



Universidad de los Andes.

Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Escuela de Bioanálisis.



**OPTIMIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Rhizomucor pusillus* EN  
MEDIOS DE CULTIVOS NO CONVENCIONALES PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PROTEOLITICAS**

**Autores:**

María Avendaño C.I: 20198418

Joelyd Parra C.I: 20.432318.

**Tutor:** Dr. Pablo García

Mérida, Octubre 2014

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradecemos a Dios en primer lugar, por habernos guiado a lo largo de nuestra carrera, por ser nuestra fortaleza y apoyo pero sobre todo por permitirnos desarrollar con éxito esta tesis que hoy presentamos, con un camino lleno de buenas experiencias y mucho aprendizaje.

A nuestro tutor el profesor Pablo García, por su dedicación y confianza porque desde que llegamos a pedir tutoría y ayuda nos brindó su apoyo y compartió sus conocimientos con nosotras, haciendo agradable el desarrollo de este trabajo de investigación con sus consejos y chistes cabe destacar, gracias “profe”.

Le damos infinitas gracias al Ing. Osman Morillo por su valiosa colaboración al presentarnos este tema de investigación como una alternativa muy interesante, por toda su ayuda en la parte tanto experimental como teórica.

Al laboratorio BIOMI por albergarnos mientras realizábamos este trabajo de investigación, por el financiamiento del mismo y por supuesto todos los que allí trabajan.

Gracias a la Lcda. Isoleth Torres por guiarnos al momento que llegamos al laboratorio, por su paciencia, ser una gran ayuda y por regalarnos un poco de su tiempo para que esta tesis se llevara a cabo de una forma más fácil y exitosa.

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                                                                                                            |              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                                                                                                                     | <b>1</b>     |
| <b>1.1 Enzimas</b>                                                                                                                                         | <b>1-2</b>   |
| <b>1.1.1 Clasificación de las enzimas según su tipo de reacción</b>                                                                                        | <b>2</b>     |
| <b>1.1.1.1 Hidrolasas</b>                                                                                                                                  | <b>2</b>     |
| <b>1.1.1.2 Liasas</b>                                                                                                                                      | <b>2</b>     |
| <b>1.1.1.3 Transferasas</b>                                                                                                                                | <b>2</b>     |
| <b>1.1.1.4 Oxidorreductasas</b>                                                                                                                            | <b>2</b>     |
| <b>1.1.1.5 Isomerasas</b>                                                                                                                                  | <b>2</b>     |
| <b>1.1.1.6 Sintetasas</b>                                                                                                                                  | <b>2-3</b>   |
| <b>1.2 Proteasas</b>                                                                                                                                       | <b>3</b>     |
| <b>1.2.1 Tipos de Proteasas</b>                                                                                                                            | <b>4</b>     |
| <b>1.3 Proteasas de Microorganismos</b>                                                                                                                    | <b>4</b>     |
| <b>1.3.1 Bacterias</b>                                                                                                                                     | <b>4</b>     |
| <b>1.3.2 Hongos</b>                                                                                                                                        | <b>5</b>     |
| <b>1.3.3 Virus</b>                                                                                                                                         | <b>5</b>     |
| <b>1.4 <i>Rhizomucor pusillus</i></b>                                                                                                                      | <b>5-6</b>   |
| <b>1.5 Importancia de las proteasas</b>                                                                                                                    | <b>7</b>     |
| <b>1.5.1 Fisiología y bioquímica</b>                                                                                                                       | <b>7</b>     |
| <b>1.5.2 Biotecnología</b>                                                                                                                                 | <b>7</b>     |
| <b>1.6 Actividad Enzimática</b>                                                                                                                            | <b>7</b>     |
| <b>1.6.1 Factores que afectan la actividad enzimática</b>                                                                                                  | <b>7</b>     |
| <b>1.6.1.1 Influencia del pH</b>                                                                                                                           | <b>8</b>     |
| <b>1.6.1.2 Influencia de la temperatura</b>                                                                                                                | <b>8</b>     |
| <b>1.7 Antecedentes en Venezuela</b>                                                                                                                       | <b>8-9</b>   |
| <b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>                                                                                                                       | <b>10</b>    |
| <b>2.1 Hipótesis</b>                                                                                                                                       | <b>10</b>    |
| <b>2.2 Objetivos</b>                                                                                                                                       | <b>11</b>    |
| <b>2.2.1 Objetivo General</b>                                                                                                                              | <b>11</b>    |
| <b>2.2.2 Objetivos Específicos</b>                                                                                                                         | <b>11</b>    |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                                                                                             | <b>12</b>    |
| <b>3.1 Microorganismos</b>                                                                                                                                 | <b>12</b>    |
| <b>3.2 Crecimiento en Agar papa dextrosa y obtención de esporas</b>                                                                                        | <b>12-13</b> |
| <b>3.3 Medio de cultivo no convencional</b>                                                                                                                | <b>13-14</b> |
| <b>3.4 Determinación de la concentración de harina en el medio de cultivo y cantidad de esporas en el inóculo que favorecen la producción de proteasas</b> | <b>14</b>    |

|                                                                                         |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.5 Toma de muestra                                                                     | 14-15 |
| 3.6 Determinación de la actividad proteolítica, mediante la coagulación de la leche     | 15-16 |
| 3.7 Concentración del extracto enzimático                                               | 17    |
| 3.8 Ensayo enzimático                                                                   | 17    |
| 3.9 Temperatura optima                                                                  | 18    |
| 3.10 pH optimo                                                                          | 18    |
| 3.11 Estabilidad térmica                                                                | 18    |
| 4. RESULTADOS Y DISCUCIONES                                                             | 19    |
| 4.1 Crecimiento de <i>R. pusillus</i> en PDA                                            | 19    |
| 4.2 Crecimiento de <i>R. pusillus</i> en medio de cultivos no convencionales            | 19-22 |
| 4.3 Determinación de Actividad Enzimática                                               | 23-24 |
| 4.4 Determinación del tamaño de inóculo en medio de harina al 0,5%                      | 24    |
| 4.5 Determinación de la actividad enzimática                                            | 24-26 |
| 4.6 Efecto de la concentración de extracto enzimático sobre la actividad                | 27    |
| 4.7 Actividad enzimática en relación al tiempo y $1 \times 10^8$ de extracto enzimático | 27    |
| 4.8 Actividad enzimática en relación al tiempo y $4 \times 10^8$ de extracto enzimático | 28    |
| 4.9 Efecto del pH sobre la actividad enzimática                                         | 28    |
| 4.10 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática                             | 29    |
| 4.11 Resistencia térmica de la enzima de <i>R. pusillus</i>                             | 30    |
| 5. Conclusiones                                                                         | 31-32 |
| 6. Bibliografía                                                                         | 33-34 |

## RESUMEN

El mercadeo de enzimas en Venezuela es considerado de competencia imperfecta, ya que existen pocos ofertantes, quienes influyen de manera importante en el precio final de las enzimas. De esta manera las empresas que requieren enzimas para la elaboración de productos se ven obligadas a importarlas, con una tendencia cada vez más marcada a través de los años. Como consecuencia de la situación nacional con respecto a la dependencia de las enzimas importadas. Se deben enfocar más investigaciones que se dediquen a la búsqueda de estas enzimas en diferentes microorganismos bacterias, hongos entre otros. El presente trabajo reporta la obtención, caracterización y purificación parcial de la proteasas provenientes de una cepa *Rhizomucor pusillus*. Se determinó la actividad proteolítica, mediante la coagulación de la leche y se realizó el ensayo enzimático por el método KEMBHAVI. Presento unan actividad enzimática 620UE. El pH óptimo de la muestra es de 8. La temperatura optima de 35°C. La estabilidad térmica es buena, reteniendo el 100% de su actividad luego de haber sido incubada 5min a 35°C. Las enzimas proteolíticas o peptídicas han beneficiado a la humanidad de diferentes formas, y no hay duda de que contribuirán más en el futuro.

## 1. NTRODUCCIÓN

En nuestro país la producción de enzimas es prácticamente inexistente, por tanto, el mercado venezolano de enzimas se caracteriza por pocos ofertantes para la demanda nacional, lo que provoca altos costos, por ende las empresas que requieren enzimas se ven obligadas a importarlas y depender de la producción externa para suplir sus necesidades.

Las proteasas son enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas, las cuales representan el 30% de la producción mundial de enzimas, siendo las denominadas alcalinas las que comprenden el mayor porcentaje de comercialización. La incapacidad de las proteasas de plantas y animales para satisfacer exigencias actuales ha llevado a un creciente interés en las proteasas producidas por microorganismos.

Los hongos elaboran una variedad más amplia de enzimas que las bacterias, producen proteasas de tipo ácido, neutro y alcalina. Por lo que existen numerosos reportes de biosíntesis de proteasas fúngicas que indican que las cepas *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Penicillium* producen concentraciones elevadas de enzimas proteolíticas. La mayoría de los estudios en la producción de enzimas proteolíticas convergen principalmente en la utilización de hongos mesófilos; sin embargo, actualmente existe interés en la producción de enzimas de microorganismo termotolerantes y termófilos, para aplicaciones a gran escala que requieren de altas temperaturas.

### 1.1.- Enzimas

Las enzimas son proteínas formadas por el protoplasma de las células y representan importantes componentes del mismo. Una enzima tiene la propiedad única de no consumirse durante las reacciones que cataliza; al final de la reacción, existe prácticamente tanta enzima como al principio, no

forma parte de los productos finales; estos provienen únicamente de las sustancias sobre las cuales actúa la enzima, los sustratos. Las enzimas se parecen a los agentes conocidos en química como catalizadores. Un catalizador se define como una sustancia que acelera una reacción sin alterarse durante esta. Por lo tanto, las enzimas pueden llamarse catalizadores orgánicos complejos producidos por las células vivientes, pero que pueden actuar independientemente de sus células de origen. (Tuttle y Schottelius, 1971)

#### **1.1.1.- Clasificación de las enzimas según su tipo de reacción**

Las enzimas se clasifican y denominan de acuerdo con la naturaleza de la reacción química que cataliza. Hay seis clases principales de reacciones catalizadas por enzimas, para nuestros propósitos solo presentaremos estos seis grupos con el ejemplo de una enzima típica de cada una: (Voet, 2006)

**1.1.1.1.- Hidrolasas:** las hidrolasas aceleran la fijación de agua al sustrato, iniciando el desdoblamiento de la molécula, como las proteasas.

**1.1.1.2.- Liasas:** las enzimas de grupo liasa rompen o desdoblan el sustrato sin que se encuentre presente ningún otro reactivo, como la Anhidrasacarbónica.

**1.1.1.3.-Tranferasas:** son las enzimas que transportan un radical de un compuesto a otro, como la Creatina fosforiltransferasa.

**1.1.1.4.- Oxidorreductasas:** las oxidorreductasas forman un importante grupo de enzimas, que se relacionan con las oxidaciones y reducciones biológicas, como la Deshidrogenasa láctica.

**1.1.1.5.- Isomerasas:** las isomerasas catalizan los cambios de estructura intramolecular, como la Fosfato de triosa.

**1.1.1.6-. Sintetasas:** las sintetasas catalizan la unión de dos moléculas separadas, como la Sintetasa de acetil-coenzima A (CoA). (Voet, 2006)

## **1.2-. Proteasas**

Las proteasas o peptidasas son un tipo de enzimas hidrolíticas (de la clase de las hidrolasas) capaces de escindir los enlaces peptídicos de las proteínas modificando su estructura y en el caso de enzimas, su actividad catalítica. La hidrólisis de un enlace peptídico es una reacción energéticamente favorable, pero extremadamente lenta (Dubey y col. 2007). Generalmente, las proteasas son sintetizadas como proenzimas inactivas para evitar la degradación en el lugar y sitio equivocados. Están ubicuamente distribuidas en todos los tejidos y fluidos biológicos (Neurath 1989), pues constituyen una clase de enzimas con muchas funciones fisiológicas (Devaraj y col. 2007). La proteólisis es fundamental para el funcionamiento normal de organismos multicelulares, y las enzimas proteolíticas están involucradas en muchos aspectos como el desarrollo, fisiología, defensa y respuestas contra estrés, y la adaptación a los cambios del ambiente. Cerca de la mitad de las enzimas disponibles comercialmente, son proteasas; se utilizan en el procesamiento de los alimentos, en el ablandamiento de las carnes, en la elaboración de quesos y panes, en las industrias textiles y del cuero, entre otros. Además, algunas proteasas también han sido utilizadas como sistemas modelos para el estudio de la relación estructura-función (Yadav y col. 2006). Con la biología molecular en auge, las enzimas proteolíticas se han convertido en un campo fértil en investigación básica y aplicada (Dubey y col. 2007)

### **1.2.1-. Tipos de proteasas**

Las proteasas se clasifican en exopeptidasas o endopeptidasas. Las exopeptidasas rompen enlaces cercanos al extremo carboxilo o amino terminal de la proteína. Las endopeptidasas por su parte rompen enlaces ubicados en un sitio interno de la cadena polipeptídica. (Genckal, 2004)

Se reconocen así, cinco clases catalíticas de proteasas determinadas por el rol primario llevado a cabo por un grupo serin, treonin, cistein, asparto y metal (en general un ion  $Zn^{2+}$ ) en la catálisis enzimática, por lo tanto las proteasas se clasifican en serinproteasas, treoninproteasas, cisteinproteasas, aspartoproteasas y metaloproteasas. Las serin, treonin y cisteinproteasas se diferencian de las asparto y metaloproteasas en que el nucleófilo del sitio catalítico de tres las primeras, es un aminoácido, en tanto que en las otras, es una molécula activada de agua. Los estados de transición de estas tres clases de proteasas involucran la formación de un intermediario tetraédrico estabilizado por la presencia de enlaces de hidrógeno con otros residuos (Dubey y col. 2007). Además, las serin y cisteinproteasas forman complejos covalentes enzima/sustrato, no así las asparto y metalproteasas (Dubey y Jagannadham 2003, Antão y Malcata 2005).

### **1.3-. Proteasas de microorganismo**

**1.3.1-. Bacterias:** la mayoría de las proteasas comerciales, sobre todo neutras y alcalinas, son producidas por microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* (Genckal, 2004)

**1.3.2-. Hongos:** estos microorganismos elaboran una variedad más amplia de enzimas que las bacterias. Producen proteasas de tipo ácido, neutro y alcalino. Las proteasas fúngicas son activas a un amplio rango de pH (pH 4,0-11,0) y exhiben una amplia especificidad por el sustrato. Las enzimas fúngicas pueden ser producidas mediante el proceso de fermentación en estado sólido. Las proteasas fúngicas ácidas presentan un pH óptimo entre 4,0 y 4,5 y son estables entre pH 2,5 y 6,0. Estas proteasas son particularmente útiles en la industria quesera debido a su estrecho rango de pH y a la especificidad de la temperatura. Las proteasas fúngicas de tipo neutro, son metaloproteasas que se activan a pH 7 y son inhibidas por agentes quelantes. Las proteasas alcalinas fúngicas se utilizan en modificación de alimentos ricos en proteínas (Genckal, 2004)

**1.3.3-. Virus:** Las proteasas virales han cobrado importancia, ya que estas proteínas forman parte de virus que causan ciertas enfermedades mortales como el SIDA y el cáncer (Genckal, 2004)

#### **1.4-. *Rhizomucor pusillus***

El género *Rhizomucor* se distingue de *Mucor* por la presencia de estolones y rizoides poco desarrollados en la base de los esporangióforos y por la naturaleza de sus termófila 3 especies: *R.miehei*, *R. pusillus* *R. tauricus*. Las tres especies son potenciales patógenos de humanos y animales y fueron clasificados originalmente en el género *Mucor*. *Rhizomucor pusillus* es cosmopolita y tanto *R. miehei* *R. pusillus* han sido reportados como patógenos para los seres humanos y animales, este último en mayor medida (Ellis, 1997).

Este zygomycete termófilo es fácilmente reconocible por su característica compacta, baja (2-3 mm de alto), gris grisáceo micelio de color marrón y por el desarrollo de la típica sympodially ramificado, hialino a esporangióforos color amarillo-marrón (8-15  $\mu\text{m}$  de diámetro), siempre con un septo por debajo del esporangio. Los esporangios son globosos (40-60  $\mu\text{m}$  de diámetro), cada una poseyendo un óvalo o columela en forma de pera (20-30  $\mu\text{m}$ ), a menudo con un collarite. Esporangiosporas son hialinas, de paredes lisas, globoso a subglobosas, ocasionalmente ovalada (3-5  $\mu\text{m}$ ), y, a menudo se mezclan con los restos cristalinos de la pared de esporangios. Clamidoconidios están ausentes. Zigosporas son toscamente amuralladas, de color marrón rojizo a negro, 45-65  $\mu\text{m}$  de diámetro y se pueden producir a lo largo de las hifas aéreas en apareamientos entre aislamientos compatibles. Rango de crecimiento Temperatura: mínima 20-27°C; óptima 35-55°C; máximo 55-60°C. RG-2 organismo (Ellis, 1997).



**Figura 1.** Esporangióforos, columelas y rizoides primitivas de *Rhizomucor pusillus*. (Ellis, 1997)

## **1.5-. Importancia de las proteasas**

### **1.5.1-. Fisiológica y bioquímica**

Las proteasas desempeñan un importante papel a nivel fisiológico en los diversos organismos que las poseen. Uno de ellos está relacionado con la formación de esporas en las bacterias y cuerpos fructíferos en mohos. También están involucradas en la germinación, modificación enzimática, nutrición y regulación de la expresión de algunos genes. (North, 1982)

### **1.5.2-.Biotecnológica**

Estas enzimas tienen gran importancia biotecnológica ya que se emplean en diversos rubros industriales: la industria farmacéutica, alimentaria, elaboración de detergentes entre otros. (Sharmin y Rahman, 2007)

## **1.6-.Actividad enzimática**

Una unidad de actividad enzimática (símbolo *U*) es la cantidad de enzima que en una reacción enzimática cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto. Se utiliza también en combinación con otras unidades (*U/mg* de proteína o *U/mL*) para señalar, respectivamente, la actividad enzimática específica o la concentración de actividad enzimática.

### **1.6.1-. Factores que afectan la actividad enzimática**

Debido a la naturaleza proteica, las enzimas se ven afectadas en su actividad y estructura por los mismos factores que afectan a las demás proteínas, entre los que cabe destacar:

#### **1.6.1.1.-Influencia del pH**

El pH del medio es el responsable de que los grupos funcionales de las enzimas (-COOH, -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH) pueden estar cargados positiva, y negativamente, o posean carga neutra (ionización). Recordar que las variaciones del pH pueden ocasionar un cambio en la estructura tridimensional de las enzimas, que pueden afectar en su actividad. (Badui, 2000)

Existe un pH óptimo en que la concentración de H<sup>+</sup> es la idónea para que se produzca la actividad catalítica. También existe una banda, que oscila entre un valor del pH mínimo y otro máximo, donde la enzima puede actuar. Los valores situados fuera de esta zona no permiten que exista actividad enzimática. (Whitaker, 1994)

#### **1.6.1.2.-Influencia de la temperatura**

Las reacciones catalizadas por enzimas siguen, por regla general, la ley de Van t'Hoff que establece que cada diez grados de aumento de la temperatura se produce un aumento de velocidad de la reacción de dos a cuatro veces. Esta regla se cumple dentro de unos límites, ya que las enzimas, debido a su naturaleza proteica, son termolábiles, siendo afectadas por las variaciones de la temperatura e inactivándose al desnaturalizarse. Cada enzima posee una temperatura óptima de funcionamiento, que en las enzimas humanas suele estar alrededor de 37°C. (Patnaik, 2002)

#### **1.7-. Antecedentes en Venezuela**

A lo largo de muchos años los países latinoamericanos han mostrado una producción limitada de enzimas que pudiesen ser empleadas a nivel industrial. En lo que concierne a Venezuela, la situación interna es similar a la que presentan otros países latinoamericanos. (Fundación CIEPE, 2007)

El mercadeo de enzimas en Venezuela es considerado de competencia imperfecta, ya que existen pocos ofertantes, quienes influyen de manera importante en el precio final de las enzimas. De esta manera las empresas que requieren enzimas para la elaboración de productos se ven obligadas a importarlas, con una tendencia cada vez más marcada a través de los años. (Fundación CIEPE,2007)

Las empresas biotecnológicas establecidas en el país, realizan los procesos necesarios para producir a gran escala diferentes enzimas, con el principal objetivo de satisfacer el mercado local, generando así fuentes de empleo y disminuyendo la necesidad de realizar importaciones. La necesidad de importar enzimas para uso industrial en Venezuela, sugiere promover el desarrollo de investigaciones a nivel nacional con la finalidad de cubrir la demanda industrial a nivel nacional. (Mendoza, 2011)

## **2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Como consecuencia de la situación nacional con respecto a la dependencia de las enzimas importadas. Se deben enfocar más investigaciones que se dediquen a la búsqueda de estas enzimas en diferentes microorganismos bacterias, hongos entre otros. En biotecnología la aplicación de enzimas es un área de impacto, específicamente dentro del sector alimentario, farmacéutico y analítico.

Actualmente el uso de las enzimas está limitado por su estabilidad sin embargo, la experiencia práctica de la ingeniería de proteínas ha demostrado que es posible utilizar la información obtenida de las proteínas termoestables para mejorar la estabilidad térmica de las enzimas. Para esto, es necesario realizar estudios referentes a la caracterización de los factores bioquímicos y estructurales que confieren la estabilidad térmica de las enzimas.

Las enzimas proteolíticas o peptídicas han beneficiado a la humanidad de diferentes formas, y no hay duda de que contribuirán más en el futuro.

El presente trabajo reporta la obtención, caracterización y purificación parcial de las proteasas provenientes de una cepa *Rhizomucor pusillus*. Hongo que se ha demostrado que produce una alta cantidad de enzimas proteolíticas, las cuales pueden ser de beneficio a nivel industrial y por tanto se procura determinar las condiciones óptimas en cuanto a factores y parámetros, para que dicho hongo tenga una mayor actividad enzimática.

### **2.1.- Hipótesis**

El crecimiento de *Rhizomucor pusillus* en medios de cultivo no convencionales, de bajo costos, representa una alternativa para producción de enzimas proteolíticas.

## **2.2-. Objetivos**

### **2.2.1-.Objetivo general**

Estudiar la actividad proteolítica de *Rhizomucor pusillus* excretada en medios de cultivo, no convencionales.

### **2.2.2-. Objetivos específicos**

- Estudiar el crecimiento de *Rhizomucor pusillus* en medios no convencionales de bajo costo.
- Medir la actividad proteolítica
- Determinar el pH óptimo, de la actividad enzimática.
- Determinar la temperatura optima, de la actividad enzimática.
- Valorar la resistencia térmica, de la actividad enzimática.
- Medir la producción enzimática variando la concentración de inóculo y del medio de cultivo.

### 3-. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1-. Microorganismos

Se utilizó una cepa fúngica de *R. pusillus* (Rp-39) previamente aislada, perteneciente a la colección del laboratorio BIOMI.



**Figura 2.-** Cepa de *Rhizomucor pusillus* en medio de conservación (Laboratorio BIOMI)

#### 3.2-. Crecimiento en Agar papa dextrosa y obtención de esporas

La cepa *R. pusillus* fue crecida en Erlenmeyer de 125mL conteniendo 45ml de Agar Papa Dextrosa, previamente esterilizados. Se utilizó un inóculo de micelio obtenido de cuñas de mantenimiento y se incubaron a 37°C durante 48 horas.



**Figura 3.-** Autoclave para esterilización de material y medios de cultivo (Laboratorio BIOMI)

Transcurridas las 48 horas de crecimiento, al Erlenmeyer se le agregaron perlas de vidrio y agua destilada esterilizada (10ml), se agitó cuidadosamente, la suspensión fue colocada en tubos falcón de 45mL, posteriormente se contó el número de esporas en cámara de Neubauer, y fueron conservadas en refrigeración a 4°C, para su posterior uso.

### **3.3.- Medio de cultivo no convencional**

Composición: Harina de frijol Bayo (*Phaseolus vulgaris* Linneo Grano) a diferentes porcentajes y agua destilada.

El medio es esterilizado en olla de presión a 120°C durante 15 minutos. Se prepararon diferentes tipos de medio variando la concentración de harina de frijol Bayo, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1% y 2%.



**Figura 4.-** Frijol Bayo, comprado en el mercado principal de Mérida

#### **3.4.- -. Determinación de la concentración de harina en el medio de cultivo y cantidad de esporas en el inóculo que favorecen la producción de proteasas**

Se varió el número de esporas en el inóculo, se utilizaron  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  y  $4 \times 10^8$  esporas de suspensión de esporas y el porcentaje de harina en el medio no convencional 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1% y 2%. Las diferentes combinaciones se incubaron a 37°C y fueron muestreadas a las 12, 24, 48 y 72 horas.

#### **3.5.- Toma de muestras**

Durante el crecimiento se tomaron muestras (1ml) en tubos eppendorf, se centrifugaron durante 10 min a 3.500g, obteniéndose el extracto enzimático contenido en el sobrenadante.



**Figura 5.-** Micro centrifuga. (Laboratorio BIOMI)

### **3.6-. Determinación de la actividad proteolítica, mediante la coagulación de la leche**

Se utilizó como sustrato: Leche descremada al 10% y Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 1,47% en agua destilada.

Se agregó 3 mL del medio de sustrato en tubos de ensayo se dejó reposar en el baño de maría hasta alcanzar los  $35^\circ\text{C}$ , y se inició la medida de la actividad al añadir 0,5ml del extracto enzimático. El tiempo de coagulación se determinó al iniciarse la precipitación de la leche.



**Figura6.-** Baño de María. (Laboratorio BIOMI)



**Figura7.-** Baño de María. (Laboratorio BIOMI)

### 3.7-. Concentración del Extracto Enzimático

El extracto enzimático se concentró con Sulfato de Amonio ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) al 60% de saturación. El precipitado obtenido después de 48h se recuperó mediante centrifugación y fue resuspendido en buffer fosfato 50 mM, pH 6 conteniendo 10 % de glicerol. El extracto enzimático se conservó a 4°C

### 3.8-. Ensayo Enzimático (Actividad caseinolítica)

La actividad proteolítica se determinó por el método KEMBHAVI descrito por Johnvesly y col. (2002). El ensayo se inició incubando a 35°C durante 10min, 0,95mL de una solución de caseína al 1% en una solución amortiguadora de Fosfato de Sodio (pH 6) y 0,05mL de extracto enzimático. La reacción fue detenida con la adición de 1,5mL de ÁcidoTricloroacético (TCA) al 5%. La mezcla de reacción fue centrifugada a 3500g durante 15 min y filtrada a través de papel filtro. La absorbancia del filtrado se determinó a 280 nm. Se definió una unidad de enzima (1U) como la cantidad de enzima que produce un cambio de absorbancia ( $\Delta\text{D.O}$ ) de  $10^{-4}$  en un minuto.



**Figura 8.-** Espectrofotómetro. (Laboratorio BIOMI)

### **3.9-. Temperatura optima**

La determinación de la temperatura que le permita a la enzima manifestar la máxima actividad, se realizó midiendo la actividad a diferentes temperaturas 25°C, 35°C, 45°C y 50°C.

### **3.10-. pH optimo**

Se midió la actividad a diferente valores utilizando una solución Buffer de Fosfato de Sodio 0,05M para pH 5,1 y 6, Buffer TRIS- HCl 0,05M para pH 7,1, 8,1 y 8,8. Se determinó la actividad caseinolítica máxima.

### **3.11-. Estabilidad térmica**

Se siguió el método de Martin y col., modificado. Se incubo del extracto enzimático 50µL durante 5 min a las siguientes temperaturas: 25°C, 35°C, 45°C, 50°C y 55°C. Posteriormente se incubo a 8°C durante 30 min, seguidamente se realizó la determinación de la actividad caseinolítica residual.

## **4-. RESULTADOS Y DISCUCIONES**

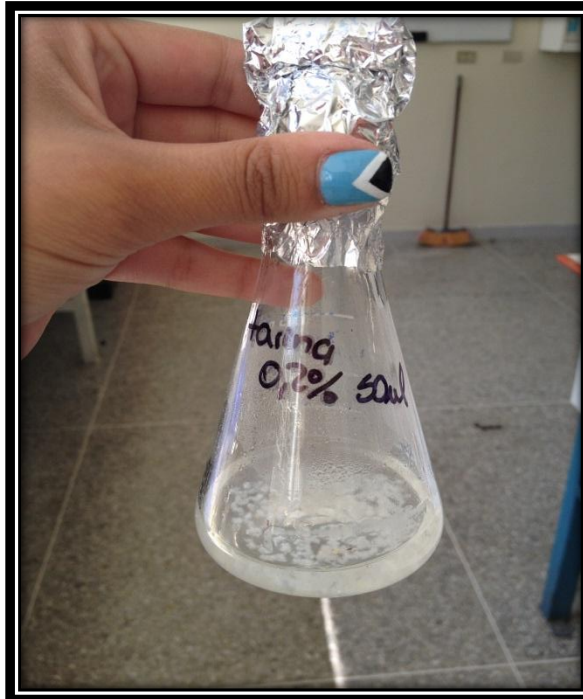
### **4.1.- Crecimiento de *R.pusillus* en PDA**

Crecimiento de *R. pusillus* en Agar papa dextrosa. Transcurridos los 7 días de incubación se pudo observar el crecimiento y esporulación del hongo y de esta manera se confirmó su viabilidad para continuar con los estudios de actividad enzimática.

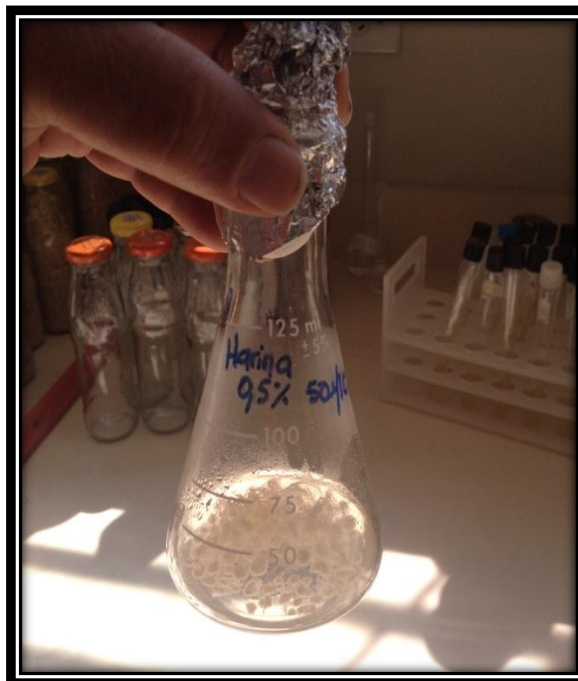
### **4.2.- Crecimiento de *R. pusillus* en medios de cultivos no convencionales**

Se obtuvo una suspensión de esporas de  $2 \times 10^9$  esporas/ml.

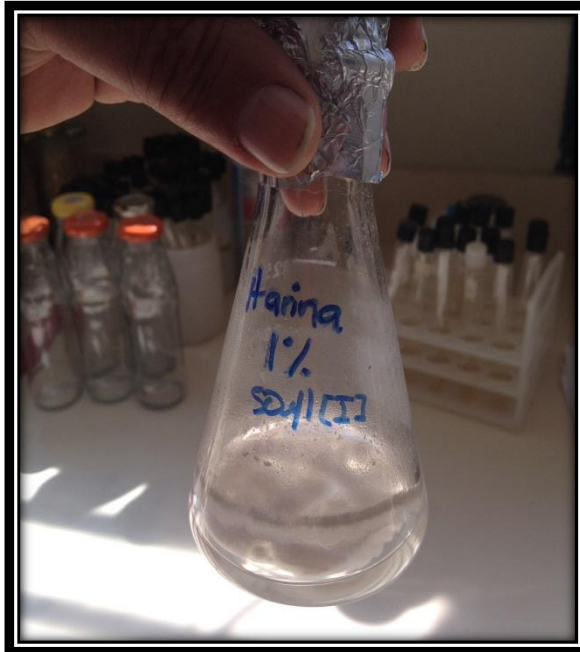
En la determinación de la concentración de harina en el medio de cultivo y cantidad de esporas en el inóculo que favorecen la producción de proteasas se obtuvieron los siguientes resultados.



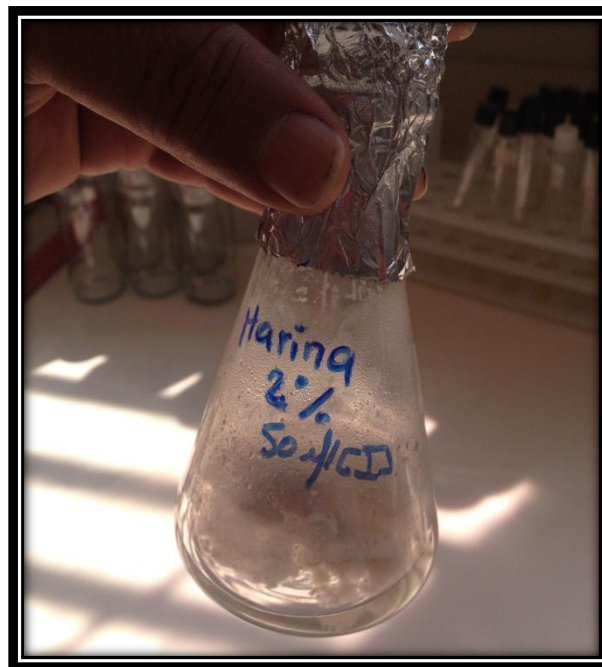
**Figura 9-.** Cultivo de esporas de  $1 \times 10^8$  en medio de harina al 0,2%



**Figura 10-.** Cultivo de esporas de  $1 \times 10^8$  en medio de harina al 0,5%



**Figura 11-.** Cultivo de esporas de  $1 \times 10^8$  en medio de harina al 1%



**Figura 12-.** Inoculo de esporas de  $1 \times 10^8$  en medio de harina al 2%

Se observa que la morfología del hongo (micelio). Varía con la concentración de harina en el medio. Concentraciones bajas como 0,2 y 0,5% muestran una estructura en forma de granos algodonosos de micelio, mientras a 1 y 2% de harina son estructuras filamentosas.

A partir de muestras tomadas de las fiolas de crecimiento a diferentes concentración tanto de inóculo como de harina, se midió la actividad enzimática mediante la coagulación de la leche en donde los menores tiempos demostraban tener mayor actividad.



**Figura 13.-** Coagulación de la leche (Laboratorio BIOMI)

#### 4.3.\_ Determinación de la actividad enzimática

##### Ensayo de Muestra tomada a las 24h

| Inoculo<br>Harina | 2x 10 <sup>7</sup><br>esporas | 1x10 <sup>8</sup><br>esporas | 2x10 <sup>8</sup><br>esporas | 4x10 <sup>8</sup><br>esporas |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0,5%              | > 1h                          | > 1h                         | > 1h                         | > 1h                         |
| 1%                | > 1h                          | > 1h                         | > 1h                         | > 1h                         |
| 2%                | > 1h                          | > 1h                         | > 1h                         | > 1h                         |

##### Ensayo de Muestra tomada a las 48h

| Inoculo<br>Harina | 2x 10 <sup>7</sup><br>esporas | 1x10 <sup>8</sup><br>esporas | 2x10 <sup>8</sup><br>esporas | 4x10 <sup>8</sup><br>esporas |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0,5%              | 20min                         | 33min                        | 31min                        | 33min                        |
| 1%                | 34min                         | > 1h                         | 53min                        | 25min                        |
| 2%                | > 1h                          | > 1h                         | > 1h                         | > 1h                         |

##### Ensayo de Muestra tomada a las 72h

| Inoculo<br>Harina | 2x 10 <sup>7</sup><br>esporas | 1x10 <sup>8</sup><br>esporas | 2x10 <sup>8</sup><br>esporas | 4x10 <sup>8</sup><br>esporas |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0,5%              | 12min                         | 16min                        | 8min                         | 13min                        |
| 1%                | 12min                         | 14min                        | 13min                        | 11min                        |
| 2%                | 16min                         | > 1h                         | 45min                        | 39min                        |

En los ensayos a las 24 horas no se observó coagulación de la leche sino hasta después de la hora de incubación; a las 48 horas, las concentraciones de 0,5% y 1% mostraron actividad coagulante en menos de una hora de incubación, dando mejores resultados el ensayo de 0,5% y descartando el ensayo de 2%, por no mostrar actividad al cabo de una hora; por último a las 72 horas, hubo un notable incremento de la actividad enzimática, que dio como resultado tiempos mucho menores a los ensayos anteriores.

#### **4.4.\_ Determinación del efecto del tamaño de inóculo en Medio de harina al 0,5%**

Por esta razón elegimos los mejores tiempos, que se estuvieron en la coagulación de la leche por el extracto enzimático de 0,5% de harina y en inóculos menores a  $1 \times 10^8$  esp./ml, a partir de estos resultados se realizó otro ensayo con los siguientes parámetros:

#### **4.5.\_ Determinación de la actividad enzimática**

##### **Ensayo de Muestra tomada a las 24h**

| Inoculo \ Harina | $2 \times 10^7$ esporas | $5 \times 10^7$ esporas | $1 \times 10^8$ esporas |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0,1%             | > 1h                    | > 1h                    | > 1h                    |
| 0,2%             | > 1h                    | 56min                   | > 1h                    |
| 0,3%             | 46min                   | 29min                   | 47min                   |
| 0,4%             | 26min                   | 27min                   | 25min                   |
| 0,5%             | 19min                   | 19min                   | 19min                   |

### Ensayo de Muestra tomada a las 48h

| Inoculo<br>Harina | $2 \times 10^7$ esporas | $5 \times 10^7$ esporas | $1 \times 10^8$ esporas |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0,1%              | 54min                   | > 1h                    | > 1h                    |
| 0,2%              | 40min                   | 30min                   | 46min                   |
| 0,3%              | 22min                   | 16min                   | 22min                   |
| 0,4%              | 14min                   | 15min                   | 17min                   |
| 0,5%              | 12min                   | 13min                   | 13min                   |

### Ensayo de Muestras tomada a las 72h

| Inoculo<br>Harina | $2 \times 10^7$ esporas | $5 \times 10^7$ esporas | $1 \times 10^8$ esporas |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0,1%              | 34min                   | 41min                   | 50min                   |
| 0,2%              | 28min                   | 26min                   | 30min                   |
| 0,3%              | 17min                   | 14min                   | 18min                   |
| 0,4%              | 11min                   | 14min                   | 14min                   |
| 0,5%              | 12min                   | 17min                   | 13min                   |

A las 24 horas, las concentraciones de 0,1% 0,2% 0,3% de harina, presentaron el mayor tiempo en coagular, en las concentraciones de 0,4% y 0,5% de harina se notó un tiempo menor en coagular al igual que la concentración de inóculo, a las 48 horas, se observó una disminución en los tiempos de coagulación tanto para la concentración de harina como de inóculo y a las 72 horas se mostraron tiempos menores pero no con mayor diferencia con respecto a la muestra de 48 horas.

Bajo estos resultados se confirma que la concentración de harina óptima es de 0,5%, se escogió la muestra de las 48h y para seleccionar la concentración de inóculo se realizó otro ensayo usando los siguientes parámetros:

**Este ensayo se hizo por duplicado**

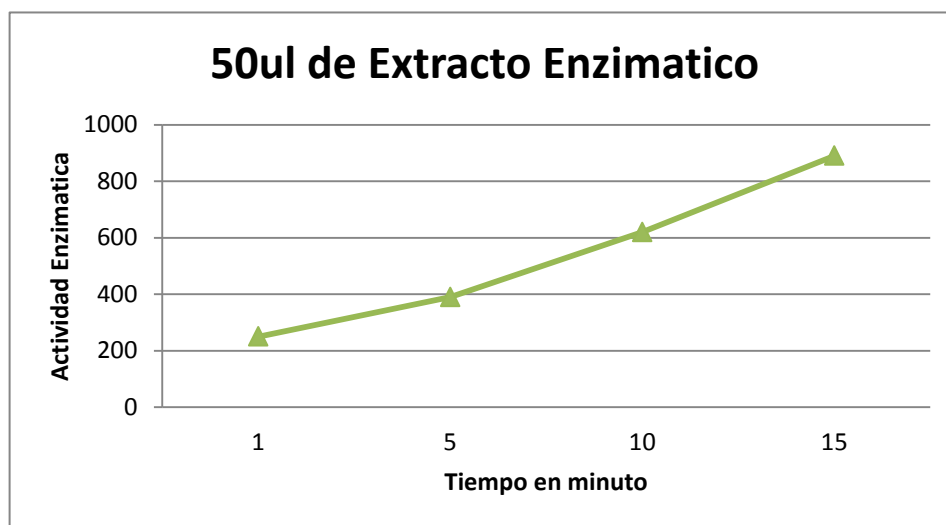
| Inoculo<br>Harina | 6 x 10 <sup>7</sup> esporas (1) | 6 x 10 <sup>7</sup> esporas(2) |
|-------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                   | 0,5%                            | 10min                          |

Gracias a este ensayo se escogió como concentración de inóculo óptima 6 x 10<sup>7</sup> esporas (30µl). Estos parámetros de cultivo se usaron para obtener extracto enzimático utilizado para medir actividad enzimática mediante el método de KEMBHAVI variando el volumen de extracto enzimático agregado en la mezcla de reacción y tiempo de incubación de la misma, arrojando los siguientes resultados.

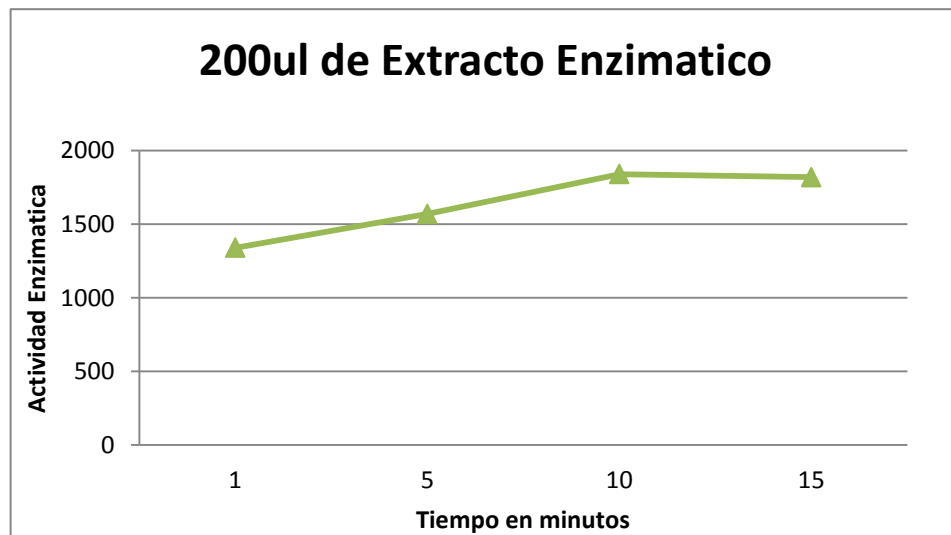
#### 4.6.\_ Efecto de la concentración de extracto enzimático sobre la actividad

| Extracto Enzimático | Tiempo de incubación | Absorbancia | Actividad Enzimática |
|---------------------|----------------------|-------------|----------------------|
| 50µL                | 1min                 | 0,025       | 250UE                |
| 50µL                | 5min                 | 0,039       | 390UE                |
| 50µL                | 10min                | 0,062       | 620UE                |
| 50µL                | 15min                | 0,089       | 890UE                |
| 200µL               | 1min                 | 0,134       | 1340UE               |
| 200µL               | 5min                 | 0,157       | 1570UE               |
| 200µl               | 10min                | 0,184       | 1840UE               |
| 200µL               | 15min                | 0,182       | 1820UE               |

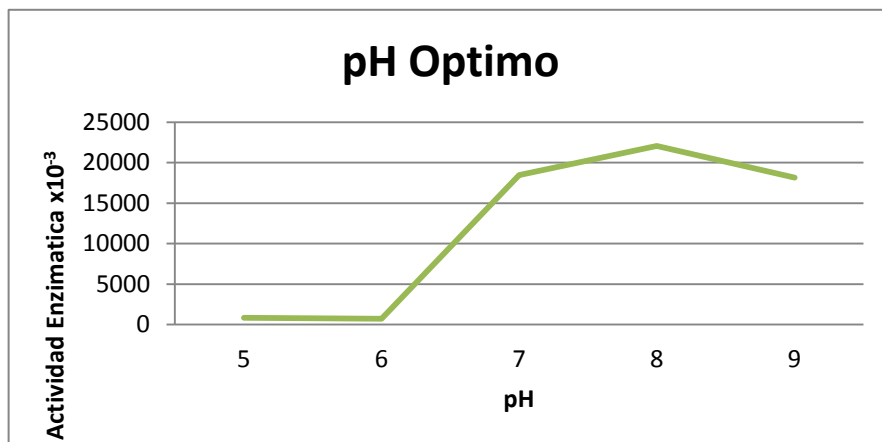
#### 4.7.- Actividad Enzimática en relación al tiempo y $1 \times 10^8$ de extracto enzimático



#### 4.8.\_ Actividad Enzimática en relación al tiempo y $4 \times 10^8$ de extracto enzimático



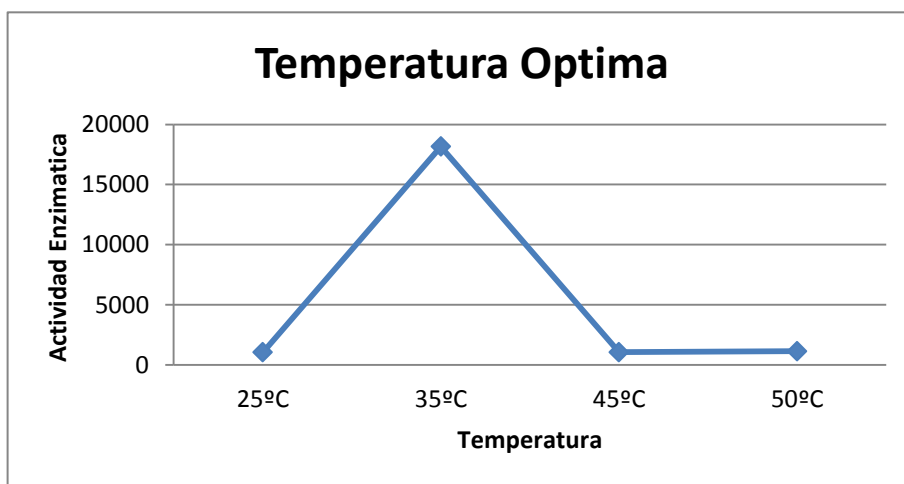
#### 4.9-. Efecto del pH sobre la actividad enzimática



En esta grafica se observa un pico máximo que corresponde a pH 8 donde se presentó la mayor actividad caseinolitica, con una actividad enzimática de

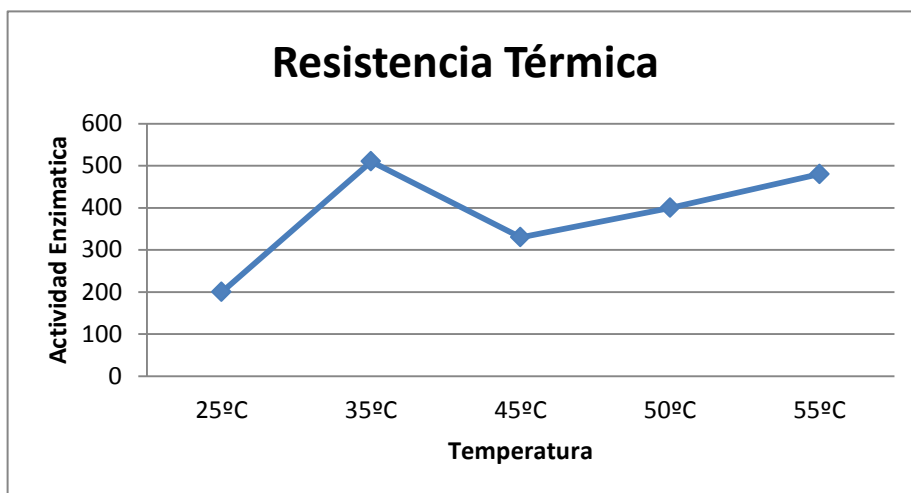
22080 UE. La literatura refiere que el rango óptimo de pH para proteasas alcalinas se encuentra normalmente entre pH 8 a 11. El amplio rango de pH donde se observa la mayor actividad, indica la presencia de diferentes proteasas (ácidas, neutras y alcalinas)

#### 4.10-. Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática.



Se encontró que la mayor actividad enzimática fue alcanzada a 35°C con una actividad caseinolítica de 18.160 UE. Lo que indica que las diferentes proteasas presentes en el sobrenadante actúan a una temperatura optima similar.

#### 4.11.- Resistencia Térmica de la enzima de *R. pusillus*



Se observó que la proteasa estudiada mantiene una máxima actividad cuando es pretratada 5min a 35°C, reteniendo el 100% de su actividad que corresponde a 510 UE. Presentando una disminución notable de la actividad caseinolítica en 45°C, más sin embargo el porcentaje de estabilidad de la enzima disminuyó solo un 3% a 55°C. Lo que puede ser debido a la presencia de diferentes tipos de proteasas.

## 5-. CONCLUSIONES

Se confirmó que en medios no convencionales, de bajo costo, la cepa de *R. pusillus* excreta al medio de cultivo enzimas con actividad proteolítica.

Se determinó la mayor actividad proteolítica de este hongo, por medio del ensayo de la coagulación de la leche. Arrojando resultados en relación a la concentración de harina, cantidad de inóculo de esporas y tiempo de incubación óptimos para una mayor producción de enzimas proteolíticas.

La actividad proteolítica se determinó por el método KEMBHAVI, utilizando la muestra con los parámetros óptimos determinados; escogiendo según este método la cantidad de extracto enzimático 50µl, tiempo de incubación de la muestra con el sustrato 10min y una mayor absorbancia expresada en actividad enzimática 620UE.

El pH de la muestra, exhibe una elevada actividad en un rango de pH amplio que va entre 5 y 9 con un valor óptimo aparente de 8. *Rhizomucor pusillus* tiene la capacidad de producir una variedad de proteasas ácidas y alcalinas, siendo de mayor importancia las proteasas alcalinas que son enzimas capaces de hidrolizar proteínas en medios cuyos pH se encuentran mayores a 7, por lo que son ideales para su utilización en detergentes. Las proteínas ácidas son de gran importancia, donde se incluye la proteasa aspártica descrita en este hongo, como un ingrediente indispensable en la industria quesera.

La temperatura óptima de incubación de la muestra con el sustrato, obtuvo una mayor producción enzimática a los 35°C.

La estabilidad térmica fue buena, reteniendo el 100% de su actividad luego de haber sido incubada 5min a 35°C. La enzima puede ser inactivada casi por completo al someterse a calentamiento a 45°C durante 5min.

La variación de la estructura del micelio dependiente de la concentración de harina es un factor importante al utilizar una mayor escala de crecimiento.

## 6-. BIBLIOGRAFÍA

**Antão C. & X. Malcata. (2005).** Plant Serine Proteases: Biochemical, Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 637-650.

**BaduiDergal, S. (2000).** Química de los alimentos. Editorial Pearson Educación.D.F. México. Pp. 589 - 593.

**Devaraj K., L Gowda y Prakash.(2007).** An usual Thermostable Aspartic Protease from the latex of *Ficus racemosa*. *Phytochemistry*, 69: 647-655

**Dubey V., M. jagannandham.(2003).** Procerain, a Stable Cystein Protease from the latex of *Calotropis Procera*. *Phytochemistry*, 62: 1057-1071

**Dubey V., M. Pande, B. Singh & M. jagannandham.(2007).** Papain-Like Protease: Applications of their Inhibitors. *African Journal of Biotechnology*, 6: 1077-1086

**Ellis, DH.(1997).** Zygomycetes. Capitulo 16 en Topley y Microbiología de Wilson y las Infecciones Microbianas. 9ª edición. Edward Arnold. Londres. pp.247-277

**Fundacion CIEPE.(2007).**Análisis del Mercado Venezolano de Enzimas destinadas a la Industria Alimentaria. Pag.16-29

**Gençkal, H. (2004).** Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. Department: Biotechnology and Bioengineering Izmir Intitute of Technology Izmir, turkey

**Mendoza, M. (2011).** Aislamiento de una cepa de *Bacillus subtilis* y Caracterización de su actividad Proteolítica. Tesis Doctoral. Mérida.

**Neurath, H. (1989).**The Diversity of Proteolytic Enzymes. In: R. Beynon& J. Bond(Eds). Proteolytic Enzymes: A Practical Approach. IRL press: Oxford. pp.1-13

**North, M. (1982).**Comparative Biochemistry of The Proteinases of eukaryotic microorganisms.Microbiol.Rev.46:308-340.

**Patnaik Pratap, R. (2002).** Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. Enzyme and Microbial Technology. 31: 198-200.

**Sharmin F, and Rahman M. (2007).**“Isolation and Characterization of Protease Producing Bacillus Strain FS-1”.Agricultural EngineeringInternational The CIGR E-journal.Vol.IX

**Tuttle, W; Schottelius, By Ron.** Fisiología. Decimosexta Edición. México: Interamericana; 1971.p.372-379

**Voet, D.** Bioquímica. 3era Edición. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2006.p.483-484

**Whitaker, J. (1994).**Principles of enzymology for the food sciences.Marcel Pecker. New York. N.Y. Pp. 3-5.

**Yadav, S, M. Pande y J. Medicherla. (2006).**Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant euphorbia milii, phytochemistry, 67: 1414-1426

