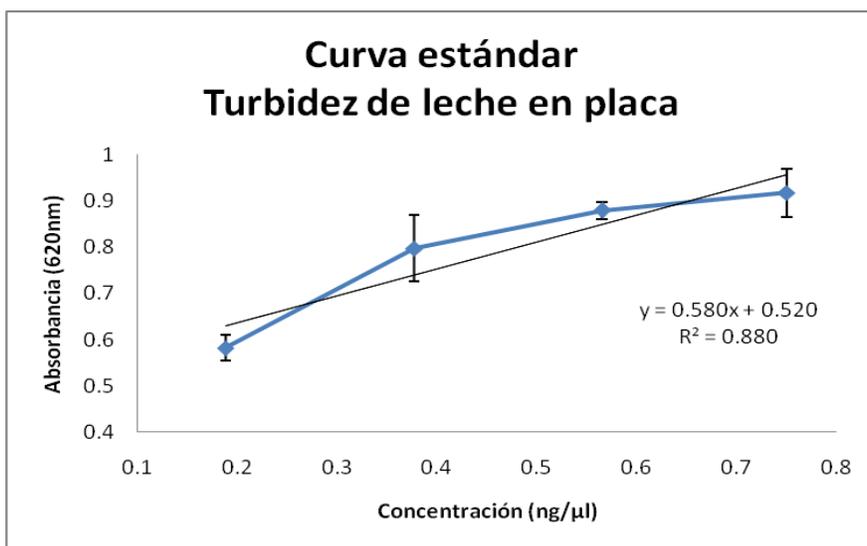


Figura 25. Curva estándar para la Cuantificación de proteasa activa mediante prueba en placa de turbidez de leche.

La actividad se reportó en función de la relación de absorbancia con respecto a la concentración de enzima activa.