

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEASAS EN DOS CEPAS DE *MUCOR SP.* POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA EMPLEANDO DOS TIPOS DE MEDIO DE CULTIVO

Federico Solera Jiménez¹
Adriana Rodríguez Villalobos²
Bibiana Soto Vargas³

RESUMEN

Los hongos se caracterizan por su capacidad de producción y secreción de enzimas al medio externo. Las especies del género *Mucor* son microorganismos importantes en la producción de proteasas. En este trabajo se investigó la producción de estas enzimas con dos cepas (A y B) de *Mucor sp* utilizando dos medios: Sabouraud-dextrosa y Sabouraud-miel. Se realizaron fermentaciones durante 120 h a temperatura ambiente en un agitador orbital a 110 rpm. Las pruebas cuantitativa y cualitativa indicaron la presencia de actividad proteásica en el medio Sabouraud-miel inoculado con la cepa B.

Palabras clave: *Mucor sp*, proteasas, fermentación sumergida, Sabouraud-miel, Sabouraud-dextrosa.

ABSTRACT

Fungi are characterized by their production and secretion capacity of enzymes to the external environment. The species of the genus *Mucor* are important microorganisms in proteases production. Here we evaluated the production of these enzymes in two *Mucor sp* strains (A and B), using two media: Sabouraud-dextrose and Sabouraud-honey. Fermentations were performed at room temperature during 120 h, on orbital shaker at 110 rpm. Quantitative and qualitative tests indicated protease activity in the Sabouraud-honey inoculated with strain B.

Key words: *Mucor sp*, proteases, submerged fermentation, Sabouraud-honey, Sabouraud-dextrose.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos producen una gran variedad de enzimas, la mayoría de las cuales son generadas en bajas cantidades y están involucradas en procesos metabólicos celulares. Las enzimas extracelulares tienen usualmente la función de digerir compuestos insolubles o moléculas poliméricas de gran tamaño (y por lo tanto de difícil internalización y digestión dentro de la célula) tales como: celulosa, proteínas, entre otros. Las proteínas enzimáticas son secretadas por los microorganismos, los cuales utilizan los productos de la degradación como alimentos para su crecimiento (Sousa et al. 2002).

Muchas enzimas importantes de producción industrial, como las proteasas, son obtenidas utilizando fermentación. De manera general, este proceso se puede definir como una operación unitaria que consiste en la transformación biológica de materias primas a productos a través de microorganismos. En la mayoría de los casos, la fermentación involucra solo a un microorganismo, pero existen casos en los que la transformación se lleva a cabo por dos o más especies. La fermentación sumergida es uno de los procesos utilizados en la obtención de proteasas. Esta emplea grandes cantidades de agua y requiere, para su eficacia, una adecuada regulación de la

1 Universidad Nacional, Escuela de Biología, Laboratorio de Biotecnología. Heredia, Costa Rica.

2 Universidad Nacional, Escuela de Biología, Laboratorio de Biotecnología. Heredia, Costa Rica.

3 Universidad Nacional, Escuela de Química, Laboratorio de Investigación y Tecnología de Polímeros. Heredia, Costa Rica.

temperatura, el pH y la concentración de los nutrientes (Flores, 2006).

Las especies del género *Mucor* (Reino Fungi, Familia Mucoraceae, Orden Mucorales) integran un grupo de microorganismos importantes por su potencial biotecnológico. En el ámbito comercial, las proteasas forman parte de uno de los tres grupos de enzimas más utilizados en la industria. Estas contabilizan cerca del 60% de las ventas a nivel mundial, porque tienen una variedad de usos, principalmente en la fabricación de detergentes, productos farmacéuticos y en la industria alimenticia (Alves et al. 2005). Las proteasas de la mayoría de especies de *Mucor* han sido principalmente utilizadas en la industria del queso para la coagulación de la leche y como sustitutos de las quimosinas de ternero (Sousa et al. 2002).

En nuestro país son escasas o ausentes las compañías productoras de enzimas u otros metabolitos fúngicos, bacterianos y de plantas, a excepción de unas pocas productoras de bebidas alcohólicas y de alcohol puro. Por esta razón, es importante trabajar en proyectos de este tipo para implementarlos en procesos industriales, y así generar bienes y servicios a la sociedad, lo cual es el objetivo primordial de la biotecnología.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de proteasas por fermentación sumergida, empleando dos cepas de *Mucor sp.* en dos medios de cultivo diferentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron dos cepas de *Mucor sp.*, las cuales se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional. Primeramente, las cepas A y B fueron subcultivadas en cinco tubos de ensayo con agar papa dextrosa inclinado para la obtención de esporas y para su posterior inoculación en los medios de fermentación Sabouraud-miel y Sabouraud-dextrosa.

PRIMER ENSAYO

Se realizaron tres repeticiones con cada cepa para ambos medios. Se prepararon los

medios de cultivo. A) Medio Sabouraud-miel: 20 g/L de peptona, 80 g/L de miel de abeja y 1 L de agua destilada; B) Medio Sabouraud-dextrosa: 10 g/L caseína, 40 g/L dextrosa y 1 L agua destilada.

Los componentes de cada medio fueron colocados en un erlenmeyer. Para el medio Sabouraud-dextrosa se llevó el pH a 6.5 y para el medio Sabouraud-miel a 5.6 con ácido sulfúrico. Posteriormente, se colocaron 100 ml de cada medio en 6 erlenmeyers de 250 ml. Por último, los medios se esterilizaron durante 20 minutos a 121°C. A partir de las cepas A y B de *Mucor sp.*, se tomó una asada con la cual se inocularon los medios de fermentación. Luego, los erlenmeyer se mantuvieron en agitación constante (110 rpm) durante 120 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los medios fueron filtrados utilizando un kitasato con papel filtro para remover el micelio.

SEGUNDO ENSAYO

Debido a los resultados obtenidos, se desarrolló un segundo ensayo, en el cual los componentes de cada medio se agregaron en una proporción de 3:1 (70 g de la fuente de proteína y 30 g de la de carbohidratos) y se llevaron a pH 5. Este ensayo se realizó por triplicado, al igual que el primero.

TERCER ENSAYO

El tercer ensayo se realizó con el medio Sabouraud-miel y las dos cepas de *Mucor sp.*, donde seis erlenmeyer con el medio fueron inoculados con la cepa A y los otros seis con la cepa B, porque en el segundo ensayo el medio Sabouraud-dextrosa no manifestó presencia de proteasas, según las pruebas de análisis de la actividad enzimática realizadas.

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Análisis cualitativo

Se utilizaron tiras de radiografía, las cuales están constituidas por poliacetato de vinilo y gelatina. Las tiras fueron sumergidas en 5 ml de la solución enzimática cruda proveniente de cada erlenmeyer. Después de cierto tiempo,

se retiraron del medio líquido y se colocaron en el flujo de agua del tubo, de manera que, si hay proteasas presentes, el poliacetato de vinilo se desprende de la placa.

Análisis cuantitativo

Este análisis se aplicó a las muestras de los medios que resultaron positivos en la prueba cualitativa. Se preparó el blanco (0% de péptidos o aminoácidos libres, porque se detuvo la reacción inmediatamente), el cual estaba compuesto por 0,5 ml de caseína al 1%, 0,5 ml de buffer regulador de fosfatos (pH 6, 0,05 M) y 0,5 ml de la solución enzimática cruda, inmediatamente la reacción se detuvo con ácido tricloroacético (ATA) al 5%, luego se centrifugó, se filtró y se midió la absorbancia del sobrenadante. Después, se realizó el mismo procedimiento para cada muestra pero el ATA se agregó a diferentes tiempos: 10, 20, 30 y 40 min (Pazos y Mata. sf).

RESULTADOS

Primer ensayo

Según la prueba cualitativa no hubo presencia de proteasas en este ensayo, por lo que no se realizó la prueba cuantitativa respectiva (Figura 1.).

Sabouraud-Miel

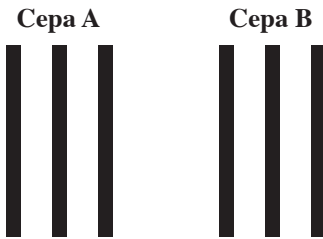


Figura 1. Prueba cualitativa con tiras de radiografía para el medio Sabouraud-Miel con la cepa A y B.

Sabouraud-Dextrosa

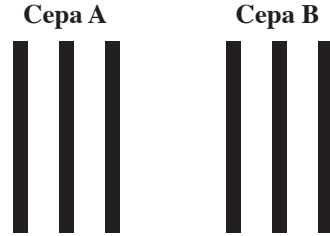


Figura 2. Prueba cualitativa con tiras de radiografía para el medio Sabouraud-Dextrosa con la cepa A y B.

Segundo ensayo

La prueba cualitativa determinó la presencia de proteasas en tres tiras que provenían del medio Sabouraud-miel con la cepa B (Figura 3).

Sabouraud-Dextrosa

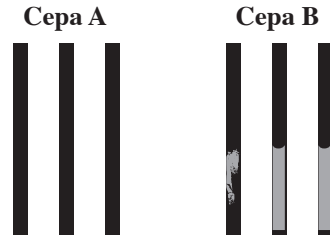


Figura 3. Prueba cualitativa con tiras de radiografía para el medio Sabouraud-Miel con presencia de proteasas en la cepa B.

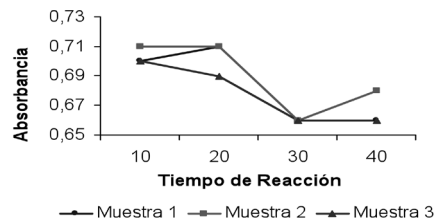


Figura 4: Absorbancia del medio Sabouraud-miel con la cepa A.

Con la cepa A en medio Sabouraud-miel, no se detectaron proteasas (Figura 4.). La ab-

sorbancia correspondiente al blanco fue de 0,68 nm y el comportamiento de la absorbancia de las muestras oscila en un rango pequeño alrededor de este indicando que no hay un patrón de actividad enzimática detectable.

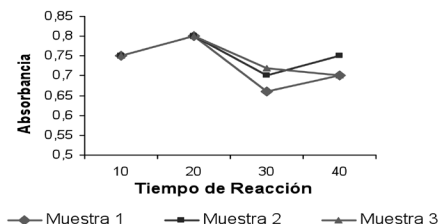


Figura 5. Absorbancia del medio Sabouraud-miel con la cepa B.

Por su parte, la cepa B con el medio Sabouraud-miel sí produjo enzima. En la figura 5 se observa que en los minutos 10 y 20 hay un crecimiento de la actividad, que a partir del último comienza a decrecer. El blanco correspondiente a esta cepa fue de 0,52 nm; al medir la absorbancia de las 3 muestras a los 10 minutos, esta es mucho mayor que el blanco, lo que indica que hay actividad hidrolítica de la enzima y los péptidos resultantes de la hidrólisis de la caseína aumentan la absorción de luz. Aunque se observe una disminución en los minutos 30 y 40, se registra una actividad enzimática creciente tomando como punto de partida el blanco.

Tercer ensayo

En la repetición con el medio sabouraud-miel resultaron positivas cinco tiras con la cepa B, mientras que la cepa A no mostró presencia de proteasas para la prueba cualitativa (Figura 6).

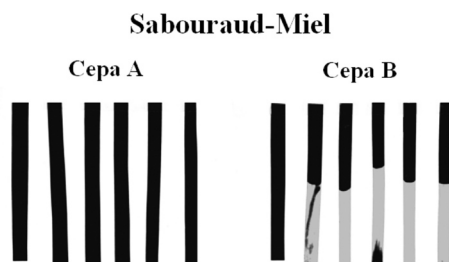


Figura 6. Prueba cualitativa con tiras de radiografía para el medio Sabouraud-Miel, donde la cepa B presenta producción de proteasas.

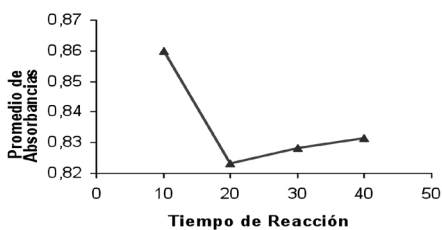


Figura 7. Promedio de absorbancia del medio Sabouraud-miel con la cepa A.

Aunque la cepa A presentó crecimiento, no produjo proteasas, según la prueba cualitativa realizada. El blanco presentó un valor de 0,84 nm y según el patrón observado en la figura 7, las absorbancias de las muestras en los 4 tiempos (10, 20, 30 y 40) oscilan alrededor de este valor. Este mismo patrón se observó en el segundo ensayo, también en la cepa A, que tampoco registró una actividad enzimática apreciable.

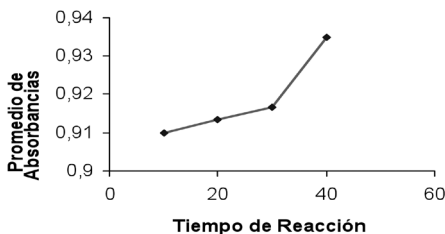


Figura 8. Promedio de absorbancia del medio Sabouraud-miel con la cepa B.

Con la cepa B, en cambio, se registra una clara actividad enzimática creciente en el tiempo (Figura 7); el valor de absorbancia para el blanco fue de 0,75 nm y se puede observar que cada promedio de absorbancia es mayor a este valor, lo que indica una considerable cantidad de péptidos libres como consecuencia de la hidrólisis de la caseína.

DISCUSIÓN

Las cepas A y B del hongo *Mucor sp* crecieron en los dos medios de cultivo utilizados para los tres ensayos. Sin embargo, en la primera prueba que se llevó a cabo, la masa micelial fue mayor. Al inicio, se pensó que la producción de proteasas en este ensayo sería mayor. No obstante, después de realizar la prueba cualitativa se determinó que no habían resultados positivos para tales enzimas (Figura 1 y 2).

Ambos medios poseían altas concentraciones de carbohidratos, lo cual reprime la producción de proteasas. Caso contrario sucede con las elevadas concentraciones de proteínas en relación con los carbohidratos, porque además de brindar al hongo un medio rico en nitrógeno. De esta forma se induce la producción y secreción de proteasas ácidas por parte del hongo para degradar y metabolizar más fácilmente la fuente extracelular de proteína (Sumantha et al., 2006).

Otro factor que pudo haber inhibido la producción de proteasas fue el pH, porque el óptimo para la producción de proteasas ácidas como las de *Mucor* se encuentra en el ámbito de 4 - 4.5 (Rao et al., 1998) y el utilizado en el primer ensayo fue mayor a este rango.

Por esta razón, en el segundo ensayo al modificar la proporción carbohidrato-proteína (agregando mayor cantidad de proteína), se obligó al hongo a producir enzimas proteolíticas, que utiliza para metabolizar la fuente de nitrógeno y así obtener energía.

Esto, en conjunto con el cambio de pH, permitió que el hongo produjera proteasas en el medio Sabouraud-miel con la cepa B (Figura 3). Es posible que el medio Sabouraud-

dextrosa no sea el apto para la producción de proteasas, probablemente porque la naturaleza de su composición no permitió que el hongo metabolizara adecuadamente la fuente de nitrógeno. Por lo que pudo haber requerido de aditivos como vitaminas (biotina), promotores de crecimiento (1-naftil ácido acético), etc, para aumentar la producción de proteasas (Sumantha et al., 2006).

Aunque la cepa A no demostró actividad enzimática, no implica que no sea capaz de producir la enzima de interés. Al no saber, específicamente, cuál especie del género *Mucor* es, no se pueden conocer sus requerimientos particulares, por ejemplo, pH o tipo de proteasa que produce. Por lo tanto, es muy difícil crear un medio de cultivo ideal para las dos cepas simultáneamente.

Alvez et al., 2005 reportó alta actividad enzimática en varias especies como *Mucor genevensis*, *M. variosporus*, *M. carbonaceus*, *M. racemosus f. chibinensis* y *M. hiemalis f. hiemalis* en pH ácido (3.9-6.2); *M. hiemalis f. luteus*, *M. circinelloides f. lusitanicus*, *M. circinelloides f. circinelloides*, *M. circinelloides f. janssenii* y *M. subtilissimus* en pH neutro. Esto demuestra que diferentes especies del género *Mucor* varían en sus requerimientos de pH. Para la cepa A, podría ser recomendable hacer pruebas con medios a diferente pH, con el objetivo de verificar cuál es el óptimo para la producción de enzimas.

En el análisis cuantitativo del segundo ensayo para la cepa B (Figura 5), la absorbancia disminuyó después de los minutos 30 y 40 aún cuando esta cepa resultó productora de enzima, pero sin alcanzar el valor del blanco. Sin embargo, las absorbancias de las 3 muestras mostraron resultados mayores que los obtenidos en el blanco (Figura 5), lo cual indica actividad enzimática.

El patrón de absorbancia registrado en la Cepa A (Figura 4 y 7), que no produjo enzima, oscila alrededor del blanco, en este caso definido como el 0% de péptidos o aminoácidos libres, al detener la reacción inmediatamente. Así, se considera que según dicho patrón, no hay actividad enzimática, porque los aminoácidos

libres absorben más luz que la proteína en su forma nativa.

La cepa B, en el tercer ensayo, registró una actividad enzimática apreciable, de acuerdo con lo que se observa en las figuras 6 y 8. Aquí se registra la actividad creciente de la enzima con respecto al tiempo, porque tiene mayor oportunidad de degradar el sustrato. Lo anterior indica una mayor presencia de péptidos y aminoácidos libres, que provocan un aumento en la absorbancia.

BIBLIOGRAFÍA

- Alves, M; Galba, M; Kaoru, O; Ferreira, I; Aduato, I. 2005. Detection of extracellular protease in *Mucor* species. Rev Iberoam Micol 22: 114-117.
- Flores, I. Utilización de los sistemas biológicos en la economía. [en línea]. <<http://www.ici.ubiobio.cl/Asignaturas/430003/apuntes/AP%20N5%20BIO%20ECO%20E%20INDUSTRIAL.doc>>. [Consulta: agosto, 2006]
- Pazos, L; Mata, J. Actividad de preparados enzimáticos para uso digestivo. (sf.) Departamento de Fisiología y Escuela de Química y Laboratorio de ensayos biológicos (LEBI), Universidad de Costa Rica. 68 pp.
- Sousa, V; Leonie, S; Kasutaka, F; Makoto, M; Kazuko, N; Galba, M. 2002. Production of extracellular proteases by *mucor circinelloides* using d-glucose as carbon source / substrate. Brazilian Journal of Microbiology 33:106-110.
- Sumantha, A; Larroche, C; Pandey, A. 2006. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A perspective. Food Technol. Biotechnol. 44 (2) 211-200.
- Rao, M; Tanksale, A; Ghatge, M; Deshpande, V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. American Society for Microbiology. 62 (3) 597-635

COLABORACIÓN

- Ph.D Julio F. Mata Segreda. Catedrático Humboldt 2006. Universidad de Costa Rica. Escuela de Química.
- Ph.D Adolfo Quesada Chanto. Estudios de doctorado académico en Biotecnología en la TU Braunschweig, Alemania. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología.
- Bach. Bernal Garro Mora. Universidad Nacional. Polímeros.
- Lic. Silvia Mau Inchaustegui. Universidad Nacional. Escuela de Biología. Laboratorio de Microbiología.
- Proyecto realizado en 2006, en el Laboratorio de Biotecnología, Escuela de Biología, Universidad Nacional.